



Réponses physiologiques et biochimiques du trèfle (*Trifolium alexandrinum* L.) à la double association

Mycorhizes-Rhizobium sous une contrainte saline

Laaziza Ben Khaled, Asunéion Gómez, El Ouarraqi, Abdallah Oihabi

► To cite this version:

Laaziza Ben Khaled, Asunéion Gómez, El Ouarraqi, Abdallah Oihabi. Réponses physiologiques et biochimiques du trèfle (*Trifolium alexandrinum* L.) à la double association Mycorhizes-Rhizobium sous une contrainte saline. *Agronomie*, 2003, 23 (7), pp.571-580. <10.1051/agro:2003037>. <hal-00886215>

HAL Id: hal-00886215

<https://hal.science/hal-00886215v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Réponses physiologiques et biochimiques du trèfle (*Trifolium alexandrinum* L.) à la double association Mycorhizes-*Rhizobium* sous une contrainte saline

Laaziza BEN KHALED^{a*}, Asunción MORTE GÓMEZ^b, El Moustapha OUARRAQI^a, Abdallah OIHABI^a

^a Laboratoire de Physiologie Végétale, BP 2390, Faculté des Sciences-Semlalia, Marrakech, Maroc

^b Laboratoire de Mycologie, Département de Biologie Végétale, Campus Universitaire de Espinardo, Université de Murcie, 30100 Murcie, Espagne

(Reçu le 3 septembre 2002 ; accepté le 14 février 2003)

Abstract – Physiological and biochemical responses to salt stress of mycorrhized and/or nodulated clover seedlings (*Trifolium alexandrinum* L.). Salt stress (0, 4, 6 and 8 g NaCl·L⁻¹) effects on arbuscular mycorrhized and/or nodulated clover (*Trifolium alexandrinum* L.) seedlings grown in greenhouse conditions under 75% field capacity were evaluated. The autochthonous mycorrhizal (AM) seedlings showed the best salt tolerance and biomass production improvement (+65%) for all the tested concentrations. AM root colonization was the highest (71%) and did not seem to be affected by salt doses. The double symbiosis (mycorrhization and nodulation) was found to be less efficient than single inoculations and revealed some antagonism between the fungus and *Rhizobium*. Phosphate nutrition was improved, mainly in the cases of single mycorrhized plants; this nutritional effect seems to be the main mechanism involved in salt tolerance. The leaf protein content was also improved by both types of symbiosis. Proline accumulated especially in the doubly inoculated (AM and *Rhizobium*) plants; meanwhile, sugars accumulated in the cases of single inoculations. However, the intensity of the salt stress showed a positive correlation with sugar accumulation for the plants which were only mycorrhized.

mycorrhiza / *Rhizobium* / salt stress / growth / sugars / proline

Résumé – L'effet de la salinité (0, 4, 6 et 8 g NaCl·L⁻¹) sur des plantules de trèfle (*Trifolium alexandrinum* L.) mycorhizées ou/et nodulées, cultivées sous serre sous une capacité au champ 75 %, a été estimé. La mycorhization par un inoculum mycorhizogène autochtone (MA) a abouti à une meilleure amélioration de la tolérance à la salinité et de la production de biomasse (+65 %) pour toutes les doses de sel appliquées. Les intensités de mycorhization et les teneurs en arbuscules obtenues pour les MA sont élevées (71 % et 57 %) et semblent non affectées par la dose de sel. La double symbiose (mycorhization et nodulation) s'est montrée moins efficace pour l'amélioration de la production de biomasse. Elle a révélé un antagonisme entre les deux symbiotes. La nutrition phosphatée a été significativement améliorée chez les plantes mycorhizées par les MA seuls. Cet effet nutritionnel semble jouer un rôle principal dans les mécanismes de tolérance à la salinité. Le contenu foliaire en protéines a été également amélioré dans le cas des deux symbioses. La proline s'est accumulée dans les feuilles du trèfle surtout chez les plantes doublement inoculées par les MA et le *Rhizobium* alors que les sucres solubles se sont accumulés suite aux inoculations simples. Toutefois, l'intensité du stress salin n'a montré de corrélation positive avec les teneurs accumulées en sucres que dans le cas des plantes mycorhizées.

mycorrhizes / *Rhizobium* / salinité / croissance / sucres / proline

1. INTRODUCTION

Les associations symbiotiques sont bien connues pour améliorer la nutrition et la productivité des plantes notamment chez les légumineuses qui sont capables de développer simultanément des associations aussi bien avec les mycorhizes qu'avec le *Rhizobium* [2, 32]. La nodosité permet la réduction de l'azote atmosphérique alors que la symbiose mycorhizienne développe les mécanismes physiologiques et biochimiques

nécessaires pour la mobilisation du phosphore du sol [30, 60] et améliore l'état hydrique de la plante [48]. Les champignons mycorhiziens peuvent aussi améliorer le prélèvement de l'azote [57] et son assimilation [6]. Les phosphatases des hyphes mycéliens favorisent la libération du phosphore inorganique (Pi) immobile du sol et la minéralisation des sources organiques des phosphates [19, 32]. La disponibilité du phosphore dans le sol et surtout sa mobilisation par la plante ont un effet direct sur sa capacité à fixer l'azote atmosphérique [9].

Communiqué par Gérard Guyot (Avignon, France)

* Auteur pour correspondance : benkha_az@hotmail.com

Ces avantages revêtent une importance particulière sous des climats arides et semi arides où la salinité des sols réduit la possibilité d'ajout de fertilisants phosphatés et azotés. Toutefois, ces conditions peuvent réduire le taux de colonisation racinaire [50] et rendre critique la réussite de la mycorhization [21]. En effet, la salinité affecte la viabilité des hyphes mycorhiziens qui constituent les principales sources de la propagation des champignons [46] et des arbuscules qui représentent le site privilégié des échanges entre les deux partenaires de la symbiose [27, 28]. Cependant, certaines espèces de champignons mycorhiziens montrent une large gamme de tolérance à la salinité [49] qui dépendrait entre autres de leur habitat d'origine [15]. La salinité limite également et d'une manière sévère la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique. Elle affecte négativement : le processus de nodulation [8], l'activité respiratoire des bactéroïdes, le contenu en légghémoglobine [17, 18], ainsi que l'activité nitrogénase. Cet effet négatif a été corrélié avec une diminution des photosynthétats fournis pour les nodules [26] et une altération de la diffusion intranodulaire de l'oxygène par le sel [22, 56].

Certains travaux ont pu montrer que la tolérance des plantes à la salinité peut être améliorée par les symbiotes racinaires [21]. Dans le cas des légumineuses, la double inoculation avec les mycorhizes et le *Rhizobium* augmenterait leur tolérance à la salinité [55]. L'efficacité de ces symbioses reste toutefois liée, en plus des conditions pédoclimatiques, aux espèces symbiotiques mises en jeu. De plus, les mécanismes physiologiques et les interactions entre les différents symbiotes surtout dans le cas de l'association tripartite mycorhizes-légumineuses-*Rhizobium* ne sont pas encore suffisamment élucidés.

