

Université de Montréal

**Analyse de l'effet de la contamination du sol sur la croissance et la
physiologie de 11 cultivars de *Salix***

par

Vanessa Grenier

Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal
Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Arts et Sciences
en vue de l'obtention du grade de deuxième cycle
en Sciences Biologiques

décembre 2014

© Vanessa Grenier, 2014

Résumé

Mon mémoire de maîtrise a été réalisé dans le cadre du projet Génorem (www.genorem.ca), un projet multidisciplinaire qui réunit différents chercheurs de l'Université de Montréal et de l'Université McGill dans le but d'améliorer les techniques utilisées en bioremédiation. Dans le cadre de l'étude, des saules à croissance rapide (*Salix* sp.) ont été utilisés comme plantes modèles dans l'étude. Ainsi, 11 cultivars de saule ont été suivis afin de déterminer leur potentiel à produire un bon rendement de biomasse, à tolérer des conditions de stress sévère causé par la présence de HAPs (hydrocarbures aromatiques polycycliques) , BPCs (biphényles polychlorés) et d'hydrocarbures pétroliers C10-C50. L'expérimentation consistait en une plantation de saule à forte densité qui a été mise en place en 2011 sur le site d'une ancienne industrie de pétrochimie à Varennes, dans le sud du Québec. Les boutures des génotypes sélectionnés ont été plantées sur une superficie d'environ 5000 m². Les plantes ont été suivies pendant les deux saisons de croissance suivant le recépage et une série de paramètres de croissance et de mesures physiologiques ont été récoltés (surface foliaire, taux de chlorophylle, conductance stomatique et statut nutritionnel) dans le but d'évaluer et de comparer les performances de chaque génotype sur un sol pollué. Les analyses statistiques ont démontré que le cultivar *S. miyabeana* (SX61) était le meilleur producteur de biomasse sur le site contaminé, tandis que *S. nigra* (S05) et *S. acutifolia* (S54) présentaient la meilleure capacité photosynthétique. *S. dasyclados* (SV1), *S. purpurea* ('Fish Creek') et *S. caprea* (S365) ont semblé particulièrement affectés par la présence de contaminants. La capacité d'établissement et la croissance de *S. nigra* (S05), *S. eriocephala* (S25) and *S. purpurea* x *S. miyabeana* ('Millbrook') indiquent une tolérance globale supérieure à la pollution .

Cette analyse comparative des différentes réponses physiologiques des saules cultivés sur un sol contaminé pourra guider le processus de sélection de plantes et les techniques de bioremédiation dans les futurs projets de phytoremédiation.

Mots-clés : *Salix*, phytoremédiation, écophysiologie végétale, composés organiques, sol

Abstract

My master thesis is part of a larger multidisciplinary initiative called GenoRem (www.genorem.ca). GenoRem brings together scientists from Université de Montréal and McGill University in a quest to improve bioremediation techniques through molecular and biological processes. Eleven fast-growing willow (*Salix* sp.) cultivars were studied, primarily to identify those that produce high biomass yields, demonstrate capacity to thrive under harsh environmental conditions and to tolerate the presence of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons), PCBs (polychlorinated biphenyls) and C10-C50. A high-density field experiment was undertaken during the summer of 2011 on a former petrochemical industrial site in southern Québec, Canada. Cuttings of selected willow genotypes were planted on an area covering ~5000 m². Plants were monitored over the two growing seasons that followed the coppicing by recording a series of growth parameters and physiological measurements (specific leaf area, chlorophyll concentration, stomatal conductance and nutrient concentration) in order to compare growth performance of each genotype on contaminated soils. *S. miyabeana* cultivars (SX61) achieved the highest biomass production, while *S. nigra* (S05) and *S. acutifolia* (S54) had the highest photosynthetic capacity. *S. dasyclados* (SV1), *S. purpurea* ('Fish Creek') and *S. caprea* (S365) were negatively affected by the presence of contaminants. The establishment capacity and development of *S. nigra* (S05), *S. eriocephala* (S25) and *S. purpurea* X *S. miyabeana* ('Millbrook') were globally less influenced by soil pollution.

This comparative analysis of physiological responses of willow on contaminated soil will guide plant selection processes and bioremediation practices in future phytoremediation projects.

Keywords : *Salix* physiology, phytoremediation, organic compounds, soil

Table des matières

1	Introduction.....	1
1.1	Mise en contexte et problématique	1
2	Revue de littérature	4
2.1	La phytoremédiation	4
2.2	Les contaminants organiques.....	8
2.2	<i>Salix</i> et ses caractéristiques.....	9
2.3	Les applications environnementales	9
2.4	L'écophysiologie du saule et l'impact des contaminants.....	11
3	Méthodologie	13
4	Genotypic differences explain most of the response of willow cultivars to petroleum-contaminated soil	16
4.1	Abstract.....	16
4.2	Introduction.....	17
4.3	Material and methods.....	18
4.3.1	Experimental design, site description and willow material	18
4.3.2	Soil analysis	21
4.3.3	Measurements and harvesting.....	22
4.4	Results and Discussion	24
4.4.1	Growth and yield.....	24
4.4.2	Chlorophyll level and standard leaf area	28
4.4.3	Stomatal Conductance	30
4.4.4	Nutrient concentration and proportion.....	31
4.5	Conclusions.....	34
4.6	Acknowledgments.....	36
5	Conclusion générale et perspective.....	36
5.1	Retour sur les hypothèses, objectifs et résultats.....	36
5.2	Implications futures	40
6	Bibliographie.....	43

Liste des tableaux

Table 4.1 Growing season mean temperature (°C), total precipitation (mm) and normal conditions (mean and standard error) from planting to harvest.....	19
Table 4.2 Willow (<i>Salix</i> sp.) cultivars tested in the project.....	20
Table 4.3 Soil analysis for mean hydrocarbon content and physicochemical properties of uncontaminated and contaminated sites made in 2011, before planting.....	21
Table 4.4 ANOVA results for genotype and treatment effect on each physiological measurement	24
Table 4.5 ANOVA results for genotype and treatment effect on nutrient concentration	32
Table 4.6 Measured concentration of nitrogen, phosphorus and potassium in <i>Salix</i> sp leaves.....	33
Table 4.7 Proportion by weight of P, K, Ca and Mg and ratio values for K/Ca and K/Mg in <i>Salix</i> sp. leaves.....	34

Liste des figures

Figure 1.1 Carte illustrant la répartition des sites contaminés dans le sud-est du Québec.....	1
Figure 1.2. Photo aérienne du site de Pétromont.....	3
Figure 1.3 Schéma synthétique présentant les grands principes de la phytoremédiation.....	5
Figure 3.1 Schémas représentant le dispositif expérimental.....	14
Figure 4.1 Growth data for all harvested willows in 2013 (mean and standard error) on uncontaminated and contaminated soils.....	27
Figure 4.2 Leaf chlorophyll concentration (A), leaf area (B) (mean and standard error) on uncontaminated and contaminated soils.....	30
Figure 4.3 Mean stomatal conductance of collected data between June and September 2013 (mean and standard error) on uncontaminated and contaminated soils.....	31

À tous les grands baristas de Montréal

Remerciements

Parce qu'un projet de maîtrise ne se réalise pas en criant : « Lapin, je ne boirai pas de ton eau », quelques remerciements s'imposent...

Merci à Michel Labrecque et Frédéric Pitre pour leur accueil, leur appui, leur patience et tout le reste. J'ai eu la chance de trouver une équipe dynamique et d'excellents superviseurs, ce qui fait de moi une fille heureuse et accomplie.

À mes collègues, particulièrement Dominic et Manu pour les bons moments, l'humour et les repas partagés. Werther, pour son expertise sur le terrain et ses conseils sur l'amour. Adriana, ma mentore, une amie et confidente extraordinaire. Tu as fait de moi une meilleure personne et certainement une meilleure scientifique, love ya.

À tous ceux et celles pour l'aide lors des sorties à Varennes. Karina Riviello, Félix Morin, Alexandre Naud, Hafssa Kadri, Grégoire De Muylder, Benoit Szegedi, Vincent Robillard. Parce que se faire piquer par les moustiques, brûler au soleil, se faire attaquer par le panais sauvage et se geler les pieds en hiver c'est beaucoup plus agréable quand t'as une équipe d'enfer.

À Stéphane Daigle, grâce à qui mon niveau en statistique est passé de vraiment poche à poche. Une augmentation significativement significative.

Et finalement, merci à pop et maman. Pour tout. Le support moral et financier pendant toutes ces années et pour avoir cru en moi et m'avoir encouragée à poursuivre mes études même si j'étais loin. J'adore ma vie, merci. Pour les confitures et la sauce à spaghetti. Les lifts Montréal - Béarn, aussi longs soient-ils.

Et merci au café.

1 Introduction

1.1 Mise en contexte et problématique

La contamination des sols est un problème d'ordre mondial qui prend énormément d'ampleur autant au Québec (voir Figure 1.1). Depuis le début de l'ère industrielle, l'exploitation des ressources minières, pétrolières et océaniques a entraîné la contamination de milliers d'hectares de sol. Les diverses méthodes conventionnelles de décontamination hors site, sur site et *in situ* utilisées actuellement ne répondent que partiellement aux enjeux auxquels nous faisons face. La plupart de ces techniques ont le désavantage d'être extrêmement coûteuses et d'être elles-mêmes polluantes. L'excavation et le transport dudit sol contaminé vers un site d'enfouissement ou de traitement hors site ainsi que l'ajout de produits chimiques est habituellement nécessaire. Bien que ces techniques soient réglementées et réalisées dans un environnement contrôlé, elles apportent néanmoins leur part de risques pour l'environnement.

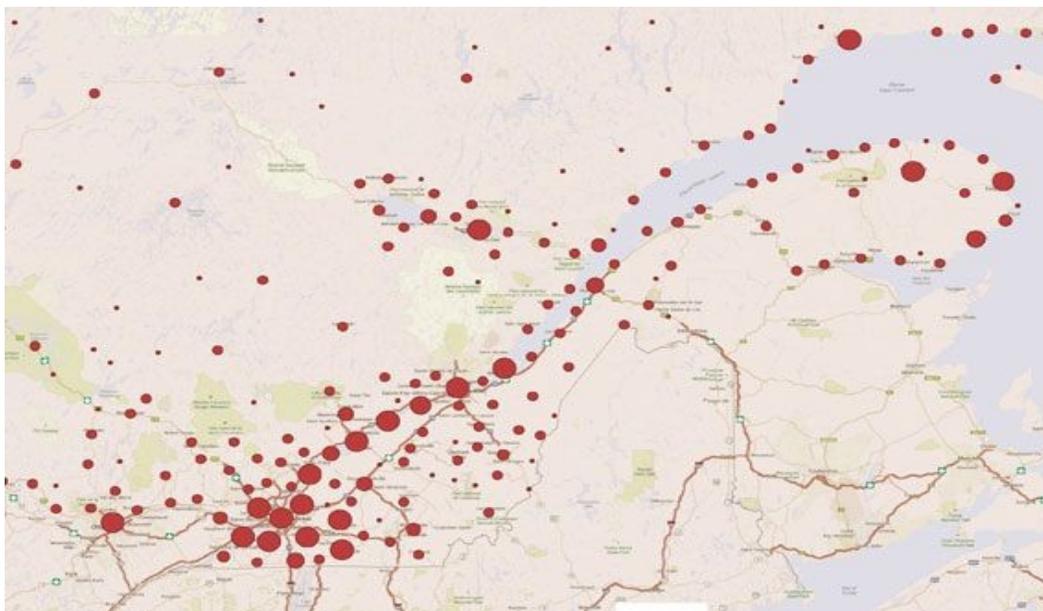


Figure 1.1 Carte illustrant la répartition des sites contaminés dans le sud du Québec. La dimension d'un point représente le nombre de terrains contaminés dans la zone. En collaboration avec 37e Avenue et MapGears, publiés dans l'édition du 1er février de *Les Affaires*.

