

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Efficacité d'espèces ligneuses en symbiose mycorhizienne
arbusculaire pour la phytoremédiation d'un site urbain
contaminé**

Par

Laurence Bissonnette

**Département de sciences biologiques
Faculté des arts et sciences**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en sciences biologiques**

Juillet 2009

© Laurence Bissonnette, 2009



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Efficacité d'espèces ligneuses en symbiose mycorhizienne
arbusculaire pour la phytoremédiation d'un site urbain
contaminé**

Présenté par :
Laurence Bissonnette

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jacques Brisson, président-rapporteur
Michel Labrecque, directeur de recherche
Marc St-Arnaud, codirecteur de recherche
Mohamed Hijri, membre du jury

Résumé

Le potentiel de phytoextraction des métaux lourds du *Salix viminalis* et du *Populus × generosa* en symbiose, ou non, avec le champignon mycorhizien à arbuscules (MA) *Glomus intraradices* a été évalué lors de leur deuxième année de croissance sur un « brownfield » modérément pollué. Les plantes ont produit d'importantes quantités de biomasse et accumulé des concentrations élevées de cadmium et de zinc dans leurs tiges alors que le cuivre, manganèse, nickel et plomb ont été accumulés dans les racines. L'accumulation du zinc et du cadmium et la biomasse végétale ont augmenté durant la deuxième année comparativement à l'année de plantation. La deuxième année, l'inoculation du *G. intraradices* n'a pas influencé la biomasse végétale, probablement à cause des bénéfices apportés par les champignons MA autochtones. Par contre, les plantes inoculées ont accumulé des quantités limitées de cuivre et de cadmium ; ainsi l'ajout de cette souche de champignons MA n'a pas favorisé la phytoextraction de ces métaux. Néanmoins, l'efficacité du *S. viminalis* et du *P. × generosa* pour la réhabilitation de sites modérément contaminés au cadmium et zinc a été établie. Ensuite, j'ai tenté d'identifier les espèces MA présentes sur ce site perturbé. L'optimisation de l'amplification en chaîne par polymérase et l'électrophorèse en gradient dénaturant (PCR-DGGE) a été laborieuse et aucun résultat probant n'a pu être obtenu. Ces données auraient permises d'étudier la compétition entre un inoculum commercial et la communauté MA autochtone et de sélectionner une espèce MA tolérante aux métaux qui potentiellement améliorerait les capacités d'extraction des végétaux.

Mots clés

Plantes à croissance rapide, Salicacées, champignons mycorhiziens à arbuscules, phytoextraction, métaux lourds, DGGE (électrophorèse en gradient dénaturant)

Abstract

The potential for the phytoextraction of heavy metals (HM) by *Salix viminalis* and *Populus × generosa* in symbiosis, or not, with the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus *Glomus intraradices* was evaluated during a second year of growth in a slightly contaminated brownfield. The plants produced high biomass yield and accumulated high concentration of cadmium and zinc in their shoots while copper, manganese, nickel and lead were accumulated in the roots. The zinc and cadmium accumulation and the plant biomass yield were superior the second year relatively to the year of plantation. During the second year, the inoculation of *G. intraradices* did not influence the plant biomass yield, most likely because of the advantages given by the native AM fungus. However, the inoculated plants accumulated limited quantities of copper and cadmium; hence the addition of this AM strain did not favor the metal phytoextraction. Nevertheless, the efficiency of *S. viminalis* and *P. × generosa* for cadmium and zinc rehabilitation in moderately contaminated soil has been demonstrated. Afterward, I tried to identify the AM species found in this disturbed site. The optimization of the polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) was laborious and no convincing result was obtained. These findings would have enable me to study the competition between a commercial inoculum and the native AM community and to select more suited AM species that could potentially increase the plant extraction capacities.

Keywords

Fast growing species, Salicaceae, arbuscular mycorrhizal fungi, phytoextraction, heavy metals, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)

Table des matières

Résumé	III
Mots clés.....	III
Abstract.....	IV
Keywords.....	IV
Liste des tableaux	VII
Liste des figures.....	X
Liste des abréviations	XIII
Remerciements	XIII
Contribution à l'article scientifique.....	XIV
Avant propos.....	XV
CHAPITRE 1 : Introduction générale	I
1.1 Réhabilitation de sites contaminés.....	1
1.1.1 Types de contamination.....	1
1.1.2 Règlements sur les sols contaminés au Québec.....	2
1.1.3 Vue d'ensemble des méthodes de décontamination	5
1.1.4 Phytoremédiation.....	6
1.2 Phytoextraction des métaux lourds.....	8
1.2.1 Plantes hyperaccumulatrices.....	8
1.2.2 Espèces ligneuses à croissance rapide	9
1.2.2.1 Gestion des tissus contaminés et production de bioénergie.....	14
1.3 Champignons MA.....	14
1.3.1 Biodiversité des champignons MA dans des milieux contaminés aux métaux lourds.....	15
1.3.2 Méthode d'identification des taxons de champignons MA	16
1.3.3 Champignons MA identifiés sur des sites contaminés aux métaux lourds	18
1.3.4 Champignons MA associés aux genres <i>Salix</i> et <i>Populus</i>	19
1.3.5 Utilisation de champignons MA en phytoremédiation.....	20
1.4 Problématique.....	23
1.5 Objectifs.....	25

1.6 Site étudié	26
1.7 Matériel biologique.....	26
CHAPITRE 2 : Phytoextraction of heavy metals by two Salicaceae clones in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi during the second year of a field trial	27
2.1 Abstract.....	27
2.1.1 Keywords.....	27
2.2 Introduction.....	28
2.3 Materials and methods.....	31
2.3.1 Site description	31
2.3.2 Biological material and experimental design	32
2.3.3 Soil characteristics and analyses.....	33
2.3.4 Plant tissues sampling and analyses	35
2.3.5 Statistical analyses.....	36
2.4 Results.....	36
2.4.1 Plants growth and mycorrhizal colonization	36
2.4.2 Metal contents.....	39
2.5 Discussion.....	47
2.5.1 Conclusion	54
2.6 Acknowledgments	55
2.7 References.....	55
CHAPITRE 3 : Conclusion générale.....	64
3.2 Références générales	68
ANNEXE 1 : Experimental design.....	i
ANNEXE 2 : Identification des champignons MA associés aux plantes ligneuses <i>S. vimilanis</i> et <i>P. × generosa</i> sur un site urbain contaminé aux métaux lourds	ii
I. Introduction	ii
II. Matériels et méthodes	v
III. Résultats et discussion	viii
IV. Références	xviii

Liste des tableaux

Chapitre 1 Introduction générale

- 1.1 Concentrations approximatives de métaux lourds dans les tissus foliaires matures (ppm de matière sèche) pour une variété d'espèces végétales communes (tiré de Kabata-Pendias 2001). 3
- 1.2 Description des critères génériques concernant la présence de contaminants dans les sols du Québec (tiré de MENV 1999). 4
- 1.3 Grille des critères génériques pour les sols (tiré de MENV 1999). 4
- 1.4 Nombre d'années nécessaire pour réduire la concentration du cadmium dans le sol de 5 ppm par l'entremise de saules ; calculé par rapport au niveau d'accumulation du cadmium dans les tissus aériens végétaux, pour différentes profondeurs de contamination (tiré de Dickinson 2002). 12

Chapitre 2 Phytoextraction of heavy metals by two Salicaceae clones in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi during the second year of a field trial

- 2.1 Physico-chemical characteristics and HM concentration in the soil. 34
- 2.2 Survival rates of the *P. x genrerosa* and *S. viminalis* clones, inoculated (Gi) or non-inoculated (Ctrl) with *G. intraradices*, in September 2007. 37
- 2.3 Pearson correlations coefficients between HM concentrations measured in plant tissues (leaves, stems and surface roots) and in soil, in September of the second growing season. 38

- 2.4** Percentage of root length bearing AM fungi structures of the *S. viminalis* and *P. × generosa* clones, inoculated (Gi) or non-inoculated (Ctrl) with *G. intraradices* at planting, in the surface (0-20 cm) and underneath (20-40 cm) soil layers. 39
- 2.5** Analysis of variance of the HM concentrations (Cd, Zn, Cu, Mn, Ni and Pb) in plant tissues (leaves, stems, surface roots and underneath roots). Within each plant tissue, differences were tested between *S. viminalis* (Sv) and *P. × generosa* (Pg) clones, and between plants inoculated (Gi) or non-inoculated (Ctrl) with *G. intraradices*. 44
- 2.6** Mean leaf and stem HM uptakes of *S. viminalis* and *P. × generosa* clones inoculated (Gi) or non-inoculated (Ctrl) with *G. intraradices*, in 2007 (n=20). 45
- 2.7** Mean biological concentration factors (BCF) in the leaves and the stems of *P. × generosa* (Pg) and *S. viminalis* (Sv) clones, inoculated (Gi) or non-inoculated (Ctrl) with *G. intraradices*, at the end of the second growing season (n=20). 46

Annexe 2 Identification des champignons MA associés aux plantes ligneuses *S. viminialis* et *P. × generosa* sur un site urbain contaminé aux métaux lourds

- 1** Analyses préliminaires des séquences des bandes excisées du DGGE complété à partir des produits PCR réalisée avec les amorces AM1 et NS31-GC. xi
- 2** Matrice de présence (1) ou absence (0) des bandes distinctes observées au DGGE complété avec les produits PCR réalisée avec les amorces AML1 et AML2-GC. Les échantillons sont divisés selon le clone végétal (*S. viminialis* ou *P. × generosa*), le traitement (témoin ou inoculé avec du *G. intraradices*), le bloc et la profondeur des racines analysées (0-20 cm ou 20-40 cm). xiv
- 3** Résumé de la diversité des taxons MA retrouvés en association avec les racines du *S. viminialis* et du *P. × generosa*, selon le traitement (témoin ou inoculé avec du *G. intraradices*) et la profondeur des racines (0-20 cm ou 20-40 cm) récoltées sur le site contaminé étudié. La diversité des taxons MA a été estimée selon le nombre de bandes observées au DGGE à la suite de PCR avec les amorces AML1 et AML2-GC. xv
- 4** Analyses préliminaires des séquences des bandes excisées du DGGE complété à partir des produits PCR réalisée avec les amorces AML1-AML2-GC. xvi

Liste des figures

Chapitre 2 Phytoextraction of heavy metals by two Salicaceae clones in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi during the second year of a field trial

Figure 2.1 Dry leaf and stem biomass production of *P. × generosa* and *S. viminalis* clones, non-inoculated (Ctrl) or inoculated (Gi) with *G. intraradices*, measured in September of the second growing season. Within each tissue, columns with a different letter are significantly different at $p < 0.05$; there was no significant difference between inoculation treatments ($n = 40$). Leaves and stems were not statistically compared with each others. 37

Figure 2.2 HM (Cd, Zn, Cu, Mn, Pb and Ni) concentrations measured in *P. × generosa* and *S. viminalis* clones tissues, inoculated (Gi) or non-inoculated (Ctrl) with *G. intraradices*. In the Cu, Mn, Ni and Pb graphs, the surface (S. roots) and underneath (D. roots) root layers, HM concentrations have been multiplied by the number written above the columns in order to improve visualization. Statistical comparisons between treatments are given in Table 2.5. Tissues were not statistically compared with each others ($n=40$ for leaves, $n=60$ for stems and roots). 43

Annexe 2 Identification des champignons MA associés aux plantes ligneuses *S. viminialis* et *P. × generosa* sur un site urbain contaminé aux métaux lourds

Figure 1 Visualisation des produits amplifiés par PCR. (1) Échelle moléculaire; fragments produits après (2) la première ronde avec la paire d'amorces universelles NS1-NS41; deuxième ronde avec les paires d'amorces spécifiques aux champignons MA (3) AML1 et AML2 et (4) AM1 et NS31. L'approximation du nombre de paires de bases (pb) respectif est indiquée sur la figure. ix

Figure 2 Profil de migration du DGGE des fragments de 18S codant pour l'ARN ribosomal amplifiés avec les amorces AM1 et NS31-GC. Chaque colonne représente un échantillon distinct décrit par la plante hôte, le traitement appliqué, le bloc et la profondeur des racines. (1) *S. viminialis* témoin, bloc 2, 0-20 cm (2) *P. × generosa* témoin, bloc 1, 0-20 cm (3) *S. viminialis* témoin, bloc 4, 20-40 cm (4) *P. × generosa* inoculé, bloc 5, 0-20 cm (5) *P. × generosa* inoculé, bloc 2, 20-40 cm (6) *S. viminialis* inoculé, bloc 2, 0-20 cm (7) *P. × generosa* témoin, bloc 2, 0-20 cm. Les lettres (a à d) représentent des bandes séquencées présentées dans le tableau 1. Le gradient dénaturant était de 40-60 %. x

Figure 3 Profils de migration du DGGE des fragments de 18S codant pour l'ARN ribosomal amplifiés avec les amorces AML1 et AML2-GC. La numérotation des colonnes correspond aux 40 échantillons étudiés. L'association des numéros aux échantillons est présentée dans le tableau 2. Les lettres (a à h) représentent les différentes positions de migration des bandes. Les résultats du séquençage des bandes d et g sont présentés dans le tableau 3. Le gradient dénaturant était de 35-40 %. xiii

Liste des abréviations

AM	arbuscular mycorrhizal (traduction française, voir MA)
ANOVA	analyse de variance
BCF	biological concentration factor (traduction française, voir CT)
BSA	albumine de sérum bovin
CEC	capacité d'échange cationique
CT	coefficient de transfert
DGGE	électrophorèse en gradient dénaturant
DMSO	diméthylesulfoxyde
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
HM	heavy metals
ICP-MS	spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif
MA	mycorhizien à arbuscules
mEq	milliéquivalent
n	nombre d'échantillons
pb	paires de bases
PCR	amplification en chaîne par polymérase
Pg	<i>Populus × generosa</i>
ppm	particule par million
RFLP	polymorphisme de longueur des fragments de restriction
Sv	<i>Salix viminalis</i> (5027)
°C	degrés Celsius

Remerciements

Tout d'abord je souhaite remercier mes directeurs de recherche, Michel Labrecque et Marc St-Arnaud, pour entre autres le support, les conseils et les encouragements. Je suis reconnaissante envers, Adela Voicu pour sa contribution inestimable sur le terrain ainsi que durant les analyses, Stéphane Daigle pour ses éclaircissements au sujet de statistiques, Marie-Pierre Gauthier pour son renfort en laboratoire, et les agentes de recherche, Hélène Lalande et Marie-Claude Turmel, qui m'ont accompagnée lors des analyses du sol et des tissus végétaux.

Merci aux aides financières de la bourse Jacques-Rousseau (IRBV) et de la bourse de mobilité du Ministère de l'éducation, du loisir et du sport du Québec qui m'ont permises de participer à un stage formidable en Espagne. Je remercie chaleureusement « Estación experimental del Zaidín » de Granada, et principalement les membres du laboratoire de Juan Antonio Ocampo, dont Horst Vierheilig et Vilma Del Carmen Castellanos Morales qui m'ont accueillie avec beaucoup de cœur. Merci au département de biologie qui m'a accordée de l'aide financière par le Fond de Bourse en Science Biologique.

Je souhaite remercier Éric Gaudreau qui m'a soutenue et encouragée tout au long de ces années, ainsi que pour sa contribution lorsque nous avons tenté de broyer d'énormes tiges dans un moulin à café. Je suis reconnaissante envers les membres de l'IRBV qui ont été présents et ont participé quotidiennement à l'accomplissement de ce travail.

Finalement ce projet n'aurait pas été possible sans le financement des organismes suivants : Arrondissement du Sud-Ouest de la Ville de Montréal, Centre d'excellence de Montréal en réhabilitation de sites (CEMRS), et Fonds municipal vert (FMV) de la Fédération canadienne des municipalités (FCM).

Contribution à l'article scientifique

Phytoextraction of heavy metals by two Salicaceae clones in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi during the second year of a field trial

Laurence Bissonnette, Marc St-Arnaud et Michel Labrecque

Article scientifique en préparation destiné à la revue *Plant and Soil*

Cet article a été principalement élaboré par moi-même, Laurence Bissonnette. J'ai pris les mesures sur le terrain, compilé les données, complété les analyses de laboratoire, effectué les analyses statistiques ainsi que la recherche bibliographique. J'ai écrit moi-même l'article dans son intégralité. Les co-auteurs, Michel Labrecque et Marc St-Arnaud, sont mes directeurs de recherche, ils ont établi la problématique du projet, ils m'ont encadrée et supervisée tout au long de ce travail, m'ont offert des conseils et ils ont amélioré et révisé mes textes.

Avant propos

Dans le cadre de ma maîtrise, je me suis intéressée au potentiel de phytoextraction des métaux lourds de deux clones de la famille des Salicacées, le *S. viminalis* (5027) et le *P. × generosa*. Le dispositif expérimental, localisé sur un terrain vacant modérément contaminé de la ville de Montréal, a été suivi pendant la deuxième année de croissance des espèces ligneuses. De plus, les effets sur les espèces végétales de l'addition d'un inoculum commercial de champignons mycorhiziens à arbuscules (MA) a été vérifié. Dans un deuxième volet, j'ai étudié les structures des communautés des champignons MA de ce site contaminé et j'ai tenté d'identifier les taxons de champignons MA qui ont naturellement colonisés les racines des plantes ligneuses.

Ce mémoire comporte une introduction générale qui comprend la revue de la littérature, la problématique, les descriptions du site et du matériel biologique et finalement une présentation des objectifs de recherche. Cette introduction est suivie d'un chapitre comprenant un article scientifique destiné à la revue *Plant and Soil*. Ensuite se trouve une conclusion générale. Finalement j'ai intégré, en annexe, les descriptions et les résultats préliminaires d'analyses biologiques moléculaires ayant pour objectif d'identifier les espèces MA associées aux plantes ligneuses du site contaminé. Comme je n'ai pas obtenu de résultats probants, ces expérimentations sont présentées en annexe.

CHAPITRE 1 : Introduction générale

1.1 Réhabilitation de sites contaminés

1.1.1 Types de contamination

Le dernier siècle d'industrialisation a marqué les paysages urbains et a laissé en héritage plus de 30 000 sites contaminés abandonnés à travers le Canada (Table Ronde Nationale sur l'Environnement et l'Économie, 2003). Le terme « brownfield » est généralement emprunté afin de décrire ces sites délaissés anciennement utilisés à des fins commerciales ou industrielles (De Sousa et al. 2009). Ces terrains urbains sont généralement perturbés, contaminés et caractérisés par des conditions de sol peu favorable à la croissance de plantes ; tel qu'un statut nutritionnel faible, un niveau de compaction élevé et une faible capacité de rétention d'eau (French et al. 2006).

Les contaminants présents sont de deux catégories, organique ou inorganique. Les polluants organiques peuvent être des solvants, des pesticides, des produits pétroliers ou des explosifs (Pilon-Smits 2005). Les polluants inorganiques sont des métaux et métalloïdes, tel que le cuivre, l'arsenic, le plomb, le zinc, le cadmium, le mercure. Ces métaux sont des éléments naturels de la croûte terrestre ou de l'atmosphère. Mais de larges quantités ont été rejetées dans l'environnement par des activités humaines des secteurs miniers, industriels et militaires (Di Baccio et al. 2003). Ainsi, il est fréquent que ces métaux atteignent des niveaux toxiques dans l'environnement (Mulligan et al. 2001; Pilon-Smits 2005). Après les produits pétroliers, les métaux lourds forment la deuxième classe de polluants les plus abondants dans les sols du Québec (Giasson et Jaouich 1998).

Certains de ces métaux sont nécessaires aux plantes, tel que le zinc, le cuivre, le nickel, le magnésium et le cobalt, alors que d'autres ne possèdent aucune fonction biologique reconnue ; c'est le cas du plomb, du mercure et du cadmium. Mais à des concentrations élevées, tous ces métaux sont nocifs (Di Baccio et al. 2003; Gaur et Adholeya 2004). Le tableau 1.1 présente, pour certains métaux, les concentrations foliaires végétales qui sont considérées insuffisantes, normales ou excessives (tiré de Kabata-Pendias 2001). Les conséquences chez les plantes de la présence de métaux en excès peuvent être par exemple : nécrose des feuilles, réduction de la croissance, endommagement et changements morphologiques des racines ou détérioration du xylème (Kabata-Pendias et Pendias 1994). En plus d'affecter la végétation, la contamination retrouvée dans les sols peut se répandre et possiblement contaminer des bassins d'eaux. Les contaminants peuvent ensuite se retrouver dans la chaîne alimentaire et mettre en péril la santé humaine et animale (Nolan et al. 2003). Au contraire des polluants organiques, les métaux sont non biodégradables et compte tenu des risques qu'ils représentent pour la santé humaine et l'environnement en général, lorsqu'ils dépassent les seuils recommandés, ils doivent être physiquement retirés des sols ou immobilisés (Gaur et Adholeya 2004).

1.1.2 Règlements sur les sols contaminés au Québec

Le Ministère de l'environnement a élaboré la *Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés* (MENV 1999). Des critères (A, B ou C) ont été établis afin de définir les limites acceptables, selon l'utilisation d'un sol, soit industrielle, commerciale, récréative, agricole ou résidentielle. La description de ces trois critères est rapportée dans le tableau 1.2. Les concentrations seuils que peuvent atteindre divers métaux, métalloïdes et polluants organiques sont réglementées. Le tableau 1.3 présente les limites qui définissent chaque critère pour les métaux les plus communs (MENV 1999). Ces critères ont été développés par une approche visant la protection de la santé

Tableau 1.1 Concentrations approximatives des métaux lourds dans les tissus foliaires matures (ppm de matière sèche) pour une variété d'espèces végétales communes¹ (tiré de Kabata-Pendias 2001).

Concentrations dans les tissus foliaires			
Métaux	Insuffisantes ²	Normales	Excessives
Arsenic	5-30	10-100	50-200
Cadmium	-	0.05-0.2	5-30
Cobalt	-	0.02-1	15-30
Chrome	-	0.1-0.5	5-30
Cuivre	2-5	5-30	20-100
Fer	-	5-30	50-500
Mercuré	-	-	1-3
Manganèse	10-30	30-300	400-1000
Nickel	-	0.1-5	10-100
Plomb	-	5-10	30-300
Sélénium	-	0.01-2	5-30
Zinc	10-20	27-150	100-400

¹ Les valeurs pour les espèces très sensibles ou très tolérantes ne sont pas indiquées.

² Insuffisante si les concentrations sont moindres que le niveau indiqué.

Tableau 1.2 Description des critères génériques concernant la présence de contaminants dans les sols du Québec (tiré de MENV 1999).

Critère	Description
A	Teneurs de fond pour les paramètres inorganiques et limite de quantification pour les paramètres organiques. Limite maximale acceptable pour les sols à usage agricole.
B	Limite maximale acceptable pour des terrains à vocation résidentielle, récréative et institutionnelle. Sont également inclus les terrains à vocation commerciale situés dans un secteur résidentiel.
C	Limite maximale acceptable pour des terrains à vocation commerciale, non situés dans un secteur résidentiel, et pour des terrains à usage industriel.

Tableau 1.3 Concentrations maximales des métaux dans le sol, limitant chacun des trois critères génériques (tiré de MENV 1999).

Concentrations dans le sol (mg kg ⁻¹ de matière sèche)			
Métaux	A	B	C
Cadmium	1.5	5	20
Cuivre	40	100	500
Manganèse	770	1000	2200
Nickel	50	100	500
Plomb	50	500	1 000
Zinc	110	500	1 500

humaine. Ainsi, des scénarios génériques en fonction de l'usage des sols ont été évalués. L'élaboration de cette politique permet aux autorités de réclamer la caractérisation des sols et si nécessaire sa décontamination jusqu'à ce que les critères génériques soient respectés.

1.1.3 Vue d'ensemble des méthodes de décontamination

Les méthodes actuellement utilisées pour traiter les sols contaminés ne sont pas satisfaisantes d'un point de vue environnemental. La méthode majoritairement utilisée, l'excavation et l'enfouissement des sols, est coûteuse et surtout elle ne règle pas la source du problème mais le lègue plutôt aux générations futures (Göhre et Paszkowski 2006; Salt et al. 1998). Une autre option communément utilisée est le lavage des sols à l'aide d'acides forts. Ce traitement est coûteux, détruit les structures physiques et chimiques des sols, tue les microorganismes présents et de plus produit un résidu riche en métaux lourds (Gaur et Adholeya 2004). Par ailleurs, ces deux techniques sont dites « ex situ », puisqu'elles requièrent le déplacement des sols contaminés hors du milieu et entraînent la dispersion des polluants (Khan et al. 2000). L'immobilisation des métaux par l'addition de matières (par exemple : phosphorite, zéolite, montmorillonite ou matière organique humique), la vitrification, l'électrocinétique et la réduction-oxydation chimique sont quelques-unes des techniques qui ont été évaluées au cours des dernières années (Brown et al. 2004; Iskandar et al. 2001; Kabata-Pendias 2001). Cependant, la plupart de ces techniques requièrent l'excavation des sols, qui génère des coûts supérieurs à 100 US \$ la tonne, alors que les coûts de phytoremédiation sont généralement inférieurs, variant entre 25 et 100 US \$ la tonne selon l'approche utilisée (Glass 2000). Plus particulièrement sur des sites étendus où la contamination est diffuse, ces techniques ne sont pas économiquement viables. Dans ces conditions, des méthodes moins radicales pourraient être utilisées et de nouvelles alternatives telles que les phytoremédiations devraient être envisagées.