Dans le présent travail on s'est intéressé à l'effet du stress salin sur quelques paramètres physiologiques (croissance et taux de mycorhization) et biochimiques (teneurs en protéines, en proline libre et en sucres solubles) chez le trèfle infecté séparément ou simultanément par les deux symbiotes racinaires mycorhizes et *Rhizobium*.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Inoculum endomycorhizien

Le sorgho est utilisé comme plante hôte pour la production de l'inoculum fongique composé de mycorhizes autochtones (MA) isolés à partir du sol de la palmeraie «Aoufous» située au sud du Maroc et une souche de référence *Glomus mosseae* (GM) aimablement fournie par le laboratoire de Mycologie de la Faculté de Biologie de Murcie, Espagne. Les graines de sorgho ont été désinfectées dans une solution d'eau oxygénée à 30 % pendant 30 minutes puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile et mises à germer dans de la vermiculite préalablement stérilisée. Après 7 jours de germination, les jeunes plantules sont repiquées dans des pots en plastique contenant un mélange sable-sol Aoufous dans le cas des MA et un mélange sable-tourbe dans le cas du GM. Chaque pot reçoit 100 ml de la solution de Long Ashton [44] tous les 15 jours. Après 3 mois de culture, les racines sont récoltées, désinfectées dans un mélange chloramine T (2 %) et streptomycine $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ selon la technique de Mosse [39] puis rincées à l'eau distillée stérile, découpées et utilisées comme inoculum pour

les jeunes plantes de trèfle. L'inoculation avec les mycorhizes a été effectuée par des fragments de racines de sorgho endomycorhizées et désinfectées à raison de 1 g d'inoculum/plante. La colonisation endomycorhizienne de ces racines a été évaluée à environ 70 % selon la technique décrite par Trouvelot et al. [66].

2.2. Inoculum rhizobien

La souche de *Rhizobium* utilisée (*Rhizobium trifolii*) a été isolée à partir des nodosités des racines du trèfle puis purifiée et produite dans notre laboratoire. Cette souche de *Rhizobium* a été sélectionnée sur milieu YEM gélosé (Yeast Extract Mannitol), et multipliée par la suite dans des Erlenmeyers de 250 ml sur milieu YEM liquide [61]. Les cultures sont incubées à 28 °C pendant 5 jours sur un agitateur orbital à 200 $\text{tour} \cdot \text{min}^{-1}$. La densité des bactéries est estimée en utilisant en même temps un dénombrement direct par étalement sur des boîtes de Pétri contenant du milieu YEM gélosé et une mesure de la densité optique à 620 nm. Les plantules destinées à l'infection par le *Rhizobium* reçoivent de l'inoculum bactérien liquide ajouté au voisinage des racines à raison de $8 \times 10^{+8}$ bactéries $\cdot \text{ml}^{-1}$ par plante.

2.3. Matériel végétal et sol

Après désinfection des graines de *Trifolium alexandrinum* L. dans une solution de H_2O_2 (30 %) pendant 30 min et rinçage à l'eau distillée stérile, la germination a été effectuée dans une enceinte thermostatée (25 ± 1 °C) dans de la vermiculite préalablement stérilisée (200 °C, 4 h) et constamment humidifiée à l'eau distillée stérile. Le substrat utilisé pour la culture des plantes de trèfle contient du sable qui a été traité à l'acide chlorhydrique (1/5N) pendant 48 h dans le but d'éliminer les microorganismes et les déchets organiques, puis lavé 4 fois à l'eau de robinet et finalement avec de l'eau distillée stérile. Par la suite, le sable a été séché et mélangé avec de la tourbe dans des proportions 2/1 (v/v), et stérilisé à 200 °C pendant une nuit.

2.4. Dispositif expérimental

Les essais ont été conduits dans des pots en plastique (20 cm de profondeur et une capacité de 2 kg) munis d'un dispositif de drainage adéquat. Tous les pots sont maintenus à une capacité au champ de 75 % selon la méthode de Tobar et al. [64, 65].

Les jeunes plantules de trèfle âgées de 7 jours (stade feuilles cotylédonaire) sont repiquées dans des pots en plastique contenant un mélange de sable-tourbe stérile 2/1 (v/v). Six traitements différents ont été effectués :

- Plantes témoins (T) sans apport des mycorhizes ou du *Rhizobium*.
- Plantes mycorhizées avec les mycorhizes autochtones (MA).
- Plantes mycorhizées avec *Glomus mosseae* (GM).
- Plantes inoculées avec *Rhizobium trifolii* (RT).
- Plantes inoculées avec les mycorhizes autochtones + *R. trifolii* (MA+RT).

- Plantes inoculées avec *G. mosseae* + *R. trifolii* (GM+RT).

L'application du sel a été effectuée 24 h après l'inoculation selon la méthode décrite par Baker et al. [7]. Chaque traitement (4, 6 et 8 g·L⁻¹) reçoit 100 ml quotidienne d'une solution à 2 g·L⁻¹ de NaCl jusqu'à atteindre l'équivalent de 200 ml de la solution saline appropriée (4, 6 et 8 g·L⁻¹). Dans notre cas la capacité au champ a été maintenue à 75 % pendant toute la durée de l'expérience.

Les cultures ont été conduites sous serre dans des conditions d'éclairement naturel et à température ambiante (29/18 °C). Les seaux sont ramenés chaque 24 h à 75 % de la capacité au champ par pesées et additions d'eau distillée. Les solutions nutritives sont préparées en se référant au milieu de base de Long-Ashton modifiée [44]. Au cours du deuxième mois de la culture, chaque pot reçoit 30 ml de la solution nutritive chaque semaine. Après deux mois de culture, les plantules ont été récoltées et les différentes analyses effectuées.

2.5. Estimation des paramètres de croissance et du taux de mycorhization

Le poids sec, le nombre de nodules et le taux de mycorhization sont déterminés pour chaque plante. Quatre répétitions par traitement ont été effectuées. Le taux de mycorhization a été estimé selon la méthode de Trouvelot et al. [66], après un traitement des racines selon la technique de Phillips et Hayman [43].

2.6. Détermination du phosphore total

Le dosage du phosphore a été déterminé par colorimétrie après calcination de la partie aérienne des plantes. Le phosphore est déterminé par le réactif de «Barton» à base de molybdate d'ammonium et de metavanadate d'ammonium. La lecture de la DO est faite à 430 nm et la gamme étalon est préparée avec KH₂PO₄.

2.7. Détermination des protéines solubles dans les feuilles

Le dosage des protéines des feuilles a été effectué selon la méthode de Bradford [14]. La densité optique est mesurée à 595 nm. La gamme étalon est établie avec l'albumine bovine sérique (BSA, Sigma).

2.8. Détermination de la proline libre dans les feuilles

L'extraction et la purification de la proline ont été effectuées selon la méthode de Paquin et Lechasseur [42] sur des feuilles de trèfle mûres et fraîches. La densité optique est mesurée à 515 nm. La gamme étalon est établie à partir de la proline pure.

2.9. Détermination des sucres solubles

Les glucides foliaires ont été dosés par la méthode « phénol-acide sulfurique » de Kochert [34]. La DO est mesurée à 485 nm et la gamme étalon est établie par le glucose pure.

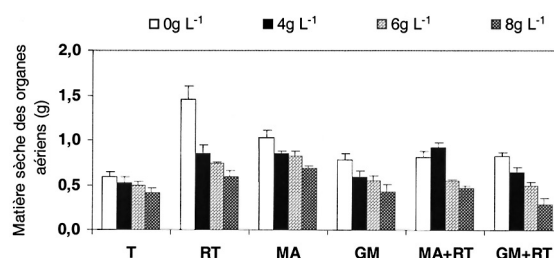


Figure 1. Effet de la concentration en sel et des symbiotes racinaires sur la production de la matière sèche des organes photosynthétiques du trèfle cultivé sous une capacité au champ de 75 %. T : plantes témoins, RT : plantes inoculées par le *Rhizobium trifolii*, MA : plantes inoculées par les mycorhizes autochtones, GM : plantes inoculées par le *Glomus mosseae*, MA+RT : plantes inoculées simultanément par le *Rhizobium* et les mycorhizes autochtones, GM+RT : plantes inoculées simultanément par le *Rhizobium* et le *Glomus mosseae*. Les valeurs représentent les moyennes de 4 mesures individuelles, les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 95 % (test de Newman et Keuls).