La nécessité d'innover et de développer des techniques plus abordables et respectueuses de l'environnement ainsi que l'augmentation quasi continue du nombre de sites pollués à l'échelle mondiale a encouragé la communauté scientifique à développer de nouvelles méthodes de décontamination (Cunningham et al. 1995; Cunningham and Ow 1996; Newman and Reynolds 2004). Plusieurs chercheurs ont donc misé sur la phytoremédiation comme alternative pour son très faible coût, sa facilité d'utilisation et son très faible impact sur l'environnement (Di Baccio et al. 2011).

L'ensemble de mes recherches a été mené dans le cadre du projet GenoRem, un projet multidisciplinaire qui réunit plusieurs scientifiques de l'Université de Montréal et de l'Université McGill et qui vise à perfectionner les techniques de bioremédiation à travers les processus biologiques et moléculaires impliqués dans l'interaction saule-microflore-sol. Mes travaux s'orientent sur l'évaluation de l'impact des contaminants organiques (HAPs, BPCs et C10-C50) sur la tolérance et la productivité de onze cultivars de saule arbustif (*Salix sp.*).

Les expérimentations ont pris place sur le site de l'ancienne usine de production de produits dérivés de pétrole, Pétromont, situé dans la ville de Varennes (45 ° 43 N, 73 ° 22 W), sur la Rive-Sud de Montréal (Figure 1.2). Pétromont est une société en commandite créée en 1979 et appartenant à parts égales à la Société générale de financement (SGF) et au géant américain Dow Chemical. L'entreprise était reconnue comme le principal fournisseur de produits pétrochimiques et de résines de polyéthylène pour le secteur du plastique dans la région du Grand Montréal. La compagnie a mis la clé dans la serrure en 2009 et a depuis été démantelée laissant derrière elle plusieurs hectares de terres contaminées à divers degrés par des composés organiques et inorganiques. Pétromont a entrepris de restaurer le site en respect de la loi 72; *Loi modifiant la Loi sur la qualité de l'environnement et d'autres dispositions législatives relativement à la protection et à la réhabilitation*, mise en vigueur depuis mars 2003 (Hébert 2006). Certains secteurs du site ont été excavés et déplacés, d'autres espaces sont utilisés pour nos travaux de recherche.

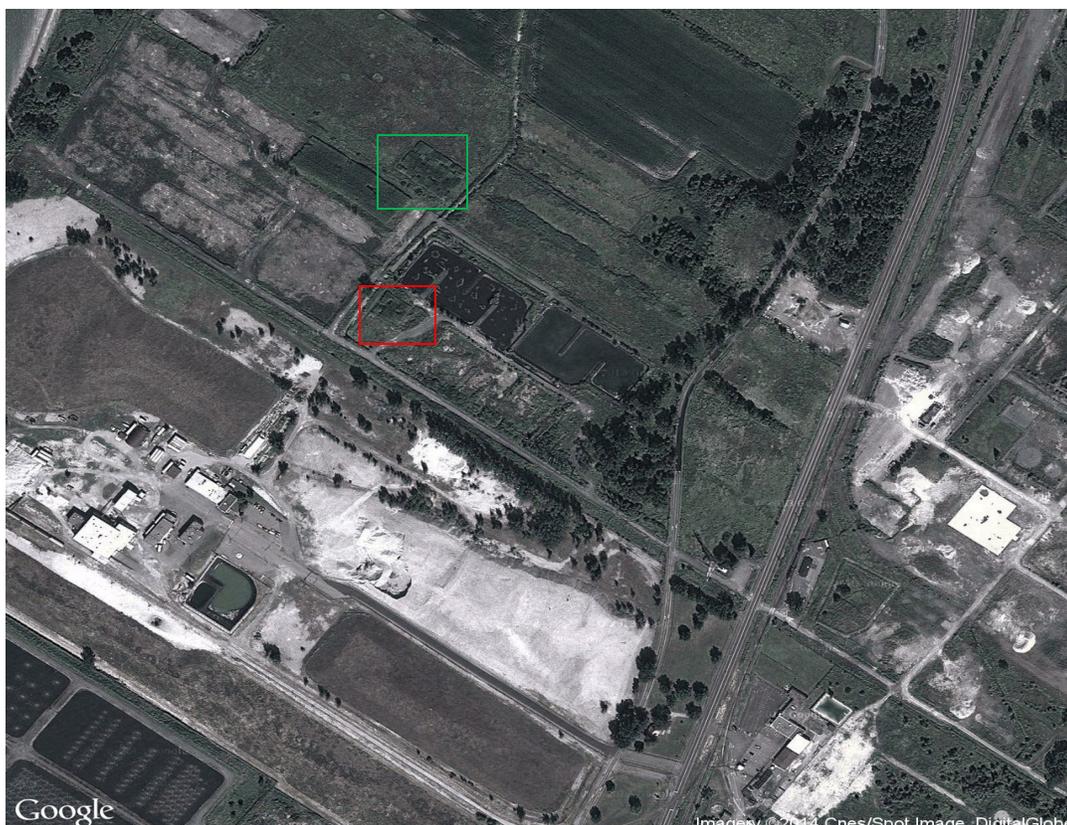


Figure 1.2. Photo aérienne du site de Pétromont. La zone encadrée en vert représente le secteur servant de témoin (non contaminé) et celle encadrée en rouge le site contaminé.

1.2 Objectifs et hypothèses du projet

Les objectifs de ce projet consistaient principalement à :

— Comparer 11 cultivars de saule cultivés sur deux types de sol (contaminé et non contaminé) durant deux saisons de croissance par le suivi de différents paramètres morphologiques et physiologiques (hauteur, diamètre, nombre de tiges, surface foliaire, taux de chlorophylle, conductance stomatique, statut nutritionnel) et la comparaison, au terme de cette étude, du rendement en biomasse aérienne.

— Évaluer la capacité des cultivars de saules à s'établir et à tolérer des conditions de stress sévère relié à la présence de contaminants organiques tels les HAPs, BPCs et les hydrocarbures pétroliers de type C10-C50.

Ces objectifs se basent sur les hypothèses suivantes :

— Les cultivars devraient avoir des réactions différentes à la contamination et présenter des niveaux de tolérance différents.

— Les cultivars les plus performants dans le sol exempt de contaminants seront ceux qui seront les plus performants en présence de contamination.

2 Revue de littérature

Le prochain chapitre réunit les informations nécessaires à la compréhension des différentes techniques utilisées en phytoremédiation et les mécanismes impliqués dans le processus. Suivra un aperçu des caractéristiques physicochimiques des différents composés organiques traités dans l'étude ainsi qu'un survol complet sur le genre *Salix*; sa classification, ses caractéristiques, sa physiologie et son utilisation dans diverses applications environnementales.

2.1 La phytoremédiation

La phytoremédiation regroupe un ensemble de technologies qui repose sur les différentes interactions impliquant les plantes, le sol et les micro-organismes présents dans la rhizosphère dans le but d'y dégrader, extraire ou stabiliser différents contaminants organiques ou inorganiques (Figure 1.3) (Cunningham et al. 1995; Corseuil and Moreno 2001; Trapp and Karlson 2001; Susarla et al. 2002; Vervaeke et al. 2003; Newman and Reynolds 2004; Yang et al. 2005; Zalesny et al. 2005; Komives and Gullner 2006; Mleczek et al. 2010). Le sol est un

milieu très complexe servant de matrice pour la croissance des plantes et de la microflore qui utiliseront les composés disponibles et utiles à leur développement. Outre les éléments utiles et essentiels à la survie de la flore, il n'est pas rare de retrouver une vaste gamme de composés qui peuvent être nocifs ou le devenir si leur concentration dépasse le seuil de toxicité toléré par la plante. Plusieurs composés, essentiellement des métaux, sont retrouvés de façon naturelle, à différentes concentrations dans la croûte terrestre. Certains sont même essentiels au bon fonctionnement des cellules végétales et animales. On considère qu'un composé a atteint le niveau de « contaminant » lorsqu'il est présent dans un milieu dans lequel on ne le retrouve pas naturellement ou lorsque sa concentration dans le milieu dépasse celle naturellement retrouvée (Cunningham and Ow 1996; McIntyre 2003; Yang et al. 2005; Vangronsveld et al. 2009).

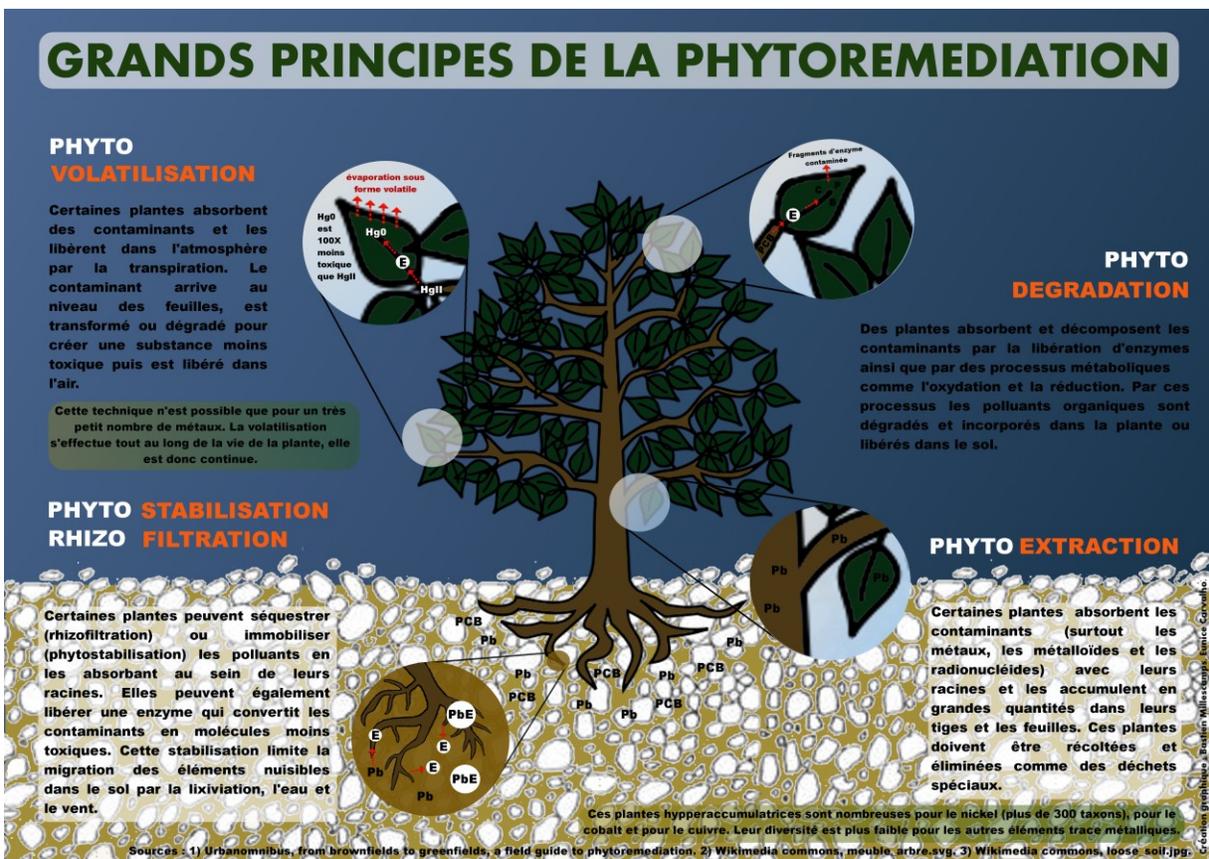


Figure 1.3 Schéma synthétique présentant les grands principes de la phytoremédiation

La présence d'une microflore diversifiée en bactéries et en mycorhizes au niveau de la rhizosphère est essentielle et assure la dégradation efficace des composés organiques contenus dans le sol, incluant les contaminants organiques. Ces micro-organismes agissent en augmentant la mobilité et en dégradant la fraction peu soluble des contaminants ce qui améliore la disponibilité de ces composés en les rendant plus assimilables pour la plante (Jordahl et al. 1997; Tesar et al. 2002; Vangronsveld et al. 2009). L'interaction entre la plante et les micro-organismes est considérée comme une relation de symbiose, où les deux parties retirent divers avantages. La présence de végétaux crée un environnement favorable au développement de ces microorganismes en sécrétant des exsudats essentiels pour leur prolifération (ex. composés organiques acides de faible poids moléculaire, sucres, acides aminés, enzymes). Ces exsudats ont pour effet de modifier la solubilité/mobilité des éléments du sol par différents procédés physicochimiques (acidification, chélation, précipitation et oxydoréduction) (Macek et al. 2000; Drzewiecka et al. 2012; Gąsecka et al. 2012). Par ailleurs, la présence des organismes rhizosphériques profite à la plante en augmentant son accès aux ressources, en facilitant l'absorption des contaminants, en retenant les particules du sol afin de le stabiliser, en diminuant les impacts causés par une sécheresse prononcée du sol et en diminuant le stress causé par la toxicité du composant (Rooney et al. 2009).