1.1.4 Phytoremédiation

La phytoremédiation est l'utilisation de plantes pour retirer des substances toxiques de l'environnement ou diminuer l'effet nocif de celles-ci (Salt et al. 1998). Ces contaminants, organiques ou inorganiques, peuvent être retrouvés dans le sol, l'eau ou l'air (Salt et al. 1998). Ces méthodes de réhabilitation sont des techniques vertes qui exploitent des processus naturels. Ces techniques sont complétées « in situ », utilisent des ressources renouvelables, ne nuisent pas aux structures du sol ou à la microflore (Chaudhry et al. 2005). De plus, la présence d'un couvert végétal réduit les risques d'érosion et de dispersion des contaminants, ainsi que le lessivage des contaminants vers l'eau souterraine. Aussi, ce couvert végétal offre un potentiel de séquestration du carbone (Meers et al. 2007; Rosselli et al. 2003). Parce que ces technologies sont naturelles et esthétiques, elles sont appréciées par l'opinion publique (Pilon-Smits 2005). En plus, ce sont des techniques généralement peu coûteuses (Chaudhry et al. 2005; Pilon-Smits 2005). On reconnaît généralement cinq modes distincts de phytoremédiation :

- 1- La phytodégradation :** les plantes dégradent les polluants organiques dans leurs tissus par des procédés enzymatiques, ou facilitent la biodégradation des polluants organiques par l'entremise des microorganismes vivant dans leur rhizosphère.
- 2- La phytostabilisation :** les plantes réduisent la mobilité et la biodisponibilité des métaux dans le sol par l'immobilisation ou la prévention de leurs mouvements.
- 3- La phytovolatilisation :** les plantes volatilisent les métaux puisés dans le sol vers l'atmosphère ou à l'inverse captent les polluants de l'air.
- 4- La rhizofiltration :** les racines immergées des plantes retirent les éléments toxiques retrouvés dans un effluent liquide.
- 5- La phytoextraction :** les plantes prélèvent du sol les contaminants et les accumulent dans leurs tissus aériens récoltables.

Bien évidemment il ne s'agit pas d'une panacée ; les phytoremédiations comportent également certaines contraintes. Tout d'abord, ces modes de réhabilitation sont dépendants du matériel biologique. Ainsi les conditions environnementales doivent permettre l'établissement et la survie des plantes, i.e. la contamination doit être inférieure aux limites phytotoxiques (Cunningham et al. 1995). De plus, seuls les contaminants biodisponibles qui peuvent être atteints par la zone racinaire ou par les microorganismes associés pourront être extraits ou transformés, limitant ainsi la profondeur. Également, à ce jour, des évidences de bioaccumulation ont surtout été rapportées pour les métaux suivant : arsenic, nickel, zinc, manganèse et cadmium (Van Nevel et al. 2007). Ensuite, lorsque la phytoremédiation est envisageable, le procédé est généralement lent. Tout de même et malgré ces restrictions, les phytoremédiations demeurent des méthodes qui répondent aux conditions et besoins de certains sites.

Par ailleurs, les phytoremédiations peuvent potentiellement engendrer quelques risques écologiques. Par exemple, il existe une possibilité de transfert des contaminants vers la chaîne alimentaire. Mais ce risque est faible car il est probable que les animaux préféreront des plantes moins toxiques et plus nutritives, sinon des clôtures pourraient être utilisées pour limiter cette possibilité (Angle et Linacre 2005). D'autre part, lors de la chute des feuilles, les métaux qui y sont concentrés sont remis en circulation et pourraient potentiellement être dispersés vers des zones non contaminées et s'accumuler dans la couche supérieure du sol (Robinson et al. 2000; Van Nevel et al. 2007). Par contre, la récolte annuelle des feuilles restreint cette éventualité (Dickinson et Pulford 2005). Ensuite, les plantes récoltées sont contaminées et doivent être gérées adéquatement. Mais une fois la biomasse brûlée, les quantités à enfouir sont minimales. Globalement, les risques associés aux phytoremédations sont relativement minimes ou aisément maîtrisables (Angle et Linacre 2005). Ainsi, pour une situation où les contaminants sont biodisponibles et lorsque la durée n'est pas un critère essentiel, les phytoremédations représentent un choix à envisager.

1.2 Phytoextraction des métaux lourds

1.2.1 Plantes hyperaccumulatrices

De nombreuses études ont analysé le potentiel de plantes hyperaccumulatrices pour la phytoextraction (Assuncao et al. 2003; Chandra et al. 2005; Ma et al. 2001; Srivastava et al. 2006). Ces plantes sont généralement retrouvées dans des lieux naturellement enrichis en métaux lourds (Pulford et Watson 2003). Elles sont capables d'accumuler des quantités de métaux 100 fois plus grandes que les plantes normales (Pulford et Watson 2003). Par exemple, pour le zinc et le manganèse, une plante hyperaccumulatrice est capable d'accumuler, en milieu naturel, au moins $10\,000\ \mu\text{g g}^{-1}$ de matière sèche dans ses tissus aériens, $1\,000\ \mu\text{g g}^{-1}$ pour le cobalt, le cuivre, le nickel, le plomb, l'arsenic et le sélénium et $100\ \mu\text{g g}^{-1}$ pour le cadmium (Chaney et al. 1997; McGrath et Zhao 2003). Ces aptitudes sont dues à une séquestration efficace des polluants, de meilleures capacités à mobiliser les éléments moins solubles du sol, ou à la production d'exsudats racinaires qui affectent la rhizosphère et agissent sur la capacité d'absorption des plantes (Chaney et al. 1997; McGrath et al. 1997; Salt et al. 1998). De plus, un avantage écologique de l'accumulation de métaux dans les parties aériennes des plantes est une défense naturelle contre les insectes herbivores (Behmer et al. 2005).

Parmi les plantes vasculaires, plus de 45 familles, incluant environ 450 espèces, sont reconnues pour leur capacité d'hyperaccumuler des métaux. La famille des *Brassicaceae*, particulièrement les genres *Alyssum* et *Thlaspi*, possèdent de nombreuses espèces hyperaccumulatrices, principalement du nickel (Assuncao et al. 2003). Tout de même, les plantes hyperaccumulatrices représentent moins de 0.2 % des angiospermes (McGrath et Zhao 2003; Salt et al. 1998). Par contre, leur faible biomasse et leur croissance lente limitent l'utilisation de ces plantes pour la phytoextraction (Salt et al. 1998). Certaines plantes hyperaccumulatrices produisant une biomasse importante ont cependant

été rapportées, tel que les hyperaccumulateurs du nickel *Alyssum bertolonii* et *Berkheya coddii*, qui peuvent produire annuellement entre 9 et 22 t h⁻¹ (Robinson et al. 1997). Mais aucune plante hyperaccumulatrice à biomasse importante n'est connue pour le zinc, le cadmium, le cuivre, le plomb et le chrome; en plus, pratiquement aucune n'est adaptée au climat tempéré (McGrath et Zhao 2003; Unterbrunner et al. 2007). En plus de leur faible production en biomasse, les plantes hyperaccumulatrices possèdent d'autres aspects contraignants. Elles sont généralement annuelles et ne possèdent pas de réseau racinaire étendu, ce qui limite la zone où les métaux peuvent être atteints et extraits du sol (Lunáčková et al. 2003).

1.2.2 Espèces ligneuses à croissance rapide

Une alternative aux plantes hyperaccumulatrices à croissance lente est l'utilisation d'espèces ligneuses à croissance rapide possédant des capacités modérées d'accumulation de métaux dans leurs tissus (Hammer et al. 2003). Plusieurs genres, tel que *Alnus*, *Betula*, *Populus*, *Salix* et *Larix*, ont été suggérés (French et al. 2006; Hammer et al. 2003; Pulford et Watson 2003). Les membres de la famille Salicacée ont montré des aptitudes particulièrement prometteuses, notamment les saules et les peupliers. Ces deux genres sont adaptés à des conditions peu favorables et grâce à leur plasticité phénotypique, ils colonisent naturellement des sols pauvres en nutriments, des sites présentant des périodes d'inondation ou de sécheresse et des sols contaminés (Dickinson 2000; Punshon et Dickinson 1997). Ces espèces végétales se caractérisent par certains traits importants en phytoremédiation, tel que la capacité d'établissement rapide, une longue durée de vie, une production importante de biomasse, un système racinaire étendu et profond, un mode de propagation rapide, la capacité à croître sur des sites perturbés et une tolérance aux contaminants (Banuelos et al. 1999; Meers et al. 2007; Robinson et al. 2000; Robinson et al. 2007). Les plantations de saules peuvent produire annuellement plus de 30 t ha⁻¹ (Fischer et al. 2005;

Hammer et al. 2003) mais une moyenne autour de 20 t ha⁻¹ serait plus réaliste selon Maxted et al. (2007) et Labrecque et al. (1998). Tandis que les peupliers produisent annuellement entre 10 et 18 t ha⁻¹ (Labrecque et Teodorescu 2005; Laureysens et al. 2004).

À cause de leur grande variabilité génétique, les multiples espèces et clones de saules et de peupliers ont des potentiels très variés pour la phytoextraction (Landberg et Greger 1996; Meers et al. 2007; Zalesny et al. 2007). Ainsi, des études comparatives ont été complétées afin de distinguer les espèces et clones plus performants dans des conditions de sols et des niveaux de contaminations variables. Certains clones ont été identifiés pour leur capacité de simultanément produire d'importantes quantités de biomasse et d'accumuler dans leurs tissus aériens des concentrations importantes de certains métaux (Dos Santos Utmazian et Wenzel 2007; Dos Santos Utmazian et al. 2007; Meers et al. 2007; Pulford et al. 2002). Les clones de *S. viminalis* en particulier sont reconnus pour leurs aptitudes intéressantes (Hammer et al. 2003; Jensen et al. 2009; Punshon et Dickinson 1997; Vervaeke et al. 2003). D'autres espèces ont aussi montré des capacités supérieures, tel que *S. burjatica* et *S. calodendron* (French et al. 2006), *S. caprea* (Wieshammer et al. 2007), *P. balsamifera* et *P. trichocarpa* × *P. deltoides* (Laureysens et al. 2004).

Afin de quantifier le potentiel de phytoextraction et de comparer les résultats de diverses études, un coefficient de transfert (CT) est utilisé. Il s'agit du ratio de la concentration d'un contaminant dans les tissus aériens par rapport à la concentration de ce même contaminant dans le sol. Un CT supérieur à 1 indique que la plante accumule activement ce contaminant dans ses tissus aériens (Dickinson et Pulford 2005).

Des études de terrain ont permis de mesurer des CT du cadmium entre 0.05 et 16.8 pour les tiges et entre 0.7 et 27.9 pour les feuilles de clones de saules (Dickinson et Pulford 2005; Klang-Westin et Eriksson 2003; Pulford et al. 2002; Rosselli et al. 2003; Vervaeke et al. 2003). Peu d'études de terrain ont évalué les capacités des peupliers. Cependant, lors d'une étude extérieure sur un site modérément contaminé et comprenant 13 clones de peupliers, Laurenysens et al. (2004), ont rapporté des CT du cadmium variant entre 1.25 et 12.5 pour les feuilles et entre 0.87 et 4 pour les tiges. Ainsi, ces études montrent que chez les saules et les peupliers, le cadmium est extrait en quantité permettant la décontamination active des sols.

Certains auteurs ont tenté de calculer le temps nécessaire pour assainir des sols de la contamination par le cadmium à l'aide de ces espèces ligneuses. Ainsi, Dickinson et Pulford (2005) ont calculé que la récolte d'une plantation de saules produisant annuellement 15 t ha^{-1} et retirant 25 mg Cd kg^{-1} , réduirait de 5 ppm la contamination d'un sol en 27 ans. Si, en plus, les feuilles sont retirées annuellement et que les racines sont enlevées de la terre à la fin de cette période, seulement 13.5 ans seraient nécessaires (Dickinson et Pulford 2005). Le tableau 1.4 présente une estimation du nombre d'années nécessaire pour la décontamination de 5 ppm de cadmium dépendamment de la profondeur de la contamination et des concentrations dans les tissus aériens. Par contre, dans le cadre d'une autre étude, il a été calculé que pour diminuer de moitié la contamination au cadmium d'un sol en 10 ans par des saules ou peupliers produisant annuellement 20 t ha^{-1} , un CT de la tige supérieur à 10 serait nécessaire (McGrath et Zhao 2003); hors ce niveau est rarement atteint. Lors d'une étude différente, il a été évalué à l'aide de modèles mathématiques que des sols pollués au cadmium pourraient potentiellement être décontaminés par *S. × calodendron* après 20 ans de culture, équivalant à une extraction totale du sol de $5.6 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ (French et al. 2006).

Tableau 1.4 Nombre d'années nécessaires pour réduire la concentration du cadmium dans le sol de 5 ppm par l'entremise de saules ; calculé par rapport au niveau d'accumulation du cadmium dans les tissus aériens végétaux, pour différentes profondeurs de contamination (tiré de Dickinson 2002).

Profondeur (cm)	Concentration dans les tissus de saules (mg kg ⁻¹ de matière sèche)			
	10	25	50	100
10	33	13	7	3
20	67	27	14	7
30	133	53	28	14

Outre le cadmium, le zinc a également été trouvé en concentrations suffisamment élevées dans les tissus des plantes pour permettre la décontamination active de sols. Par exemple, le *S. × calodendron* a atteint un CT approximatif de 1.5 lors d'une expérience au champ (French et al. 2006). Également, des CT de 3 ont été mesurés lors d'une étude conduite en pot avec *S. caprea* (Wieshammer et al. 2007). Aussi, des CT allant jusqu'à 3 ont été mesurés chez des clones de peupliers (Laureysens et al. 2004). En conséquence, le taux d'extraction du zinc est généralement plus faible que celui du cadmium, mais la décontamination est tout de même effective. Cependant, la dépollution du zinc nécessitera une période de temps supérieure à celle estimée pour le cadmium.

Les autres métaux communément retrouvés dans le sol, tel que le nickel, le cuivre, le manganèse, le plomb et le chrome, ne sont généralement pas accumulés en concentrations élevées dans les tissus aériens des saules et des peupliers (Punshon et Dickinson 1997; Rosselli et al. 2003; Sebastiani et al. 2004). Par contre, ces espèces sont généralement tolérantes à des quantités élevées de contamination de ces métaux. Par exemple, Kuzovkina et al. (2004) a évalué que 5 espèces de saules natives de l'Amérique du Nord pouvaient tolérer des solutions concentrées de 5 µM de cuivre sans que leur croissance ne soit affectée. Lors d'une autre expérience hydroponique, le *P. × euramericana* (clone *Adda*) a montré une tolérance supérieure allant jusqu'à 20 µM de cuivre (Borghi et al. 2007). Shanahan et al. (2007) ont mesuré que les concentrations létales du

manganèse pour le *S. geyeriana* et le *S. monticola* sont particulièrement élevées soit respectivement 3117 et 2791 mg Mn l⁻¹.

En comparant différentes études, des chercheurs ont remarqué que des CT inférieurs sont généralement mesurés sur des sites fortement contaminés comparativement aux sites faiblement contaminés (Dickinson et Pulford 2005). Ainsi, la phytoextraction par des plantes à croissance rapide apparaît moins réalisable pour des sites hautement contaminés, car la période nécessaire à l'assainissement des sols serait trop longue (Borghi et al. 2007; Dickinson et Pulford 2005). Jensen et al. (2009) ont aussi rapporté que même si les concentrations des métaux étaient plus élevées chez les *S. viminalis* d'un site fortement contaminé, à cause d'une diminution marquée de la production de biomasse, les quantités totales extraites de métaux étaient plus petites, dévoilant que le potentiel de décontamination du *S. viminalis* est supérieur pour un site faiblement contaminé.

La plupart de ces expériences ont été accomplies dans un environnement contrôlé, soit en solution hydroponique ou en pot localisé dans des serres. Peu d'expériences ont été réalisées « in situ » et encore moins se sont intéressées à vérifier le potentiel sur plus d'une année du processus de phytoextraction. Lors de deux expériences à long terme, Hammer et al. (2003) ont mesuré une diminution avec le temps des concentrations des métaux dans les tissus aériens de *S. viminalis*. Par contre, comme cette réduction a été jumelée à une augmentation annuelle de la production de biomasse, la quantité totale des métaux retirés du sol a augmenté avec le temps. D'autre part, Jensen et al. (2009) ont observé que les concentrations en métaux dans les tissus aériens de *S. viminalis* sont demeurées stables pendant 3 années consécutives. De même, Unterbrunner et al. (2007) ont rapporté des concentrations de métaux similaires entre les années de croissance de *S. caprea*. Ces deux dernières études contestent ainsi la prémisse qui suggère que parce que les quantités de métaux disponibles dans le sol diminuent avec le temps, les concentrations accumulées par les

plantes devraient aussi être réduites (Maxted et al. 2007; Sander et Ericsson 1998).

1.2.2.1 Gestion des tissus contaminés et production de bioénergie

Après la récolte des tissus contaminés, ceux-ci peuvent être brûlés afin de réduire le volume de matériel à enfouir. Un avantage important de l'utilisation en phytoextraction de plantes ligneuses versus des herbacées, est la possibilité de produire du biocarburant et ainsi d'offrir un volet économique à la décontamination. En effet, la biomasse obtenue annuellement peut produire une énergie renouvelable lors qu'elle est brûlée (Hammer et al. 2003). Après l'incinération, la majorité des métaux lourds se trouvent dans la fraction des cendres (Klang-Westin et Eriksson 2003; Meers et al. 2005). Afin d'éviter la volatilisation et l'émission de métaux volatils (le cadmium par exemple), des filtres peuvent être installés (Meers et al. 2005). Certains métaux peuvent être récupérés de ces cendres, sinon, les cendres sont gérées comme des déchets dangereux (Garbisu et Alkorta 2001; Salt et al. 1998).

1.3 Champignons MA

Les champignons mycorrhiziens à arbuscules (MA) sont des microorganismes communément associés aux plantes et sont retrouvés dans la plupart des écosystèmes. Ces membres de la division *Glomeromycota* (Schüßler et al. 2001) forment un groupe de champignons vivant en symbiose avec les plantes depuis plus de 450 millions d'années (Göhre et Paszkowski 2006; Sanders 2002; Simon et al. 1993). Ils sont associés de façon non spécifique à approximativement 80 % des plantes terrestres (Sanders 2002; van der Heijden et al. 1998). Les champignons MA offrent plusieurs avantages aux plantes hôtes. Grâce à leurs réseaux d'hyphes qui forment une extension aux réseaux racinaires des plantes, les champignons MA favorisent l'acquisition par les plantes hôtes du

phosphore, de l'azote et de plusieurs autres nutriments. En échange, les plantes offrent des carbohydrates aux champignons MA. Les champignons MA sont considérés comme des composants déterminants des écosystèmes; ils influencent la diversité, la structure et la productivité de la communauté végétale (Sanders 2002; van der Heijden et al. 1998).

1.3.1 Biodiversité des champignons MA dans des milieux contaminés aux métaux lourds

Plusieurs recherches ont permis de montrer la présence de champignons MA dans des milieux contaminés (Pawlowska et al. 1996; Zarei et al. 2008a; Zarei et al. 2008b). Par exemple, des espèces de *Glomus* ont été retrouvées en colonisation naturelle des racines de *Fragaria vesca* et de *Viola calaminaria* sur différents sites contaminés aux métaux lourds (Tonin et al. 2001; Turnau et al. 2001). Par contre, la diversité des champignons MA est souvent réduite en milieux contaminés comparativement à des milieux non contaminés (Regvar et al. 2006). En effet, les métaux lourds peuvent inhiber la germination des spores, le taux de colonisation (Gildon et Tinker 1983), la croissance des hyphes et la production d'arbuscules (del Val et al. 1999) des champignons MA. De plus, le nombre de spores, le niveau de colonisation ainsi que le nombre de taxon de champignons MA diminuent lorsque le niveau de contamination des métaux lourds augmente (Zarei et al. 2008a). Pourtant, des résultats contradictoires ont été trouvés sur un site contaminé aux métaux lourds de Grande Bretagne où, ni le taux de colonisation des racines d'une espèce de thym sauvage, ni le nombre de génotypes des champignons MA associés à cette plante vivace, ne semblaient influencés par l'augmentation du niveau de contamination (Whitfield et al. 2004). Également, des niveaux élevés de colonisation par des champignons MA, atteignant jusqu'à 71 % du système racinaire et des quantités élevées de spores (662 spores par 100 g de sol) ont été mesurés dans un sol contaminé de l'Inde (Sambandan et al. 1992). En fait, il a été trouvé que la tolérance des taxons de

champignons MA diffère selon l'espèce et même l'écotype (del Val et al. 1999; Liao et al. 2003; Whitfield et al. 2004). En effet, certains génotypes sont présents seulement dans des zones hautement contaminées alors que d'autres génotypes sont limités aux zones moins polluées (Whitfield et al. 2004). Identifier les taxons de champignons MA qui sont plus tolérants aux métaux lourds est essentiel afin d'optimiser l'utilisation de ces microorganismes pour des stratégies de phytoremédiation. Ainsi, des espèces MA cibles pourraient être utilisées comme inoculum lors de l'établissement de projet d'assainissement de sites contaminés.

1.3.2 Méthode d'identification des taxons de champignons MA

Les méthodes conventionnelles d'identification des champignons MA, soit l'identification morphologique et la capture de spores, sont des procédés imprécis et biaisés qui demandent beaucoup de temps et d'expertise (de Souza et al. 2004). Les variations subtiles dans la morphologie des hyphes et des spores entre les espèces rendent l'identification des champignons MA très ardue. Une autre option, l'isolation et la culture des champignons, est possible mais complexe et mal adaptée pour les champignons MA qui sont dépendants des plantes pour leur croissance. De plus, le manque de connaissances à propos de leurs besoins nutritifs complique la création de mediums de croissance qui devraient reproduire des conditions naturelles (Ercolini 2004). Actuellement, il est possible de cultiver seulement une petite fraction des microorganismes retrouvés dans la nature (Amann et al. 1995). Des méthodes basées sur une PCR amplifiant les gènes de la sous-unité 18S codant pour l'ARN ribosomal, permettent aujourd'hui d'isoler des séquences de microorganismes (de Souza et al. 2004). Les gènes codant pour l'ARN ribosomal sont utilisés car ils sont présents en copies multiples et présentent des régions très conservées, ce qui permet des analyses phylogénétiques (Clapp et al. 1999; Redecker et al. 1997). Ces méthodes ont d'abord été utilisées en association avec des techniques de RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction) ou de clonage.

Mais une technique différente, l'électrophorèse en gradient dénaturant (DGGE), offre des résultats complémentaires aux résultats obtenus par ces techniques (Smit et al. 1999), tout en étant rapide, fiable et peu coûteuse (de Souza et al. 2004; Ercolini 2004). Un net avantage de cette méthode, est la possibilité d'étudier des échantillons puisés directement dans l'environnement (de Souza et al. 2004). La méthode PCR-DGGE a souvent été utilisée pour des études des communautés de bactéries (Ferris et al. 1996; Muyzer et Smalla 1998; van der Wal et al. 2006; Wamberg et al. 2003). Plus récemment, cette technique a été appliquée pour des études sur les communautés des champignons MA (Kowalchuk et al. 2002; Kowalchuk et al. 1997; Ma et al. 2005; Öpik et al. 2003; Smit et al. 1999; Yergeau et al. 2006). Ainsi, des champignons MA peuvent être identifiés à partir de racines, de sol ou de spores (de Souza et al. 2004).

Lors de l'exécution du DGGE, les fragments d'ADN provenant de produits PCR migrent dans un gel d'acrylamide où la concentration de dénaturants composés d'urée et de formamide forment un gradient croissant de dénaturation (Ercolini 2004). Ainsi, les liaisons entre les bases sont éventuellement brisées, le point de dénaturation d'un brin étant spécifique à sa séquence. Ces cassures réduisent la capacité de mouvement des fragments dans le gel (Ercolini 2004). Ainsi, les fragments provenant des champignons MA de différents taxons (i.e. idéalement différentes séquences) auront des niveaux de dénaturation différents et formeront des bandes distinctes qui peuvent être séquencées et ensuite comparées à une banque de données, telle GenBank. Kowalchuk et al. (2002) ont vérifié que plusieurs analyses de DGGE de la même espèce de champignon MA produisent des bandes similaires, ce qui suggère que la variation intraspécifique de l'ARN ribosomal 18S serait minime. Ainsi, ils ont montré que différentes espèces peuvent être distinguées les unes des autres par DGGE. Par contre, Clapp et al. (1999) ont montré qu'il existe une variabilité intrasporale pour la sous-unité du 18S chez les champignons MA qui peut causer des problèmes d'interprétation.