3. RÉSULTATS

3.1. Effet de la salinité sur la croissance des plantes infectées

La figure 1 montre les résultats de la production de biomasse en fonction de la concentration en sel dans le cas des différents traitements. Chez les plantes témoins non infectées, le stress salin provoque une réduction de la production de biomasse des parties aériennes de 12 à 30 % selon la dose de sel. Ces réductions sont statistiquement significatives à l'exception de celle enregistrée entre 4 et 6 g·L⁻¹ de sel. L'inoculation avec le *Rhizobium* améliore la production de biomasse d'environ 145 % chez les plantes non stressées. Cette production de biomasse chute sensiblement (42 à 58 %) dans le cas du stress salin mais reste comparativement supérieure et les différences statistiquement significatives, par rapport à celle enregistrée chez les plantes témoins non infectées. L'amélioration obtenue varie de 60 à 45 % en fonction de la dose du sel. Des résultats similaires ont été obtenus aussi dans le cas des plantes mycorhizées avec les MA, l'effet dépressif provoqué par le sel est estimé respectivement à 17, 19 et 34 % selon la concentration de sel. Uniquement, les différences avec les plantes non stressées ont été statistiquement significatives. Toutefois, la production de biomasse est restée supérieure à celle obtenue dans les cas analogues de stress chez les plantes témoins non infectées. L'amélioration enregistrée dans ces cas a été pratiquement identique (~ 65 %) pour toutes les concentrations en sel. La mycorhization avec le GM aboutit à des améliorations de production de biomasse inférieures à celles obtenues avec les MA. Chez les plantes non stressées mycorhisées avec le GM la production de biomasse a été améliorée d'environ 34 % en comparaison avec les plantes témoins. Sous stress salin les améliorations obtenues (13 à 2 % selon la dose du sel) restent statistiquement non significatives.

La combinaison de la mycorhization et de l'infection avec le *Rhizobium* aboutit chez les plantes non stressées à des améliorations de la production de biomasse comparables pour les

Tableau I. Influence des différentes concentrations en NaCl sur le nombre de nodules formées par plante dans le cas des plantes inoculées avec : le *Rhizobium* seul (R.T), les mycorhizes autochtones et le *Rhizobium* (M.A+R.T), le *Glomus mosseae* et le *Rhizobium* (G.M+R.T). Les valeurs représentent les moyennes de 3 mesures individuelles, les analyses statistiques sont calculées au seuil de 95 % (test de Newman et Keuls).

Traitements NaCl (g·L ⁻¹)	0	4	6	8
R.T	99 a	61 b	47 cd	46 d
M.A + R.T	83 a	53 c	36 e	29 f
G.M + R.T	49 c	44 d	42 d	28 f

deux types de mycorhizes (~ 40 %). Dans le cas du stress salin, les MA semblent permettre une meilleure production de biomasse surtout dans le cas de 4 g·L⁻¹ de NaCl où la biomasse sèche a été supérieure d'environ 75 % à celle obtenue en absence de sel. À 8 g·L⁻¹ de sel, la combinaison de la mycorhization avec le GM et le *Rhizobium* a abouti à une chute statistiquement significative de la biomasse en comparaison avec les plantes témoins non infectées. D'une manière générale, le double traitement (mycorhizes + *Rhizobium*) des plantes n'a pas pu améliorer davantage la production de biomasse comparativement aux traitements simples (mycorhizes ou *Rhizobium*). Ceci semble suggérer un antagonisme entre les deux symbiotes.

3.2. Effet de la salinité sur les taux d'infections

L'action de sel sur le nombre de nodules chez les plantes inoculées seulement avec le *Rhizobium* (Tab. I) se manifeste par une diminution croissante du nombre des nodules par plante au fur et à mesure que la salinité augmente dans le milieu. Cette réduction est de 38 % à 4 g·L⁻¹ de NaCl et atteint environ 52 % à 6 et 8 g·L⁻¹ de sel. Des résultats comparables ont été observés chez les plantes nodulées et mycorhizées par les MA. Par contre, le nombre de nodules n'a pratiquement pas été affecté par les doses 4 et 6 g·L⁻¹ de NaCl, dans le cas des plantes infectées par le GM et le *Rhizobium*. A 8 g·L⁻¹ de sel, le nombre de nodules a chuté de 43 % par rapport au témoin.

En absence de sel et sous une capacité au champ de 75 %, la colonisation mycorhizienne du trèfle exprimée par l'intensité de mycorhization et la teneur en arbuscules racinaires (Figs. 2, 3) montre des intensités de mycorhization et des teneurs en arbuscules respectivement de 86 % et 63 % pour le GM et 71 % et 57 % dans le cas des MA. Le stress salin a provoqué une diminution de l'intensité de la mycorhization par le GM qui a été réduite de 57 % en passant de 0 à 4 g·L⁻¹ et de 82 % à 8 g·L⁻¹ de NaCl. Cette diminution est restée pratiquement comparable à 4 et à 6 g·L⁻¹ de sel. Les teneurs en arbuscules montrent une évolution pratiquement similaire. L'intensité de mycorhization et la teneur en arbuscules radiculaires obtenues avec les MA sont restées élevées et n'ont pas été affectées par les doses appliquées de NaCl et semblent même augmenter légèrement.

L'association avec le *Rhizobium* provoque une diminution du taux de mycorhization et de la teneur en arbuscules pour les deux champignons symbiotiques. Chez les plantes témoins

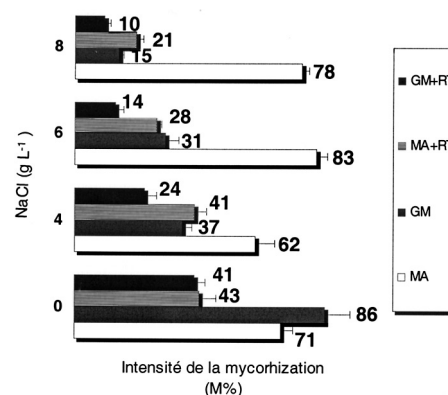


Figure 2. Effet de la contrainte saline sur l'intensité de mycorhization (M %) des racines du trèfle cultivé sous une capacité au champ de 75 % en présence des symbiotes racinaires (légende voir Fig. 1). Les valeurs représentent les moyennes de 3 mesures individuelles, les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 95 % (test de Newman et Keuls).

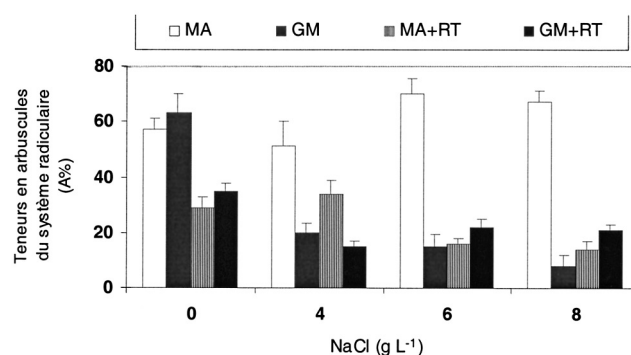


Figure 3. Effet de la contrainte saline sur la teneur en arbuscules des racines du trèfle cultivé sous une capacité au champ de 75 % en présence des symbiotes racinaires. Les valeurs représentent les moyennes de 3 mesures individuelles, les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 95 % (test de Newman et Keuls).

non stressées, l'intensité de mycorhization a été pratiquement identique pour les deux types de champignons et n'a pas dépassé les 43 %. Contrairement aux cas de l'infection avec les champignons mycorhiziens seuls, la salinité a provoqué la chute du taux de l'intensité de mycorhization aussi bien avec le GM que les MA lors de l'association avec le *Rhizobium*.