De nombreuses espèces de plantes ont la capacité d'accumuler dans leurs tissus des métaux lourds, des radionucléides, des composés organiques polluants et d'autres produits indésirables. Ces connaissances ont contribué à l'essor important des technologies de décontamination *in situ* au cours des dernières années (Cunningham and David 1994; Bell et al. 2013; Cloutier-Hurteau et al. 2013).

On reconnaît une grande variété de mécanismes impliqués dans la phytoremédiation. La phytodégradation ou rhizodégradation, est définie comme la dégradation/transformation de polluants organiques en composés généralement plus simples et moins toxiques. Suite à la libération de diverses enzymes favorisant la métabolisation du composé, une variété d'agents nocifs tels les hydrocarbures, les herbicides et insecticides et divers solvants chlorés peuvent être modifiés au niveau des tissus de la plante par l'activité métabolique de celle-ci ou dans la rhizosphère grâce à l'action de la microflore (Trapp and Karlson 2001; Conger 2003; Mirck et al. 2005; Gerhardt et al. 2009; Vangronsveld et al. 2009).

La phytoextraction a lieu lorsque la plante est en mesure d'absorber les contaminants présents dans le sol. Ces polluants sont majoritairement de nature inorganique et sont extraits par les racines de la plante et transloqués puis accumulés dans divers organes aériens ou souterrains selon la nature du contaminant et sa biodisponibilité. Le composé toxique doit absolument être sous une forme soluble pour que l'absorption ait lieu et le niveau de biodisponibilité influencera la distance que le composé parcourra dans les tissus de la plante. La capacité d'extraction est fortement reliée à la production de biomasse par la plante. Ainsi, une plante ayant un rendement en biomasse élevé sera en mesure d'accumuler une quantité de métaux beaucoup plus importante. Par la suite, la plante peut être incinérée permettant ainsi de récupérer les métaux accumulés. On parle dans ce cas de « phytominage » (Cunningham and David 1994; Trapp and Karlson 2001; Conger 2003; Mirck et al. 2005; Gerhardt et al. 2009; Vangronsveld et al. 2009).

La phytostabilisation intervient en précipitant ou en piégeant les polluants dans la plante. Leur mobilité en est ainsi diminuée et leur dispersion dans la nappe souterraine est ralentie. Dans ce cas, on opte pour une plante qui possède une grande capacité de pompage et un taux d'évapotranspiration élevé couplé à un système racinaire important qui permettra une régulation hydraulique efficace. Les contaminants peuvent également être stabilisés en étant transformés ou précipités en composés non solubles suite à des réactions chimiques dans la rhizosphère (Trapp and Karlson 2001; Conger 2003; Mirck et al. 2005; Gerhardt et al. 2009; Vangronsveld et al. 2009).

Pour terminer, on reconnaît la phytovolatilisation, où la plante absorbe des composés organiques présents dans le sol et les volatilise dans l'atmosphère lors du processus de transpiration. Les composés toxiques sont pompés par les racines et sont modifiés ou dégradés lors de leur parcours dans la plante (Trapp and Karlson 2001; Conger 2003; Mirck et al. 2005; Gerhardt et al. 2009; Vangronsveld et al. 2009).

2.2 Les contaminants organiques

Les contaminants organiques tels les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les biphényles polychlorés (BPCs) et les hydrocarbures pétroliers C10-C50 sont des polluants de nature presque essentiellement anthropique et largement retrouvés d'un bout à l'autre du globe. Les HAPs contrairement aux BPCs peuvent être créés naturellement, notamment lors de feux de forêts. Les sources anthropiques les plus importantes sont la combustion d'énergie fossile, les rejets d'alumineries, les déversements de produits pétroliers, les usines métallurgiques, les cokeries, la dispersion de matières créosotées, les déversements d'hydrocarbures accidentels, les précipitations et les dépôts atmosphériques, les procédés industriels (brai de goudron, asphalte et épandage des boues, les effluents municipaux et l'élimination (enfouissement) de déchets contenant des HAP (Jackson 1985; Branch and Centre 1988; Vandermeulen 1989; Wan 1991; Wan 1994). Les BPCs quant à eux sont des produits chimiques industriellement synthétisés. Ils n'ont jamais été produits au Canada, mais ont été largement utilisés comme diélectriques dans les transformateurs et les condensateurs électriques, comme fluides caloporteurs et hydrauliques, en tant qu'additifs pour peinture ou dans les plastiques ou dans l'huile de coupe et l'encre (Harvey 1991; Gilbert and Walsh 1996; Mastral and Callén 2000; Gouvernement du Canada 2004; Bard 2006; Gouvernement du Canada 2006).

La solubilité dans l'eau des HAPs va de très faible à faible. Leurs coefficients de partage octanol/eau (K_{ow}) sont relativement élevés, ce qui favorise l'adsorption des HAPs présents dans le sol sur les matières particulaires et une dégradation très lente par la faune microbienne (Bosma et al. 1997; Grosser et al. 2000). Les HAP sont éliminés des sols par divers procédés comme la volatilisation, la photolyse, l'oxydation et l'activité microbienne; l'importance de ceux-ci dépend de plusieurs facteurs comme la température, le type de sol, la présence d'autres contaminants, la concentration du contaminant, le taux de désorption et la masse moléculaire. Les HAP à faible masse moléculaire (ex.: Naphtalène) se volatilisent plus rapidement que les HAP à masse moléculaire élevée (ex.: Benzo[a]anthracène) (Bulman 1985; Ogram et al. 1985; Wild et al. 1991; Wild and Jones 1993; Cornelissen et al. 1998).

La solubilité des BPC dans l'eau varie selon leur composition, mais elle est habituellement extrêmement faible. Les BPCs sont solubles dans les solvants organiques non polaires, les huiles et les tissus biologiques riches en lipides. Les coefficients de partage octanol-eau des BPC sont très élevés, ce qui signifie que, comme pour les HAPs, ils sont très peu solubles dans l'eau, ils sont donc facilement bioaccumulables dans les tissus lipidiques par exemple, mais sont très peu biodisponibles pour les plantes (Gilbert and Walsh 1996).

2.2 *Salix* et ses caractéristiques

Le genre *Salix*, de la famille des Salicaceae, regroupe entre 330-500 espèces d'arbres et d'arbustes qui colonise principalement les régions fraîches et humides de l'hémisphère nord. La structure taxonomique du genre *Salix* est un sujet largement débattu, mais il semblerait y avoir un certain consensus sur la classification et ainsi, on reconnaîtrait cinq sous-genres différents à l'intérieur du genre *Salix* : *Salix* (*S. alba*), *Protitea*, *Longifoliae* (*S. nigra*), *Chamaetia* (*S. acutifolia*) et *Vetrix* (*S. eriocephala*, *S. caprea*, *S. viminalis*, *S. purpurea*, *Salix miyabeana*, *Salix dasyclados*) (Argus 1986; Kuzovkina and Volk 2009). Le sous-genre *Vetrix* englobe près des deux tiers des espèces du genre et comprend principalement des arbustes et de petits arbres. Les saules sont des espèces pionnières, de début de succession. C'est-à-dire qu'avec d'autres espèces, comme le peuplier et le bouleau, ils font partie des premiers arbres ou arbustes à coloniser un milieu ouvert, perturbé, ou une zone riparienne. Leur croissance requiert un maximum de lumière et des précipitations importantes. Les saules sont des plantes ligneuses à feuilles caduques, alternes, généralement lancéolées et souvent stipulées. Les plants sont dioïques et les inflorescences tant mâles que femelles se présentent sous la forme de chaton.

2.3 Les applications environnementales

Les membres de la famille des Salicaceae, particulièrement les saules, ont été utilisés depuis fort longtemps par un grand nombre de civilisations. On relate que certains peuples du Moyen-Orient utilisaient le saule il y a plus de 10 000 ans pour cuisiner, chauffer et construire

leur maison. Son utilisation s'est développée par la suite. Il a été cultivé pour en extraire l'acide salicylique qui entre dans la composition de l'aspirine, pour construire des paniers, des bateaux, des binettes, des charrues, divers manches à outils, des chaussures, des meubles, des filets, de la corde et j'en passe (Kuzovkina and Quigley 2005; Isebrands and Richardson 2014).

Plus récemment, l'utilisation du saule s'est orientée vers des applications plus environnementales. Depuis quelques décennies, le genre *Salix* est au centre de plusieurs projets de recherche et de développement pour la production de ressources renouvelables pour les compagnies œuvrant dans le domaine des bioénergies (Hoffmann and Weih 2005; Labrecque and Teodorescu 2005; Keoleian and Volk 2005). La culture intensive du saule en courtes rotations pour la production de biomasse et de bioénergie est sans aucun doute l'application la plus connue et répandue du saule arbustif (Weih and Nordh 2002). Les études menées dans ce domaine ont permis d'acquérir énormément de connaissances sur l'écologie, la physiologie et la génétique du saule (Verwijst 2001; Smart et al. 2005) qui ont pu être transférées pour faciliter l'apparition d'applications plus récentes telles les haies résidentielles, brise-vent et antibruit, les clôtures et les structures végétales, les vanneries, les bandes riveraines, la naturalisation de site abandonné, la décontamination des sols et des effluents contaminés, la réduction de la pollution de l'air et la biorestauration de sites d'assainissement des eaux. Ces nouvelles applications se développent très rapidement et s'orientent principalement vers le traitement de l'eau et des sols contaminés (Corseuil and Moreno 2001; Aronsson and Perttu 2001; Vervaeke et al. 2003; Zalesny et al. 2005; Kuzovkina and Quigley 2005; Ucisik and Trapp 2006; Ucisik and Trapp 2008; Mleczek et al. 2010) conjointement à la production de biomasse (Kopp et al. 2001a; Adegbi et al. 2001; Weih and Nordh 2002; Laureysens et al. 2004; Labrecque and Teodorescu 2005; Volk et al. 2006; Sevel et al. 2012; Guidi et al. 2013).

2.4 L'écophysiole du saule et l'impact des contaminants

Plusieurs saules arbustifs à croissance rapide faisant partie du sous-genre *Vetrix* notamment ont fait l'objet d'hybridation et de programmes d'amélioration génétique afin d'optimiser les performances des dispositifs utilisés dans diverses phytotechnologies. Il existe présentement plusieurs centaines de cultivars différents, sélectionnés pour une ou plusieurs caractéristiques spécifiques. Le nombre de cultivars développés s'accroît annuellement, suivant les besoins associés au climat, au sol et l'utilisation qu'on désire en faire (Kuzovkina and Volk 2009).