Avec la méthode PCR-DGGE, les séquences isolées de champignons MA peuvent généralement être identifiées précisément au genre et parfois à l'espèce (de Souza et al. 2004; Öpik et al. 2003). Théoriquement, chaque bande représente un taxon différent, mais comme il s'agit de variants de séquences, on parle communément d'un ribotype (Ercolini 2004). Il a été montré qu'une bande ne représente pas toujours un seul taxon (Sekiguchi et al. 2001). Particulièrement lors d'étude d'échantillons comprenant un grand nombre de taxons, le DGGE ne peut pas séparer tous les taxons, car les bandes proches peuvent être confluentes. Comme pour virtuellement toutes les approches sauf le clonage, le séquençage massif ou le pyroséquençage, le DGGE ne peut pas séparer tous les taxons, car les séquences rares formant moins de 1:100 à 1:1000 de l'amplicon ne seront pas visibles. Cette technique ne peut donc généralement pas détecter des populations mineures représentant moins de 1 % de la communauté (Muyzer et Smalla 1998). Il est important de noter que l'intensité de chacune des bandes du gel n'est pas corrélée quantitativement avec la présence initiale de chaque taxon amplifié. Ceci est causé entre autres par l'affinité variable des amorces selon la séquence précise de chaque taxon (de Souza et al. 2004), de la variabilité du rendement de l'amplification dans chaque réaction, ainsi que par le nombre variable de copies de gènes selon les taxons. D'autres biais sont causés par l'utilisation du PCR, tel que la non spécificité des amorces qui parfois amplifient des séquences d'autres organismes que des champignons MA.

1.3.3 Champignons MA identifiés sur des sites contaminés aux métaux lourds

Quelques chercheurs ont tenté d'identifier les genres de champignons MA présents sur des sites contaminés aux métaux lourds. Par exemple, sur un site situé en Inde et pollué au zinc, cuivre, plomb et cadmium, 10 espèces appartenant au genre *Glomus*, 2 aux genres *Gigaspora* et *Acaulospora* et une espèce appartenant au genre *Sclerocytis* ont été identifiées en association à la végétation

spontanée (Sambandan et al. 1992). Tel que dans tous les sols, *Glomus* est le genre prédominant des zones contaminées (Ortega-Larrocea et al. 2001; Tonin et al. 2001; Whitfield et al. 2004; Zarei et al. 2008b). Plus particulièrement, le *G. mosseae* a été retrouvé à plusieurs reprises comme l'espèce la plus abondante sur des sites pollués aux métaux lourds (Ortega-Larrocea et al. 2001; Ortega-Larrocea et al. 2007). En plus du *G. mosseae*, Ortega-Larrocea et al. (2001) ont aussi identifié les *G. intraradices*, *G. geosporum* et quelques spores du genre *Acaulospora* sur un site contaminé du Mexique. Dans un sol pollué au plomb, au zinc et au cadmium, des spores du *G. fasciculatum* et du genre *Entrophospora* ont été trouvées (Pawlowska et al. 1996). Des spores d'*Acaulospora* ont aussi été observées dans des sols modérément contaminés alors que ce genre semblait absent des sites hautement contaminés aux métaux lourds de la même région, démontrant une faible tolérance aux métaux (Zarei et al. 2008b). Lors d'une étude sur un site hautement contaminé au zinc, Turnau et al. (2001) ont trouvé que les colonisateurs les plus performants de *Fragaria vesca* étaient de proches parents des espèces *G. gerdemannii*, *G. clarodeum* et *G. oculatum*, alors que les *G. mosseae* et *G. intraradices* ont été identifiés moins fréquemment. Parmi ces études, seul Whitfield et al. (2004) et Turnau et al. (2001) ont utilisé des méthodes d'identification moléculaires, soit respectivement une PCR couplée à du clonage ou l'utilisation d'amorces spécifiques aux taxons.

1.3.4 Champignons MA associés aux genres *Salix* et *Populus*

Peu d'études ont tenté d'identifier les champignons MA associés aux saules et peupliers. Cependant, il est connu que les saules et peupliers peuvent s'associer simultanément avec des champignons MA et des champignons ectomycorhiziens (Lodge 1989; van der Heijden 2001; van der Heijden et Vosatka 1999). Beauchamp et al. (2006) ont identifié les champignons MA d'un site inondable naturellement dominé par le peuplier (*P. fremontii* S. Wats.) et le saule (*S. gooddingii* Ball). Dans chaque site échantillonné, entre 2 et 13 espèces de champignons MA étaient présentes; les espèces de *Glomus* étaient les plus

abondantes, suivies par les genres *Acaulospora*, *Entrophora* et une seule espèce de *Paraglomus* et d'*Archaeospora* a été identifiée. Lors d'une autre étude récente, Chiffot et al. (2009) ont utilisé la méthode moléculaire de PCR-RFLP pour identifier les espèces de champignons MA associées aux racines du *P. nigra* L. × *P. maximowiczii* cv. A. Henry « Max 5 » dans une plantation avec le soya (*Glycine max* L.). Treize phylotypes ont été trouvés, 11 appartenant au genre *Glomus*, un au genre *Acaulospora*, et un au genre *Scutellospora*.

1.3.5 Utilisation de champignons MA en phytoremédiation

Une limitation importante de la phytoextraction est la longue durée du procédé. Quelques solutions ont été suggérées pour accélérer l'extraction des métaux du sol, entre autres par l'exploitation d'une symbiose avec des champignons MA. Ainsi, un nombre élevé d'études tentent de mesurer le potentiel des champignons MA en phytoremédiation (Audet et Charest 2007; Hildebrandt et al. 2007). Des résultats apparemment contradictoires ont été rapportés par les diverses études. Dans certains cas, la présence de champignons MA résulte en une augmentation des concentrations des métaux dans les tissus aériens des végétaux (Davies et al. 2001; Díaz et al. 1996; Guo et al. 1996; Joner et Leyval 2001; Leung et al. 2006; Liao et al. 2003; Liu et al. 2005). Dans d'autres cas, des réductions des concentrations des métaux dans les tissus aériens des plantes associées à des champignons MA ont été mesurées (Heggo et al. 1990; Vogel-Mikus et al. 2006). En effet, les champignons MA peuvent limiter la translocation des métaux en liant les métaux à leur paroi cellulaire, composée de chitine et de mélanine, ou en séquestrant les métaux sous formes complexés dans des vacuoles (Gonzalez-Chavez et al. 2002; Joner et Leyval 2001). Ainsi, dans ce cas, l'association aux champignons MA pourrait plutôt favoriser la tolérance des plantes aux métaux (Hildebrandt et al. 2007). Ces conclusions différentes pourraient être dues aux variations des caractéristiques des sols, des plantes hôtes, des différents métaux, ou de la densité des racines (Joner et Leyval 2001). Après une comparaison exhaustive des études publiées à ce sujet, Audet et

Charest (2007) concluent que les champignons MA augmenteraient la capacité d'extraction de plantes sur des sites faiblement contaminés, alors que sur des sites hautement contaminés les champignons MA diminueraient la biodisponibilité des métaux et ainsi réduiraient la capacité des plantes à extraire ceux-ci. Conséquemment, les champignons MA ne seraient un avantage en phytoextraction que sur des sites faiblement contaminés aux métaux lourds.

Plusieurs études ont vérifié l'effet de l'association des champignons MA avec des plantes hyperaccumulatrices (par exemple: Díaz et al. 1996; Heggo et al. 1990; Leung et al. 2006; Malcova et al. 2003). De plus, comme les saules et les peupliers forment des ectomycorhizes, ce type de symbiose a été étudié à quelques reprises en phytoremédiation. Baum (2006) ont trouvé que l'association ectomycorhizienne entre le *Paxillus involutus* et le *S. × dacyclados* augmente sa production de biomasse ainsi que l'accumulation du cadmium, du zinc et du cuivre dans ses tissus aériens par rapport aux plantes témoins. Ainsi, ces chercheurs suggèrent l'utilisation de cette ectomycorhize pour accroître la capacité d'accumulation de métaux des saules. Également, Sell et al. (2005) ont vérifié l'effet de trois champignons ectomycorhiziens avec le *S. viminalis* et le *P. canadensis* sur des sols faiblement contaminés. Ils ont mesuré une augmentation de 100 % des concentrations du cadmium dans les *P. canadensis* infectés avec le *Paxillus involutus*, alors qu'aucun effet n'a été mesuré chez les *S. viminalis*.

Cependant, les effets de l'association de champignons MA aux saules et aux peupliers en phytoremédiation est un sujet très peu abordé dans la littérature. À notre connaissance, une seule étude portant sur les effets de champignons MA associés à des clones de *Populus* a été publiée. Lingua et al. (2008) ont analysé deux clones, Villafranca (*P. alba*) et Jean Poutet (*P. nigra*) inoculés ou non avec les champignons MA *G. mosseae* ou *G. intraradices* et plantés dans un sol artificiellement contaminé au zinc. Ils ont mesuré une faible colonisation des racines par les champignons MA, soit en dessous de 20%. La production de biomasse des plantes inoculées avec du *G. mosseae* a été supérieure, alors que la

biomasse n'a pas été modifiée chez les plantes inoculées avec du *G. intraradices* comparativement aux plantes témoins, non inoculées. Tous les clones inoculés avec du *G. mosseae* ont montré des concentrations plus faibles de zinc dans leurs tissus aériens ainsi qu'un transfert sol-feuilles restreint. Chez les clones Villafranca associés au *G. intraradices*, les concentrations de zinc ont été limitées comparativement aux plantes témoins, alors que les clones Jean Poutet en symbiose avec cette même espèce MA ont accumulé des concentrations de zinc similaires aux plantes témoins. Ainsi, cette étude démontre que les réponses des plantes sont différentes dépendamment de l'espèce végétale hôte ainsi que de l'espèce de champignons MA associée.

1.4 Problématique

La pollution organique et inorganique des sols, causée par diverses activités humaines est un problème d'actualité internationale. Les méthodes conventionnelles utilisées pour le traitement des sols contaminés ne sont pas satisfaisantes car en plus d'être coûteuses, elles ne sont pas respectueuses de l'environnement. Ainsi, de nouvelles alternatives doivent être étudiées afin de remédier à ce problème d'envergure. La phytoremédiation, l'utilisation de plantes pour retirer des substances toxiques de l'environnement ou diminuer l'effet nocif de celles-ci, est une approche de décontamination des sols qui possède un potentiel très intéressant. Une technique particulièrement attrayante est la phytoextraction; les plantes retirent du sol des contaminants et les accumulent dans leurs parties aériennes, qui peuvent ensuite être récoltées et éliminées (Hammer et al. 2003; Kramer 2005; Salt et al. 1998). Pour procéder à la phytoextraction, l'utilisation d'espèces à croissance rapide possédant des capacités modérées d'accumulation de métaux dans leurs tissus, des capacités de croître dans des conditions difficiles et produisant une biomasse importante est une avenue prometteuse (Hammer et al. 2003; Pilon-Smits 2005; Rosselli et al. 2003). Mais, cette méthode est limitée par la lenteur du procédé, c'est à dire plusieurs décennies. Une option pour accélérer l'extraction des contaminants du sol est l'exploitation de champignons MA qui peuvent former des symbioses avec les végétaux. La symbiose mycorhizienne arbusculaire a amené une contribution bénéfique lors de plusieurs essais de décontamination, particulièrement sur des sites faiblement contaminés (Audet et Charest 2007; Guo et al. 1996; Joner et Leyval 2001; Leung et al. 2006).

Une expérience extérieure a été implantée en 2006, pour vérifier le potentiel d'espèces à croissance rapide associées à des champignons MA lors de la décontamination de sols contenant des métaux lourds. Un site urbain faiblement contaminé au zinc, cadmium, cuivre, plomb, nickel et manganèse a été sélectionné. Sur ce terrain, deux espèces végétales ont été plantées, le clone européen 5027 du *Salix viminalis* et le clone "Unal" de l'hybride *Populus × generosa* A Henry. Certaines plantes ont été inoculées avec un champignon MA très répandu et commercialement disponible, du *Glomus intraradices*, alors que d'autres plantes ont été utilisées comme témoins. Lors de la première saison de croissance (2006), les plantes ont démontré une capacité à croître sur ce site contaminé où les conditions sont non favorables (Lefebvre 2007). De plus, une accumulation modérée du cadmium et du zinc ont été mesurée dans les parties aériennes des plantes. L'inoculation du *G. intraradices* a amélioré la croissance des clones végétaux, sans toutefois augmenter la capacité d'accumulation des métaux dans les tissus aériens des plantes (Lefebvre 2007). J'ai suivi cette expérimentation une seconde année, afin de vérifier si l'accumulation des métaux dans les tissus des plantes, la croissance des plantes, le taux de colonisation des racines par des champignons MA, ainsi que l'impact de l'inoculation du *G. intraradices* sont des effets persistants et s'ils vont s'estomper ou s'accroître avec le temps. De plus, j'ai tenté d'étudier l'effet de l'inoculation du *G. intraradices* sur la structure des communautés des champignons MA autochtones de ce site contaminé. De façon plus détaillée, les objectifs de ce travail sont présentés dans la section subséquente.

1.5 Objectifs¹

1) Analyser le potentiel de phytoextraction des métaux lourds de deux clones de plantes à croissance rapide, le *S. viminalis* (5027) et le *P. × generosa*, après deux saisons de croissance sur un brownfield perturbé et faiblement contaminé aux métaux lourds.

- Évaluer le taux de survie des plantes sur un brownfield perturbé et contaminé.
- Juger des capacités de production de biomasse de ces plantes.
- Vérifier la capacité d'extraction des métaux lourds par les deux clones végétaux.
- Déterminer dans quelles parties des plantes (feuilles, tiges ou racines) les métaux lourds sont accumulés en plus grandes concentrations.
- Évaluer pour quel métal la stratégie de phytoextraction par des plantes à croissance rapide est réalisable.
- Comparer l'ensemble des résultats avec ceux obtenus après une saison de croissance et juger de l'efficacité de l'approche à plus long terme.

2) Étudier l'effet de l'inoculation du *G. intraradices* en combinaison avec les *S. viminalis* (5027) et *P. × generosa*.

- Mesurer si la production de biomasse des plantes est influencée par l'inoculation initiale du *G. intraradices*.
- Évaluer si la capacité des plantes à prélever des contaminants inorganiques est affectée par l'association avec le *G. intraradices*.
- Comparer l'affinité des clones pour la colonisation par le *G. intraradices*.

3) Évaluer la structure des communautés de champignons MA associés aux racines de *Salix* et de *Populus* inoculés ou non avec le *G. intraradices* sur un brownfield perturbé et faiblement contaminé aux métaux lourds.

¹ Les objectifs 1 et 2 correspondent aux Chapitre 2 de ce mémoire. Alors que la description de l'expérience et les résultats répondant à l'objectif 3 sont rassemblés dans l'annexe 2.

1.6 Site étudié

Le site étudié est situé sur l'île de Montréal, dans le quartier St-Henri de l'arrondissement Sud-Ouest. Ce site, connu sous le nom de l'Allée des tanneries, est situé au N 45°28'314 W 073°35'708. Il s'agit d'un site récréatif ayant un passé industriel. Du côté sud se trouve la voie ferrée du Canadien National, au nord et à l'est des zones résidentielles et à l'ouest un terrain vacant. Le site plutôt plat est colonisé par une végétation spontanée variée. Des dépôts polygéniques de sol de sources inconnues ont été ajoutés sur plus d'un mètre et demi de profondeur lors de travaux de réaménagement en 2004. Le type de remblai est constitué principalement de silt et de sable. Cet horizon est mélangé à quelques centimètres de matière organique discontinus. Le sol est compact et contient une quantité importante de roches de diamètre supérieur à 5 cm. Des analyses du sol ont démontré la présence de plusieurs métaux lourds : cuivre, zinc, cadmium, manganèse, nickel et plomb. Toutefois, les concentrations de ces métaux ne dépassent pas les limites permises (i.e. critère B) par le gouvernement du Québec pour des zones résidentielles (MENV 1999).

1.7 Matériel biologique

Deux clones de plantes à croissance rapide ont été sélectionnés pour cette expérimentation. Soit un clone de peuplier hybride *Populus × generosa* A Henry "Unal" et un clone de saule européen *Salix viminalis* (5027). Ces deux clones sont reconnus pour leur production importante de biomasse aérienne et souterraine et leur capacité à emmagasiner des métaux dans leurs tissus (Dickinson et Pulford 2005; French et al. 2006; Rosselli et al. 2003). Le *Glomus intraradices* Schenck and Smith (MYKE®, Premier Tech Biotechnologies, Rivière-du-Loup, Canada), a été choisi pour infecter une partie des plantes du dispositif. Cette souche commercialisée a été isolée à Pont-Rouge dans la région de Québec. Cette espèce de champignon mycorhizien à arbuscules (MA) est très abondante, croît rapidement et une formulation commerciale contenant cette espèce est homologuée et commercialisée dans plusieurs pays, incluant le Canada.

CHAPITRE 2: Phytoextraction of heavy metals by two Salicaceae clones in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi during the second year of a field trial

2.1 Abstract

We evaluated the potential for the phytoextraction of heavy metals (HM) by *Salix viminalis* (5027) and *Populus × generosa* in association, or not, with the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus *Glomus intraradices* during a second year of growth in a randomized complete block field trial set up in a slightly contaminated site. Both plant clones produced high aboveground biomass yield, however *P. × generosa* produced significantly more biomass than the willow clone. The two plant clones accumulated high concentration of Cd and Zn in their shoots while Cu, Mn, Ni and Pb were limited to roots. In general, *S. viminalis* accumulated higher concentrations of HM. The inoculation of *G. intraradices* on the previous year did not influence the plant clones biomass yield during a second growing season. However, Cu and Cd translocation to the shoots was limited, and Cu was preferentially concentrated in roots of inoculated plants, compared to non-inoculated plants which were also colonized by native AM fungi taxa. Efficiency of *S. viminalis* and *P. × generosa* for Cd and Zn rehabilitation in moderately contaminated soil has been demonstrated but mycorrhizal inoculation did not significantly increased the HM extraction.

2.1.1 Keywords

Heavy metal, phytoextraction, *Salix viminalis*, hybrid poplar, arbuscular mycorrhizal fungi

2.2 Introduction

Phytoextraction refers to the transfer of inorganic contaminants, mainly heavy metals (HM), from the soil to the plant harvestable aboveground tissues (Kumar et al. 1995). This technique was proposed for the clean up of contaminated sites. It is an “in situ”, environment-friendly technique which involves reduced costs and low maintenance (Chaudhry et al. 2005). Site continuous vegetation cover results in soil stabilization and reduced risk of contaminants erosion, dispersion or leaching (Hammer et al. 2003). Additionally, it is one of the unique soil decontamination technique which preserves soil structure and microbial community (Pulford and Watson 2003).

Hyperaccumulator plants can be used in phytoextraction; these plants are capable of accumulating HM in concentrations over 100 times higher than those measured in other plant species (Salt et al. 1998). Unfortunately, the use of such plants is generally limited by their slow growth, little biomass yield and shallow root systems which restrict the amount of HM removed from the soil. Therefore, fast growing woody plants with moderate capacity to accumulate HM but characterized by high biomass yields, high transpiration rates and widely spread root systems are more appropriate candidates for phytoextraction (Kumar et al. 1995; Landberg and Greger 1996; Pulford and Watson 2003). Numerous species or clones belonging to the genera *Salix* and *Populus* feature these characteristics (Dos Santos Utmazian et al. 2007; French et al. 2006; Robinson et al. 2000; Stoltz and Greger 2002; Unterbrunner et al. 2007). The phytoextraction potential of *Salix* and *Populus* species or clones has been studied in hydroponics systems (e.g., Dos Santos Utmazian et al. 2007; Kuzovkina et al. 2004; Punshon and Dickinson 1997), in pot experiments (e.g., Dos Santos Utmazian and Wenzel 2007; Fischerová et al. 2006; Klang-Westin and Perttu 2002; Meers et al. 2007; Sasaki et al. 2001; Wieshammer et al. 2007) and in field trials (e.g., Felix 1997; Laureysens et al. 2004; Laureysens et al. 2005; Meers et al. 2005; Meers et al.

2003; Nissen and Lepp 1997; Vandecasteele et al. 2002). These experiments have demonstrated large variances in HM tolerance and translocation capacities between *Salix* and *Populus* species and clones (Dickinson and Pulford 2005; Unterbrunner et al. 2007). In species and clones showing good potential, Zn, Cd and least often Ni and Mn are translocated in high concentrations to the aboveground tissues, while Pb and Cu are mainly accumulated in the roots (Dickinson and Pulford 2005; Lefebvre 2007; Pulford et al. 2002; Pulford and Watson 2003; Rosselli et al. 2003; Vandecasteele et al. 2004). However, longer termed phytoextraction field trials investigating poplars and willows clones are scarce, and more studies are required to fully acknowledge their potential (French et al. 2006; Hammer et al. 2003; Kayser et al. 2000; Maxted et al. 2007).

A practice which could enhance phytoextraction efficiency is the inoculation of plant roots with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi (Gaur and Adholeya 2004; Göhre and Paszkowski 2006; Khan 2005; Leyval et al. 1997). The AM symbiosis is the association between plants and a group of fungi forming the *Glomeromycota* phylum (Schüßler et al. 2001). These obligate biotrophs form a symbiotic association with the roots of the vast majority of plant species and are found in nearly all terrestrial ecosystems. They act as root extensions that increase the volume of soil influenced and exploited by plants, supplying mineral nutrients to their host, especially phosphorus, enhancing water uptake and reducing the impact of root pathogens (Beauregard et al. 2008; St-Arnaud and Vujanovic 2007). Hence, these fungi improve general plant health, growth and stresses resistance in harsh conditions generally found in contaminated soil (Leyval et al. 1997). Enhancement of the plant growth by the AM symbiosis as been reported in contaminated field (Lefebvre 2007; Lingua et al. 2008; Wang et al. 2005). However, with regards to HM accumulation, the AM symbiosis was shown to either (i) increases metals bioaccumulation in aboveground tissues of the host plant (Davies et al. 2001; Díaz et al. 1996; Guo et al. 1996; Joner and Leyval 2001; Liao et al. 2003) or contrarily (ii) to reduces metals concentrations in the plant host shoot (Heggo et al. 1990; Lefebvre 2007; Vogel-Mikus et al. 2006; Wang et al. 2007). From a throughout analysis of the

literature, it was recently proposed that the AM fungi hyphal network is more likely to enhance plant uptake of most HM at low soil concentrations, while at high HM concentration the fungal symbiosis reduces bioavailability via metal-binding processes thus lowering HM uptake and decreasing toxicity for plants (Audet and Charest 2007). Overall, the effects of AM fungi on plant productivity and HM translocation and accumulation are dependant on factors such as AM fungi species and isolates, host plant species and HM types and availability (Audet and Charest 2008; Jankong and Visoottiviseth 2007; Leyval et al. 1997; Lingua et al. 2008; Malcova et al. 2003).

Little attention has been paid to the association of fast growing plants with mycorrhizal fungi for HM phytoextraction purposes. Sell et al. (2005) reported enhanced Cd uptake by *Populus canadensis* when associated with an ectomycorrhizal fungal species (*Paxillus involutus*), whereas Cd uptake remained unchanged in *Salix viminalis* (clone 78198) when associated with the same ectomycorrhizal fungi. On the other hand, Baum et al. (2006) reported higher Cd, Zn and Cu concentrations in the stems of *Salix × dasyclados* (clone SDHM) associated with an ectomycorrhizal fungi (*P. involutus*). To our knowledge, the phytoextraction capacity of willow or poplar associated with AM fungi have only been studied by Lingua et al. (2008) and our laboratory (Labrecque et al. 2006; Lefebvre 2007). Lingua et al. (2008) reported that *Populus alba* Villafranca clone inoculated with *Glomus mosseae* or *Glomus intraradices* accumulated lower Zn concentration; *Populus nigra* Jean Pourtet clone also accumulated lower Zn concentration when inoculated with *G. mosseae* whereas its Zn concentration remained unchanged when inoculated with *G. intraradices*. In previous researches, we also observed that *G. intraradices* did not modified the metal concentrations of *S. viminalis* (5027) and *Populus* NM5 (*P. nigra* × *P. maximowiczii*) grown in pot (Labrecque et al. 2006), whereas in a field experiment, Cu stem and Cd aboveground concentrations were reduced in *S. viminalis* (5027) and *Populus* × *generosa* when inoculated with *G. intraradices* at planting (Lefebvre 2007).

The present study aims to evaluate longer term HM (Cd, Zn, Cu, Mn, Ni and Pb) phytoextraction potential of two woody plant clones belonging to the genera *Salix* and *Populus* inoculated or not with a commercial AM fungal inoculum containing *G. intraradices*. The data were collected during the second year of an 18 months field experiment set on an urban brownfield contaminated with HM. The specific objectives were firstly to investigate (i) HM accumulation in aboveground and underground plant tissues, (ii) plant responses to AM inoculation and (iii) plant biomass production; and secondly to compare the plant performances with those observed during the year of planting (Lefebvre 2007) in order to evaluate the persistence over two years of effects measured during the initial plant establishment.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Site description

A field experiment was established on an urban site located on the island of Montreal, in the province of Quebec, Canada (45°28'314 N, 73°35'708 W) in May 2006 (Lefebvre 2007). This brownfield has been polluted as a result of a long industrial history. The site was delimited by the Canadian National rail road, abandoned fields and a residential zone. The selected site was restructured in 2004 when the soil surface was covered by 1.5 m of polygenic soil mixed with some organic matter. This open field has a flat topography and is potentially exposed to dry wind conditions. It was colonized by diverse ruderal species.