3.3. Effet des symbiotes racinaires sur la nutrition phosphatée

L'analyse des résultats des teneurs en phosphate dans les parties aériennes du trèfle (Tab. II) révèle que les endomycorhizes améliorent la nutrition phosphatée du trèfle cultivé sous une capacité au champ de 75 % en présence de NaCl. Chez les plantes témoins, les teneurs en phosphore dans les feuilles de trèfle diminuent suite à l'augmentation de la dose de sel dans le sol. À 8 g·L⁻¹ cette chute a atteint 50 % par rapport aux plantes non stressées. La mycorhization avec les MA permet

Tableau II. Influence des différents traitements sur les teneurs en phosphore ($\text{mg} \cdot \text{g MS}^{-1}$) dans les feuilles du trèfle cultivé sous une capacité au champ de 75 % en présence de différentes concentrations en sel. Les valeurs représentent les moyennes de 3 mesures individuelles, les analyses statistiques sont calculées au seuil de 95 % (test de Newman et Keuls).

Traitements NaCl ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0	4	6	8
T	2,5 e	2,1 ef	1,8 f	1,2 g
R.T	2,6 e	1,9 f	1,7 f	1,5 fg
M.A	5,3 b	6,4 a	5,1 b	4,6 c
G.M	3,5 d	2,8 ed	2,3 e	2,1 ef
M.A + R.T	2,9 ed	2,7 ed	1,4 g	0,8 h
G.M + R.T	2,3 e	2,5 e	1,8 f	1,2 g

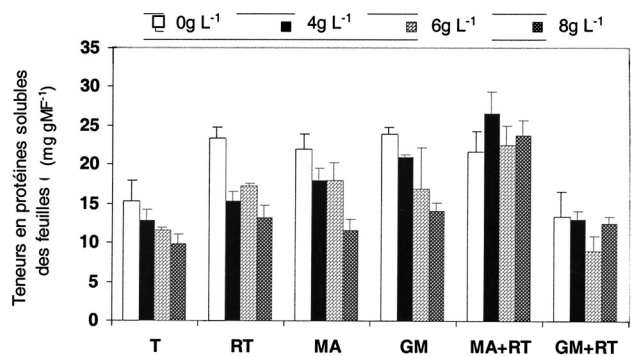


Figure 4. Effet de la contrainte saline et des symbiotes racinaires sur la teneur en protéines solubles des feuilles du trèfle cultivé sous une capacité au champ de 75 % (légende voir Fig. 1). Les valeurs représentent les moyennes de 4 mesures individuelles, les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 95 % (test de Newman et Keuls).

une meilleure absorption et accumulation du phosphore que la souche monospécifique de GM même sous stress salin. L'infection avec le *Rhizobium* n'a eu aucun effet sur l'absorption et l'accumulation du phosphore et les plantes nodulées ont été pratiquement aussi sensibles au stress salin que les plantes témoins non infectées. La coexistence du *Rhizobium* et des champignons mycorhiziens n'a pas favorisé l'absorption du phosphore et a abouti à des teneurs même plus faibles dans le cas des MA à 6 et $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sel comparativement aux plantes témoins non infectées.

3.4. Influence du stress salin et des différents traitements sur la composition chimique des feuilles du trèfle

Teneurs en protéines (Fig. 4) : En absence de stress salin la teneur en protéines dans les feuilles de trèfle non infecté a été estimée à $\sim 15 \text{ mg} \cdot \text{g MF}^{-1}$. Cette teneur augmente respectivement de 53 %, 56 % et 44 % chez les plantes infectées avec le *Rhizobium*, le GM et les MA. La combinaison de la mycorhization et de l'inoculation avec le *Rhizobium* n'a pu améliorer la teneur en protéines que dans le cas des MA. Ces augmentations sont statistiquement significatives.

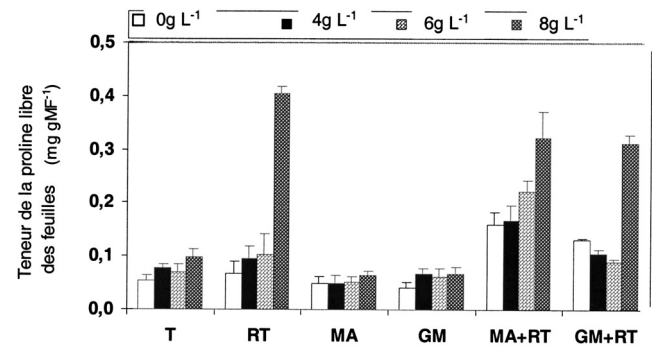


Figure 5. Effet de la contrainte saline et des symbiotes racinaires sur la teneur en proline libre des feuilles du trèfle cultivé sous une capacité au champ de 75 % (légende voir Fig. 1). Les valeurs représentent les moyennes de 3 mesures individuelles, les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 95 % (test de Newman et Keuls).

À l'exception du cas des plantes infectées simultanément avec les MA et le *Rhizobium*, le stress salin provoque une chute des teneurs moyennes en protéines. Chez les plantes témoins non infectées cette chute a atteint 36 % à $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl. Les variations des teneurs en protéines enregistrées dans le cas des différentes doses de sel et des différents symbiotes ne sont pas toujours significatives sauf entre 0 et $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl.

De la même façon que pour le *Rhizobium*, les champignons mycorhiziens MA et GM semblent améliorer la résistance au stress salin et la teneur en protéines des feuilles du trèfle. Toutefois, le comportement de ces deux champignons devient très contrasté quand ils sont associés au *Rhizobium*. La combinaison MA + *Rhizobium* n'est pas affectée par le stress salin et aboutit même à des teneurs en protéines relativement plus élevées alors qu'elles ont été les plus basses dans le cas de l'association GM + *Rhizobium*.

Proline libre (Fig. 5) : chez les plantes témoins non infectées, le stress salin a provoqué une accumulation de la proline dans les feuilles du trèfle. Les taux d'augmentation des teneurs en proline ont atteint 42 % et 81 % par rapport aux plantes non stressées respectivement à 4 et $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl. Lors de l'infection avec les symbiotes racinaires et à l'exception des traitements avec les MA et le GM, le stress salin a provoqué une accumulation de la proline en fonction de la dose de sel appliquée. Cependant, ces augmentations des teneurs en proline libre restent statistiquement non significatives entre 0 et $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl dans la majorité des cas. Les plus fortes accumulations ont été observées à $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl dans le cas des plantes infectées avec le *Rhizobium* séparément (+ 500 %) ou en association avec les MA et le GM (respectivement 103 et 138 %).