On reconnaît chez le saule une multitude de caractéristiques qui font d'eux d'excellents choix pour la phytoremédiation de sols contaminés. L'intérêt pour ces saules vient entre autres de leur croissance rapide, leur forte production de biomasse, leur variabilité génétique, leurs traits adaptatifs selon le type de sol et de contaminant, leur grande capacité de pompage de l'eau relié à leur haut taux de transpiration élevé, leur système racinaire fortement développé, leur tolérance à la sécheresse, aux inondations, à un taux de salinité élevé, au gel, à la chaleur, à des niveaux de pH très bas, leur facilité de reproduction, de propagation et de production, leur fort taux de photosynthèse, leur capacité à absorber et accumuler une vaste gamme de contaminants et nutriments, leur capacité à produire des racines malgré un sol pauvre en oxygène, leur capacité à croître dans une plantation à forte densité, etc. (Perttu and Kowalik 1997; Corseuil and Moreno 2001; Trapp and Karlson 2001; Aronsson and Perttu 2001; Susarla et al. 2002; Vervaeke et al. 2003; Zalesny et al. 2005; Komives and Gullner 2006; Yu et al. 2008; Mleczek et al. 2010; Di Baccio et al. 2011; Drzewiecka et al. 2012; Gąsecka et al. 2012)

La présence de contaminants dans le sol est reconnue comme ayant un impact négatif sur la croissance et le métabolisme des plantes. Lorsque la présence d'un composé potentiellement toxique pour la plante dépasse le seuil de phytotoxicité, la plante subit divers problèmes reliés à l'absorption de nutriments, à la performance photosynthétique et aux échanges gazeux, ce qui peut mener à des problèmes de croissance et de développement ainsi qu'à des déséquilibres biochimiques (Kukkola et al. 2000; Wu et al. 2010; Drzewiecka et al. 2012; Gąsecka et al. 2012). Plusieurs études ont démontré que la présence d'agents toxiques

dans le milieu de croissance d'une plante menait à une diminution de la biomasse des racines, à une diminution de la longueur/taille des racines, des tiges, et des feuilles et une sénescence prématurée des feuilles (Morris et al. 2000). Dans le cas d'une contamination au HAPs, des études ont établi que les effets sur le taux de croissance des plantes étaient dépendants de la concentration du composé (Huang et al. 2005). Ce phénomène se nomme hormèse et survient lorsqu'il y a une stimulation des défenses biologiques favorables d'un organisme en réponse à une faible exposition de stress ou de toxines. Ce phénomène résulte en une augmentation de croissance de la plante et une accélération du taux d'absorption des contaminants lorsque la concentration en HAPs est faible. Le phénomène inverse est observé lorsque la concentration du contaminant atteint un certain seuil; le développement ralenti, jusqu'à l'arrêt total de croissance. Les HAPs agissent également en pénétrant dans la plante et en diminuant l'efficacité d'utilisation de l'eau et des nutriments, en inhibant l'activité photosynthétique et la chaîne de transport d'électrons (Laughlin et al. 1981; Reilley et al. 1996; Calabrese 2004; Calabrese and Blain 2009). Les réactions possibles chez la plante sont toutefois très variables et dépendent de plusieurs facteurs comme les conditions expérimentales, le type de plante utilisé, le type de sol, la nature et la concentration des contaminants. La présence d'un composé en trop grande quantité peut également entrer en compétition avec d'autres éléments essentiels pour la plante, ce qui peut causer certaines carences ou induire un stress oxydatif. L'introduction de contaminants dans la plante catalyse directement ou indirectement la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et de radicaux libres (Michalak 2006). Une diminution de l'activité de certaines enzymes antioxydantes est également fréquente (Chen et al. 2009). Ces enzymes ont comme rôle de détoxifier les radicaux libres, les DRO, ce qui amène une surabondance de ces composés et l'apparition de stress oxydatifs. Les DRO sont hautement réactifs et tendent à réagir avec les composantes organiques des cellules comme les protéines, les lipides, la chlorophylle et l'ADN. Ces réactions peuvent contribuer à la peroxydation lipidique au niveau de la membrane cellulaire, à des défauts de développement et une instabilité génétique (Tsang et al. 1991; Michalak 2006). Ce type de réaction largement répandue chez presque toutes les plantes est en lien avec plusieurs types de stress biotiques et abiotiques (Inzé and Montagu 1995).

La présence de contaminants dans la plante cause dans plusieurs cas une augmentation de la concentration de divers sucres (glucose, fructose, sucrose) dans les feuilles, qui serait la conséquence d'une perturbation au niveau de l'hydrolyse de l'amidon (Mandre et al. 1998; Roitto et al. 2005; Rejšková et al. 2007; Drzewiecka et al. 2012; Gąsecka et al. 2012). L'accumulation de glucides à l'intérieur des organes photosynthétiques cause une diminution de la production de la photosynthèse et une sénescence prématurée des feuilles (Wingler et al. 2006; Tholen et al. 2007). Le ralentissement de l'activité de l'appareil photosynthétique pourrait être dû à une accumulation de glucose dans les feuilles, molécule qui agirait comme inhibitrice de l'expression de divers gènes photosynthétiques (Sheen 1990). Dans le cas de la contamination au nickel et au cuivre par exemple, on suggère que leur présence empêcherait le transport des sucres de la feuille vers les autres organes de la plante. Cet arrêt de transport des glucides vers la plante et l'augmentation de la sécrétion d'exsudats racinaires vers la rhizosphère provoquée par la présence des contaminants et les besoins énergétiques de la microflore est coûteux énergiquement pour l'organisme et peut entraîner une diminution du taux de photosynthèse et de production de biomasse.

3 Méthodologie

Le dispositif expérimental utilisé pour l'étude a été mis en place au cours de l'été 2011 sur le site de l'ancienne industrie de pétrochimie Pétromont, localisé à Varennes, sur la Rive-Sud de Montréal (Figure 3.1). Le site a été divisé suivant un modèle de bloc aléatoire pseudorépliqué et comporte deux secteurs distancés par une centaine de mètres, soit un contaminé (900 m²) et un non contaminé (2400 m²) servant de témoin. Étant donné la nature du site étudié, il était impossible de répliquer le facteur « contamination » à l'intérieur des blocs. Nous sommes donc conscients que la conception expérimentale de l'étude a certaines limites et celles-ci ont été prises en considération en conduisant les analyses statistiques appropriées (Hurlbert 1984). Quatre blocs sur le site non contaminé (parmi les huit blocs présents) et les trois blocs sur le site contaminé ont été sélectionnés pour le suivi des cultivars (Figure 3.1). Chaque bloc est divisé en 12 parcelles qui contiennent chacune un des 11

cultivars, une parcelle par bloc est laissée non plantée à titre de témoin. La caractérisation du sol réalisé avant la plantation a permis de confirmer la présence d'une vaste gamme de contaminants organiques sur le secteur contaminé et l'absence de contaminant sur le secteur témoin. Nous avons également évalué les conditions physicochimiques des deux types de sol (Tableau 4.3).

4	SV1	Témoin	SX61	SX67	SV1	Témoin	S05	S54	5
	S44	Mill	S33	Fish	S365	S33	SX61	Mill	
	S25	S05	Mill	S25	Fish	S44	S25	SX67	
3	S33	S54	SX67	Fish	Témoin	Fish	Mill	S365	6
	SX61	Témoin	Mill	S25	S33	SX61	S05	S25	
	SV1	S365	S05	S44	S54	SX67	S44	SV1	
2	SV1	SX67	S33	S05	S365	S25	Témoin	Mill	7
	Fish	S54	Témoin	S365	SV1	SX67	S33	S44	
	Mill	SX61	S25	S44	S54	SX61	S05	Fish	
1	S05	S33	Mill	SV1	S33	SX67	Témoin	Mill	8
	S365	SX67	S25	S54	S05	S25	SX61	S365	
	S44	Fish	Témoin	SX61	SV1	Fish	S44	S54	

2	S54	S44	SX67	S365	S05	SX61
	SX61	Témoin	S05	Fish	S54	SV1
	Mill	SV1	S25	S33	Témoin	S25
1	S54	Fish	Mill	S05	Mill	S33
	SX67	Témoin	S25	S44	S44	SX67
	SX61	SV1	S365	S33	S365	Fish
						3

Figure 3.1 Schémas représentant le dispositif expérimental. Le dispositif de gauche représente le secteur non contaminé et celui de droite le secteur contaminé. Les blocs colorés en gris sont ceux qui ont été sélectionnés pour l'étude.

Au total, 11 cultivars de saule ont été sélectionnés pour l'étude et ont été plantés en mai 2011 : *Salix purpurea* Fish Creek; *Salix miyabeana* SX67; *Salix miyabeana* SX61; *Salix nigra* S05; *Salix eriocephala* S25; *Salix caprea* S365; *Salix dasyclados* SV1; *Salix acutifolia* S54; *Salix alba* S44; *Salix viminalis* S33 and *Salix purpurea* X *Salix miyabeana* 'Millbrook' (Tableau 4.2). Les boutures ont été plantées à une densité de 30 000 par hectare et un recépage a été effectué à la fin de l'année 2011.

L'été 2012 a marqué le début du suivi de croissance (hauteur, diamètre et nombre de tiges) et de la prise de différents paramètres physiologiques (conductance stomatique, taux de chlorophylle et surface foliaire). Les mesures ont été répétées à quatre reprises à raison d'une

fois par mois (de juin à septembre). Les mesures de conductance ont été répétées à la même fréquence lors de l'été 2013 et les valeurs finales de hauteur, diamètre, nombre de tiges et taux de chlorophylle ont été récoltées en septembre uniquement. À cela se sont ajoutées les mesures de statut nutritionnel (calcium, magnésium, phosphore, potassium, azote, bore, cuivre, fer, manganèse et zinc) et de biomasse aérienne des saules. Les mesures de croissance, le taux de chlorophylle et les mesures de surface foliaire ont été prises sur huit individus, choisis de façon aléatoire par parcelle, pour un total de 616 individus mesurés. Les mesures de conductance stomatique ont été effectuées sur cinq individus par parcelle, les mesures de biomasse sur quatre arbres par parcelle et les mesures de statut nutritionnel sur un seul arbre.

Les analyses statistiques ont été réalisées sur la moyenne des mesures récoltées pour chaque traitement et pour chaque cultivars afin d'éviter les problèmes liés à la pseudo réplication. Les mesures utilisées pour les analyses sont celles récoltées en septembre 2013, seules les analyses de surface foliaire ont été faites avec les valeurs de 2012 puisque cette mesure n'a pas été reconduite en 2013. Les analyses de conductance stomatique ont été faites avec la moyenne des mesures récoltées de juin à septembre 2013. L'analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) a été choisie pour la comparaison des moyennes des différentes mesures prises sur les deux types de sol. Les deux facteurs expérimentaux, soit le génotype et la « présence » ou « absence » de contamination ont été analysées et la présence d'une différence significative entre les moyennes a été mise en évidence avec le test de Tukey (HSD) ou le test de Student (t-test) selon le type de données disponible. Le seuil de significativité a été établi à $\alpha = 0,05$ et des analyses subséquentes ont été menées lorsque le p-value des ANOVA était tout juste sous le seuil de la significativité. Un test de Wilcoxon a été conduit sur les analyses physicochimiques du sol afin d'évaluer la similarité des deux secteurs à l'étude.