The Montreal region is characterized by a temperate and humid climate with an average growing season (May-October) temperature of 15.8 °C and a mean total annual precipitation of 979.1 mm (1971-2000, Montreal-Trudeau airport, meteorological station). The growing seasons of 2006 and 2007 were characterized by similar average temperatures (16.42 °C and 16.97 °C

respectively), which were slightly higher than normal. The 2006 annual precipitation (1343 mm) exceeded 2007 rainfall amount (999.6 mm), and both years were higher than normal.

2.3.2 Biological material and experimental design

Salix viminalis (5027) woody cuttings (100 cm in length) were obtained from Saule Magique enr. and *Populus × generosa* A Henry “Unal” cuttings (100 cm in length) were acquired from a provincial nursery of the Natural Resources Ministry of Quebec. A commercial inoculum of the AM fungus *Glomus intraradices* Schenck and Smith (MYKE®, Premier Tech Biotechnologies, Rivière-du-Loup, Canada) was used to inoculate half of the plants. The experimental design was a randomized complete block and included five blocks divided in four plots. The four levels of combinations (two woody clones and the inoculation treatments: with or without *G. intraradices*) were randomized in each block. Each plot received ten plants; therefore the experiment was composed of 200 plants: 2 woody plant clones × 2 inoculation treatments × 5 blocks × 10 replicates. For more clarity, a diagram of the experimental design is found in Annex 1. In May 2006, unrooted woody cuttings were planted at 30 cm in depth into the ground at 20 cm intervals in each 2 m long plot. At plantation, 1620 ml of mycorrhizal inoculum containing 500 spores per 100 ml were mixed thoroughly into the first 5 cm of the soil surface in each inoculated plot, while control plots received no inoculum. In April 2007, all plants were cut at 5 cm from the ground to simulate a harvesting cycle of a phytoremediation system and to facilitate the plant response comparison between the first and second year of growth.

Manual weeding was completed frequently while the plants were watered during drought periods only. Throughout the growing season we surveyed, twice every month, the incidence of insects potentially harmful to the plants and the

occurrence of phytotoxicity symptoms such as depressed growth, leaf withering and changes in foliar development or discoloration. An organic soap insecticide, 25 % alkanolamine salts of fatty acids (Green Earth ®), was used to control severe aphid infestations in June and July of 2007. The experiment was maintained until October 2007, i.e. 18 months from the establishment to the end of the second growing season.

2.3.3 Soil characteristics and analyses

In May 2006, two soil samples per plot were collected using a shovel, one at a depth of 0-20 cm and a second at a 20-40 cm depth. Soil samples were thoroughly homogenized and pooled to form one composite sample per soil depth (n=20). Before analyses, samples were dried at 70 °C and sieved (<2 mm). The pH, CEC (cation exchange capacity), organic matter fraction and soil granulometry are given in Table 2.1. The soil texture was defined as a sandy loam. Soil available P, K, Ca, Mg and Al were measured with a Mehlich-3 extractant and an inductively coupled plasma spectrophotometer (US EPA 1983). The characteristics of both layers of soil are rather similar. The soil is slightly alkaline and is poor in organic matter. CEC, mineral composition and base saturation are within normal range. In July 2006, one soil sample per plot was collected from the 0-40 cm soil layer; the 20 soil samples were thoroughly homogenized and pooled to form two replicates of composite sample. Subsequently, the soil was prepared as previously described for HM analyses. HM concentrations were determined by the block digestion technique after HNO₃ digestion for 5 h at 120 °C, using inductively coupled plasma mass spectrometry (IPC-MS) (Varian Ultramass 800, Varian, Australia) (Table 2.1). In order to insure optimal results, standardized reference tissues, replicated samples and blanks were present in all analyses. The soil analyses revealed the presence of six widespread HM: Zn, Cu, Cd, Pb, Ni and Mn, none of which exceeding the HM guideline values set by provincial regulations (MENV 1999).

Table 2.1 Physico-chemical characteristics and HM concentration in the soil.

Soil parameters	Soil depth		
	0-20 cm	20-40 cm	0-40 cm
pH	7.7	7.8	-
CEC (mEq per 100 g)	29.3	28.1	-
Organic matter (%)	5	4.9	-
P ¹ (kg ha ⁻¹)	97	121	-
K ¹ (kg ha ⁻¹)	568	649	-
Mg ¹ (kg ha ⁻¹)	418	408	-
Ca ¹ (kg ha ⁻¹)	12100	11600	-
Al ¹ (kg ha ⁻¹)	604	655	-
Saturation K (%)	2.2	2.6	-
Saturation Mg (%)	5.3	5.4	-
Saturation Ca (%)	92.5	92	-
Particle size distribution (%)			
Clay	18	22	-
Silt	23	24	-
Sand	59	54	-
Total HM concentration ² (mg kg ⁻¹)			
Pb	-	-	153
Mn	-	-	< 0.002
Ni	-	-	24.6
Cu	-	-	54.5
Zn	-	-	184.3
Cd	-	-	0.7

¹ Mehlich-3 extractions² HNO₃ extractions

2.3.4 Plant tissues sampling and analyses

In September 2007, two plants per plot were randomly selected and the stems and leaves were separately harvested. Plant tissues were oven dried for 48 h at 70 °C, then leaf and stem dry weights were measured. The dry tissues were grounded into powder, homogenized and samples from each plot were pooled. The composite samples (0.2 g) were digested with HNO₃ and Zn, Cu, Cd, Mn, Ni and Pb concentrations were determined by ICP-MS. The total metal uptake into leaves and stems was computed for each HM by multiplying tissue concentration (mg kg⁻¹) by the tissue dry weight (mg). A biological concentration factor (BCF) was also calculated for each metal. BCF was defined as the ratio of HM concentration in plant tissues by the HM concentration (HNO₃ extractable) in soil. In September 2007, a 20 cm deep, 1 m length and 40 cm wide trench was dug along the base of the plants in each plot. All roots found in this trench were collected. Then, each trench was excavated for a supplementary 20 cm in depth and roots found in the 20-40 cm underneath layer were separately collected. Roots were washed under tap water, homogenized and divided in two parts. A first part was dried, digested and analyzed for HM content. The other half was used to estimate the percentage of roots length bearing AM fungal colonization at the 0-20 cm and 20-40 cm layers. To this end, roots were cut in small pieces, homogenized and a sub-sample was cleared with 10 % KOH (1 h at 90 °C) and stained with Schaeffer black ink in a 5 % vinegar solution (30 min at 90 °C) (Vierheilig et al. 1998). Percentages of total roots length bearing mycorrhizal colonization were calculated at 20-50 × magnification, according to the gridline intercept method (Giovannetti and Mosse 1980). At the end of the second growing season (October 2007), the height of each plant main stem was measured and the plant survival rate was assessed.

2.3.5 Statistical analyses

The effect of woody plant clone and AM inoculation on leaf and stem biomasses, leaf, stem and root metal concentrations, leaf and stem metal uptakes, BCF, and percentage of root length bearing mycorrhizal colonization were investigated by analysis of variance (ANOVA) using GLM procedures of the SAS system for Windows software, version 9.1 (SAS Institute, Cary, NC). The statistical model included block, plant clone, *G. intraradices* inoculation treatment and the interaction terms. *A posteriori* comparisons of means were performed by Tukey's studentized range tests at 5 % level of significance. To compare plant biomass yield and aboveground metal concentration between the two years, we conducted paired t-tests using the JMP 6.0.0 software. Also, we tested if the BCF values were significantly different from 1.

2.4 Results

2.4.1 Plants growth and mycorrhizal colonization

After the second growing season, plant survival was overall 83 % (Table 2.2). *S. viminalis* clone survival rate was significantly superior to *P. × generosa* ($p=0.0240$) independently of the inoculation treatment. The plants did not show sign of phytotoxicity. The second year of growth, *P. × generosa* clone produced significantly more aboveground biomass than the *S. viminalis* clone (Fig. 2.1). In fact, *P. × generosa* clone yielded up to five times more dry mass than *S. viminalis* clone. *P. × generosa* clone reached a maximum of 4.5 m in height, while the tallest *S. viminalis* clone reached 2.6 m. No significant difference was found between the aboveground dry biomasses of inoculated and non-inoculated plants. Non-inoculated *P. × generosa* plants produced significantly more dry mass the second growing season than during the first, while inoculated *P. × generosa* plants produced similar biomass both growing seasons (Table 2.3). *S. viminalis* clones also produced similar dry weight of stem tissue both years,

while its foliar biomass was significantly reduced the second growing season. However, large colonies of *Tuberolachnus salignus* Gmelin (Giant willow aphids) induced a high level of leaf mortality on *S. viminalis* clones during the months of June and July of the second year of growth.

Table 2.2 Survival rates of the *P. × generosa* and *S. viminalis* clones, inoculated (Gi) or non-inoculated (Ctrl) with *G. intraradices*, in September 2007.

Clones	Inoculation	Survival (%) ¹
<i>P. × generosa</i>	Gi	80 a
	Ctrl	74 a
<i>S. viminalis</i>	Gi	86 b
	Ctrl	92 b
Overall		83

¹ Survival rates followed with a different letter are significantly different ($p < 0.05$). No significant difference was found between inoculation treatments ($p < 0.05$) ($n = 20$).

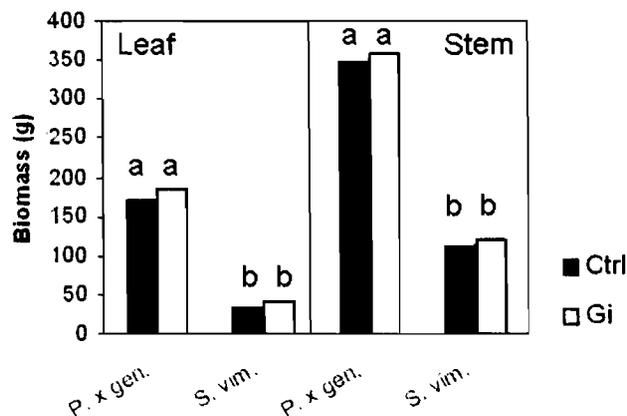


Fig. 2.1 Dry leaf and stem biomass production of *P. × generosa* and *S. viminalis* clones, non-inoculated (Ctrl) or inoculated (Gi) with *G. intraradices*, measured in September of the second year. Within each tissue, columns with a different letter are significantly different at $p < 0.05$; there was no significant difference between inoculation treatments ($n = 40$). Leaves and stems were not statistically compared with each others.

Table 2.3 Results of paired t-tests comparing *S. viminalis* and *P. × generosa* biomass production (leaves and stems) and aboveground plant metal accumulation (leaves and stems) of inoculated (Gi) and non-inoculated (Ctrl) plant between the first (1) and second (2) year of growth in the field.

Comparison between both years of growth ^{1,2}									
Clones	Tissues	Inoculation	Biomass	Metal concentration					
				Cd	Zn	Cu	Mn	Pb	Ni
<i>P. × generosa</i> ³	Leaves	Gi	1=2	1=2	1=2	1=2	1=2	1=2	1=2
		Ctrl	1<2*	1=2	1=2	1=2	1=2	1=2	1=2
	Stems	Gi	1=2	1=2	1=2	1=2	1=2	1=2	1=2
		Ctrl	1<2*	1=2	1=2	1=2	1=2	1=2	1=2
<i>S. viminalis</i>	Leaves	Gi	1>2*	1=2	1=2	1=2	1=2	1<2**	1<2*
		Ctrl	1>2*	1=2	1=2	1=2	1=2	1<2*	1<2**
	Stem	Gi	1=2	1<2**	1<2**	1<2**	1=2	1=2	1=2
		Ctrl	1=2	1<2*	1<2**	1<2*	1<2*	1=2	1<2*

¹ p values: * p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.01.

² Data of the first year (2006) were retrieved from Lefebvre (2007).

³ Analyses were completed separately for each combination of clone and inoculation treatment.

After two growing seasons in the field, the percentages of root length bearing mycorrhizal colonization significantly differed between the two woody plant clones at the two sampling depths, independently of the inoculation treatment (Table 2.4). In the 0-20 cm soil depth, *P. × generosa* colonization rates ranged from 34 to 59 %, while the *S. viminalis* clone showed significantly lower percentages of root length bearing mycorrhizal structures, varying from 1 to 14 %. In the deeper soil layer (20-40 cm), *P. × generosa* root length bearing mycorrhizal structures varied between 22 to 51 %, while *S. viminalis* had significant lower colonization percentages, ranging from 0 to 6 %. Inoculation with *G. intraradices* resulted in slightly increased colonization percentages at both soil depths compared to the non-inoculated control plants, but the differences were not significant. For both plant clones, with or without the initial inoculation of *G. intraradices*, the roots found in the deeper soil layer showed significantly less mycorrhizal colonization than the superficial roots (p=0.0202).

Table 2.4 Percentage of root length bearing AM fungi structures of the *S. viminalis* and *P. × generosa* clones, inoculated (Gi) or non-inoculated (Ctrl) with *G. intraradices* at planting, in the surface (0-20 cm) and underneath (20-40 cm) soil layers.

Clones	Inoculation	Mycorrhizal root colonization (%) [†]	
		Surface (0-20 cm)	Underneath (20-40 cm)
<i>P. × generosa</i>	Gi	48.88 a	40.2 a
	Ctrl	44.6 a	36.6 a
<i>S. viminalis</i>	Gi	5.8 b	2.8 b
	Ctrl	4.8 b	2.6 b

[†] Means followed with a different letter are significantly different ($p < 0.001$). No significant difference was found between inoculation treatments ($p < 0.05$) ($n = 20$). For both clones and inoculation treatments, the AM colonization was significantly lower at the deeper soil layer ($p = 0.0202$).

2.4.2 Metal contents

Over the second growing season, *S. viminalis* clones had similar Cd concentration in their leaves, but significantly higher concentration in their stems, than *P. × generosa* clones (Fig. 2.2 and Table 2.5). In both plant clones, AM inoculation had no significant overall effect on Cd shoot concentrations. However, in superficial roots, there was a significant interaction for Cd concentrations between plant clones and mycorrhizal inoculation treatments. The non-inoculated *S. viminalis* clone had significantly higher Cd concentrations in their surface roots than *P. × generosa* clone, while Cd concentrations were similar between clones in the plants inoculated with *G. intraradices*. In the deeper roots, *S. viminalis* had significantly higher Cd concentrations than *P. × generosa* independently of the inoculation treatment, while mycorrhizal

inoculation had no significant effect on Cd concentrations in both clones. No significant difference was found between *P. × generosa* and *S. viminalis* metal uptakes (Table 2.6). Also, the initial inoculation with *G. intraradices* did not significantly modify leaf Cd uptakes. No significant differences in stem Cd uptakes were measured between the plant clones or between the inoculated and non-inoculated plants. The Cd BCF of leaf ranged from 1.40 to 6.89 and were significantly similar in the two plant clones; however, the non-inoculated control plants had marginally but significant higher leaf BCF than the inoculated ones (Table 2.7). Whereas, the Cd stem BCF ranged from 0.89 to 8.09 and were significantly higher for the *S. viminalis* than the *P. × generosa* clones, and the non-inoculated plants had a significantly higher stem BCF than the inoculated plants. Only the Cd BCF in the aerial tissues of *S. viminalis* clones were found to be significantly superior to 1 (Table 2.7). Both growing seasons, Cd was measured in significantly similar concentration in the aboveground tissues of the plant clones, excepted in *S. viminalis* stems where the Cd accumulation was significantly higher the second year of growth (Table 2.3).

At the end of the second growing season, foliar Zn concentration did not significantly differ between plant clones or inoculation treatments (Fig. 2.2 and Table 2.5). Zn concentrations measured in stems and roots from the two soil depths were significantly higher in *S. viminalis* clones compared to the concentrations measured in *P. × generosa* clones. Inoculation with *G. intraradices* at plantation had no effect on the Zn concentration in the leaves, stems and roots of both plant clones. Zn uptake in the aerial tissues did not significantly differ between plant clones or inoculation treatments (Table 2.6). The Zn BCF in foliage ranged from 0.48 to 2.47 while the Zn stem BCF ranged from 0.42 to 1.54; Zn leaf BCF were not significantly different between clones or inoculation treatments, while Zn stem BCF was significantly higher for *S. viminalis* than *P. × generosa* clones but did not differ between inoculation treatments (Table 2.7). Statistically, Zn was significantly bioaccumulated in the aerial tissues of only non-inoculated *S. viminalis* (Table 2.7). Zn was measured in

significantly similar concentration in both clone aboveground tissues after each growing season, except in *S. viminalis* stem where Zn accumulation was significantly higher after the second year of growth (Table 2.3).

Cu concentration measured in *S. viminalis* leaves after the second growing season were significantly higher than in *P. × generosa*, while mycorrhizal inoculation had no influence on this parameter (Fig. 2.2 and Table 2.5). *S. viminalis* had also significantly higher Cu concentrations than *P. × generosa* in stems, and in both superficial and deeper roots. Interestingly, the inoculation with *G. intraradices* produced marginally ($p=0.08$) significant higher Cu concentrations in the superficial roots than in the non-inoculated plants. No significant inoculation effect was measured in the stems and in the deeper root systems. At the end of the second growing season, Cu uptake in *P. × generosa* leaves was significantly higher than in the *S. viminalis* clone; however, no difference was found in stem concentrations between clones or inoculation treatments (Table 2.6). The Cu leaf and stem BCF varied from 0.05 to 0.34 (Table 2.7). Cu leaf BCF did not differ between clones, but Cu stem BCF was significantly higher in *S. viminalis* than *P. × generosa* clones. Also, plants initially inoculated with *G. intraradices* showed significantly lower leaf and stem Cu BCF than non-inoculated plants. Cu concentration in both clone aboveground tissues did not significantly differed between the two growing seasons, except in *S. viminalis* stem where Cu accumulation was significantly higher at the end of the second growing season (Table 2.3).

Mn, Pb and Ni concentrations were significantly higher in *S. viminalis* aerial tissues than in *P. × generosa* tissues (Fig. 2.2 and Table 2.5), except Pb concentration in stems that was similar between plant clones. The concentration of these metals in roots did not differ between clones. Inoculation of *G. intraradices* did not modify the Mn, Pb and Ni concentrations in leaves, stems and roots. At the end of the second growing season, Pb and Ni uptakes were not significantly different between clones or inoculation treatments (Table 2.6).

However, Mn uptake was significantly higher in *P. × generosa* leaves and stems than in *S. viminalis* clone, while no effect of mycorrhizal inoculation was measured. The BCF of these metals were all below 1 (Table 2.7). Leaf BCF for Ni and Mn, and the stem BCF for Ni were significantly higher for the *S. viminalis* than the *P. × generosa* clones, while the stem BCF for Mn did not differ between clones. Leaf and stem BCF of Mn and Ni did not differ between inoculation treatments. Pb leaf BCF in *P. × generosa* clone was not influenced by mycorrhizal inoculation, while in *S. viminalis* clone, Pb leaf BCF was significantly lower in inoculated than in non-inoculated plants. There was a significant interaction between plant clones and inoculation treatments for Pb BCF in foliage. However this effect was not measured for the stem BCF for Pb which did not differ between clones or inoculation treatments. Mainly, the concentration of these metals in plant aboveground tissues did not significantly differed between both growing seasons (Table 2.3). Although the second year of growth Mn concentration was significantly higher in *S. viminalis* stem, while Ni concentration was significantly higher in stem of non-inoculated *S. viminalis* plants, Ni concentration was also significantly higher in *S. viminalis* leaves as was Pb.

Fig. 2.2² HM (Cd, Zn, Cu, Mn, Pb and Ni) concentrations measured in *P. × generosa* and *S. viminalis* clones tissues, inoculated (Gi) or non-inoculated (Ctrl) with *G. intraradices*. In the Cu, Mn, Ni and Pb graphs, the surface (S. roots) and underneath (D. roots) root layers, HM concentrations have been multiplied by the number written above the columns in order to improve visualization. Statistical comparisons between treatments are given in Table 2.5. Tissues were not statistically compared with each others (n=40 for leaves, n=60 for stems and roots).

² The figure 2.2 is found at the following page.

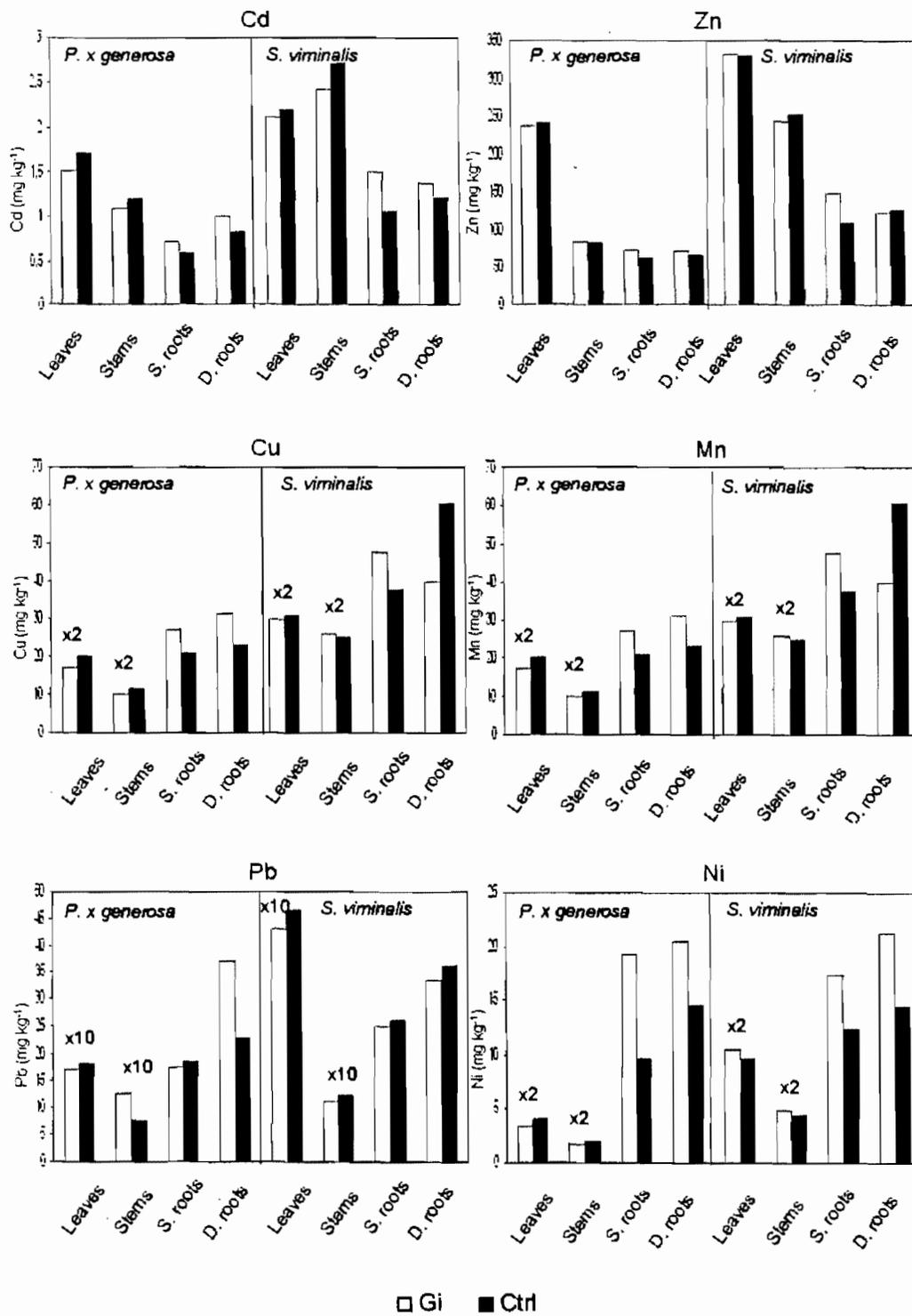


Fig. 2.2

Table 2.5 Analysis of variance of the HM concentrations (Cd, Zn, Cu, Mn, Ni and Pb) in plant tissues (leaves, stems, surface roots and underneath roots). Within each plant tissue, differences were tested between *S. viminalis* (Sv) and *P. × generosa* (Pg) clones, and between plants inoculated (Gi) or non-inoculated (Ctrl) with *G. intraradices*.

Tissues	ANOVA comparisons ¹							
	Leaves		Stems		Surface roots		Underneath roots	
Metals	Clones	Inoculation	Clones	Inoculation	Clones	Inoculation	Clones	Inoculation
Cd	Sv=Pg ²	Gi=Ctrl	Sv>Pg***	Gi=Ctrl ²	Gi: Sv=Pg**	Gi=Ctrl	Sv>Pg**	Gi=Ctrl
					Ctrl: Sv>Pg**			
Zn	Sv=Pg ²	Gi=Ctrl	Sv>Pg***	Gi=Ctrl	Sv>Pg*	Gi=Ctrl	Sv>Pg**	Gi=Ctrl
Cu	Sv>Pg**	Gi=Ctrl	Sv>Pg***	Gi=Ctrl	Sv>Pg*	Gi=Ctrl ²	Sv>Pg*	Gi=Ctrl
Mn	Sv>Pg**	Gi=Ctrl	Sv>Pg*	Gi=Ctrl ²	Sv=Pg	Gi=Ctrl	Sv=Pg	Gi=Ctrl
Ni	Sv>Pg***	Gi=Ctrl	Sv>Pg*	Gi=Ctrl	Sv=Pg	Gi=Ctrl	Sv=Pg	Gi=Ctrl
Pb	Sv>Pg***	Gi=Ctrl	Sv=Pg	Gi=Ctrl	Sv=Pg	Gi=Ctrl	Sv=Pg	Gi=Ctrl

¹ Significance level ANOVA: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ (n=40 for leaves, n=60 for stems and roots).