Sucres solubles (Fig. 6) : chez les plantes témoins non infectées, les teneurs en sucres solubles chutent légèrement suite au stress salin entre 0 et $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl et augmentent d'environ 11 % à $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl. Toutes ces variations ont été jugées significatives après analyse de la variance. Après inoculation avec le *Rhizobium*, ces teneurs augmentent sensiblement (60 à 200 %) en comparaison avec les plantes témoins et semblent dépendre faiblement des concentrations en sel. Hormis le cas des plantes mycorhizées par les MA et cultivées à $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl, les endomycorhizes provoquent

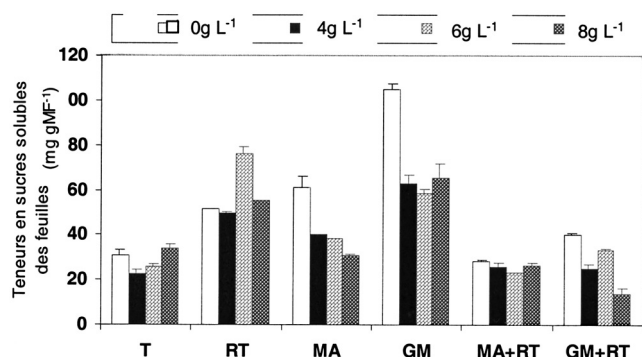


Figure 6. Effet de la contrainte saline et des symbiotes racinaires sur la teneur en sucres solubles des feuilles du trèfle cultivé sous une capacité au champ de 75 % (légende voir Fig. 1). Les valeurs représentent les moyennes de 3 mesures individuelles, les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 95 % (test de Newman et Keuls).

une augmentation significative des teneurs en sucres solubles et une sensibilité au stress salin pratiquement équivalente quel que soit la dose de sel. Les augmentations observées dans le cas des plantes mycorhizées par le GM (~ 90 à 240 %) sont plus importantes que dans le cas des MA (~ 50 à 100 %). Dans la quasi majorité des cas, la combinaison de la mycorhization et de l'inoculation avec le *Rhizobium* a induit une diminution des teneurs en sucres aussi bien en comparaison avec les plantes témoins qu'avec les plantes mycorhisées ou nodulées. Les teneurs en sucres solubles semblent n'être influencées que légèrement par le stress salin surtout dans le cas du MA + RT.

4. DISCUSSION

L'apport des symbiotes racinaires, mycorhizes ou/et *Rhizobium* pour la croissance et le développement du trèfle cultivé sous un stress salin dépend de l'inoculum endomycorhizien (souche monospécifique (GM) ou ensemble hétérogène de souches fongiques (MA)), de l'association avec le *Rhizobium* et du niveau de la salinité. En absence de NaCl ou en présence de concentrations modérées, la mycorhization avec le GM et les MA seuls ou associés au *Rhizobium* a favorisé la production de la matière sèche. Des résultats similaires ont été rapportés dans plusieurs travaux [2, 3, 49, 53]. Selon Ruiz-Lozano et al. [54], l'amélioration de la tolérance des plantes à la salinité par

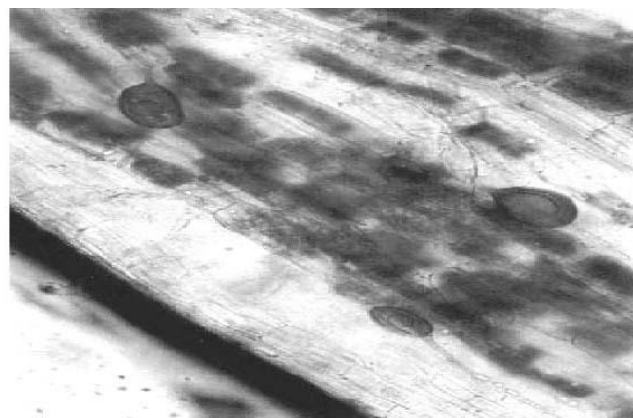


Figure 7. Racine de *Trifolium alexandrinum* L. infecté par les mycorhizes autochtones (MA) montrant un taux de mycorhization et une teneur en arbuscules élevés. Les plantes sont cultivées en condition de serre en présence comme en absence de NaCl. Les racines des plantes âgées de 9 semaines sont traitées par du KOH et colorées au bleu de Trypan ($G \times 100$).

l'apport des endomycorhizes est conditionnée par un perfectionnement de l'activité photosynthétique et une meilleure efficacité d'absorption hydrique. Les taux de mycorhization des racines des plantes infectées par les MA révèlent l'absence d'effet dépressif du NaCl sur la colonisation symbiotique avec même une légère augmentation des taux d'infections aux fortes doses de NaCl (Fig. 7), ce qui expliquerait le maintien de la croissance du trèfle inoculé par les MA même à des doses élevées en sel, un effet comparable a été observé chez *Leucaena* inoculée par *Glomus* sp. [21]. Chez le trèfle infecté par le GM seul, les réductions du taux d'infection endomycorhizienne, de la teneur en arbuscules (Fig. 8) et de la croissance sont d'autant plus importants que le niveau de NaCl dans le milieu est élevé. Des résultats comparables ont été rapportés par Ojala et al. [41] pour des plantes d'oignon mycorhizées. Cette réduction de l'intensité de mycorhization du GM en présence de NaCl dans le milieu serait liée à des changements physiologiques de la plante hôte [33] et au degré de sensibilité de la souche au sel. A forte concentration en sel ($8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), la chute de l'intensité de mycorhization a probablement été accompagnée d'une réduction de la propagation du champignon. En effet, la sensibilité de la croissance des hyphes fongiques au sel entraîne une

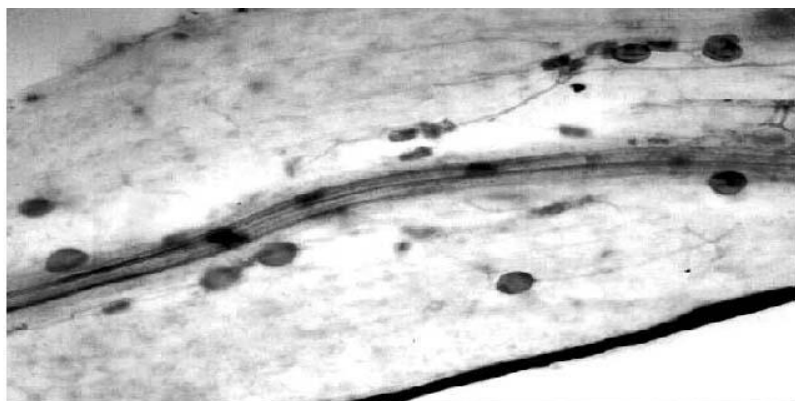


Figure 8. Racine de *Trifolium alexandrinum* L. infecté par *Glomus mosseae* montrant un taux de mycorhization très faible et les arbuscules sont pratiquement absents. Les plantes sont cultivées en condition de serre en présence de NaCl ($8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Les racines des plantes âgées de 9 semaines sont traitées par du KOH et colorées au bleu de Trypan ($G \times 100$).

diminution de leur propagation, de la colonisation mycorrhizienne [38, 54] et une perte de la viabilité des hyphes qui peut s'avérer critique pour la survie et la réussite de l'installation de la mycorrhization [21]. Certains travaux rapportent que la salinité peut agir sur les premiers stades de l'infection mycorrhizienne en retardant le processus d'apparition du tube germinatif [33] et même parfois en inhibant complètement la germination des spores [23, 31].

Comparativement à l'autre symbiote endomycorhizien, les mycorrhizes indigènes d'Aoufous (MA) ont montré une nette efficacité à améliorer la croissance du trèfle en absence comme en présence du sel. La biodiversité et l'adaptation à la salinité de l'inoculum mycorrhizogène du sol Aoufous ont certainement contribué à cette performance. Les analyses quantitatives et qualitatives des spores du sol d'Aoufous ont montré la présence de quatre genres différents de spores mycorrhizogènes : *Glomus*, *Sclerocystis*, *Scutellospora* et *Acaulospora* avec des pourcentages d'abondance variables [1, 40]. En plus, la détermination des paramètres physico-chimiques du sol de la palmeraie Aoufous a révélé un pH légèrement alcalin de 8,2 et une salinité relativement élevée avec une conductivité électrique de $5,65 \text{ ds} \cdot \text{m}^{-1}$ soit l'équivalent d'une concentration de $3,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl. D'après Coperman et al. [15] le comportement des champignons mycorrhiziens et leur efficacités seraient liés à leur milieu d'origine et précisément aux facteurs environnementaux de leurs habitats.