4 Genotypic differences explain most of the response of willow cultivars to petroleum-contaminated soil

Authors: Grenier, Vanessa¹; Pitre, Frédéric E.¹; Guidi Nissim, Werther^{1,2}; Labrecque, Michel¹

¹ Institut de recherche en biologie végétale, 4101 Sherbrooke East, Montréal, Québec, Canada, H1X 2B2

² Department of Plant, Soil and Environmental Science, University of Florence, Piazza di San Marco, 4, 50121 Florence, Italy

4.1 Abstract

Tolerance of *Salix* to various organic and inorganic contaminants has been well documented and can vary widely among genotypes. In this study, we compared the responses and tolerances of 11 willow cultivars grown in soil contaminated with petroleum hydrocarbons (PHC). The study aimed to identify cultivars with the best performance and capacity to establish under these conditions. Using cuttings of the selected willow genotypes, a high-density field experiment was set up on a former industrial site encompassing two distinct sectors: one contaminated (900 m²), and the other uncontaminated (2400 m²), which was used as control following a randomized block design. Trees were monitored over two growing seasons by recording a series of growth parameters and physiological measurements (leaf area, chlorophyll concentration, stomatal conductance and nutrient concentration). Genotypic differences explained most of the responses of cultivars observed to soil contamination. *S. miyabeana* (SX67 and SX61) achieved the highest biomass production, while *S. nigra* (S05) and *S. acutifolia* (S54) had the highest photosynthetic capacity. While the cultivars *S. dasyclados* (SV1), *S. purpurea* ('Fish Creek') and *S. caprea* (S365) appeared to be negatively affected by the presence of contaminants, the establishment and development of S05, *S. eriocephala* (S25) and *S. purpurea* X *S. miyabeana* ('Millbrook') was much less influenced

by soil pollution. Our results will help to guide cultivar selection in future phytoremediation projects.

Keywords

Salix, organic compound, ecophysiology, phytoremediation, biomass

4.2 Introduction

Soil contamination from a range of sources is increasingly problematic around the world. The high financial and environmental costs associated with conventional decontamination techniques have motivated the search for more affordable and sustainable approaches (Cunningham et al. 1995; Cunningham and Ow 1996; Newman and Reynolds 2004). Researchers have turned to phytoremediation as a low-cost alternative with minimal negative environmental impacts (Di Baccio et al. 2011). Phytoremediation uses plants to stabilise, reduce or degrade organic and inorganic pollutants present in air, water or soil as a result of human activities (Trapp and Karlson 2001; Susarla et al. 2002; Zalesny et al. 2005; Komives and Gullner 2006). Several distinct mechanisms are included in phytoremediation, i.e. phytodegradation, phytoextraction and phytostabilisation (Report 1997; Gerhardt et al. 2009; Vangronsveld et al. 2009). Given the low water solubility of hydrophobic organic compounds such as PAHs and PCBs, these contaminants are only very minimally bioavailable to plants and can only rarely be extracted from the ground. However, there is evidence that some of these compounds can be absorbed by plants (Conger 2003; Newman and Reynolds 2004; Vangronsveld et al. 2009). Most frequently, plants and their rhizosphere microflora are used to degrade or transform contaminants into less toxic compounds (Macek et al. 2000).

Willows possess many features that make them an excellent choice as a model species in phytoremediation field experiments. These include rapid growth, high biomass production, high genetic variability, important capacity to pump water efficiently to maintain a high transpiration rate, well-developed root system and the ability to absorb and accumulate a wide range of pollutants (Perttu and Kowalik 1997; Vervaeke et al. 2003; Kuzovkina and Quigley 2005; Mleczek et al. 2010; Drzewiecka et al. 2012; Gąsecka et al. 2012). The presence of

contaminants in soil at levels exceeding thresholds for phytotoxicity is known to have a negative impact on metabolism of plants, affecting absorption of nutrients, photosynthetic performance and gas exchange, growth and development (Kukkola et al. 2000; Wu et al. 2010).

Several studies have demonstrated that the presence of toxic agents in the environment leads to a decrease in size and biomass of roots, stems, and leaves, length, and premature senescence of leaves (Morris et al. 2000). In this study, we compared various physiological responses as well as productivity of 11 willow cultivars grown on a site contaminated by petroleum. The aim of the study was to assess their ability to establish in conditions of severe stress related to the presence of organic compounds such as PAHs, PCBs and C10 - C50 petroleum hydrocarbons. Our objective was to identify cultivars with the best performance and capacity to establish under these conditions, which would therefore be ideal candidates for future phytoremediation projects in southern Québec, Canada.

4.3 Material and methods

4.3.1 Experimental design, site description and willow material

A high-density field experiment was established in May 2011 near a former petrochemical plant in Varennes, southern Québec, Canada (45°46' N, 73°22' W). The region has a continental climate characterized by an average annual temperature of 6.6 °C and 984 mm of precipitation (including 186 cm of snow). Mean temperature and total yearly precipitation at the site are presented in Table 4.1. Cuttings were planted in June 2011 and coppiced at the end of October, in a randomized block design on an area encompassing two distinct sectors: one moderately contaminated (900m²) with petroleum hydrocarbons (PHC) and another (2400 m²), uncontaminated, which was used as control. Soil characteristics of each sector are presented in Table 4.2. Eleven willow cultivars were selected for the study (Table 4.3): *S. purpurea* 'Fish Creek'; *S. miyabeana* SX67; *S. miyabeana* SX61; *S. nigra* S05; *S. eriocephala* S25; *S. caprea* S365; *S. dasyclados* SV1; *S. acutifolia* S54; *S. alba* S44; *S. viminalis* S33 and *S. purpurea* x *S. miyabeana* 'Millbrook' (Dickmann & Kuzovkina, 2008;

Newsholme, 1992). The experimental design comprised three blocks on the contaminated sector and four on the uncontaminated. Each block covered 300 m² and was split into 12 plots, one cultivar plus a control per plot. Cuttings were planted at a density of 30 000 ha⁻¹. Five rows spaced by 1 m were planted in each plot. Each row comprised 75 cuttings distanced by 30 cm from one another. The rows on the border of each plot served as a buffer and were not used in the experiment. Willows were monitored over two growing seasons (2012 and 2013) by recording a series of growth and physiological measurements (leaf area, chlorophyll concentration, stomatal conductance and nutrient leaf status).

For the height, diameter, number of stem, chlorophyll concentration and leaf area, four blocks were monitored on the uncontaminated site (32 trees) and three were monitored on the contaminated site (24 trees). The same sampling strategy was used to evaluate the biomass yield (16 - 12 trees). For the stomatal conductance, three blocks were monitored on each sector (15 - 15 trees). Three blocks per site were selected for the nutrient status of leaves analysis as well (3 - 3 trees).

Table 4.1 Growing season mean temperature (°C), total precipitation (mm) and normal conditions (mean and standard error) from planting to harvest.

Month	Year 1					Year 2					Year 3					Average ¹				
	May	Jun	Jul	Aug	Sep	May	Jun	Jul	Aug	Sep	May	Jun	Jul	Aug	Sep	May	Jun	Jul	Aug	Sep
Av. Temp. (°C)	13.7	19.3	23	21.1	17.4	14.9	20	22.5	22	16	15.1	17.9	22	20.1	15.2	13.4	18.6	21.1	20.1	15.4
Tot. Prec. (mm)	100	131	37.3	205	105	148	69.2	67.5	107	121	116	190	67.4	90.8	48.5	84.5	98.6	93.2	93.6	93

Av. Temp. = Average temperature , Tot. Prec. = Total precipitation from Environment Canada - Verchères Weather Station

¹Average from 1980 to 2010

Table 4.2 Soil analysis for mean hydrocarbon content and physicochemical properties of uncontaminated and contaminated sites made in 2011, before planting

Hydrocarbon concentration (kg ⁻¹)	Soils		Physicochemical properties	Soils	
	Control	Polluted		Control	Polluted
BPCs (total congeners)	< 0.05	0.499*	Electrical conductivity (µS cm ⁻¹)	143	261*
MAHs - Xylene	< 0.2	0.3	pH	6.65	7.12
MAHs - Ethylbenzene	< 0.2	0.4	Organic matter (g/kg)	26.3	33.2
C10-C50	< 100	957	CEC (cmol (+) /kg)	27.9	34.1*
Acenaphtene	< 0.1	5.63*	P-Mehlich III (mg kg ⁻¹)	0.47	0.81*
Acenaphtylene	< 0.1	0.43*	N total (g/kg)	2.8	3.0
Anthracene	< 0.1	3.43	Ca (cmol (+) /kg)	20.3	27.4*
Benzo(a)anthracene	< 0.1	0.27	Al (cmol (+) /kg)	0.136	0.067
Chrysene	< 0.1	0.33	K (small (+) /kg)	1.8	1.6
Fluoranthene	< 0.1	1.17	Mg (cmol (+) /kg)	5.5*	4.7
Fluorene	< 0.1	3.77			
Naphthalene	< 0.1	2.10			
Phenanthrene	< 0.1	20.3*			
Pyrene	< 0.1	1.77			
Methyl-1naphtalene	< 0.1	4.83			
Methyl-2naphtalene	< 0.1	4.87			
Dimethyl-1.3naphtalene	< 0.1	7.80			
Trimethyl-2.3.5naphtalene	< 0.1	2.20			

Values observed in the “Control” column of the hydrocarbon concentration analyses represent the quantification limit. Asterisks indicate a significant difference between the two type of soil. The position of the asterisk indicate which soils has the highest mean value.

Table 4.3 Willow (*Salix* sp.) cultivars used in the project. Modified from (Bell et al. 2013).

Name	Authority	Genotype	Characteristics	Origin / Distribution ¹
FishCreek	SUNY-ESF, NY, USA	<i>Salix purpurea</i>	High biomass production and JGI-DOE sequencing project underway Introduced species	Northern Africa, Europe and Russia
SX67	University of Toronto, ON, Canada	<i>Salix miyabeana</i>	High biomass production Cultivated species	Native of Honshu and Hokkaido, Japan, Russian Far East, Korea, northeast and north China and Mongolia
SX61	University of Toronto, ON, Canada	<i>Salix miyabeana</i>	High biomass production Cultivated species	
S05	Unknown	<i>Salix nigra</i>	Indigenous species	Eastern North America (southern Canada to northern Florida, west from Minnesota and Texas)
S25	University of Toronto, ON, Canada	<i>Salix eriocephala</i>	Indigenous species	Northern and eastern North America, from New Brunswick to British Columbia and south to Virginia, Colorado and California
S365	University of Toronto, ON, Canada	<i>Salix caprea</i>	Introduced species, hybrid	British Isles, lowlands of Europe and central Asia
SV1	University of Toronto, ON, Canada	<i>Salix dasyclados</i>	High biomass hybrid	Northern Europe, Russia to west Asia
S54	Quebec Natural Resources Ministry (QMNR)	<i>Salix acutifolia</i>	High biomass production Cultivated species	Native of Poland and Russia, extending to east Asia
S44	QMNR	<i>Salix alba</i>	High biomass production Introduced species	Europe, British Islands, Asia Minor, western Siberia, northern Africa
S33	QMNR	<i>Salix viminalis</i>	High biomass production and genetic maps available	Eurasia except Far East
Millbrook	SUNY-ESF, NY, USA	<i>S. purpurea x S. miyabeana</i>	High biomass production	Hybrid

4.3.2 Soil analysis

Soil samples were taken for organic compound analysis prior to planting. Twelve core samples were gathered from the top 30 cm of the bulk soil in each of the seven blocks and pooled for analysis. Pooled samples were sent to AGAT Laboratories (specializing in laboratory analysis and accredited by the Standards Council of Canada (SCC) for soil analysis and to determine the concentration of all polychlorinated biphenyls congeners (PCBs), total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), monocyclic aromatic hydrocarbons (MAHs),

halogenated hydrocarbons (THHs) and petroleum hydrocarbons C10-C50 by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. Soil samples were also taken for physicochemical characterisation following the procedure described in (Cloutier-Hurteau et al. 2013). The contamination level at the site was assessed following the generic criteria for soils from the Soil Protection and contaminated Sites Rehabilitation Policy of the Quebec Ministry of Sustainable Development, Environment, Wildlife and Parks (<http://www.mddefp.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique-en/appendix2-Table1.htm>). Results of both analyses are presented in Table 4.2.