² ANOVA comparisons marginally significant, $0.05 < p \leq 0.1$.

Table 2.6 Mean leaf and stem HM uptakes of *S. viminalis* (Sv) and *P. × generosa* (Pg) clones inoculated (Gi) or non-inoculated (Ctrl) with *G. intraradices*, in 2007 (n=20).

Clones	Tissues	Inoculation	HM uptakes (mg plant ⁻¹) ¹					
			Cd	Zn	Cu	Mn	Pb	Ni
<i>P. × generosa</i>	Leaves	Gi	0.349	46.373	1.685	3.541	0.333	0.317
		Ctrl	0.313	43.760	1.785	3.623	0.314	0.364
	Stems	Gi	0.492	29.352	1.898	2.724	0.557	0.226
		Ctrl	0.452	30.183	2.034	3.137	0.283	0.383
<i>S. viminalis</i>	Leaves	Gi	0.092	14.577	0.613	1.392	0.183	0.217
		Ctrl	0.078	10.863	0.509	1.109	0.155	0.148
	Stems	Gi	0.282	29.476	1.522	1.227	0.127	0.299
		Ctrl	0.340	28.359	1.362	1.228	0.128	0.240
Statistics ²	Leaves	Clones	Sv=Pg ³	Sv=Pg ³	Sv<Pg*	Sv<Pg**	Sv=Pg ³	Sv=Pg
		Inoculation	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl
	Stems	Clones	Sv=Pg	Sv=Pg	Sv=Pg	Sv<Pg*	Sv=Pg	Sv=Pg
		Inoculation	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl

¹ HM uptakes = dry biomass × metal concentration in tissue.

² ANOVA comparisons: * p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001.

³ Marginally significant (0.05 < p ≤ 0.1).

Table 2.7 Mean biological concentration factors (BCF) in the leaves and the stems of *P. × generosa* (Pg) and *S. viminalis* (Sv) clones, inoculated (Gi) or non-inoculated (Ctrl) with *G. intraradices*, at the end of the second growing season (n=20).

Clones	Tissues	Inoculation	Biological concentration factor ^{1,2}					
			Cu	Cd	Zn	Mn	Ni	Pb
<i>P. × generosa</i>	Leaves	Gi	0.15	2.56	1.24	0.04	0.06	0.014
		Ctrl	0.21	3.29	1.35	0.05	0.08	0.012
	Stems	Gi	0.09	1.87	0.44	0.09	0.01	0.030
		Ctrl	0.12	2.31	0.46	0.02	0.01	0.038
<i>S. viminalis</i>	Leaves	Gi	0.22	2.97³	1.52	0.07	0.19	0.025
		Ctrl	0.29	4.41³	1.76³	0.08	0.17	0.037
	Stems	Gi	0.19	3.30³	1.12	0.02	0.01	0.083
		Ctrl	0.24	5.50³	1.35³	0.02	0.01	0.081
	Leaves	Clones	Sv=Pg	Sv=Pg	Sv=Pg	Sv>Pg**	Sv>Pg**	Ctrl:Sv>Pg***
Statistics ⁴								Gi:Sv>Pg**
		Inoculation	Gi<Ctrl*	Gi=Ctrl ^d	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl	Sv:Gi<Ctrl**
								Pg:Gi=Ctrl
	Stems	Clones	Sv>Pg*	Sv>Pg**	Sv>Pg**	Sv=Pg	Sv>Pg*	Sv=Pg
		Inoculation	Gi<Ctrl*	Gi<Ctrl*	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl	Gi=Ctrl

¹ Biological concentration factor = tissue concentration / soil concentration.

² Values in bold are active bioaccumulation (>1).

³ Values significantly superior to 1.

⁴ ANOVA comparisons: * p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001.

2.5 Discussion

This study demonstrated that *P. × generosa* and *S. viminalis* can be established successfully and produce large amounts of biomass in a disturbed and contaminated brownfield. Moreover, the results confirmed the capacity of *S. viminalis* and *P. × generosa* to uptake soil HM in their tissues. Cd and Zn were actively bioaccumulated in the plant aerial tissues, mainly in the leaves, while Cu, Pb, Ni and Mn were stored in the plant roots. The plant aboveground biomass was not influenced, during the second year of growth, by the inoculation of *G. intraradices* on the previous year, contrarily to the effect observed on the plantation year (Lefebvre 2007). Still, the results suggest the persistence of the effect of *G. intraradices* inoculated the first year, since the second year of growth, as in the previous year, the initial inoculation affected both plant clones by decreasing Cu and Cd translocation to the shoots and enhancing Cu accumulation in the plant root systems. Also in *S. viminalis* clone, Pb translocation to the leaves was limited in plants initially inoculated.

During this field pilot experiment, Cd and Zn were accumulated in high concentrations in the clone aerial tissues. Even though this study was conducted in slightly alkaline soil condition (7.8) and that high pH causes low mobility and reduced availability of the soil HM (Kabata-Pendias 2004), Cd and Zn extraction was relatively elevated. Cd concentration measured in the foliar tissues were above normal, but did not reach the toxic level defined as 5-30 mg kg⁻¹ for this metal, whereas, Zn concentration was higher than the toxic level defined at 100-400 mg kg⁻¹ (Kabata-Pendias 2001). The present study validates that *S. viminalis* and *P. × generosa* are Cd and Zn accumulators as their aboveground tissue concentrations were higher than those found in the soil. Several *Salix* and *Populus* clones have been reported to be Zn and Cd accumulators (Lingua et al. 2008; Punshon and Dickinson 1997; Rosselli et al. 2003; Stoltz and Greger 2002; Vandecasteele et al. 2005). Very little annual variations of Zn and Cd

concentrations in aboveground tissues of willow and poplar clones were observed by Unterbrunner (2007) and Jensen et al. (2009), which is mostly in accordance with the present results where approximately similar concentrations were measured for the two years in *P. × generosa* aboveground tissues and *S. viminalis* foliar tissues. Interestingly, an increase through time of both Cd and Zn concentrations in *S. viminalis* stem tissues was measured. To our knowledge, such increase has not been reported previously. Contrarily, significant metal concentration declines with time in *Salix* clones were measured by Wieshammer et al. (2007), Hammer et al. (2003) and Pulford et al. (2002). However, unlike most of these studies, in the present experiment the aerial biomass was harvested after one year of growth; consequently the result of the second year are from the new shoots which grew from the stump, which could have influence the plants uptake capacities.

In the present study, mean BCF for Cd and Zn were higher than 1, which demonstrates active Cd and Zn transfer from the soil to the plant aboveground tissues. *S. viminalis* Cd and Zn BCF were significantly superior to 1, this is in accordance with other studies which reported high Cd and Zn BCF for *Salix* clones growing on moderately contaminated soils (Dickinson and Pulford 2005; Meers et al. 2003). Whereas, in the present study, even though the Zn and Cd means BCF of *P. × generosa* were above 1, there were not significantly superior to 1. Furthermore, these metals were more accumulated in the leaves of *P. × generosa* than in its lignified tissues, therefore since the plant harvest occurred during winter, the amount removed from the system by this plant clone would not be very satisfactory, and consequently we agree with authors who suggested that the biomass harvest should happen before leaf fall (Dickinson 2002; Maxted et al. 2007; Meers et al. 2003; Vysloužilová et al. 2003). In this study, the BCF in foliage range for Cd was 1.4-6.89 and the stem BCF ranged from 0.89-8.09 in an average soil concentration of 0.62 mg Cd kg⁻¹, while the ranges of Zn BCF in foliage was 0.48-2.47 and was in the stem 0.42-1.54 in an average soil concentration of 199.87 mg Zn kg⁻¹. In a pot experiment Roselli et al. (2003)

measured for Cd a mean leaf BCF of 0.83 and a mean stem BCF of 0.72, and for Zn a leaf BCF of 0.37 and a stem BCF of 0.72 in *S. viminalis* clone growing in a soil contaminated with 1.8 mg Cd kg⁻¹ and 620 mg Zn kg⁻¹; these BCF from this more polluted soil were lower than the one measured in this study. In a field trial using dredged sediment, Vervaeke et al. (2003) measured for *S. viminalis* "Orm." a mean Cd foliar BCF of 1.4 and a mean stem BCF of 1.2, and for Zn the mean foliar BCF was 0.8 and 0.3 for the stem, in a soil contaminated with 3 mg Cd kg⁻¹ and 437 mg Zn kg⁻¹; as previously these mean BCF were lower than ours while the site was more heavily contaminated. In a field work Klang-Westin and Eriksson (2003) measured BCF for Cd varying between 4.8-27.9 in foliage and 2.9-16.8 in stem of *S. viminalis* clone (78183) growing in a soil contaminated with 0.17-0.45 mg Cd kg⁻¹; the BCF from this slightly less contaminated soil are larger than the ones found in the current study. These few results corroborate that typically highest BCF values are measured in lower soil contamination.

In this study, Cu, Ni, Pb and Mn accumulated mainly in roots. These metals were not actively extracted from the soil as shown by their BCF far below 1. The plant clones exhibited Cu exclusion by restricting its transport from roots to shoots, this avoidance mechanism have been observed for willow and poplar clones in several studies (Borghi et al. 2007; Punshon and Dickinson 1997; Rosselli et al. 2003; Sebastiani et al. 2004). Low Ni accumulation in aboveground parts of *Populus* and *Salix* clones has also been measured previously (French et al. 2006); however in a soil where concentrations were higher, Ni was accumulated in larger amount in the aboveground tissues of several *Salix* clones (Pulford et al. 2002). Pb is a relatively immobile metal and is generally poorly accumulated by plants (Lasat 2002). Consequently, in willow and poplar clones; Pb is generally preferentially accumulated in the roots (Fischerová et al. 2006; French et al. 2006; Pulford et al. 2002). Studies on contaminated soils have established that *S. caprea*, *S. cinerea* and *S. atrocinerea* can accumulate high amount of Mn in their tissues (Alvarez et al. 2003; Vandecasteele et al. 2004; Wislocka et al. 2006). However, in the presently

studied site, Mn concentration in the soil was quite low. Accordingly, *P. × generosa* Mn foliar concentrations were in the critical deficiency range which is 5-25 mg Mn kg⁻¹ (Kabata-Pendias 2001), while *S. viminalis* foliar concentration were slightly over 30 mg Mn kg⁻¹ reaching normal level; therefore this site was not appropriate to verify the plant clone Mn extraction potential. Overall, the woody plant clones used in this experiment would therefore not be suitable candidates for the extraction of Cu, Ni and Pb, where plant clones Mn extraction capacities could not be verified in the present soil conditions.

The poplar and willow clones used in this experiment have proven to be cold resistant, adapted to northern climatic conditions and rather performing on compacted and poor soils. Actually the plant clones survival rate after 18 months was fairly high (83 %). Additionally, the coppicing technique was efficient since afterward the plants have resprouted successfully and produced numerous vigorous shoots, which formed shrub like plants. During this experiment, *S. viminalis* accumulated generally higher HM concentrations than *P. × generosa*. Previous studies have also measured higher aboveground HM accumulation in *Salix* relatively to *Populus* clones (Fischerová et al. 2006; Robinson et al. 2000). However since *P. × generosa* produced more aerial biomass than *S. viminalis*, the total metal uptake by *P. × generosa* was higher. However, during the second growing season, the *S. viminalis* growth performances were reduced because of the severe infestation by *Tuberolachnus salignus*. Generally *Salix* clones produce higher annual biomass the second and third years of growth (Labrecque and Teodorescu 2001; Maxted et al. 2007; Wieshammer et al. 2007). Because the metal concentration is the limiting factor in phytoextraction and *S. viminalis* normally produces higher yield in the next growing seasons, we conclude that *S. viminalis* may still have a higher phytoextraction potential than *P. × generosa*. Moreover, *S. viminalis* demonstrated a higher survival rate. However, *S. viminalis* potential would have to be examined on a longer time lapse in further experiments.

Inoculation with *G. intraradices* at planting did not result in a higher root mycorrhizal colonization level than that found in non-inoculated control plant at the end of the first and the second growing seasons in the field. This emphasizes the presence of a natural AM fungi community in this severely disturbed contaminated soil. It is reasonable to assume that interaction and competitive processes between the natural taxa and the introduced AM fungus strain occurred over the 18 months of the experiment. However, significant inoculation effects were measured in both plant clones, both years of growth, suggesting the persistence and competitiveness of the introduced AM fungus over time or at least supporting the persistence of the effects of the inoculation. *G. intraradices* is generally considered as an aggressive (Cano and Bago 2005; Graham and Abbott 2000; Graham et al. 1996) or intermediate root colonizer (Jansa et al. 2008), which may have contributed to its presumed persistence in the field. In opposition Harinikumar and Bagtaraj (1996) reported that when introduced in agricultural field, *G. intraradices* is a poor competitor with low aggressiveness and persistence. However, AM fungi persistence is probably influenced by the nature of its host, which are in this experiment perennial woody plants and not herbaceous annual as in Harinikumar and Bagtaraj (1996) research.

During the first growing season, inoculation of the cuttings resulted in higher yield of *P. × generosa* and *S. viminalis* leaf and stem biomass (Lefebvre 2007). These results are consistent with claims of other authors who measured larger biomass in plant inoculated with AM fungi in HM contaminated fields (Lingua et al. 2008; Wang et al. 2005). We presume that in the early stage of the experiment, a rapid and massive colonization of the plants inoculated with *G. intraradices* took place, while the non-inoculated plants were rather gradually colonized by the natural AM fungi community. At that time, the inoculated plants were probably advantaged by their presumed greater level of mycorrhizal association, hence the higher biomass yield of the initially inoculated plants. However this was not verified since when the roots samples were collected at the

end of the first growing season, the colonization of the non-inoculated plants by the natural AM fungi taxa had reached similar level than the one measured in the initially inoculated plants (Lefebvre 2007). We believe that during the second year of growth, the natural AM fungi likely provided similar benefits to the non-inoculated plants, than the benefits the inoculated plants received from *G. intraradices*. Accordingly, during the second growing season, the biomass yield of the initially inoculated and non-inoculated plant was similar. At that time, the initially inoculated plants were probably colonized by the inoculated *G. intraradices* in co-existence with the native AM taxa. We agree with Cano and Bago (2005) who stated that studies regarding AM fungi interspecies interaction are scarce; extended field observations concerning the fate of inoculated AM fungi in soil containing a native AM fungi community are even more lacking. More experiments should investigate these events.

During the first growing season, inoculation of the *P. × generosa* clone with *G. intraradices* induced a significant decrease of the foliar Cd and stem Cu concentrations (Lefebvre 2007); these effects did not persist after the second growing season, although the Cd stem concentration was still slightly lower in the initially inoculated plants. Over the second year, the transfer of Cu and Cd from the soil into the shoots was lowered in the inoculated *S. viminalis* and *P. × generosa* where Cu was preferentially stored in the roots. This restriction may indicate an immobilization of Cu and Cd by the *G. intraradices* mycelium since it was shown that AM fungal mycelium has high sorption capacities for these metals (Gonzalez-Chavez et al. 2002; Gonzalez-Guerrero et al. 2008; Joner et al. 2000). Gonzalez-Chavez et al. (2002) have demonstrated that various *Glomus* species can store Cu in their mucilaginous outer hyphal layer and in the cell wall. Glomalinalin, a glycoprotein produced by AM fungi (Driver et al. 2005), is probably the protein enabling metal sequestration in hyphae cell wall (Gonzalez-Chavez et al. 2004; Vodnik et al. 2008). An increase of Cu concentration in plants roots was previously reported in *Aster tripolium* L. inoculated with *G. geosporum*, however this increase was not associated with a change in translocation to the shoot

(Carvalho et al. 2006). Restriction of Cd transfer into the shoots caused by *G. mosseae* has previously been observed in clover species (Joner and Leyval 1997; Vivas et al. 2003). We can hypothesize that the inoculation of *G. intraradices* may contribute to protect the plants from phytotoxic Cu and Cd effects by reducing these metals concentration in the aerial tissues, therefore, increasing plant tolerance. We also observed that Pb transfer to the foliar tissues in inoculated *S. viminalis* clones was limited. Overall, the inoculation of this strain of *G. intraradices* did not offer the expected benefits to the phytoextraction process.

In the present study, the extent of *P. × generosa* root length colonized by AM fungi was high (22–59 %), while *S. viminalis* showed a relatively low colonization, reaching a maximum of only 6 %. This result is in accordance with van der Heijden (2001) who measured low colonization level of the AM fungus *G. mosseae* (5 %) in *Salix repens* roots. Still, strong responses were measured in *S. repens* inoculated plants such as higher shoot dry weight and longer roots length leading the author to conclude that low root colonization does not imply little host plant response; this was also suggested in this study, with the inoculation effects measured during this experiment.

2.5.1 Conclusion

We propose that *S. viminalis* (5027) clone is a good candidate for Cd and Zn rehabilitation of moderately contaminated soils while *P. × generosa* A Henry “Unal” clone is mainly appropriate for Cd soil decontamination. These clones have several attractive features for phytoextraction: elevated survival rate, adaptation to northern climate, high biomass yield and large transfer of Cd and Zn to the aboveground tissues. In the present experiment, inoculation of *G. intraradices* provided few beneficial effects other than the initial increase of plants growth during the establishment period. However, the changes in Cd and Zn uptakes and in Cu, Cd and Pb BCF measured in the inoculated plants suggest that the mycorrhizal colonization influence HM dynamics and should be further analyzed to fully assess their potential in bioremediation practices. Inoculation of *G. intraradices* has decreased the Cu and Cd transfer to the shoots as well as increased the Cu storage in the roots; these results could suggest an increase in plants tolerance to Cu and Cd. Since plant host response depend on the fungal species (Lingua et al. 2008) or potentially the strain used, this experiment will need to be replicated using other AM fungi species to assess the intraspecific variability. We suggest that *G. mosseae*, which has frequently been identify in contaminated soil (Hassan et al. 2009; Ortega-Larrocea et al. 2001; Turnau et al. 2001; Vallino et al. 2006), could potentially be a suitable candidate for further investigations.

2.6 Acknowledgments

This project was financially supported by the Federation of Canadian Municipalities' (FCM) Green Municipal Fund (GMF), the South-West district of Montreal City and the Montreal Centre of Excellence in Brownfields Rehabilitation (MCEBR). The authors gratefully thank Adela Voicu, Stéphane Daigle, Traian Ion Teodorescu, H el ene Lalande and Marie-Claude Turmel for their help with settings, samplings, analyses and statistics.

2.7 References

- Alvarez E, Marcos M L F, Vaamonde C and Fernandez-Sanjurjo M J 2003 Heavy metals in the dump of an abandoned mine in Galicia (NW Spain) and in the spontaneously occurring vegetation. *Sci. Total Environ.* 313, 185-197.
- Audet P and Charest C 2007 Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Environ. Pollut.* 147, 609-614.
- Audet P and Charest C 2008 Allocation plasticity and plant-metal partitioning: Meta-analytical perspectives in phytoremediation. *Environ. Pollut.* 156, 290-296.
- Baum C, Hryniewicz K, Leinweber P and Meißner R 2006 Heavy-metal mobilization and uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal willows J. *Plant. Nutr. Soil Sc.* 169, 516-522.
- Beauregard M S, Hamel C and St-Arnaud M 2008 AM fungi communities in major intensive North American grain productions. In *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Eds. Z A Siddiqui, S Akhtar and K Futai. pp 135-158. Springer, The Netherlands.
- Borghi M, Tognetti R, Monteforti G and Sebastiani L 2007 Responses of *Populus x euramericana* (*P. deltoides* x *P. nigra*) clone *Adda* to increasing copper concentrations. *Environ. Exp. Bot.* 61, 66-73.

- Cano C and Bago A 2005 Competition and substrate colonization strategies of three polyxenically grown arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 97, 1201–1214.
- Carvalho L M, Cacador I and Martins-Loucao M A 2006 Arbuscular mycorrhizal fungi enhance root cadmium and copper accumulation in the roots of the salt marsh plant *Aster tripolium* L. *Plant Soil* 285, 161–169.
- Chaudhry Q, Blom-Zandstra M, Gupta S K and Joner E 2005 Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Pollut. R.* 1, 34-48.
- Davies J F T, Puryear J D, Newton R J, Egilla J N and Saraiva Grossi J A 2001 Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *J. Plant Physiol.* 158, 777-786.
- Díaz G, Azcón-Aguilar C and Honrubia M 1996 Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant Soil* 180, 241-249.
- Dickinson N M 2002 Phytoremediation of industrially-contaminated sites using trees. In *Phytoremediation of metal-contaminated soils*. Eds. J-L Morel, G Echevarria and N Goncharova. pp 229-240. Springer, Trest, Czech Republic.
- Dickinson N M and Pulford I D 2005 Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environ. Int.* 31, 609-613.
- Dos Santos Utmazian M N and Wenzel W W 2007 Cadmium and zinc accumulation in willow and poplar species grown on polluted soils. *J. Plant. Nutr. Soil Sc.* 170, 265-272.
- Dos Santos Utmazian M N, Wieshammer G, Vega R and Wenzel W W 2007 Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. *Environ. Pollut.* 148, 155-165.
- Driver J D, Holben W E and Rillig M C 2005 Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 37, 101–106.
- Felix H R 1997 Field trials for in situ decontamination of heavy metals polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.* 160, 525-529.

- Fischerová Z, Tlustos P, Jirina S and Kornelie S 2006 A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environ. Pollut.* 144, 93-100.
- French C J, Dickinson N M and Putwain P D 2006 Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. *Environ. Pollut.* 141, 387-395.
- Gaur A and Adholeya A 2004 Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils *Curr. Sci.* 86, 528-534.
- Giovannetti M and Mosse B 1980 An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489-500.
- Göhre V and Paszkowski U 2006 Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223, 1115 - 1122.
- Gonzalez-Chavez C, Carrillo-Gonzalez R, Wright S F and Nichols K A 2004 The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Pollut.* 130, 317-323.
- Gonzalez-Chavez C, D'Haen J, Vangronsveld J and Dodd J C 2002 Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant Soil* 240, 287-297.
- Gonzalez-Guerrero M, Melville L H, Ferrol N, Lott J N A, Azcon-Aguilar C and Peterson L R 2008 Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Can. J. Microbiol.* 54, 103-110.
- Graham J H and Abbott L K 2000 Wheat responses to aggressive and non-aggressive arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 220, 207-218.
- Graham J H, Drouillard D L and Hodge N C 1996 Carbon economy of sour orange in response to different *Glomus* spp. *Tree Physiol.* 16, 1023-1029.
- Guo Y, George E and Marschner H 1996 Contribution of an arbuscular mycorrhizal fungus to the uptake of cadmium and nickel in bean and maize plants. *Plant Soil* 184, 195-205.
- Hammer D, Kayser A and Keller C 2003 Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. *Soil Use and Manage.* 19, 187-192.

- Harinikumar K M and Bagyaraj D J 1996 Persistence of introduced *Glomus intraradices* in the field as influenced by repeated inoculation and cropping system. *Biol. Fertil. Soils* 21, 184-188.
- Hassan S E, Hijri M and St-Arnaud M 2009 PCR-DGGE analysis of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in heavy metal polluted soils. In Program and Abstracts of the 59th Ann. Conf. Can. Soc. Microbiol., Univ. Concordia, Montréal, Canada.
- Heggo A, Angle J S and Chaney R L 1990 Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biol. Biochem.* 22, 865-869.
- Jankong P and Visoottiviseth P 2008 Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on plants growing on arsenic contaminated soil. *Chemosphere* 72, 1092-1097.
- Jansa J, Smith F A and Smith S E 2008 Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytol.* 177, 779-789.
- Jensen J K, Holm P E, Nejrup J, Larsen M B and Borggaard O K 2009 The potential of willow for remediation of heavy metal polluted calcareous urban soils. *Environ. Pollut.* 157, 931-937.
- Joner E and Leyval C 2001 Time-course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regimes. *Biol. Fertil. Soils* 33, 351-357.
- Joner E J, Briones R and Leyval C 2000 Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226, 227-234.
- Joner E J and Leyval C 1997 Uptake of ^{109}Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae/Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytol.* 135, 353-360.
- Kabata-Pendias A 2001 Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kabata-Pendias A 2004 Soil-plant transfer of trace elements—an environmental issue. *Geoderma* 122, 143-149.
- Kayser A, Wenger K, Keller A, Attinger W, Felix H R, Gupta S K and Schulin R 2000 Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd, and Cu from calcareous soil: the use of NTA and sulfur amendments. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1778-1783.