Suite au stress salin la diminution des produits de la photosynthèse vers les racines pourrait aussi affecter le taux de la colonisation des mycorrhizes [33]. En conséquence, l'efficacité de la symbiose sera réduite. De même comme il a été souvent rapporté, l'effet négatif de la salinité sur la fixation biologique d'azote s'accompagne de changements physiologiques et métaboliques. La salinité provoque une diminution des photosynthétats fournis pour les bactéroïdes [17, 18, 26] et une altération de la diffusion intra-nodulaire de l'oxygène [56].

L'association mycorrhizes-*Rhizobium* a abouti à une amélioration de la biomasse sèche du trèfle en comparaison aux plantes témoins non infectées. Ce résultat concorde parfaitement avec les travaux de Barea et al. [11]. Toutefois, La combinaison de la mycorrhization avec l'infection par le *Rhizobium* a conduit dans la majorité des cas à un antagonisme et à une chute de la croissance comparativement aux cas où ils sont appliqués séparément. Barea et al. [11] ont montré qu'il y a une synergie et non un antagonisme entre les différents partenaires de l'association tripartite (mycorrhizes-légumineuse-*Rhizobium*), particulièrement dans les écosystèmes désertiques où le phosphore est peu disponible et constitue un facteur limitant pour la fixation symbiotique de l'azote. Requena et al. [47] rapportent également que l'inoculation de *Anthyllis cytisoides* par *Glomus intraradices* devient plus efficace lorsqu'il est associé avec le *Rhizobium* sp. NR₄. La réduction de la croissance dans le cas de la combinaison de la mycorrhization et de la nodulation a été accompagnée dans la plupart des cas d'une chute plus importante du taux de mycorrhization, du nombre des nodules et de la teneur foliaire en sucres solubles comparativement aux cas où les symbiotes ont été appliqués séparément. L'antagonisme supposé entre les deux micro-symbiotes ainsi que l'inhibition inter-endophytes seraient le résultat d'éventuelles compétitions entre les champignons mycorrhiziens et la bactérie fixatrice d'azote notam-

ment vis-à-vis des hydrates de carbone solubles dans les racines de la plante hôte [13, 67] et non pas à une compétition pour les sites d'infection [58]. La présence des deux symbiotes influence également les niveaux hormonaux [9] et affecte l'ensemble de la productivité de la plante [13] et par conséquent une variabilité de sa réponse. D'après Azcón et al. [5], l'intensité des effets de l'interaction entre les microsymbiotes dépend largement de la combinaison champignon-bactérie.

Le statut nutritionnel en phosphore des feuilles du trèfle a été significativement amélioré chez les plantes mycorrhisées par les MA même en présence de sel. Des effets similaires ont été observées chez des plantes de luzerne mycorrhisées et soumises aux conditions de stress salin [2]. Contrairement aux champignons MA, le GM n'a pas permis une amélioration de l'absorption du phosphore en présence de NaCl. Selon Reddell et al. [45], l'efficacité de l'association symbiotique pour l'amélioration de la nutrition minérale des plantes hôtes dépend entre autres du degré de tolérance de la plante et des symbiotes au sel. Chez les plantes simultanément mycorrhisées et inoculées par le *Rhizobium*, la teneur des tissus foliaires en phosphore a été très faiblement améliorée et reste comparable à celles des témoins alors que la production de la matière sèche a été améliorée. Des résultats comparables ont été rapportés par Gavito et al. [25] chez le petit pois doublement infecté par le *Rhizobium* et *G. caledonium* après 9 semaines de culture, ces auteurs ont supposé que l'amélioration de la teneur en phosphore se serait produite très tôt et pour une courte durée.

Il est bien établi que les champignons mycorrhiziens à arbuscules affectent la physiologie et la biochimie de la plante hôte [35, 51]. L'inoculation du trèfle par les mycorrhizes a augmenté la teneur foliaire en protéines et en sucres solubles. En effet, les plantes répondent à la mycorrhization par la synthèse des sucres réducteurs [62]. Cette augmentation de la teneur en sucres serait liée à une amélioration du taux de la photosynthèse induite par la mycorrhization [4, 52]. Les endomycorrhizes améliorent également l'assimilation de l'ammonium considéré comme peu mobile dans le sol [10, 24], en stimulant l'activité de la glutamate synthétase [59]. La propriété des mycorrhizes à prélever différents types d'éléments nutritifs notamment azotés [64] suite à leur grande capacité d'absorption d'eau [36] leur permet d'apporter un avantage décisif dans la compétition pour l'azote et d'accéder à des sources d'azote peu accessibles aux racines des plantes non mycorrhisées. De même, l'inoculation du trèfle par le *Rhizobium* a montré des teneurs élevées en sucres en comparaison avec les témoins non nodulés.

La faiblesse des teneurs en protéines solubles dans les feuilles du trèfle inoculé simultanément par le GM et le *Rhizobium* résulterait de l'interaction entre les deux symbiotes racinaires [20]. Toutefois, les plantes inoculées simultanément avec les MA et le *Rhizobium* augmentent leurs teneurs en protéines même en présence du NaCl, ce qui suggère que ces champignons mycorrhiziens tolèrent les conditions de la salinité du sol. Par ailleurs, il faut signaler le rôle indirect des endomycorrhizes dans la nutrition azotée chez les légumineuses en condition de stress, cette dernière devient plus efficace quand la nutrition phosphatée de la plante est satisfaisante [64, 65]. Selon Azcón et El-Atrash [2], les plantes mycorrhisées et inoculées par le *Rhizobium meliloti* présentent une grande amélioration de la fixation de N₂ sous des doses élevées en sel.

La diminution observée de la teneur foliaire en protéines du trèfle inoculé par le *Rhizobium* et cultivé sous stress salin, peut être associée à plusieurs facteurs : l'effet inhibiteur de NaCl sur la nodulation et sur la fixation d'azote [12], l'inhibition de l'activité enzymatique de la glutamine synthétase (GS) et de la glutamate synthase dépendante de NADH (NADH-GOGAT) au sein des nodules par les fortes concentrations de NaCl [16].

L'adaptation des plantes aux stress abiotiques a souvent été associée à des changements biochimiques au niveau de la plante : accumulation des sucres et de la proline, changement de la composition lipidique des membranes, altération de l'expression des certains gènes [63]. D'après nos résultats, le stress salin n'a pas induit d'accumulation de proline dans les tissus foliaires du trèfle infecté seulement par les mycorrhizes. Des réponses analogues ont été notées chez la luzerne sous un stress hydrique [29]. Chez la laitue cultivée en présence de sel, des faibles teneurs en proline ont été observées dans les feuilles des plantes inoculées par *G. fasciculatum* et celles par *G. deserticola* comparativement aux plantes témoins et celles infectées par *G. mosseae* [53]. Dans notre cas, les plantes doublement infectées par le *Rhizobium* et les mycorrhizes ont montré une forte accumulation en proline. Cette accumulation peut résulter soit d'une hydrolyse de protéines et/ou une synthèse de nouveau cet acide aminé [37]. L'accumulation de la proline serait impliquée dans des mécanismes d'ajustement osmotique et servirait aussi comme osmoprotecteur.