4.3.3 Measurements and harvesting

4.3.3.1 Biometric analysis and chlorophyll measurements

Chlorophyll concentration and biometric parameters, including height and diameter of principal shoot and number of stems, were monitored monthly over two growing seasons (year 1 and 2). The chlorophyll level was measured twice for each individual with the Chlorophyll Meter from atLEAF+, Wilmington, USA. Relative chlorophyll concentration was converted to a SPAD value before calculation into total chlorophyll concentration (mg/cm²) using the converter on the atLEAF+ website (<http://www.atleaf.com/>) (Schaper and Chacko 1991; Roitto et al. 2005; Uddling et al. 2007; Zhu et al. 2012) Leaf area data were collected at the end of the first growing season. The area of the first five fully expanded leaves from the apex of eight trees per plot was calculated using the Area Meter MK2 from Delta-T Devices (Cambridge, UK), for a total of 32 stools per cultivar on the uncontaminated sector and 24 on the contaminated one. Stem biomass was harvested at the end of November 2013, when the stems were two years old. The fresh aboveground woody material of the selected trees was weighed in the field using an industrial scale (SAFIR S100 from Gram Precision, Barcelona, Spain). To estimate dry weight from measured fresh weight across the trial, a moisture content of 50% was assumed. Although this value could vary, data from four previous studies (Labrecque and Teodorescu 2005; Guidi et al. 2013; Mosseler et al. 2014b; Mosseler et al. 2014a) all showed a value of 50% with less than 2% of variation, suggesting it's would be unlikely to impact biomass yield assessment in these system.

4.3.3.2 Stomatal conductance

Stomatal conductance was measured from June to September during each of the two growing seasons, and the average per year of the measurements was used for statistical analysis. The top ten mature leaves on each tree were measured twice using two separate Leaf Porometers (Model SC-1, Decagon Devices, Pullman, WA, USA), to measure the stomatal conductance of each genotype on both contaminated and uncontaminated soil simultaneously.

4.3.3.3 Nutrient concentration

About 15 to 20 fully developed leaves from the upper portion of the main stem of one chosen tree for each cultivar on each block were harvested at the end of September of the second growing season for nutrient concentration analysis. 25 g of the leaf material was placed in a cooler and sent to Agridirect Laboratories for analysis. Samples were treated for quantification of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium and trace mineral elements (Al, Na, B, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn) following an adapted version of AOAC Official Method, 16th edition (<http://www.agridirect.ca/systeme/nosmethodes.asp#tissus>).

4.3.3.4 Statistical analysis

Physiological responses and biomass productivity of the 11 willow genotypes on contaminated and uncontaminated soils were compared using JMP ® 8.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The effects of the two experimental factors, i.e. "willow genotype" and "the presence or absence of contamination" were assessed with a two-way analysis of variance (ANOVA). Homogeneity of the variance and normality of the data were checked visually and a logarithmic transformation was performed when necessary. Significance of differences between means was tested by Tukey's HSD test or the Student's t-test, depending on the data, and was considered significant at $\alpha = 0.05$. Further analyses were carried out when the P-value of the ANOVA test was under but very close to significance. A non-parametric Wilcoxon test was performed on the raw data to quantify the difference between the two sectors (uncontaminated and contaminated).

4.4 Results and Discussion

All monitored growth and physiological parameters varied according to the willow genotype during both growing seasons, while contamination had a lower impact, or, in some cases, no significant impact. The overall effects of genotype and contamination, and the combination of genotype and soil contamination on nutrient concentration, growth parameters and physiological variables are shown in Table 4.4.

Table 4.4 ANOVA results for genotype and treatment effect on each physiological measurement (*p* value) at $\alpha = 0.05$.

Variance source	df	Stem Biomass (Mg ha ⁻¹)			Diameter (mm)		Shoot per stool		Chlo. conc. (mg cm ⁻²)		G.S. (mmol m ⁻² s ⁻¹)	LA (mm ²)
		Year 3	Year 2	Year 3	Year 2	Year 3	Year 2	Year 3	Year 2	Year 3	Year 3	Year 2
Genotype	10	0.002 **	0.000 ***	0.000 ***	0.001 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***
Treatment	1	0.020 *	0.002 **	0.009 **	0.010 **	0.031 *	0.003 **	0.293	0.171	0.009 **	0.673	0.037 *
Genotype x Treatment	10	0.046 *	0.005 **	0.141	0.048 *	0.057	0.481	0.446	0.099	0.179	0.083	0.004 **

df = degree of freedom, S.C. = stomatal conductance, LA = leaf area, *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01 and ***P ≤ 0.001

4.4.1 Growth and yield

Growth parameters, i.e. height, diameter and number of shoots per stool, varied strongly according to genotype. The "treatments" factor (contaminated vs uncontaminated) had a limited impact on these parameters. The height and the diameter were significantly affected by contamination but less than the genotype on the total variance. The treatment explained 24.4% of the variability of height and 12.8% of the diameter compared to 29.2% and 22.5% respectively, of the variability explained by the genotype (Figure 4.1). Eight of the eleven cultivars tested had a significantly shorter stem on the contaminated site. Only S05, S33 and S54 were not affected with a diminution of height of only 9%, 6% and 24% respectively. 'Fish Creek' was the only cultivar with a significantly lower number of stems on uncontaminated versus contaminated soil (25% less stem), a pattern displayed by S365 and

‘Fish Creek’ for diameter size (loss of 36% in diameter size for S365 and 16% for ‘Fish Creek’) (Figure 4.1). *S. alba* (S44) had the longest main stem and the largest stem diameter among cultivars on both uncontaminated and contaminated sectors. S33 had the lowest value of height and diameter on the uncontaminated sector, while S365 had the lowest value on the contaminated one. ‘Fish Creek’ had the highest number of shoots per stool on both uncontaminated and contaminated soils. S33 and S365 had the lowest number of stems on the uncontaminated and contaminated sectors, respectively.

A study have reported that willow growth habit tends to be related to number of stems and diameter (Tharakan and Volk 2005). Genotypes producing several stems generally have lower diameters (‘Fish Creek’, S365) and those that produce less stems tend to have larger diameters (SV1, S44, S25, ‘Millbrook’, SX67 and SX61). The same pattern holds for groups with intermediary stem production and dimensions (S54, S05). Indeed, cultivars with high biomass production were also taller and had the larger stem diameters (for example SX67 and SX61)). contrariwise, the cultivars who produced a lot of stems (S33, S365) had a poor biomass yield.

Mean biomass production of willow cultivars was different among genotype and soil contamination. An interaction was also detected between the two factors which indicates a difference in the effect of treatment between cultivars (Table 4.4). Soil contamination had a significant effect on yield of SV1 and S365 (loss of 68% and 69% in biomass respectively (Figure 1). On the uncontaminated site, SV1 produced the largest amount of biomass, while SX61 was the most productive on the contaminated area. S33 and S365 had the lowest aboveground biomass on uncontaminated and contaminated sectors respectively.

Several factors, including physico-chemical composition of soil, temperature, amount of precipitation and nutrient characteristics can influence the yield of willow planted in short rotation intensive culture (Weih and Nordh 2002; Labrecque and Teodorescu 2003). Studies in Denmark and Québec on willow performance on various sites have shown that it tends to achieve optimum growth on poorly-drained sites and in soil with a high organic matter levels (Labrecque and Teodorescu 2001; Sevel et al. 2012). The evapotranspiration rate of willow

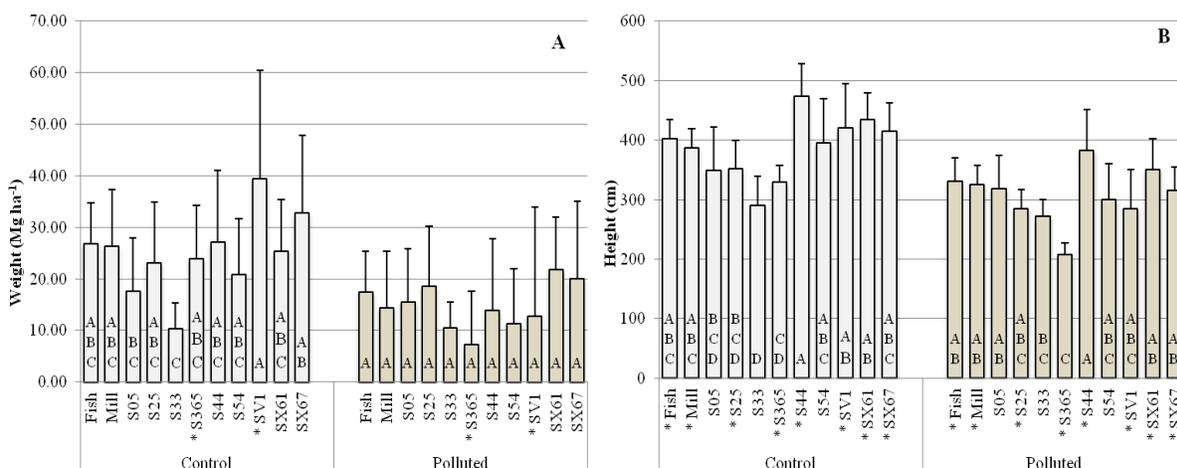
being very high, the presence of a large amount of clay facilitates water retention and thus reduces the risk of drought-related stress. In general, willow performances on the contaminated soil were quite respectable. The characteristics of the contaminated soil were generally more favorable to growth and the Wilcoxon test showed that there is some significant differences between the two sectors. We monitored a significantly higher electrical conductivity (261 $\mu\text{S}/\text{cm}$ versus 143 $\mu\text{S}/\text{cm}$), a higher organic matter content (33.2 g/kg versus 26.3 g/kg), significantly greater cation exchange capacity (34.1 $\text{cmol}(+) \text{kg}^{-1}$ versus 27.9 $\text{cmol}(+) \text{kg}^{-1}$) and significantly higher phosphorus concentration (0,81 ppm versus 0.47 ppm). These characteristics may explain the good performance of the cultivars on the contaminated site and why contamination had no significant effect on most physiological parameters. The summer of 2011 was characterised by high levels of precipitation, over the average for this location (477.6 mm between June and September compared to 385.1 mm). Although mean temperature was slightly above average, these climatic conditions are extremely beneficial for willow establishment (Labrecque and Teodorescu 2003) and could explain the very low mortality rate observed during the first summer.