- Khan A G 2005 Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Bio.* 18, 355-364.
- Klang-Westin E and Eriksson J 2003 Potential of *Salix* as phytoextractor for Cd on moderately contaminated soils. *Plant Soil* 249, 127-137.
- Klang-Westin E and Perttu K 2002 Effects of nutrient supply and soil cadmium concentration on cadmium removal by willow. *Biomass Bioenerg.* 23, 415-426.
- Kumar P, Dushenkov V, Motto H and Rasakin I 1995 Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1232-1238.
- Kuzovkina Y A, Knee M and Quigley M F 2004 Cadmium and copper uptake and translocation in five willow (*Salix* L.) species. *Int. J. Phytorem.* 6, 269-287.
- Labrecque M, Lefebvre R and St-Arnaud M 2006 Growth potential and heavy metals accumulation in poplar and willow plants inoculated with an arbuscular mycorrhizal fungi. In Proceeding of the 27th annual meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). p. 356, Montreal, Quebec, Canada.
- Labrecque M and Teodorescu T I 2001 Influence of plantation site and wastewater sludge fertilization on the performance and foliar nutrient status of two willow species grown under SRIC in southern Quebec (Canada). *Forest Ecol. Manag.* 150, 223-239.
- Landberg T and Greger M 1996 Differences in uptake and tolerance to heavy metals in *Salix* from unpolluted and polluted areas. *Appl. Geochem.* 11, 175-180.
- Lasat M M 2002 Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31, 109-120.
- Laureysens I, Blust R, De Temmerman L, Lemmens C and Ceulemans R 2004 Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environ. Pollut.* 131, 485-494.
- Laureysens I, De Temmerman L, Hastir T, Van Gysel M and Ceulemans R 2005 Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture. II. Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environ. Pollut.* 133, 541-551.

- Lefebvre R 2007 Réhabilitation d'un site contaminé de la ville de Montréal par des approches de phytoremédiation. Mémoire de maîtrise. Université de Montréal, Département des Sciences Biologiques, Montréal, Canada.
- Leyval C, Turnau K and Haselwandter K 1997 Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7, 139-153.
- Liao J P, Lin X G, Cao Z H, Shi Y Q and Wong M H 2003 Interactions between arbuscular mycorrhizae and heavy metals under sand culture experiment. *Chemosphere* 50, 847-853.
- Lingua G, Franchin C, Todeschini V, Castiglione S, Biondi S, Burlando B, Parravicini V, Torrigiani P and Berta G 2008 Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environ. Pollut.* 153, 137-147.
- Malcova R, Vosatka M and Gryndler M 2003 Effects of inoculation with *Glomus intraradices* on lead uptake by *Zea mays* L. and *Agrostis capillaris* L. *Appl. Soil Ecol.* 23, 55-67.
- Maxted A, Black C, West H, Crout N, Mcgrath S and Young S 2007 Phytoextraction of cadmium and zinc by *Salix* from soil historically amended with sewage sludge. *Plant Soil* 290, 157-172.
- Meers E, Lamsal S, Vervaeke P, Hopgood M, Lust N and Tack F M G 2005 Availability of heavy metals for uptake by *Salix viminalis* on a moderately contaminated dredged sediment disposal site. *Environ. Pollut.* 137, 354-364.
- Meers E, Vandecasteele B, Ruttens A, Vangronsveld J and Tack F M G 2007 Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environ. Exp. Bot.* 60, 57-68.
- Meers E, Vervaeke P, Filip T M G, Lust N, Verloo M and Lesage E 2003 Field trial experiment: phytoremediation with *Salix* sp. on a dredged sediment disposal site in Flanders, Belgium. *Remediation Journal* 13, 87-97.
- MENV 1999 Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés, Québec.
- Nissen L R and Lepp N W 1997 Baseline concentrations of copper and zinc in shoot tissues of a range of *Salix* species. *Biomass Bioenerg.* 12, 115-120.

- Ortega-Larrocea M P, Siebe C, Bécard G, Méndez I and Webster R 2001 Impact of a century of wastewater irrigation on the abundance of arbuscular mycorrhizal spores in the soil of the Mezquital Valley of Mexico. *Appl. Soil Ecol.* 16, 149-157.
- Pulford I D, Riddell-Black D and Stewart C 2002 Heavy metal uptake by willow clones from sewage sludge-treated soil: the potential for phytoremediation. *Int. J. Phytorem.* 4, 59 - 72.
- Pulford I D and Watson C 2003 Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. *Environ. Int.* 29, 529-540.
- Punshon T and Dickinson N M 1997 Acclimation of *Salix* to metal stress. *New Phytol.* 137, 303-314.
- Robinson B, Mills T, Petit D, Fung L, Green S and Clothier B 2000 Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant Soil* 227, 301-306.
- Rosselli W, Keller C and Boschi K 2003 Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant Soil* 256, 265-272.
- Salt D E, Smith R D and Raskin I 1998 Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 643-668.
- Sasaki A, Fujiyoshi M, Shidara S and Nakatsubo T 2001 Effects of nutrients and arbuscular mycorrhizal colonization on the growth of *Salix gracilistyla* seedlings in a nutrient-poor fluvial bar. *Ecol. Res.* 16, 165-172.
- Schüßler A, Schwarzott D and Walker C 2001 A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105, 1413-1421.
- Sebastiani L, Scebba F and Tognetti R 2004 Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides x maximowiczii*) and I-214 (*P. x euramericana*) exposed to industrial waste. *Environ. Exp. Bot.* 52, 79-88.
- Sell J, Kayser A, Schulin R and Brunner I 2005 Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant Soil* 277, 245-253.
- St-Arnaud M and Vujanovic V 2007 Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant diseases and pests. In *Mycorrhizae in crop production*. Eds. C Hamel and C Plenchette. pp 67-122. Haworth Food & Agricultural Products Press, Binghamton, NY.

- Stoltz E and Greger M 2002 Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environ. Exp. Bot.* 47, 271-280.
- Turnau K, Ryszka P, Gianinazzi-Pearson V and van Tuinen D 2001 Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza* 10, 169-174.
- Unterbrunner R, Puschenreiter M, Sommer P, Wieshammer G, Tlustos P, Zupan M and Wenzel W W 2007 Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. *Environ. Pollut.* 148, 107-114.
- U.S. Environmental Protection Agency 1983 Method 2007. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometric method for trace element analysis of water and waste. *Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*. EPA-600/4-79-020, revised March 1983. U.S. Government Printing Office, Washington D.
- Vallino M, Massa N, Lumini E, Bianciotto V, Berta G and Bonfante P 2006 Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of *Solidago gigantea* growing in a polluted soil in Northern Italy. *Environ. Microbiol.* 8, 971-983.
- van der Heijden E W 2001 Differential benefits of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal infection of *Salix repens*. *Mycorrhiza* 10, 185-193.
- Vandecasteele B, De Vos B and Tack F M G 2002 Cadmium and Zinc uptake by volunteer willow species and elder rooting in polluted dredged sediment disposal sites. *Sci. Total Environ.* 299, 191-205.
- Vandecasteele B, Meers E, Vervaeke P, Vos B D, Quataert P and Tack F M G 2005 Growth and trace metal accumulation of two *Salix* clones on sediment-derived soils with increasing contamination levels. *Chemosphere* 58, 995-1002.
- Vandecasteele B, Quataert P, Vos B D, Tack F M G and Muysc B 2004 Foliar concentrations of volunteer willows growing on polluted sediment-derived sites versus sites with baseline contamination levels. *J. Environ. Monitor.* 6, 313-321.
- Vervaeke P, Luysaert S, Mertens J, Meers E, Tack F M G and Lust N 2003 Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial. *Environ. Pollut.* 126, 275-282.

- Vierheilig H, Coughlan A P, Wyss U and Piche Y 1998 Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 5004-5007.
- Vivas A, Voros I, Biro B, Camposa E, Barea J B and Azcona R 2003 Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. *Environ. Pollut.* 126, 179-189.
- Vodnik D, Grčman H, Maček I, van Elteren J T and Kovačević M 2008 The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Sci. Total Environ.* 392.
- Vogel-Mikus K, Pongrac P, Kump P, Necemer M and Regvar M 2006 Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environ. Pollut.* 139, 362-371.
- Vysloužilová M, Tlustoš P and Száková J 2003 Cadmium and zinc phytoextraction potential of seven clones of *Salix* spp. planted on heavy metal contaminated soils. *Plant Soil Environ.* 49, 542-547.
- Wang F Y, Lin X and Yin R 2005 Heavy metal uptake by arbuscular mycorrhizas of *Elsholtzia splendens* and the potential for phytoremediation of contaminated soil. *Plant Soil* 269, 225-232.
- Wang F Y, Lin X G and Yin R 2007 Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decreases Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. *Pedobiologia* 51, 99-109.
- Wieshammer G, Unterbrunner R, García T, Zivkovic M, Puschenreiter M and Wenzel W 2007 Phytoextraction of Cd and Zn from agricultural soils by *Salix* ssp. and intercropping of *Salix caprea* and *Arabidopsis halleri*. *Plant Soil* 298, 255-264.
- Wislocka M, Krawczyk J, Klink A and Morrison L 2006 Bioaccumulation of heavy metals by selected plant species from uranium mining dumps in the Sudety Mts., Poland. *Pol. J. Environ. Stud.* 15, 811-818.

CHAPITRE 3 : Conclusion générale

Ce projet avait pour objectif premier de démontrer les capacités de phytoextraction des métaux lourds de plantes ligneuses à croissance rapide. De plus, j'ai vérifié les réponses des plantes à l'ajout d'un inoculum commercial de champignons MA. Dans un deuxième volet, j'ai tenté d'identifier des espèces MA tolérantes aux métaux lourds et d'étudier les structures des communautés des champignons MA associés aux racines de saules et de peupliers sur un site contaminé. Cette étude a été réalisée à partir de données provenant d'un dispositif expérimental qui a été établi sur un terrain vacant perturbé et contaminé de la Ville de Montréal.

Ce travail a été innovateur car peu d'études de phytoextraction avec des espèces ligneuses à croissance rapide ont été accomplies à l'extérieur sur plus d'une année (French et al. 2006; Hammer et al. 2003; Maxted et al. 2007). Cette expérience pilote a révélé des résultats prometteurs. Tout d'abord, cette étude a permis de confirmer que le *S. viminalis* (5027) et le *P. × generosa* A Henry "Una1" peuvent s'établir sur un site peu favorable, produire d'importantes quantités de biomasse, extraire du cadmium et du zinc du sol et accumuler ces métaux en concentrations importantes dans leurs tissus aériens récoltables. Ainsi cette étude a montré que ces plantes peuvent être utilisées pour l'assainissement de sites modérément contaminés au cadmium et au zinc. Toutefois, le *S. viminalis* a montré des capacités d'accumulation des métaux plus élevées que le *P. × generosa*; d'autres études ont aussi rapporté que des saules possèdent de meilleurs potentiels d'accumulation des métaux que des peupliers (Fischerová et al. 2006; Robinson et al. 2000). Ensuite, cette étude a montré que l'accumulation du zinc et du cadmium dans les tissus du *S. viminalis* ainsi que la production de biomasse des deux clones végétaux peuvent accroître d'une année à l'autre. Conséquemment, ces résultats contestent la prémisse émise par certains auteurs : puisque les quantités disponibles des métaux du sol diminuent avec le temps, les

quantités accumulées par les plantes devraient être réduites (Maxted et al. 2007; Sander et Ericsson 1998). D'ailleurs la conservation, d'une année à l'autre, des capacités d'accumulation des métaux par les plantes ligneuses a été observée à quelques reprises (Jensen et al. 2009; Unterbrunner et al. 2007). Ces discussions montrent la nécessité d'étudier des essais pilotes de phytoextraction s'échelonnant sur plusieurs années.

Lors de la première saison de croissance, les plantes inoculées avec le *G. intraradices* ont développé plus de biomasse aérienne que les plantes témoins (Lefebvre 2007). Cependant, cet effet n'a pas été mesuré lors de la deuxième saison de croissance. Pendant les deux années, les plantes inoculées ont accumulé moins de cuivre et de cadmium dans leurs tissus aériens que les plantes témoins. Ainsi, l'ajout du *G. intraradices* a réduit significativement l'exposition des plantes au cadmium et au cuivre. Ce champignon MA a probablement accumulé ces métaux dans ses structures (Gonzalez-Chavez et al. 2004; Kaldorf et al. 1999). Il est intéressant de noter que ces effets ont été les mêmes pour les deux clones végétaux. Ainsi, dans le cadre de cette étude, l'ajout d'inoculum du *G. intraradices* n'a pas amélioré les capacités de phytoextraction des métaux lourds des plantes ligneuses associées. Par contre, l'ajout de cet inoculum pourrait être intéressant lors de l'établissement d'un couvert végétal sur un site hautement contaminé où la réduction de l'exposition des plantes aux métaux serait fortement avantageuse. Cependant plus d'études devraient être conduites pour vérifier cette présomption.

La présence d'effets biologiques mesurés seulement chez les plantes initialement inoculées, suggère que le *G. intraradices* s'est associé aux racines des plantes et qu'il était toujours en symbiose avec celles-ci 18 mois plus tard, ou du moins que son effet a perduré. Ainsi, cette étude suggère la persistance de ce taxon MA en milieu contaminé. L'observation de structures MA sur les réseaux racinaires des plantes non inoculées témoigne de la présence d'une communauté naturelle de champignons MA sur ce site perturbé. Similairement, la présence de

champignons MA sur des sites contaminés a été montrée dans le cadre de quelques études (Tonin et al. 2001; Turnau et al. 2001; Zarei et al. 2008a; Zarei et al. 2008b). Le *G. intraradices* inoculé est probablement entré en compétition avec les champignons MA autochtones du site. D'ailleurs, l'effet bénéfique de l'inoculation sur la production de biomasse des plantes mesuré la première année, n'a pas été observé l'année suivante. Aussi, la restriction du transfert du cadmium et du cuivre vers les tissus aériens des plantes était plus faible la deuxième année. La diminution de la vigueur des réponses végétales à l'inoculation initiale du *G. intraradices* est probablement due à l'association graduelle des plantes non inoculées aux champignons MA naturels. Ceux-ci ont potentiellement apporté à ces plantes des effets bénéfiques égaux aux effets offerts par le *G. intraradices* aux plantes inoculées.

L'ajout d'un inoculum du *G. intraradices* n'a pas produit les effets positifs escomptés, c'est-à-dire une augmentation des capacités d'extraction des métaux lourds des plantes hôtes. Plusieurs études antérieures ont montré que les réponses des plantes hôtes diffèrent dépendamment de l'espèce MA associée (Leyval et al. 1997; Lingua et al. 2008; Orłowska et al. 2005). Ainsi, un accroissement du potentiel d'extraction des métaux pourrait être obtenu avec d'autres combinaisons plante hôte et champignon MA. En conséquence, l'identification des espèces de champignons MA natifs du site et par le fait même tolérantes aux métaux lourds présents, permettrait de cibler des espèces de champignons MA adaptées à ces conditions. Aussi, les interactions entre un inoculum commercial ajouté et les champignons MA naturels du sol ont très peu été étudiées. Pour ces raisons, j'ai tenté d'identifier les taxons de champignons MA présents sur le site contaminé étudié et de comparer les structures des communautés MA en fonction des traitements appliqués. L'optimisation du DGGE, une méthode de biologie moléculaire récente, a été difficile et n'a pas pu être complétée dans le cadre de cette maîtrise. Tout de même, j'ai obtenu des résultats préliminaires. Approximativement 8 taxons MA seraient associés aux racines du *S. viminalis* et du *P. × generosa* sur ce site contaminé, 4 taxons

communs à presque toutes les parcelles et 4 taxons plus rares. De plus, mes résultats montrent très peu de variations entre les différents traitements : profondeur des racines, plante hôte et ajout d'inoculum du *G. intraradices*. Par contre, une étape supplémentaire de clonage serait probablement nécessaire pour identifier les espèces de champignons MA associées aux saules et aux peupliers de ce site contaminé.

Ce projet m'a permis d'approfondir et d'actualiser mes connaissances sur les phytoremédiations et plus précisément, sur la phytoextraction des métaux lourds. Ces technologies représentent une alternative ou un complément aux techniques coûteuses et destructives qui sont actuellement utilisées pour la décontamination de sols. Même si la période requise afin que les sols atteignent des niveaux acceptables de décontamination est relativement longue, il demeure que pour certains sites la rapidité du processus n'est pas un élément primordial. C'est le cas, entre autres, des terrains municipaux abandonnés depuis des décennies ou des sites industriels délaissés. Les phytoremédiations sont des pratiques vertes qui exploitent des ressources naturelles, permettent de capter des gaz à effet de serre, améliorent la beauté du paysage et favorisent le reverdissement de zones abandonnées. Ces pratiques représentent un exemple concret de développement durable. De plus, la biomasse produite peut être transformée en énergie renouvelable pour entre autres chauffer des édifices. Ce type de bioénergie suscite actuellement énormément d'intérêt. La phytoextraction possède peu de risques écologiques et de nombreux avantages autant environnementaux qu'économiques. En conséquence, cette technique devrait être de plus en plus accessible et présente dans notre environnement urbain dans les années futures.

3.2 Références générales

- Alkorta I and Garbisa C 2001 Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technol.* 79, 273-276.
- Amann R I, Ludwig W and Schleifer K H 1995 Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59, 143-169.
- Angle J S and Linacre N A 2005 Metal phytoextraction; a survey of potential risks. *Int. J. Phytorem.* 7, 241 - 254.
- Assuncao A G L, Schat H and Aarts M G M 2003 *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.* 159, 351-360.
- Audet P and Charest C 2007 Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Environ. Pollut.* 147, 609-614.
- Banuelos G S, Shannon M C, Ajwa H, Draper J H, Jordahl J and Licht J 1999 Phytoextraction and accumulation of boron and selenium by Poplar (*Populus*) hybrid clones. *Int. J. Phytorem.* 1, 81 - 96.
- Baum C, Hrynkiewicz K, Leinweber P and Meißner R 2006 Heavy-metal mobilization and uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal willows J. *Plant. Nutr. Soil Sc.* 169, 516-522.
- Beauchamp V B, Stromberg J C and Stutz J C 2006 Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Populus-Salix* stands in a semiarid riparian ecosystem. *New Phytol.* 170, 369-380.
- Behmer S T, Lloyd C M, Raubenheimer D, Stewart-Clack J, Knight J, Leighton R S, Harper F A and Smith J A C 2005 Metal hyperaccumulation in plants: mechanisms of defence against insect herbivores. *Funct. Ecol.* 19, 55-66.
- Borghi M, Tognetti R, Monteforti G and Sebastiani L 2007 Responses of *Populus x euramericana* (*P. deltoides* x *P. nigra*) clone *Adda* to increasing copper concentrations. *Environ. Exp. Bot.* 61, 66-73.
- Brown S, Chaney R, Hallfrisch J, Ryan J A and Berti W R 2004 In situ soil treatments to reduce the phyto- and bioavailability of lead, zinc, and cadmium. *J. Environ. Qual.* 33, 522-531.

- Chandra S, Kamala C T, Chary N S, Balaram V and Garcia G 2005 Potential of *Hemidesmus indicus* for phytoextraction of lead from industrially contaminated soils. *Chemosphere* 58, 507-514.
- Chaney R L, Malik M, Li Y M, Brown S L, Brewer E P, Angle J S and Baker A J M 1997 Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 279-284.
- Chaudhry Q, Blom-Zandstra M, Gupta S K and Joner E 2005 Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Pollut. R.* 1, 34-48.
- Chiffot V, Rivest D, Olivier A, Cogliastro A and Khasa D 2009 Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal community structure and spores distribution in tree-based intercropping and forest systems. *Agric. Ecosyst. Environ.* In press.
- Clapp J P, Fitter A H and Young J P W 1999 Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. *Mol. Ecol.* 8, 915-921.
- Cunningham S D, Berti W R and Huang J W 1995 Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13, 393-397.
- Davies J F T, Puryear J D, Newton R J, Egilla J N and Saraiva Grossi J A 2001 Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *J. Plant Physiol.* 158, 777-786.
- De Sousa C A D, Wu C and Westphal L M 2009 Assessing the effect of publicly assisted brownfield redevelopment on surrounding property values. *Econ. Dev. Q.* 23, 95-110.
- de Souza F A, Kowalchuk G A, Leeflang P, van Veen J A and Smit E 2004 PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1413-1424.
- del Val C, Barea J M and Azcon-Aguilar C 1999 Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.* 11, 261-269.
- Di Baccio D, Tognetti R, Sebastiani L and Vitagliano C 2003 Responses of *Populus deltoides* x *Populus nigra* (*Populus* x *euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytol.* 159, 443-452.

- Díaz G, Azcón-Aguilar C and Honrubia M 1996 Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant Soil* 180, 241-249.
- Dickinson N M 2000 Strategies for sustainable woodland on contaminated soils. *Chemosphere* 41, 259-263.
- Dickinson N M 2002 Phytoremediation of industrially-contaminated sites using trees. In *Phytoremediation of metal-contaminated soils*. Eds. J-L Morel, G Echevarria and N Goncharova. pp 229-240. Springer, Trest, Czech Republic.
- Dickinson N M and Pulford I D 2005 Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environ. Int.* 31, 609-613.
- Dos Santos Utmazian M N and Wenzel W W 2007 Cadmium and zinc accumulation in willow and poplar species grown on polluted soils. *J. Plant. Nutr. Soil Sc.* 170, 265-272.
- Dos Santos Utmazian M N, Wieshammer G, Vega R and Wenzel W W 2007 Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. *Environ. Pollut.* 148, 155-165.
- Ercolini D 2004 PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Meth.* 56, 297-314.
- Ferris M. J, Muyzer G and Ward D M 1996 Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 340-346.
- Fischer G, Prieler S and van Velthuisen H 2005 Biomass potentials of miscanthus, willow and poplar: results and policy implications for Eastern Europe, Northern and Central Asia. *Biomass Bioenerg.* 28, 119-132.
- Fischerová Z, Tlustos P, Jirina S and Kornelie S 2006 A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environ. Pollut.* 144, 93-100.
- French C J, Dickinson N M and Putwain P D 2006 Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. *Environ. Pollut.* 141, 387-395.
- Garbisu C and Alkorta I 2001 Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technol.* 77, 229-236.

- Gaur A and Adholeya A 2004 Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils *Curr. Sci.* 86, 528-534.
- Giasson P and Jaouich A 1998 La phytorestauration des sols contaminés au Québec. *Vecteur environnement* 31, 40-53.
- Gildon A and Tinker P B 1983 Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. *New Phytol.* 95, 247-261.
- Glass D J 2000 Economic potential of phytoremediation. In *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*. Eds. I Raskin and B D Ensley. p. 304. John Wiley & Sons, inc., New York, USA.
- Göhre V and Paszkowski U 2006 Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223, 1115 - 1122.
- Gonzalez-Chavez C, Carrillo-Gonzalez R, Wright S F and Nichols K A 2004 The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Pollut.* 130, 317-323.
- Gonzalez-Chavez C, D'Haen J, Vangronsveld J and Dodd J C 2002 Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant Soil* 240, 287-297.
- Guo Y, George E and Marschner H 1996 Contribution of an arbuscular mycorrhizal fungus to the uptake of cadmium and nickel in bean and maize plants. *Plant Soil* 184, 195-205.
- Hammer D, Kayser A and Keller C 2003 Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. *Soil Use and Manage.* 19, 187-192.
- Heggo A, Angle J S and Chaney R L 1990 Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biol. Biochem.* 22, 865-869.
- Hildebrandt U, Regvar M and Bothe H 2007 Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68, 139-146.
- Iskandar I K and al. e 2001 *Environmental restoration of metals-contaminated soils*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Jensen J K, Holm P E, Nejrup J, Larsen M B and Borggaard O K 2009 The potential of willow for remediation of heavy metal polluted calcareous urban soils. *Environ. Pollut.* 157, 931-937.

- Joner E and Leyval C 2001 Time-course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regimes. *Biol. Fertil. Soils* 33, 351-357.
- Kabata-Pendias A 2001 Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 413.
- Kabata-Pendias A and Pendias H 1994 Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 365.
- Kaldorf M, Kuhn A J, Schroder W H, Hildebrandt U and Bothe H 1999 Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *J. Plant Physiol.* 154, 718-728.
- Khan A G, Kuek C, Chaudhry T M, Khoo C S and Hayes W J 2000 Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41, 197-207.
- Klang-Westin E and Eriksson J 2003 Potential of *Salix* as phytoextractor for Cd on moderately contaminated soils. *Plant Soil* 249, 127-137.
- Kowalchuk G A, de Souza F A and van Veen J A 2002 Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Mol. Ecol.* 11, 571-581.
- Kowalchuk G A, Gerards S and Woldendorp J W 1997 Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3858-3865.
- Kramer U 2005 Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 133-141.
- Kuzovkina Y A, Knee M and Quigley M F 2004 Cadmium and copper uptake and translocation in five willow (*Salix* L.) species. *Int. J. Phytorem.* 6, 269-287.
- Labrecque M and Teodorescu T I 2005 Field performance and biomass production of 12 willow and poplar clones in short-rotation coppice in southern Quebec (Canada). *Biomass Bioenerg.* 29, 1-9.
- Labrecque M, Teodorescu T I and Daigle S 1998 Early performance and nutrition of two willow species in short-rotation intensive culture fertilized with wastewater sludge and impact on the soil characteristics. *Can. J. Forest Res.* 28, 1621 - 1635.