5. CONCLUSION

Les mycorrhizes autochtones (MA) se sont montrés les plus efficaces pour améliorer la productivité du trèfle cultivé sous stress salin. Ils se sont montrés particulièrement tolérants au sel, colonisateurs et ont pu stimuler d'une manière significative la croissance et la nutrition phosphatée et augmenter la teneur foliaire en protéines solubles même en conditions de stress salin. Par contre, la souche monospécifique de *Glomus mosseae* semble être moins efficace et plus affectée par le sel. La salinité a diminué le nombre de nodules chez les plantes infectées par le *Rhizobium*. Dans la double symbiose ce dernier a provoqué une réduction du taux de mycorrhization et de la teneur en arbuscules pour les deux types de mycorrhizes (GM et MA). La combinaison mycorrhizes-*Rhizobium*, quoiqu'elle a abouti à des améliorations relative de la production de biomasse, a révélée un certain antagonisme peu fréquent entre les deux symbioses. La double symbiose s'est montrée moins efficace pour l'amélioration des teneurs foliaires en protéines et en sucres solubles comparativement aux traitements simples. Le stress salin s'est aussi traduit au niveau des feuilles par une accumulation de la proline surtout chez les plantes doublement inoculées et une accumulation des sucres solubles en cas du traitement avec le *Rhizobium*.

Pour une meilleure compatibilité symbiotique et une tolérance optimale aux conditions de la salinité, la sélection des trois partenaires de l'association est primordiale. Le succès d'une association symbiotique nécessite un degré élevé de coordination intercellulaire et de corégulation métabolique.

Remerciement : Ce travail a bénéficié du soutien financier de la coopération Maroc-Espagnole (Action Intégrée n° 43/P/00).

RÉFÉRENCES

- [1] Abbas Y., Mycorrhizes à arbuscules des zones arides : Biodiversité et rôle dans la tolérance du trèfle (*Trifolium alexandrinum*) au stress salin, Thèse de 3^e cycle, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, 1998, pp. 32–34.
- [2] Azcón R., Al-Atrash F., Influence of arbuscular mycorrhiza and phosphorus fertilisation on growth, nodulation and N₂ fixation [¹⁵N] in *Medicago sativa* and four salinity levels, Biol. Fert. Soils 24 (1997) 81–86.
- [3] Azcón-Aguilar C., Barea J.M., Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms, in: Allen M.F. (Ed.), Mycorrhizal Functioning. An Integrative Plant-Fungal Process, Chapman & Hall, New York, 1992, pp. 163–198.
- [4] Azcón R., Gomez M., Tobar R., Effects of nitrogen source on growth, nutrition, photosynthetic rate and nitrogen metabolism of mycorrhizal and phosphorus fertilized plants of *Lactuca sativa* L., New Phytol. 121 (1992) 227–234.
- [5] Azcón R., Rubio R., Barea J.M., Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains and their effects on growth, N₂ fixation (¹⁵N) and nutrition of *Medicago sativa* L., New Phytol. 117 (1991) 399–404.
- [6] Azcón R., Tobar R., Activity of nitrate reductase and glutamine synthetase in shoot and root of mycorrhizal *Allium cepa*. Effect of drought stress, Plant Sci. 133 (1998) 1–8.
- [7] Baker A., Sprent J.I., Wilson J., Effect of sodium chloride and mycorrhizal infection on the growth and nitrogen fixation of *Prosopis juliflora*, Symbiosis 19 (1995) 39–51.
- [8] Banet G., Wininger S., Badani H., Ben-Dor B., Friedman Y., Kapulnik Y., Toxic and osmotic effects of salinity on growth and nodulation of *Medicago sativa*, Symbiosis 21 (1996) 209–222.
- [9] Barea J.M., Azcón-Aguilar C., Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen fixing plants, Adv. Agron. 3 (1983) 1–54.
- [10] Barea J.M., Azcón-Aguilar C., Azcón R., Vesicular-arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N₂ fixation and N uptake from soil as assessed with a N¹⁵ technique under field conditions, New Phytol. 106 (1987) 717–725.
- [11] Barea J.M., Azcón R., Azcón-Aguilar C., Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing systems, Methods Microbiol. 24 (1992) 391–416.
- [12] Bekki K., Trinchant J.C., Rigaut J., Nitrogen fixation by *Medicago sativa* nodules and bacteroids under sodium chloride stress, Physiol. Plant. 71 (1987) 61–67.
- [13] Bethlenfalvay G.J., Brown M.S., Stafford A.E., Glycine-*Rhizobium* symbiosis. II. Antagonistic effects between mycorrhizal colonization and nodulation, Plant Physiol. 79 (1985) 1054–1058.
- [14] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254.
- [15] Coperman R.H., Martin C.A., Stutz J.C., Tomato growth in response to salinity and mycorrhizal fungi from saline or non-saline soils, Hort. Sci. 31 (1996) 341–344.
- [16] Cordovilla M.P., Ligerio F., Lluch C., The effect of salinity on N fixation and assimilation in *Vicia faba*, J. Exp. Bot. 45 (1994) 1483–1488.
- [17] Delgado M.J., Garrido J.M., Ligerio F., Lluch C., Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress, Physiol. Plant. 89 (1993) 824–829.
- [18] Delgado M.J., Ligerio F., Lluch C., Effect of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba bean, common bean and soybean plants, Soil Biol. Biochem. 26 (1994) 371–376.
- [19] De Mars B.D., Broener R.E.J., A simple method for observing VAM with suggestions for designing class activities, J. Biol. Edu. 29 (1995) 209–214.
- [20] Dianda M., Comparaison des effets de champignons V.A. introduits et indigènes associés ou non à *Bradyrhizobium*, sur la fixation d'azote et la croissance d'*Acacia albida*, in: Groupe d'Étude