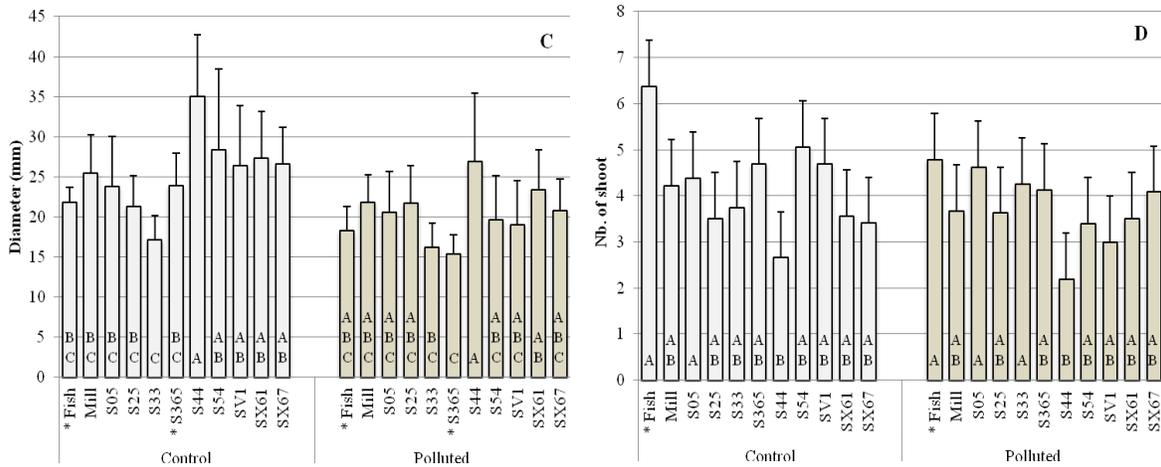
Previous studies conducted in Québec (Labrecque and Teodorescu 2003; Labrecque and Teodorescu 2005) using S33 and SV1 found these cultivars to have high biomass production. Our results suggest this success may not extend to all growing conditions. While SV1 produced the largest amount of biomass on the uncontaminated sector, it performed far less well in contaminated soil (loss of biomass of 67.5%). This finding is of particular interest because it shows that contamination by PHC has a significant negative effect on this cultivar's biomass production, making it an unsuitable candidate for future phytoremediation projects. The biomass production of S33 was also far below the values published by previous studies (Labrecque et al. 1997; Labrecque and Teodorescu 2003; Labrecque and Teodorescu 2005) but in this case, the poor field performances of this cultivar was mostly due to damages caused by the potato leafhopper (*Empoasca fabae* Harris) which is common on *S. viminalis* cultivars (Keoleian and Volk 2005; Guidi et al. 2013). The vulnerability of these cultivars to this insect, common to southern Québec, could also justify excluding this cultivar from potential phytoremediation candidates. While other insects were found on the plantation site, including

Tuberolachnus salignus, particularly numerous on ‘Fish Creek’ shoots on the uncontaminated sector, they did not appear to affect tree growth.

If no significant differences in biomass production were detected between the cultivars on the contaminated sector, it is interesting to compare the yield of some cultivars on each sector. For instance, the performance of SX61 on the contaminated sector was very good considering that he produced the largest amount of biomass and that his yield of production was only 13.8% less compared to the biomass produced on the uncontaminated sector. On the contrary, the yield produced by SX67 after two growing seasons dropped drastically with a diminution of 39.2% on the contaminated site compared to the uncontaminated site. S05 experienced the less significant diminution in production with a difference of only 12.3% between the contaminated sector and the uncontaminated sectors, making this cultivar the least influenced by pollution.

Fig. 4.1 Shoot growth data for all harvested willows in 2013 (mean and standard deviation) on uncontaminated and contaminated soils.





Analyzed using Tukey's HSD test ($\alpha = 0.05$). Asterisk indicates significant difference between soil contaminations, for a particular cultivar. Means in each treatment with different letters are significantly different.

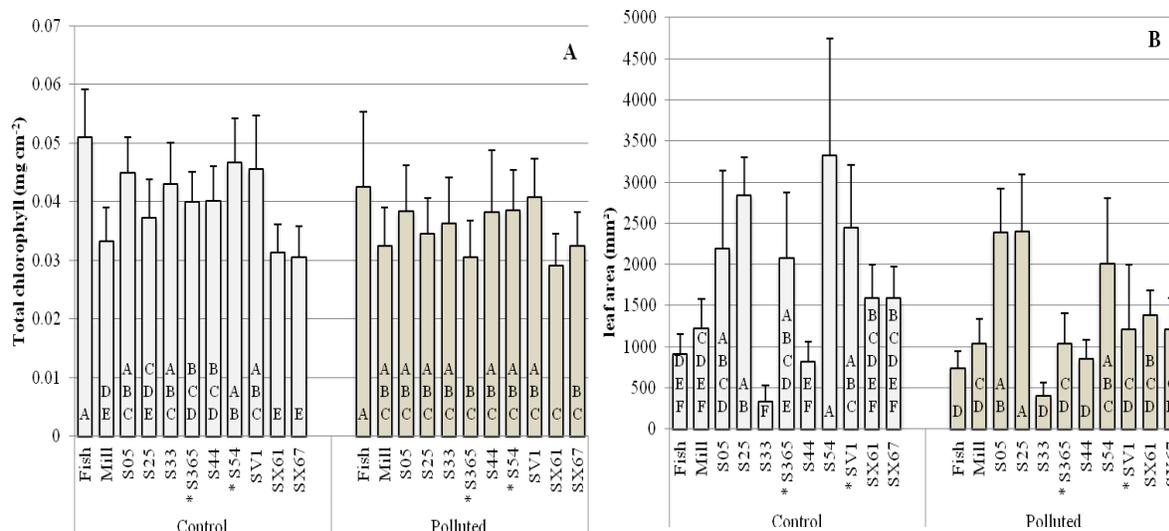
4.4.2 Chlorophyll level and standard leaf area

Willow genotype had the greatest impact on the variance of chlorophyll concentration and leaf area in the selected cultivars. The treatment explained 5.8% of the variability of chlorophyll concentration while 30.0% of the variability is explain by the genotype. The effect of soil contamination was far more subtle, significantly affecting the chlorophyll concentration of S365 and S54 (diminution of 23% and 17% of chlorophyll respectively) and the leaf area of S365 and SV1 (diminution of 50% of mean leaf area for both cultivars) (Figure 2). 'Fish Creek' had the highest concentration of chlorophyll in leaves under both conditions, while SX61 leaves had the lowest concentration on the uncontaminated sector and SX67 on the contaminated one. The cultivar with the largest leaves on the uncontaminated sector was S54, and on the contaminated one, S25. S33 developed the smallest leaves on both uncontaminated and contaminated soil.

Several willow cultivars have been found to be very effective at absorbing available nitrogen in their rhizosphere (Ericsson 1981; Labrecque and Teodorescu 2001). Since the chlorophyll amount in leaves is strongly influenced by the amount of nitrogen present in plant and therefore nitrogen available in the soil, small variations in chlorophyll level between the two tested sectors could be explained by the edaphic properties of the contaminated soil. In

fact, Table 4.2 shows that the contaminated site contains a higher proportion of nitrogen, which could explain why chlorophyll production was not affected by the presence of contaminants. Although chlorophyll is a stress-sensitive pigment, the majority of the selected genotypes responded well to this stress, and their photosynthetic capacity did not decrease. The highest chlorophyll concentration was measured in cultivar SX67. On the contaminated sector, SV1 and S365 showed the greatest drop in leaf area, with a decrease in excess of 50%, while S05 leaf size increased slightly, more than 9%. The generally lower leaf area values measured on the contaminated sector probably reflect plant response to environmental stress, which has been observed frequently (Drzewiecka et al. 2012; Gąsecka et al. 2012; Zhou et al. 2013). The huge difference in leaf size between the different cultivars on the contaminated site and mostly, the very unequal effect of contamination leaf development could be a consequence of a different partitioning of nutritive resources within the plant. Genotype can play an important role in carbon allocation during a stressful situation such as soil contamination (Von Fircks and Sennerby-Forsse 1998; Bollmark et al. 1999; Von Fircks et al. 2001). Some plants might favor roots development to the detriment of aerial growth (SV1 and S365) in order to compensate while others might favor leaves development to assure a good photosynthetic and transpiration rate in stressful situation (S05). It would be interesting to conduct further analysis on roots growth and starch accumulation order to validate these hypothesis.

Figure 4.2 Leaf chlorophyll concentration (A) leaf area (B) (mean and standard error) on uncontaminated and contaminated soils.



Analyzed using Tukey's HSD test ($\alpha = 0.05$). The asterisk indicates significant difference between conditions, for a particular cultivar. Means in each treatment with different letters are significantly different. The chlorophyll concentration assessment was undertaken in 2013, while the leaf area was measured at the end of the first growing season (2012).

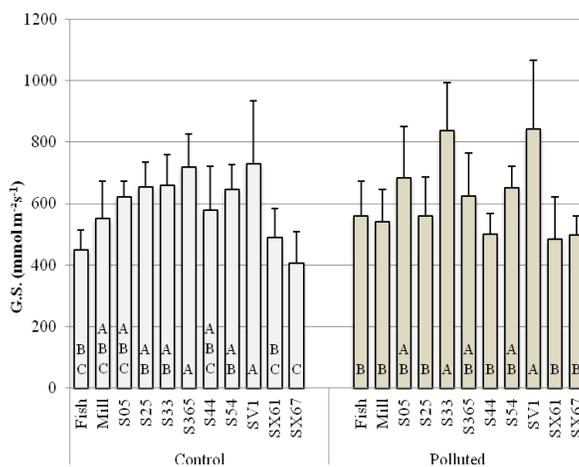
4.4.3 Stomatal Conductance

All variations observed in stomatal conductance values were attributable to genotype, while contamination had no significant impact. The treatment explained 0.6% of the variability of stomatal conductance while 39.7% of the variability is explained by the genotype. S365 and SV1 both had the highest values of stomatal conductance on the uncontaminated soil, while SV1 and S33 had the highest values on the contaminated soil (Figure 4.3). SX67 and SX61 showed the lowest values on the uncontaminated and contaminated sectors, respectively.

Stomatal conductance is known to be influenced by environmental stress and the presence of contaminants in soil (Farquhar and Sharkey 1982; Hermle et al. 2007). Nonetheless, the measurements taken during the summer of 2013 show that such variations

were entirely associated with genotypic factors. For example, we observed that S33 and SV1 had a high density of trichomes on the abaxial leaf surface (data not shown). These appendages play a very important role in regulating leaf temperature, evapotranspiration, and in the degree of stomatal opening (ESAU 1965). Stomatal conductance levels in these two cultivars are therefore probably the result of this characteristic, which reduces the adverse effects of excessive water loss in times of stress. Some genotypes had higher conductance values on the contaminated sector ('Fish Creek', S05, S33, SV1 and SX67), some lower values (S25, S365 and S44) and others very similar values ('Millbrook, S54, and SX61) regardless of soil quality. No general trend was observed in regard to other physiological traits of leaves.

Fig. 4.3 Mean stomatal conductance of collected data between June and September 2013.



Analysed using Tukey's HSD test ($\alpha = 0.05$). Means in each treatment with different letters are significantly different.

4.4.4 Nutrient concentration and proportion

All foliar nutrient concentration variables (N, P and K) were significantly different according to the genotype but only P was affected by soil contamination (Table 4.5).

Table 4.5 Mean stomatal conductance of collected data between June and September 2013.

Variance source	df	% N	% P	% K	% Ca	% Mg
Genotype	10	0.006 **	0.001 ***	0.002 **	0.001 ***	0.001 ***
Treatment	1	0.526	0.050 *	0.055	0.315	0.390
Genotype x Treatment	10	0.708	0.979	0.010 **	0.184	0.299

df = degree of freedom, % N = % Nitrogen, % P = % Phosphorous, % K = % Potassium, % Ca = % Calcium, % Mg = % Magnesium, *P ≤0.05, **P ≤0.01 and ***P ≤0.001

Nitrogen use efficiency (NUE), which is defined by the N productivity during the growth season and the losses of N by the abscission of the leaves in autumn is known to be a limiting factor for willow growth under temperate climatic conditions, such as those of the study site (Weih and Nordh 2002). Following the concept elaborated in this study, the phylogeny of bud burst and how quickly the willow start to grow is decisive for a high biomass production. It has been shown that willows which start their growing season earlier in spring have better chances of producing a large amount of biomass. The "early starting" clones tend to use their available nitrogen earlier in the season which lead to a lower growth rate at the end of the summer and lower leaf N concentration. Conversely, "late starting" clones start by accumulating N before using it for growth so they end the season with higher concentration of N in their leaves (Hirose 1988; Rönnberg-Wästljung 2001; Kopp et al. 2001b; Weih and Nordh 2002). We observed this tendency in our study as well. In spring 2012, after coppicing, the cultivars SX67 and SX61 started their growing season extremely rapidly and were the bigger trees on the field (data not shown). They also produced more biomass in contaminated soil and had the lowest concentration of nitrogen in their leaves at the end of the experiment. S365 and S33 were the smallest trees on the contaminated site in June 2012, produced the lowest amount of biomass, and had a rather high foliar nitrogen concentration. This correlation between bud burst, biomass production and NUE is quite interesting and could be useful for further willow selections. The use of cultivars which start growing rapidly in early spring could be favored in order to achieve a highest biomass production.