- Landberg T and Greger M 1996 Differences in uptake and tolerance to heavy metals in *Salix* from unpolluted and polluted areas. *Appl. Geochem.* 11, 175-180.
- Laureysens I, Blust R, De Temmerman L, Lemmens C and Ceulemans R 2004 Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environ. Pollut.* 131, 485-494.
- Lefebvre R 2007 Réhabilitation d'un site contaminé de la ville de Montréal par des approches de phytoremédiation. In *Sciences biologiques*. Université de Montréal, Montréal, Canada.
- Leung H M, Ye Z H and Wong M H 2006 Interactions of mycorrhizal fungi with *Pteris vittata* (As hyperaccumulator) in As-contaminated soils. *Environ. Pollut.* 139, 1-8.
- Leyval C, Turnau K and Haselwandter K 1997 Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7, 139-153.
- Liao J P, Lin X G, Cao Z H, Shi Y Q and Wong M H 2003 Interactions between arbuscular mycorrhizae and heavy metals under sand culture experiment. *Chemosphere* 50, 847-853.
- Lingua G, Franchin C, Todeschini V, Castiglione S, Biondi S, Burlando B, Parravicini V, Torrigiani P and Berta G 2008 Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environ. Pollut.* 153, 137-147.
- Liu Y, Zhu Y G, Chen B D, Christie P and Li X L 2005 Influence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on uptake of arsenate by the As hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. *Mycorrhiza* 15, 187-192.
- Lodge D J 1989 The influence of soil moisture and flooding on formation of VA-endo- and ectomycorrhizae in *Populus* and *Salix*. *Plant Soil* 117, 243-253.
- Lunáčková L, Masarovičová E, Král'ová K and Streško V 2003 Response of fast growing woody plants from family Salicaceae to cadmium treatment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 576-585.
- Ma L Q, Komar K M, Weihua C T, Cai Z Y and Kennelley E D 2001 A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409.
- Ma W K, Siciliano S D and Germida J J 2005 A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1589-1597.

- Malcova R, Vosatka M and Gryndler M 2003 Effects of inoculation with *Glomus intraradices* on lead uptake by *Zea mays* L. and *Agrostis capillaris* L. *Appl. Soil Ecol.* 23, 55-67.
- Maxted A, Black C, West H, Crout N, Mcgrath S and Young S 2007 Phytoextraction of cadmium and zinc by *Salix* from soil historically amended with sewage sludge. *Plant Soil* 290, 157-172.
- McGrath S P, Shen Z G and Zhao F J 1997 Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. *Plant Soil* 188, 153-159.
- McGrath S P and Zhao F-J 2003 Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 277-282.
- Meers E, Lamsal S, Vervaeke P, Hopgood M, Lust N and Tack F M G 2005 Availability of heavy metals for uptake by *Salix viminalis* on a moderately contaminated dredged sediment disposal site. *Environ. Pollut.* 137, 354-364.
- Meers E, Vandecasteele B, Ruttens A, Vangronsveld J and Tack F M G 2007 Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environ. Exp. Bot.* 60, 57-68.
- MENV 1999 Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés, Québec.
- Mulligan C N, Yong R N and Gibbs B F 2001 Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Eng. Geo.* 60, 193-207.
- Muyzer G and Smalla K 1998 Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Anton. Leeuw.* 73, 127-141.
- Nolan A L, Lombi E and McLaughlin M J 2003 Metal bioaccumulation and toxicity in soils; why bother with speciation? *Aust. J. Chem.* 56, 77-91.
- Õpik M, Moora M, Liira J, Koljalg U, Zobel M and Sen R 2003 Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal scots pine forest and grassland soils. *New Phytol.* 160, 581-593.
- Orlowska E, Ryszka P, Jurkiewicz A and Turnau K 2005 Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) strains in colonization of plants involved in phytostabilisation of zinc wastes. *Geoderma* 129, 92-98.

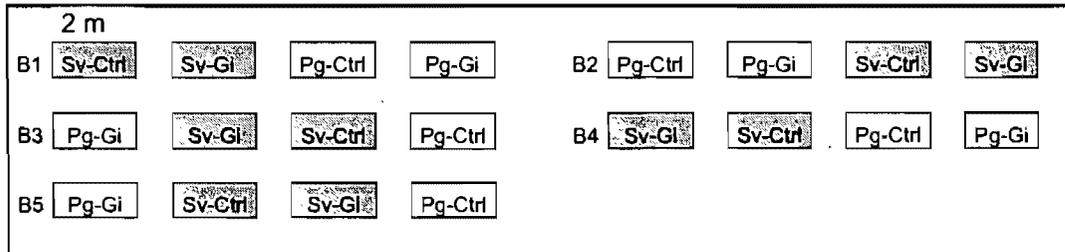
- Ortega-Larrocea M P, Siebe C, Bécard G, Méndez I and Webster R 2001 Impact of a century of wastewater irrigation on the abundance of arbuscular mycorrhizal spores in the soil of the Mezquital Valley of Mexico. *Appl. Soil Ecol.* 16, 149-157.
- Ortega-Larrocea M P, Siebe C, Estrada A and Webster R 2007 Mycorrhizal inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi in soils irrigated with wastewater for various lengths of time, as affected by heavy metals and available P. *Appl. Soil Ecol.* 37, 129-138.
- Pawlowska T E, Błaszowski J and Rühling A 1996 The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland. *Mycorrhiza* 6, 499-505.
- Pilon-Smits E 2005 Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 15-39.
- Pulford I D, Riddell-Black D and Stewart C 2002 Heavy metal uptake by willow clones from sewage sludge-treated soil: the potential for phytoremediation. *Int. J. Phytorem.* 4, 59 - 72.
- Pulford I D and Watson C 2003 Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. *Environ. Int.* 29, 529-540.
- Punshon T and Dickinson N M 1997 Acclimation of *Salix* to metal stress. *New Phytol.* 137, 303-314.
- Redecker D, Thierfelder H, Walker C and Werner D 1997 Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1756-1761.
- Regvar M, Vogel-Mikus K, Kugonic N, Turk B and Batic F 2006 Vegetational and mycorrhizal successions at a metal polluted site: indications for the direction of phytostabilisation? *Environ. Pollut.* 144, 976-984.
- Robinson B, Mills T, Petit D, Fung L, Green S and Clothier B 2000 Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: implications for phytoremediation. *Plant Soil* 227, 301-306.
- Robinson B H, Chiarucci A, Brooks R R, Petit D, Kirkman J H, Gregg P E H and De Dominicis V 1997 The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *J. Geochem. Expl.* 59, 75-86.
- Robinson B H, Green S R, Chancerel B, Mills T M and Clothier B E 2007 Poplar for the phytomanagement of boron contaminated sites. *Environ. Pollut.* 150, 225-233.

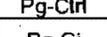
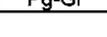
- Rosselli W, Keller C and Boschi K 2003 Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant Soil* 256, 265-272.
- Salt D E, Smith R D and Raskin I 1998 Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 643-668.
- Sambandan K, Kannan K and Raman N 1992 Distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in heavy metal polluted soils of Tamil Nadu, India. *J. Environ. Biol.* 13, 159-167.
- Sander M-L and Ericsson T 1998 Vertical distributions of plant nutrients and heavy metals in *Salix viminalis* stems and their implications for sampling. *Biomass Bioenerg.* 14, 57-66.
- Sanders I R 2002 Ecology and evolution of multigenomic arbuscular mycorrhizal fungi. *Am. Nat.* 160, S128-S141.
- Schüßler A, Schwarzott D and Walker C 2001 A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105, 1413-1421.
- Sebastiani L, Scebba F and Tognetti R 2004 Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides* x *maximowiczii*) and I-214 (*P. x euramericana*) exposed to industrial waste. *Environ. Exp. Bot.* 52, 79-88.
- Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T and Uchiyama H 2001 A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol. Lett.* 23, 1205-1208.
- Sell J, Kayser A, Schulin R and Brunner I 2005 Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant Soil* 277, 245-253.
- Shanahan J O, Brummer J E, Leininger W C and Paschke M W 2007 Manganese and zinc toxicity thresholds for mountain and geyer willow. *Int. J. Phytorem.* 9, 437 - 452.
- Simon L, Bousquet J, Levesque R C and Lalonde M 1993 Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363, 67-69.
- Smit E, Leeflang P, Glandorf B, Dirk van Elsas J and Wernars K 1999 Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2614-2621.
- Srivastava M, Ma L Q and Santos J A G 2006 Three new arsenic hyperaccumulating ferns. *Sci. Total Environ.* 364, 24-31.

- Tonin C, Vandenkoornhuyse P, Joner E J, Straczek J and Leyval C 2001 Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola alaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza* 10, 161-168.
- Turnau K, Ryszka P, Gianinazzi-Pearson V and van Tuinen D 2001 Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza* 10, 169-174.
- Unterbrunner R, Puschenreiter M, Sommer P, Wieshammer G, Tlustos P, Zupan M and Wenzel W W 2007 Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. *Environ. Pollut.* 148, 107-114.
- Van Nevel L, Mertens J, Oorts K and Verheyen K 2007 Phytoextraction of metals from soils: How far from practice? *Environ. Pollut.* 150, 34-40.
- van der Heijden E W 2001 Differential benefits of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal infection of *Salix repens*. *Mycorrhiza* 10, 185-193.
- van der Heijden E W and Vosatka M 1999 Mycorrhizal associations of *Salix repens* L. communities in succession of dune ecosystems. II. Mycorrhizal dynamics and interactions of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Botany* 77, 1833-1841.
- van der Heijden M G A, Klironomos J N, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A and Sanders I R 1998 Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 69-72.
- van der Wal A, van Veen J A, Pijl A S, Summerbell R C and de Boer W 2006 Constraints on development of fungal biomass and decomposition processes during restoration of arable sandy soils. *Soil Biol. Biochem.* 38, 2890-2902.
- Vervaeke P, Luysaert S, Mertens J, Meers E, Tack F M G and Lust N 2003 Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial. *Environ. Pollut.* 126, 275-282.
- Vogel-Mikus K, Pongrac P, Kump P, Necemer M and Regvar M 2006 Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environ. Pollut.* 139, 362-371.

- Wamberg C, Christensen S, Jakobsen I, Muller A K and Sorensen S J 2003 The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). *Soil Biol. Biochem.* 35, 1349-1357.
- Whitfield L, Richards A J and Rimmer D L 2004 Relationships between soil heavy metal concentration and mycorrhizal colonisation in *Thymus polytrichus* in northern England. *Mycorrhiza* 14, 55-62.
- Wieshammer G, Unterbrunner R, García T, Zivkovic M, Puschenreiter M and Wenzel W 2007 Phytoextraction of Cd and Zn from agricultural soils by *Salix* ssp. and intercropping of *Salix caprea* and *Arabidopsis halleri*. *Plant Soil* 298, 255-264.
- Yergeau E, Vujanovic V and St-Arnaud M 2006 Changes in communities of fusarium and arbuscular mycorrhizal fungi as related to different asparagus cultural factors. *Microb. Ecol.* 52, 104 -113.
- Zalesny J A, Zalesny R S, Wiese A H and Hall R B 2007 Choosing tree genotypes for phytoremediation of landfill leachate using phyto-recurrent selection. *Int. J. Phytorem.* 9, 513 - 530.
- Zarei M, Konig S, Hempel S, Nekouei M K, Savaghebi G and Buscot F 2008a Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *Veronica rechingeri* at the Anguran zinc and lead mining region. *Environ. Pollut.* 156, 1277-1283.
- Zarei M, Saleh-Rastin N, Jouzani G S, Savaghebi G and Buscot F 2008b Arbuscular mycorrhizal abundance in contaminated soils around a zinc and lead deposit. *Eur. J. Soil Biol.* 44, 381-391.

ANNEXE 1 : Experimental design



	<i>S. viminalis</i> (non-inoculated)
	<i>S. viminalis</i> (inoculated)
	<i>P. x generosa</i> (non-inoculated)
	<i>P. x generosa</i> (inoculated)

ANNEXE 2 : Identification des champignons MA associés aux plantes ligneuses *S. vimilanis* et *P. × generosa* sur un site urbain contaminé aux métaux lourds

I. Introduction

Les champignons MA sont des microorganismes en symbiose obligatoire avec les racines des plantes. Grâce à leurs vastes réseaux d'hyphes, ils absorbent l'eau et des nutriments minéraux du sol, particulièrement le phosphore, et les transportent vers la plante hôte en échange de carbohydrates. Des champignons MA ont été observés dans la plupart des écosystèmes, dont les sites contaminés aux métaux lourds (Pawłowska et al. 1996; Tonin et al. 2001; Turnau et al. 2001; Zarei et al. 2008). Ces champignons influencent la productivité, la diversité et la composition des communautés végétales (Sanders 2002) et permettent de conserver la structure et la stabilité des sols (Treseder et Turner 2007). De plus, ils affectent, entre autres, la croissance, la santé et la reproduction des plantes hôtes (Subramanian et Charest 1997). En milieux contaminés aux métaux lourds, il a été montré que l'association de champignons MA aux espèces végétales accélère l'établissement et améliore le rendement des plantes (Lefebvre 2007; Lingua et al. 2008; Wang et al. 2005). En conséquence, les champignons MA sont très avantageux lors de la restauration et du développement d'un couvert végétal en zones contaminées. Par contre, les isolats distincts de champignons MA affectent les plantes différemment (Leyval et al. 1997). Pour ces raisons, il est primordial d'analyser les communautés MA en zones polluées et d'identifier les espèces naturellement tolérantes aux contaminants.

Différencier des espèces MA par des critères morphologiques est très ardu, rendant ainsi complexes les études de communautés. D'ailleurs, il existe des variations morphologiques importantes entre des spores de la même espèce de champignons MA (Walker et Vestberg 1998), certaines espèces ne produisent pas de spores (Helgason et al. 2002) et la sporulation est dépendante de l'espèce, la plante hôte, les conditions de croissance, la saison et plusieurs facteurs environnementaux (Oehl et al. 2003). Ainsi, des techniques de biologie moléculaire ont été développées pour contourner ces difficultés. Les méthodes moléculaires détectent les champignons présents indépendamment de la production de spores et fournissent un mode d'identification moins subjectif, plus précis et rapide. La PCR (amplification en chaîne par polymérase) avec une paire d'amorces spécifiques permet de cibler une séquence unique à un groupe d'organismes. Dans une variante de la méthode, la PCR nichée, une deuxième paire d'amorces s'hybride à une séquence retrouvée à l'intérieur de la séquence produite par une première paire d'amorces. Ce type de PCR permet l'amplification de séquences cibles présentes en plus faible quantité dans les échantillons d'ADN, elle permet ainsi d'amplifier des séquences qui n'auraient pas été détectées par une PCR régulière (Yergeau et al. 2006). Plusieurs études en écologie ont été complétées avec les amorces AM1 (Helgason et al. 1998; Helgason et al. 1999; Kowalchuk et al. 2002) et NS31 (Helgason et al. 1998; Helgason et al. 1999; Simon et al. 1992). Cette paire d'amorces amplifie une portion du gène 18S codant pour l'ARN ribosomal des champignons MA. L'amorce AM1 amplifie les gènes des champignons et exclut celle des plantes (Helgason et al. 1998). Cependant, il a été trouvé que cette paire d'amorces n'amplifie pas certains groupes des champignons MA et que dans certains cas des séquences appartenant à d'autres groupes d'organismes ont aussi été amplifiées par ces amorces (Helgason et al. 1999; Ma et al. 2005; Öpik et al. 2003). Ainsi, pour résoudre ces problèmes, une paire d'amorces qui amplifie tous les groupes de champignons MA et exclut les séquences provenant d'autres organismes a été développée par Lee et al. (2008). Ces nouvelles amorces, désignées AML1-AML2, amplifient une portion variable du gène du 18S codant

pour l'ARN ribosomale. Ce segment du gène permet de différencier au niveau espèces les champignons MA. D'ailleurs, il est plus long que celui amplifié par les amorces AM1-NS31 (Lee et al. 2008). Selon Lee et al. (2008), seul l'*Archaeospora trappei*, parmi les séquences de champignons MA connues, n'est pas amplifié par ces amorces. Ensuite, les fragments de même longueur mais de séquences différentes obtenues par la PCR peuvent être séparés par la méthode du DGGE (gel d'électrophorèse en gradient dénaturant). Les bandes obtenues par DGGE, peuvent être isolées, séquencées et ensuite comparées à celles d'une banque de données telle que GenBank afin d'identifier à quel taxon elles sont le plus similaires.

Dans le cadre de cette expérimentation, j'ai tenté d'identifier les espèces de champignons MA associés aux racines de *Populus* et de *Salix* d'un dispositif expérimental localisé sur un site urbain perturbé et contaminé aux métaux lourds. Parmi ces plantes ligneuses, la moitié avait été inoculée l'année précédente avec une formulation commerciale du *Glomus intraradices*, c'est à dire lors de la mise en terre des boutures. L'objectif global de cette étude était d'évaluer la structure et la diversité des communautés de champignons MA. Plus précisément, j'ai tenté (i) d'identifier les taxons de champignons MA autochtones présents sur le site pollué étudié, (ii) de confirmer que le *G. intraradices* était toujours associé aux racines des plantes initialement inoculées, (iii) de comparer la diversité des communautés de champignons MA entre les plantes inoculées et celles non inoculées, (iv) de comparer la diversité des communautés de champignons MA associés aux deux clones végétaux et finalement (v) de déterminer si les espèces de champignon MA retrouvées dans la section supérieure du sol était les mêmes que celles vivant plus en profondeur. Par contre, j'ai rencontré des difficultés importantes lors de l'optimisation du DGGE, ainsi je n'ai pas atteint ces objectifs. Tout de même, je souhaite décrire les analyses que j'ai complétées et présenter des résultats préliminaires.

II. Matériels et méthodes

Le site étudié, situé dans la ville de Montréal, (45°28'314 N, 073°35'708 E) a été préalablement présenté au chapitre 2 de ce manuscrit. Tel que mentionné à ce chapitre, en mai 2006 une expérience pilote a été mise en place sur ce terrain contaminé aux métaux lourds. Il s'agit d'un dispositif en blocs aléatoires complets composé de 5 blocs chacun incluant de façon aléatoire les deux clones de plantes ligneuses (*S. viminalis* clone 5027 et *P. × generosa* A Henry "Unal") et les deux traitements d'inoculation, présence ou absence de l'inoculum du *G. intraradices* Schenck and Smith (MYKE®, Premier Tech Biotechnologies, Rivière-du-Loup, Canada). Le dispositif comportait ainsi 20 parcelles ; 2 clones végétaux × 2 traitements × 5 blocs. En septembre 2007, un échantillonnage des racines des saules et peupliers a été complété. Une tranchée de 1 m de longueur par 20 cm de large et d'une profondeur de 40 cm a été creusée, parallèlement à la ligne formée par les 10 plantes de chaque parcelle, le côté de la tranchée ayant été déterminé aléatoirement. Les racines en surface (0-20 cm de profondeur) et les racines profondes (20-40 cm de profondeur) ont été entreposées séparément. Elles ont été lavées attentivement à l'eau du robinet, coupées en segments de quelques centimètres, homogénéisées et ensuite conservées à -20 °C.

Un échantillon homogénéisé d'environ 0.6 g de racines a été utilisé afin de procéder à l'extraction de l'ADN à l'aide du kit d'extraction Ultra clean microbial DNA kit (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA). Quelques modifications ont été apportées au protocole original : 100 µl d'IRS supplémentaire ont été ajoutés à la troisième étape, l'étape 4 optionnelle a été complétée, soit 10 min d'incubation dans un bain-marie à approximativement 55 °C, par la suite les échantillons ont été broyés par 3 cycles de 20 sec, à l'intensité 4, au Fast Prep® FP120 (BIO 101), et ensuite, à l'étape 9, les solutions ont été incubées 10 min à -20 °C plutôt que 5 min à 4 °C. L'ADN total extrait, comprenant l'ADN de la plante et celui des microorganismes, incluant les

champignons MA, a été utilisé pour compléter une suite de deux amplifications PCR selon un protocole de PCR nichée (Yergeau et al. 2006). Lors de la première ronde d'amplification, la paire d'amorces universelles pour eucaryotes NS1 (White et al. 1990) et NS41 (Simon et al. 1992) ciblant une séquence du gène 18S a été utilisée afin d'amplifier des fragments de 1200 paires de bases (pb). Ces PCR ont été complétées avec 2.5 µl de solution tampon colorée (Quiagen), 2.5 µl de chaque amorce à une concentration de 5 µM, 0.5 µl de dNTP, 0.125 µl de BSA, 0.5 µl de MgCl₂, 1 µl de DMSO, 0.125 µl de « hot start » TAQ polymérase (Quiagen) et 1 µl d'ADN pour un volume total de 25 µl. Le programme d'amplification a été complété avec un Thermal cycler Techné 512-TC (Burlington, USA), selon le programme suivant : période de dénaturation de 15 min à 95 °C, 35 cycles (1 min à 94 °C, 1 min à 50 °C et 1 min à 72 °C) et période d'élongation de 10 min à 72 °C. Ces produits PCR ont été ré-amplifiés avec une deuxième combinaison d'amorces. Tout d'abord les amorces AM1 (Helgason et al. 1998) et NS31 (Simon et al. 1992) avec une queue poly GC (Kowalchuk et al. 1997) qui augmente le pouvoir discriminant du DGGE, ont été utilisées. Les PCR ont été réalisées suivant le même protocole que les PCR précédentes mais sans les solutions MgCl₂, DMSO et BSA, avec une TAQ polymérase régulière (Quiagen) et utilisant 1 µl du premier produit PCR, pour un volume total de 25 µl. L'amplification a été complétée selon les cycles : 3 min à 94 °C de dénaturation initiale, 30 cycles (45 sec à 94 °C, 45 sec à 58 °C et 45 sec à 72 °C) et 10 min à 72 °C. Suite au développement d'amorces plus spécifiques aux champignons MA, j'ai recommencé cette deuxième ronde de PCR avec les amorces AML1 et AML2 (Lee et al. 2008), avec une queue poly GC (Kowalchuk et al. 1997). Les PCR ont été complétées dans un volume total de 25 µl comprenant les mêmes quantités de solutions que les PCR de la première ronde mais avec une TAQ polymérase régulière (Quiagen) et en ajoutant 0.5 µl de Tween (1 %) avec 1 µl du premier produit PCR. Les conditions d'amplification utilisées sont rapportées par Lee et al. (2008). Tous les produits PCR ont été séparés par une électrophorèse (135 V, 35 min) sur un gel de 1 % d'agarose et une solution tampon de TAE 1 % (Tris-acétate, acide acétique glacée et EDTA)

et visualisés après une coloration au bromure d'éthidium. Les produits des deuxièmes rondes de PCR étant des fragments d'ADN de mêmes longueurs, ont été séparés en séquences différentes par DGGE avec le Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Un gel (16 cm × 14 cm) a été préparé avec de l'acrylamide 6 % (40 % 37.5 :1 acrylamide : bisacrylamide), du TAE 50 %, du formamide déionisé 40 %, une solution d'ammonium persulfate 10 % et du TEMED (N, N, N', N'-tetraméthylènediamine). Dans le cas des amorces AML1 et AML2-GC, un gradient linéaire dénaturant de 35-40 % a été formé, alors qu'un gradient dénaturant de 40-60 % a été utilisé pour les produits amplifiés avec les amorces AM1 et NS41-GC. Le gradient a été formé avec une solution de 100 % comprenant de l'urée (7 M) et du formamide 40 %. Le gel a été installé dans un contenant rempli de TAE 1 % à une température de 60 °C. Les 15 premières minutes une charge de 85 V a été produite, ensuite une charge de 45 V a été conservée pour 17 h. Les gels obtenus ont été colorés au SYBRgold et visualisés avec un Gel Doc imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Ensuite, les positions de migration des bandes des 40 échantillons ont été comparées. Pour chaque position, des bandes ont été sélectionnées excisées et ré-amplifiées avec les deuxièmes paires d'amorces. Les produits amplifiés ont été ré-isolés au DGGE et ensuite, ré-excisés et ré-amplifiés sans la séquence GC additionnelle. Les produits purifiés ont été séquencés par le Centre d'innovation Génome Québec (Université McGill, Montréal, Canada). Finalement, les pourcentages de similarités ont été utilisés pour déterminer la proximité des séquences obtenues avec les taxons représentés dans la banque de données GenBank.

III. Résultats et discussion

Suite à l'extraction de l'ADN et l'amplification d'une portion du gène 18S codant pour l'ARN ribosomal des champignons MA colonisant les racines de saules et de peupliers, des produits PCR ont été obtenus et des bandes claires ont été observées sur le gel d'électrophorèse (Fig. 1). Le fragment produit par les amorces NS1-NS41, est d'une longueur approximative de 1200 pb. Le fragment amplifié par les amorces AM1 et NS31-GC est d'approximativement 550 pb, alors que le fragment obtenu par l'amplification PCR avec les amorces AML1 et AML2-GC est d'environ 800 pb.

Les produits PCR ont ensuite été séparés par DGGE. Techniquement, les différentes séquences devraient se retrouver à des positions de migration distinctes. Ainsi, chaque bande représente théoriquement un taxon différent de champignon MA. Comme il s'agit de variants de séquences, on parle généralement d'un ribotype. Par contre, certains problèmes liés à l'interprétation des bandes DGGE ont été reconnus. Par exemple, il est fréquent qu'un isolat unique de champignon MA produisent deux bandes sur le gel DGGE à cause de l'hétérogénéité du 18S d'un isolat (Clapp et al. 1999; Kowalchuk et al. 2002; Ma et al. 2005). Ce phénomène peut entraîner une surestimation du nombre de taxons présent dans une communauté étudiée : en réalité, une diversité plus restreinte que le nombre de bandes observées sur le gel DGGE serait généralement présente. Aussi, des taxons différents peuvent parfois présenter des positions de migration similaires sur le gel DGGE, ce qui complexifie l'interprétation mais aussi l'isolation et l'identification de ces séquences (Kowalchuk et al. 2002; Ma et al. 2005; Öpik et al. 2003; Sekiguchi et al. 2001). Dans le cas précédant, le nombre de bandes DGGE entrainera plutôt une sous-estimation de la diversité.