- de l'arbre, Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides, John Libbey Eurotext, Paris, 1991, pp. 263–269.
- [21] Dixon R.K., Rao M.V., Garg V.K., Inoculation of *Leucaena* and *Prosopis* seedlings with *Glomus* and *Rhizobium* species in saline soil: Rhizosphere relations and seedling growth. *Arid Soil, Res. Rehabil.* 7 (1993) 133–144.
- [22] Escuredo P.R., Minchin F.R., Gogorcena Y., Iturbe-Ormaetxe I., Klucas R.V., Becana M., Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules, *Plant Physiol.* 110 (1996) 1187–1195.
- [23] Estaun M.V., Effect of sodium chloride and mannitol on germination and hyphal growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*, *Agric. Ecosyst. Environ.* 29 (1989) 123–129.
- [24] Frey B., Schüepp H., Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L., *New Phytol.* 124 (1993) 221–230.
- [25] Gavito M.E., Curtis P.S., Mikkelsen T.N., Jakobsen I., Atmospheric CO₂ and mycorrhiza effects on biomass allocation and nutrient uptake of nodulated pea (*Pisum sativum* L.) plants, *J. Exp. Bot.* 51 (2000) 1931–1938.
- [26] Georgiev G.I., Atkins C.A., Effects of salinity on N₂ fixation, nitrogen metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root nodules, *Symbiosis* 15 (1993) 239–255.
- [27] Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S., The physiology of improved phosphate nutrition in mycorrhizal plants, in: *Les mycorrhizes, Physiologie et génétique*, INRA Editions, Paris, 1986, pp. 101–109.
- [28] Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S., Morphological integration and functional compatibility between symbionts in vesicular arbuscular mycorrhizal associations, in: Scannerini S., Smith D., Bonfante-Fasolo P., Gianinazzi-Pearson V. (Eds.), *Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis*, Springer-Verlag, Berlin, Deutschland, 1988, pp. 73–84.
- [29] Goicoechea N., Szalai G., Antolin M.C., Sánchez-Díaz M., Paldi E., Influence of arbuscular mycorrhizae and rhizobium on free polyamines and proline levels in water-stressed alfalfa, *J. Plant Physiol.* 153 (1998) 706–711.
- [30] Hatimi A., Achouri M., Oihabi A., Endomycorhization de légumineuses fixatrices de dunes : croissance et nutrition phosphatée, *Sécheresse* 8 (1997) 99–102.
- [31] Hirrell M.C., Gerdemann J.W., Improved growth of onion and bell pepper in saline soils by two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44 (1980) 654–655.
- [32] Joner Erik J., Johansen A., Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi, *Mycol. Res.* 104 (2000) 81–86.
- [33] Juniper S., Abbott L., VAM and soil salinity, *Mycorrhiza* 4 (1993) 45–57.
- [34] Kochert G., Carbohydrate determination by the phenolsulfuric acid method, in: Hellebust J., Craigie J. (Eds.), *Physiological and Biochemical Methods. Handbook of Phycological Methods*, Cambridge University Press, London, 1978, pp. 95–98.
- [35] Koide R.T., Schreiner R.P., Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43 (1992) 557–581.
- [36] Kucey R.M.N., Paul E.A., Vesicular-arbuscular mycorrhizal spore populations in various Saskatchewan soils and the effect of inoculation with *Glomus mossae* on *faba bean* growth in greenhouse and field trials, *Can. J. Soil Sci.* 63 (1983) 87–95.
- [37] Lluch C., Delgado M.J., Cordovilla M.P., Ocanà A., Ligeró F., Aspects physiologiques de la fixation d'azote de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse sous stress salin : effet nitrate, *Les colloques – INRA Editions* 77 (1995) 57–71.
- [38] Mc Millen B.G., Juniper S., Abbott L.K., Inhibition of hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil containing sodium chloride limits the spread of infection from spores, *Soil Biol. Biochem.* 30 (1998) 1639–1646.
- [39] Mosse B., The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza, *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 42 (1959) 173–286.
- [40] Oihabi A., Meddich A., Effet des mycorrhizes à arbuscules sur la croissance et la composition minérale du trèfle (*Trifolium alexandrinum*), *Cah. Agric.* 5 (1996) 382–386.
- [41] Ojala J.C., Jarrell W.M., Menge J.A., Johnson E.L.V., Influence of mycorrhizal fungi on the mineral nutrition and yield of onion in saline soil, *Agron. J.* 75 (1983) 255–259.
- [42] Paquin R., Lechasseur P., Observation sur une méthode de dosage de la proline libre dans les extraits de plantes, *J. Can. Bot.* 57 (1979) 1851–1854.
- [43] Phillips J.M., Hayman D.S., Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection, *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55 (1970) 158–161.
- [44] Plenchette C., Furlan V., Fortin J.A., Effects of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay, *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 107 (1982) 535–538.
- [45] Reddell P., Foster R.C., Bowen G.D., The effects of sodium chloride on growth and nitrogen fixation in *Casuarina obesa* Mig., *New Phytol.* 102 (1986) 397–408.
- [46] Requena N., Jeffries P., Barea J.M., Assessment of natural mycorrhizal potential in a desertified semiarid ecosystem, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 842–847.
- [47] Requena N., Jimenez I., Toro M., Barea J.M., Interactions between Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* sp. In the rhizosphere of *Anthyllus cytisoides*, a model legume for revegetation in Mediterranean semi-arid ecosystems, *New Phytol.* 136 (1997) 667–677.
- [48] Requena N., Perez-Solis E., Azcón-Aguilar C., Jeffries P., Barea J.M., Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 495–498.
- [49] Rosendahl C.N., Rosendahl S., Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* sp.) on the response of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to salt stress, *Environ. Exp. Bot.* 31 (1991) 313–318.
- [50] Rozema J., Arp W., Van Diggelen J., Van Esbroek M., Broekman R., Punte H., Occurrence and ecological significance of vesicular-arbuscular mycorrhiza in the salt marsh environment, *Acta Bot. Neerl.* 35 (1986) 457–467.
- [51] Ruiz-Lozano J.M., Azcón R., Gomez M., Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 456–460.
- [52] Ruiz-Lozano J.M., Gomez M., Azcón R., Influence of different *Glomus* species on the time-course of physiological responses of lettuce to progressive drought stress periods, *Plant Sci.* 110 (1995) 37–44.
- [53] Ruiz-Lozano J.M., Azcón R., Gomez M., Alleviation of salt stress by arbuscular *Glomus* species in *Lactuca sativa* plants, *Physiol. Plant.* 98 (1996) 767–772.
- [54] Ruiz-Lozano J.M., Azcón R., Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *Glomus deserticola* under salinity, *Mycorrhiza* 10 (2000) 1–7.
- [55] Sanchez-Diaz M., Aguirreolea J., Goicoechea M.C., Antolin M.C., Limitations de la fixation symbiotique d'azote et autres aspects physiologique des légumineuses des zones méditerranéennes, *Les colloques – INRA Editions* 77 (1995) 11–29.
- [56] Serraj R., Roy G., Drevon J.J., Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion, *Physiol. Plant.* 91 (1994) 161–168.

- [57] Shachar-Hill Y., Rolin D.B., Pfeffer P.E., Douds D.D., Uptake transfer of nitrogen to the host by arbuscular mycorrhizal fungus, *Plant Physiol. (Suppl.)* 114 (1997) Abstract No. 106.
- [58] Smith S.E., Bowen G.D., Soil temperature, mycorrhizal infection and nodulation of *Medicago trunculata* and *Trifolium subterraneum*, *Soil Biol. Biochem.* 11 (1979) 469–473.
- [59] Smith S.E., St John B.J., Smith F.A., Nicholas D.J.D., Activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L.: Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition, *New Phytol.* 99 (1985) 211–227.
- [60] Smith S.E., Gianinazzi-Pearson V., Physiological interactions between symbiots in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39 (1988) 221–244.
- [61] Somasegaran P., Hoben H.J., Methods in Legume-*Rhizobium* technology. Research report from University of Hawaii, NIFTAL project and MIRCEN, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, 1985, p. 367.
- [62] Tawaraya K., Saito M., Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on amino acid composition in roots of onion and white clover, *Soil Sci. Plant Nutr.* 40 (1994) 339–343.
- [63] Thomashow M.F., Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance, *Plant Physiol.* 118 (1998) 1–7.
- [64] Tobar R., Azcón R., Barea J.M., Improved nitrogen uptake and transport from ^{15}N -labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions, *New Phytol.* 126 (1994) 119–122.
- [65] Tobar R., Azcón R., Barea J.M., The improvement of plant N acquisition from an ammonium-treated, drought-stressed soil by the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizae, *Mycorrhiza* 4 (1994) 105–108.
- [66] Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V., Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle, in: Gianinazzi S. (Ed.), *Les Mycorhizes : Physiologie et Génétique*, 1^{er} Séminaire Européen sur les Mycorhizes, Dijon, INRA Editions, Paris, 1986, pp. 217–221.
- [67] Warembourg F.R., Montange D., Bardin R., The simultaneous use of $^{14}\text{CO}_2$ and $^{15}\text{N}_2$ labelling techniques to study the carbon and nitrogen economy of legumes grown under natural conditions, *Physiol. Plant* 56 (1982) 46–55.