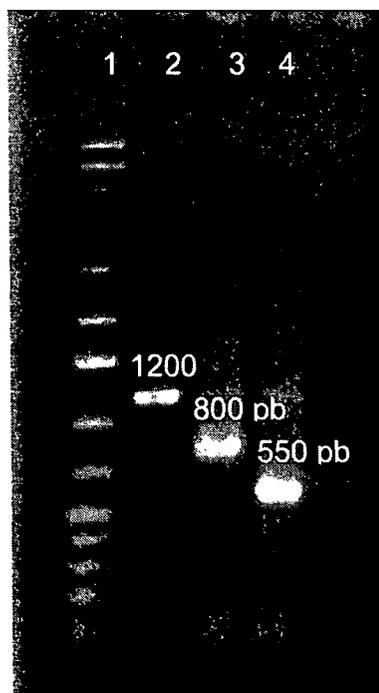


Fig. 1 Visualisation des produits amplifiés par PCR. (1) Échelle moléculaire (1Kb Plus DNA Ladder, Introgen); fragments produits après (2) la première ronde avec la paire d'amorces universelles NS1-NS41; deuxième ronde avec les paires d'amorces spécifiques aux champignons MA (3) AML1 et AML2-GC et (4) AM1 et NS31-GC. L'approximation du nombre de paires de bases (pb) respectif est indiquée sur la figure.

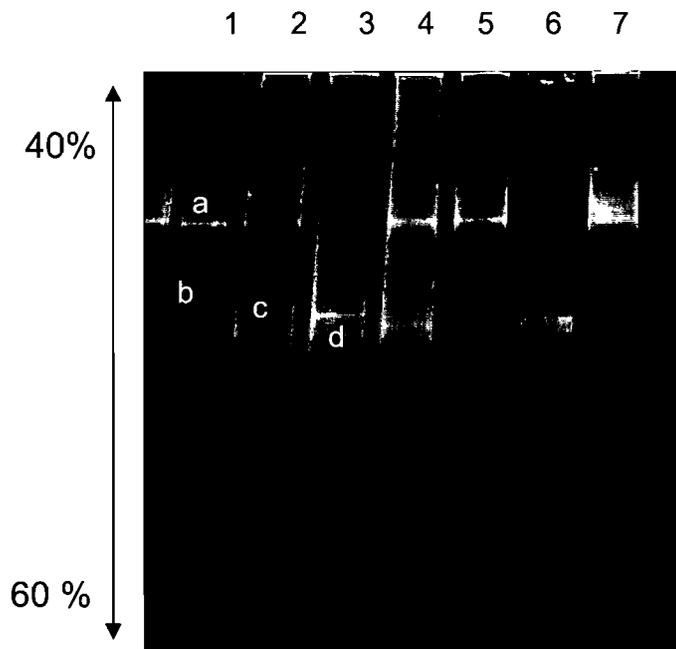


Fig. 2 Profil de migration du DGGE des fragments de 18S codant pour l'ARN ribosomal amplifiés avec les amorces AM1 et NS31-GC. Chaque colonne représente un échantillon distinct décrit par la plante hôte, le traitement appliqué (témoin ou inoculé avec du *G. intraradices*), le bloc et la profondeur des racines (0-20 ou 20-40 cm). (1) *S. viminalis* témoin, bloc 2, 0-20 cm (2) *P. × generosa* témoin, bloc 1, 0-20 cm (3) *S. viminalis* témoin, bloc 4, 20-40 cm (4) *P. × generosa* inoculé, bloc 5, 0-20 cm (5) *P. × generosa* inoculé, bloc 2, 20-40 cm (6) *S. viminalis* inoculé, bloc 2, 0-20 cm (7) *P. × generosa* témoin, bloc 2, 0-20 cm. Les lettres (a à d) représentent des bandes séquencées présentées dans le tableau 1. Le gradient dénaturant était de 40-60 %.

La figure 2 présente le profil de migration de l'ADN amplifié par la paire d'amorces AM1 et NS31-GC d'un sous-groupe de 7 échantillons sélectionnés aléatoirement parmi les 40 échantillons. Ce profil de migration montre de 3 à 10 bandes (i.e. taxons) par échantillons. J'ai isolé et séquencé certaines des bandes observées ; les résultats du séquençage sont présentés dans le tableau 1. Seulement des fractions de séquences d'une longueur de 350 pb ont pu être identifiées, probablement parce que les bandes séquencées contenaient une variété de séquences différentes. Les portions lues débutent à la position 170 et se terminent à la position 250. Les portions restantes des fragments n'étaient pas de qualité suffisante pour permettre le séquençage. Tout de même, ces résultats préliminaires m'ont permis d'observer que la paire d'amorces AM1 et NS31-GC amplifie aussi des séquences provenant d'autres organismes que des champignons MA, notamment des membres de la division *Ascomycota*. L'amplification, avec les amorces AM1 et NS31-GC, de séquences provenant d'organismes non MA, a aussi été observée par Ma et al.(2005) et Öpik et al.(2003).

Tableau 1 Analyses préliminaires des séquences des bandes excisées du DGGE complété à partir des produits PCR réalisée avec les amorces AM1 et NS31-GC.

Division	Bande ¹	Longueur estimée de la séquence lue (pb)	Taxon le plus similaire ²	Similarité (%)
Glomeromycota	a	350	<i>Glomus</i> non cultivé	98
Ascomycota	b	350	<i>Torrubiella luteoestrata</i>	100
Ascomycota	c	350	<i>Fusarium</i> sp.	100
Ascomycota	d	350	<i>Fusarium</i> sp.	98

¹ Ces numéros correspondent à ceux présentés sur la figure 2.

² Selon une comparaison avec la banque de données GenBank.

Afin de circonvenir au problème d'amplification d'organismes non MA, j'ai décidé d'utiliser une nouvelle paire d'amorces plus spécifique aux champignons MA. En effet, selon Lee et al. (2008), la paire d'amorces AML1 et AML2, amplifie exclusivement une section du gène du 18S codant pour l'ARN ribosomal des champignons de la division *Glomeromycota*. De plus, ces amorces amplifient des champignons MA supplémentaires (*Ambisporaceae* et *Paraglomaceae*) qui n'étaient pas détectés par les amorces AM1-NS31 (Daniell et al. 2001; Lee et al. 2008). La figure 3 illustre les patrons de migration au DGGE des fragments d'ADN amplifiés par les amorces AML1 et AML2-GC des 40 échantillons analysés. Le tableau 2 présente une matrice de présence et d'absence des bandes observées pour les 40 échantillons. Un sommaire de cette table est présenté ensuite au tableau 3.

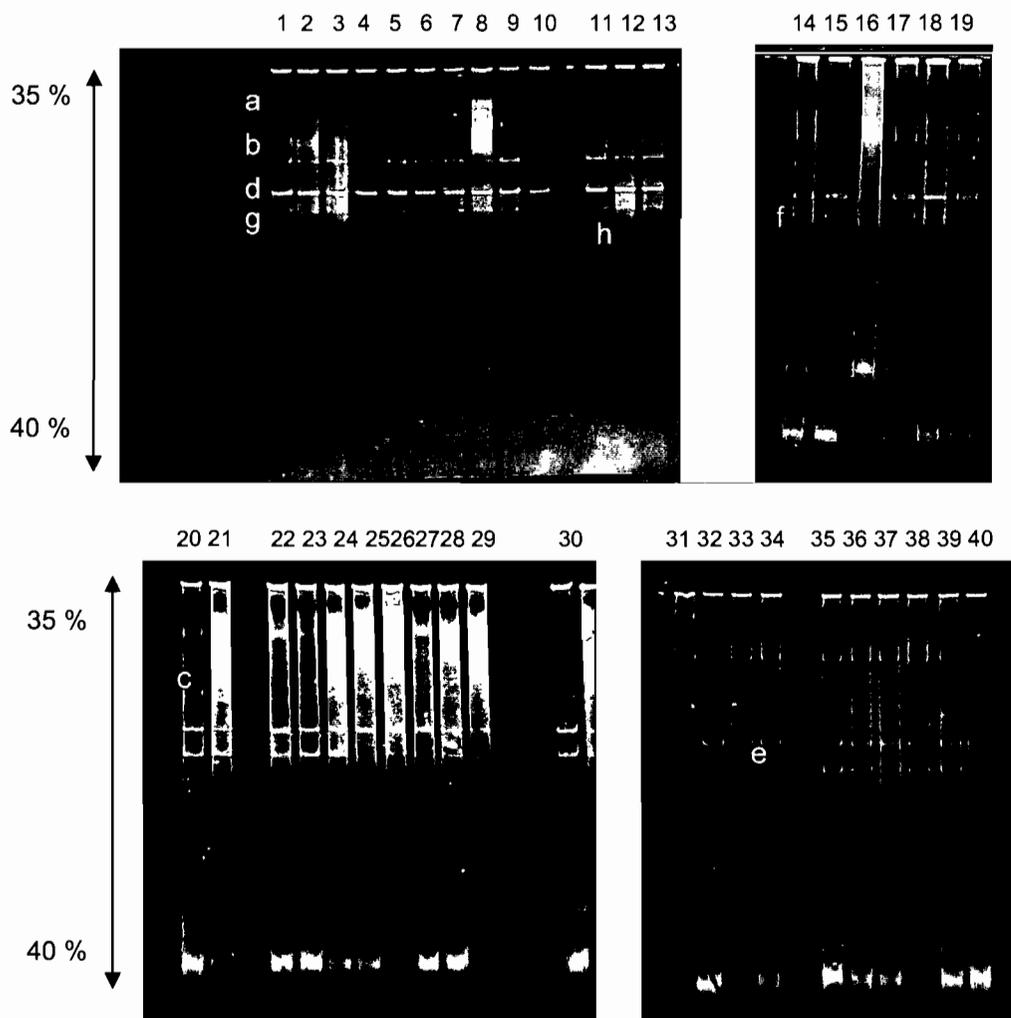


Fig. 3 Profils de migration du DGGE des fragments de 18S codant pour l'ARN ribosomal amplifiés avec les amorces AML1 et AML2-GC. La numérotation des colonnes correspond aux 40 échantillons étudiés. L'association des numéros aux échantillons est présentée dans le tableau 2. Les lettres (a à h) représentent les différentes positions de migration des bandes. Les résultats du séquençage des bandes d et g sont présentés dans le tableau 3. Le gradient dénaturant était de 35-40 %.

Tableau 2 Matrice de présence (1) ou absence (0) des bandes distinctes observées au DGGE complété avec les produits PCR réalisée avec les amorces AML1 et AML2-GC. Les échantillons sont divisés selon le clone végétal (*S. viminalis* ou *P. × generosa*), le traitement (témoin ou inoculé avec du *G. intraradices*), le bloc et la profondeur des racines analysées (0-20 cm ou 20-40 cm).

Clone végétal	Traitement	Bloc	Prof. (cm)	Numéro DGGE ¹	Bandes observées ²								Total		
					a	b	c	d	e	f	g	h			
<i>S. viminalis</i>	témoin	1	0-20	13	1	1	0	1	0	0	1	0	4		
			20-40	32	0	1	0	1	0	1	1	0	4		
		2	0-20	9	0	1	0	1	0	0	1	0	3		
			20-40	36	1	1	0	1	0	0	1	0	4		
		3	0-20	5	0	1	0	1	0	0	1	0	3		
			20-40	20	1	1	0	1	1	0	1	0	5		
		4	0-20	1	1	1	0	1	0	0	1	0	4		
			20-40	30	0	1	0	1	0	0	1	0	3		
		5	0-20	16	1	0	0	1	0	0	0	0	2		
			20-40	26	1	0	0	1	0	0	1	0	3		
		<i>S. viminalis</i>	inoculé	1	0-20	12	0	1	0	1	0	0	1	1	4
					20-40	33	1	0	0	1	0	0	0	0	2
				2	0-20	8	1	1	0	1	0	0	1	0	4
					20-40	37	1	1	0	1	1	0	1	0	5
				3	0-20	4	0	1	0	1	0	0	1	0	3
20-40	40				1	1	1	1	0	0	1	0	5		
4	0-20			19	1	1	0	1	0	0	1	0	4		
	20-40			23	1	1	0	1	0	0	1	0	4		
5	0-20			15	1	0	0	1	0	0	1	0	3		
	20-40			27	1	0	0	1	0	0	1	0	3		
<i>P. × generosa</i>	témoin			1	0-20	11	0	1	0	1	0	0	1	0	3
					20-40	34	1	1	0	1	0	0	1	0	4
				2	0-20	7	0	1	0	1	0	0	1	0	3
					20-40	38	1	0	0	1	0	0	1	0	3
				3	0-20	3	0	1	0	1	0	0	1	0	4
		20-40	21		1	1	1	1	0	0	1	0	5		
		4	0-20	18	1	1	0	1	0	0	1	0	4		
			20-40	24	1	0	0	1	0	0	1	0	3		
		5	0-20	14	1	0	0	1	0	1	0	0	3		
			20-40	28	1	0	0	1	0	0	1	0	3		
		<i>P. × generosa</i>	inoculé	1	0-20	10	0	1	0	1	0	0	1	0	3
					20-40	35	1	1	0	1	0	0	1	0	4
				2	0-20	6	0	1	0	1	0	0	1	0	3
					20-40	39	1	1	0	1	0	0	1	0	4
				3	0-20	2	1	1	0	1	0	0	1	0	4
20-40	22				1	0	0	1	0	0	1	0	3		
4	0-20			17	1	1	0	1	0	0	1	0	4		
	20-40			25	1	0	0	1	0	0	1	0	3		
5	0-20			31	1	0	0	1	0	0	1	0	3		
	20-40			29	1	0	0	1	0	0	0	0	2		

¹ Les numéros correspondent aux colonnes des gels DGGE présentés à la figure 3.

² Les positions de migration des bandes peuvent être observées à la figure 3.

Tableau 3 Résumé de la diversité des taxons MA retrouvés en association avec les racines du *S. viminalis* et du *P. × generosa*, selon le traitement (témoin ou inoculé avec du *G. intraradices*) et la profondeur des racines (0-20 cm ou 20-40 cm) récoltées sur le site contaminé étudié. La diversité des taxons MA a été estimée selon le nombre de bandes observées au DGGE à la suite de PCR avec les amorces AML1 et AML2-GC.

Clone végétal	Traitement	Profondeur (cm)	Nombre de taxons ¹				
			Min	Max	Moyen	Rare	Commun
<i>S. viminalis</i>	témoin	0-20	2	4	3.2	-	4
		20-40	3	5	3.8	4	4
	inoculé	0-20	3	4	3.6	-	4
		20-40	2	5	3.8	1	4
<i>P. × generosa</i>	témoin	0-20	3	4	3.4	2	4
		20-40	3	5	3.6	1	4
	inoculé	0-20	3	4	3.4	-	4
		20-40	2	4	3.2	-	4

¹ Ces analyses ne permettent pas d'affirmer que chaque bande observée est réellement un taxon unique, car je n'ai pas obtenu les séquences de ces bandes, mais théorique nous pouvons parler de ribotype.

Ces profils de migration de DGGE suggèrent que de 2 à 5 taxons sont associés simultanément aux racines du *S. viminalis* et du *P. × generosa*, alors qu'approximativement 8 taxons différents coloniseraient leurs racines sur ce site contaminé (Fig. 3). Ceci est en accord avec Turnau et al. (2001) qui ont découvert 6 différents taxons MA sur un site pollué au zinc. Par contre, sur un site hautement contaminé au zinc et plomb, Whitfield et al. (2004) ont trouvé 20 séquences distinctes de champignons MA, suggérant qu'une grande diversité est parfois présente dans des sols contaminés. Tel que présumé, le nombre de bandes présentes, i.e. de taxons techniquement distincts, est moindre que celui estimé par la paire d'amorces moins spécifique AM1 et NS31-GC. Les profils de migrations des fragments obtenus avec les amorces AML1 et AML2-GC illustrent la présence de 4 taxons prédominants communs à tous les traitements (plante hôte, ajout d'inoculum du *G. intraradices* et profondeur) et en coexistence sur 16 des 40 échantillons répartis uniformément parmi les différents traitements. De plus, 4 autres taxons plus rares, ne sont retrouvés uniquement que sur 1 ou 2 parcelles du

site. Le nombre moyen de taxons est similaire pour tous les traitements, ainsi ces résultats suggèrent une faible variation entre les différentes zones d'échantillonnages. Ces résultats indiquent que ces taxons MA n'ont pas de préférence de plante hôte entre les deux clones étudiés. De plus, la diversité des champignons MA colonisant les racines plus profondes ne semble pas moins grande que celle mesurée en association avec les racines de surface.

Afin de confirmer que les bandes sont des taxons distincts et d'identifier les espèces présentes, elles doivent être isolées, purifiées, séquencées et comparées à des séquences connues. Malgré de nombreuses tentatives, cette série d'étapes a échoué. En effet, une migration DGGE subséquente de l'ADN extrait des bandes isolées et réamplifiées a toujours été un échec et je n'ai donc pas réussi à purifier les bandes. J'ai tenté de séquencer les bandes excisées du premier DGGE, mais les fragments retrouvés dans ces bandes n'étaient pas uniques. En effet, la présence de plusieurs organismes dans une bande DGGE a été observée auparavant (Ma et al. 2005; Sekiguchi et al. 2001). Deux seuls fragments de 100 et 250 pb ont pu être séquencés (tableau 4). Les portions restantes de ces fragments, ainsi que la totalité des fragments des autres bandes, n'étaient pas de qualité suffisante pour permettre le séquençage. Ces fragments séquencés ont montré une similitude variant entre 78 et 86 % à des séquences déposées d'espèces du genre *Glomus*.

Tableau 4 Analyses préliminaires des séquences des bandes excisées du DGGE complété à partir des produits PCR réalisée avec les amorces AML1-AML2-GC.

Division	Bande ¹	Longueur estimée de la séquence lue (pb)	Taxon le plus similaire ²	Similarité (%)
Glomeromycota	d	100	<i>Glomus</i> sp.	78
Glomeromycota	g	250	<i>Glomus</i> non cultivé	86

¹ Ces numéros correspondent à ceux présentés sur la figure 3.

² Selon une comparaison avec la banque de données GenBank.

Ce problème d'optimisation du DGGE pourrait être causé par la longueur assez étendue du fragment d'ADN amplifié par les amorces AML2 et AML1-GC. En effet, un fragment de 800 pb est amplifié par ces amorces. Comme ces amorces ont été développées récemment, aucune étude publiée ne présente des résultats d'analyse de DGGE les utilisant. La majorité des études des communautés des champignons MA réalisées avec le DGGE ont utilisé les amorces AM1 et NS31-GC (Kowalchuk et al. 2002; Ma et al. 2005; Öpik et al. 2003; Yergeau et al. 2006). Ces amorces produisent un fragment plus court d'approximativement 550 pb (Kowalchuk et al. 2002; Lee et al. 2008). Lors d'études des communautés bactériennes, plusieurs auteurs suggèrent de ne pas utiliser pour la séparation au DGGE, des séquences de plus de 500 ou 600 pb (Cheng et al. 2009; Ercolini 2004). Par exemple, Wang et al. (2008), ont eu de la difficulté à séparer par DGGE les séquences de fragments de 700 pb, un problème qu'ils n'ont pas rencontré avec des fragments de 300 et 400 pb. Ainsi, il est probable que la longueur des fragments obtenus avec les amorces AML1 et AML2-GC ne soit pas compatible avec le DGGE. Pourtant, des segments de cette longueur offrent une meilleure résolution taxonomique permettant de distinguer les organismes potentiellement au niveau de l'espèce.

Une manière de résoudre ce problème de purification et d'obtenir des résultats précis, serait d'effectuer le clonage des bandes DGGE. Liang et al. (2008) suggèrent de construire une bibliothèque de clones à partir d'un sous groupe représentatif d'échantillons et d'établir un profil de migration DGGE de toutes les séquences trouvées par clonage. Ensuite, ces auteurs proposent d'utiliser le profil DGGE des clones comme une échelle pour associer les bandes retrouvées dans chacun des échantillons environnementaux à la séquence appropriée. Cette approche est d'ailleurs en cours dans notre laboratoire et semble donner des résultats prometteurs.

IV. Références

- Cheng Y F, Mao S Y, Liu J X and Zhu W Y 2009 Molecular diversity analysis of rumen methanogenic *Archaea* from goat in eastern China by DGGE methods using different primer pairs. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 585–592.
- Clapp J P, Fitter A H and Young J P W 1999 Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. *Mol. Ecol.* 8, 915-921.
- Daniell T J, Husband R, Fitter A H and Young J P W 2001 Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 203-209.
- Ercolini D 2004 PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Meth.* 56, 297-314.
- Helgason T, Daniell T J, Husband R, Fitter A H and Young J P W 1998 Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394, 431-431.
- Helgason T, Fitter A H and Young J P W 1999 Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Mol. Ecol.* 8, 659-666.
- Helgason T, Merryweather J W, Denison J, Wilson P, Young J P W and Fitter A H 2002 Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *J. Ecol.* 90, 371-384.
- Kowalchuk G A, de Souza F A and van Veen J A 2002 Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Mol. Ecol.* 11, 571-581.
- Kowalchuk G A, Gerards S and Woldendorp J W 1997 Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3858-3865.
- Lee J, Lee S and Young J P W 2008 Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 339–349.
- Lefebvre R 2007 Réhabilitation d'un site contaminé de la ville de Montréal par des approches de phytoremédiation. In *Sciences biologiques*. Université de Montréal, Montréal, Canada.

- Leyval C, Turnau K and Haselwandter K 1997 Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7, 139-153.
- Liang Z, Drijber R A, Lee D J, Dwiekat I M, Harris S D and Wedin D A 2008 A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. *Soil Biol. Biochem.* 40, 956-966.
- Lingua G, Franchin C, Todeschini V, Castiglione S, Biondi S, Burlando B, Parravicini V, Torrigiani P and Berta G 2008 Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environ. Pollut.* 153, 137-147.
- Ma W K, Siciliano S D and Germida J J 2005 A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1589-1597.
- Oehl F, Sieverding K, Ineichen K, Mader P, Boller T and Wiemken A 2003 Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2816-2824.
- Öpik M, Moora M, Liira J, Koljalg U, Zobel M and Sen R 2003 Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal scots pine forest and grassland soils. *New Phytol.* 160, 581-593.
- Pawlowska T E, Błaszczkowski J and Rühling A 1996 The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland. *Mycorrhiza* 6, 499-505.
- Sanders I R 2002 Ecology and evolution of multigenomic arbuscular mycorrhizal fungi. *Am. Nat.* 160, S128-S141.
- Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T and Uchiyama H 2001 A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol. Lett.* 23, 1205-1208.
- Simon L, Lalonde M and Bruns T D 1992 Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 291-295.
- Subramanian K S and Charest C 1997 Nutritional, growth, and reproductive responses of maize (*Zea mays* L.) to arbuscular mycorrhizal inoculation during and after drought stress at tasselling. *Mycorrhiza* 7, 25-32.

- Tonin C, Vandenkoornhuyse P, Joner E J, Straczek J and Leyval C 2001 Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola alaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza* 10, 161-168.
- Treseder K K and Turner K M 2007 Glomalin in Ecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71.
- Turnau K, Ryszka P, Gianinazzi-Pearson V and van Tuinen D 2001 Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza* 10, 169-174.
- Walker C and Vestberg M 1998 Synonymy amongst the arbuscular mycorrhizal fungi: *Glomus claroideum*, *G. maculosum*, *G. multisubstenum* and *G. fistulosum*. *Ann. Bot.* 82, 601-624.
- Wang F Y, Lin X and Yin R 2005 Heavy metal uptake by arbuscular mycorrhizas of *Elsholtzia splendens* and the potential for phytoremediation of contaminated soil. *Plant Soil* 269, 225-232.
- Wang J, Ma T, Zhao L, Lv J, Li G, Liang F and Liu R 2008 PCR-DGGE method for analyzing the bacterial community in a high temperature petroleum reservoir *World J. Microb. Biot.* 24, 1981.
- White T J, Bruns T D, Lee S and Taylor J W 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic press, San Diego. pp. 315.
- Whitfield L, Richards A J and Rimmer D L 2004 Relationships between soil heavy metal concentration and mycorrhizal colonisation in *Thymus polytrichus* in northern England. *Mycorrhiza* 14, 55-62.
- Yergeau E, Vujanovic V and St-Arnaud M 2006 Changes in communities of fusarium and arbuscular mycorrhizal fungi as related to different asparagus cultural factors. *Microb. Ecol.* 52, 104 -113.
- Zarei M, Konig S, Hempel S, Nekouei M K, Savaghebi G and Buscot F 2008 Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *Veronica rechingeri* at the Anguran zinc and lead mining region. *Environ. Pollut.* 156, 1277-1283.