According to Kopinga and Burg (1995), they're concentrations of nutrient elements, the proportion of K, P and Mg in relation to N concentration in the leaves of deciduous trees can be used to evaluate nutrient status and classify it as "sufficient", "nearly sufficient" or "insufficient". These authors tested three willow species in their study (*S. viminalis*, *S. alba* and *S. triandra*), and determined so-called "normal values" for N (2.3 - 3%), P (0.17 - 0.21%), K (0.85 - 1.2%) and Mg (0.17 - 0.30%). Considering this, (4.6) we can conclude that all cultivars had a normal nutrient intake on the contaminated sector and that several even had an optimal concentration of nutrients in their leaves. For the proportions of P, K and Mg with respect to N, the nutritional status of the plants in our study was generally optimal, on both the uncontaminated and contaminated sectors (Table 4.7). Those cultivars which did not have "optimal" status could still be considered "sufficient", and no clones showed a nutritional deficit.

Table 4.6 Measured concentration of nitrogen, phosphorus and potassium in *Salix* sp. leaves

Cultivars	Nitrogen (%)		Phosphorous (%)		Potassium (%)		Calcium (%)		Magnesium (%)	
	Control	Polluted	Control	Polluted	Control	Polluted	Control	Polluted	Control	Polluted
'Fish Creek'	2.80	2.50	0.448	0.295	1.15	0.96	2.6	2.58	0.387	0.353
'Millbrook'	2.27	2.37	0.288	0.261	1.37	1.27	2.56	2.56	0.343	0.297
S05	2.63	2.57	0.329	0.293	1.29	1.52	1.95	1.72	0.420 *	0.287 *
S25	2.67 *	2.37 *	0.279	0.263	1.56 *	1.29 *	2.05	2.38	0.347	0.347
S33	3.07	2.67	0.409	0.362	1.54	1.32	1.53	1.53	0.32	0.343
S365	2.97	2.70	0.323	0.332	1.44	1.37	1.78	2.02	0.377	0.39
S44	2.70	2.93	0.329	0.332	1.87 *	1.26 *	1.61	2.45	0.367	0.413
S54	2.73	2.47	0.259	0.245	1.56	1.39	2.22	1.97	0.337	0.333
SV1	2.70	2.73	0.453	0.406	1.30	0.95	1.93	2.02	0.417	0.397
SX61	2.13	2.30	0.225	0.185	1.31	1.53	2.52	2.79	0.303	0.273
SX67	2.20	2.30	0.267	0.246	1.89 *	1.21 *	2.94	2.51	0.237	0.25

Asterisk indicates significant difference between treatments.

Table 4.7 Proportion by weight of P, K, Ca and Mg for N = 100 and ratio values for K/Ca and K/Mg in *Salix* sp. leaves

Foliar Values ¹	Phosphorous		Potassium		Magnesium		Calcium	
Optimal	10 - 14		50 - 100		10		-	
Sufficient	5 - 10		25 - 50		5 - 10		-	
Insufficient	< 5		< 25		< 5		-	
Normal	-		-		-		-	
Possible deficiency	-		-		-		-	
Deficiency	-		-		-		-	
Cultivars	Cont.	Poll.	Cont.	Poll.	Cont.	Poll.	Cont.	Poll.
'Fish Creek'	16.00	11.82	41.07	38.40	13.82	14.12	92.86	103.2
'Millbrook'	12.73	11.05	60.44	53.52	15.13	12.55	112.9	108.2
S05	12.50	11.40	48.86	59.35	15.95	11.18	74.05	67.01
S25	10.46	11.10	58.43	54.43	13.00	14.64	76.78	100.4
S33	13.32	13.57	50.33	49.38	10.43	12.86	49.89	57.37
S365	10.90	12.29	48.65	50.86	12.71	14.44	60.00	74.81
S44	12.19	11.31	69.26	42.95	13.59	14.08	59.63	83.52
S54	9.48	9.94	57.07	56.35	12.33	13.50	81.22	79.86
SV1	16.76	14.86	48.15	34.88	15.44	14.52	71.48	73.90
SX61	10.55	8.05	61.56	66.67	14.20	11.87	118.1	121.3
SX67	12.13	10.72	85.91	52.61	10.77	10.87	133.6	109.1

¹ (Kopinga and Burg 1995) Cont. = Control, Poll. = Polluted

4.5 Conclusions

The willow cultivars tested in this study were able to grow well and tolerate the soil contaminated with PHC. Our results show that most variability in physiological responses was due to genotype and not to the presence of contaminants in the soil. The more favorable physicochemical conditions of the contaminated site probably helped minimize the effect of contaminants on clone growth. SX67 and SX61, produced the greatest biomass, while S05 and S54 showed the highest photosynthetic capacity. The productivity of some cultivars, notably S365 and SV1, were particularly influenced by the presence of contaminants. Only S05 performed similarly on both contaminated and uncontaminated soil. Not only did none of its

physiological parameters appear to be influenced significantly by pollution, it even exhibited superior performance on the contaminated site in regard to leaf area and number of stems. In terms of biomass production, the performances of both SX61 and SX67 cultivars were not that surprising. Those two are known to achieve large heights and produce a lot of woody material (Labrecque and Teodorescu 2005). Regarding the cultivar S33, the measurements presented in the figures should be taken with caution since the trees monitored on the uncontaminated site were affected by a pest (potato leafhopper) while no sign of infestation was present on the contaminated site.

Previous studies have shown that low concentrations of PAH and other organic compounds can have no notable effect on biomass yields and, in some cases, can even enhance the growth and transpiration of willow trees (Thygesen and Trapp 2002; Vervaeke et al. 2003; Ucisik and Trapp 2006; Ucisik and Trapp 2008). Growth stimulation of plants, when exposed to small amounts of phytotoxic compounds, is known as hormesis and can occur when the concentration of a pollutant doesn't reach a high enough level to create permanent damage to the plant. In this case, the presence of a stress will rather cause the activation of the metabolism of the plant and promote its growth. This could give an insight into the high tolerance of our cultivars and the low impact of contamination on the physiological processes in the plants (Laughlin et al. 1981; Calabrese 2004; Calabrese and Blain 2009).

The high tolerance of S05 on the contaminated site is very interesting. Although this cultivar has been used in a few phytoremediation studies (Susarla et al. 2000; Punshon et al. 2003; Kuzovkina et al. 2004), its high tolerance to PHC contamination on the Varenne's site was unexpected. *S. nigra* S05 is native to eastern Canada, which will be preferable to the use of exotic germplasm for many projects. We are confident that these promising findings can help inform cultivar selection and improve phytoremediation techniques in Québec and around the world.

4.6 Acknowledgments

Our thanks to Stéphane Daigle for assistance with statistical analysis, to Karen Grislis for linguistic revision of the manuscript and to the numerous individuals who assisted in biomass harvesting and measurement of physiological parameters. We would also like to thank Pétromont Société en Commandite for providing access to the experimental site. This study was funded by Genome Canada and Génome Québec, as part of the GenoRem project.

5 Conclusions générales et perspectives

Le projet de recherche présenté ci-dessus a été mené à terme et les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre 4. La section suivante présente les conclusions générales de l'étude et les perspectives et les implications pour l'avenir de la phytoremédiation au Québec.

5.1 Retour sur les hypothèses, objectifs et résultats

Ce projet avait pour objectif de comparer les réponses physiologiques et morphologiques de 11 cultivars de saule, en procédant à la prise de mesure de différents paramètres de croissance et d'évaluer la capacité des cultivars à s'établir dans des conditions de stress relié à la présence de contaminants organiques tels les HAPs, BPCs et les hydrocarbures pétroliers de type C10-C50.

L'analyse de l'ensemble des paramètres récoltés montre entre autres que quelques cultivars se démarquent par leur forte production de biomasse (SX61 et SX67) alors que d'autres se démarquent plutôt par leur capacité photosynthétique supérieure (S05 et S54). Ces deux traits ont chacun leur avantage, lorsque sélectionnés pour un projet de phytoremédiation.

Différentes hypothèses ont été posées au début du projet. La première supposait que les cultivars sélectionnés auraient des réactions différentes en réponse à la présence d'hydrocarbures pétroliers dans le sol et auraient des niveaux de tolérance également différents. L'analyse comparative des différentes réponses physiologiques et des mesures de croissance nous a permis de constater que la plus grande portion de la variation enregistrée entre les cultivars était due au génotype, la contamination ayant un effet relativement plus faible. Pour l'ensemble des mesures, excepté pour les mesures de biomasse des plants du site contaminé, des différences significatives entre certains cultivars ont été relevées. Nous avons également été en mesure de déceler quelques tendances. Par exemple, certains cultivars semblaient être en mesure de tolérer particulièrement bien la présence de contamination au niveau du sol. Ces cultivars (S05, S25 et 'Millbrook') sont parvenus à conserver des performances similaires malgré les conditions de croissances très différentes entre les deux sites. Seulement la hauteur des cultivars S25 et 'Millbrook' ont été significativement affectés par la présence de contamination alors que S05 n'a vu aucun de ses paramètres de croissance et physiologiques être influencé par les contaminants. À l'inverse, certains cultivars ('Fish Creek', SV1 et S365) se sont démarqués des autres par une diminution importante de leur croissance et de leur capacité photosynthétique. La majorité des paramètres mesurés chez ces cultivars étaient significativement différents entre les deux sites à l'étude. Ces résultats témoignent d'un niveau de tolérance aux hydrocarbures pétroliers particulièrement faible pour ces cultivars. Bien que la conception expérimentale de l'étude souffre de pseudoréplication, nous avons été en mesure de prouver qu'il y avait des différences significatives entre les propriétés du sol et la concentration en contaminants des deux secteurs à l'étude (Tableau 4.2). Peu de différences significatives ont été décelées entre la concentration en contaminant sur les différents sites malgré une moyenne de contaminants généralement élevée. Ceci s'explique par la très grande variance observée entre les différents blocs sur le site contaminé. Les blocs 1 et 2 contiennent généralement une faible quantité de composés organiques alors que le bloc 3 contient beaucoup plus de contaminants. Les analyses de variances démontrent néanmoins une concentration significativement supérieure de BPCs, acénaphène, acénaphylène et phénanthrène sur le site contaminé. Une très forte concentration de C10-C50 était également présente dans le bloc 3. Nous supposons donc qu'il y a de fortes chances que les différences observées entre les cultivars soient reliées à la présence de contaminant dans le sol, ce qui

nous permet de confirmer notre première hypothèse : les cultivars sélectionnés présentent effectivement des réponses très différentes face à la contamination et certains d'entre eux sont beaucoup plus tolérants que d'autres. Les génotypes sélectionnés proviennent de différentes régions du globe et de différents climats. Ils appartiennent également à différents sous-genres et présentent des traits morphologiques très différents il est donc normal qu'ils présentent des caractères différents.

Il est intéressant de noter que deux des cultivars qui démontrent une tolérance supérieure (S05, S25) proviennent de génotypes (*Salix nigra* et *Salix eriocephala*), espèces indigènes en Amérique du Nord. Ils se retrouvent donc naturellement dans la région d'étude et sont particulièrement bien adaptés aux conditions climatiques du Québec. Ceci pourrait expliquer en partie leur capacité à s'adapter au sol contaminé utilisé pour l'étude. On peut en effet penser que ces cultivars d'espèces indigènes puissent plus aisément recruter des microorganismes qui facilitent la formation de symbioses et les avantagent dans leur capacité à tolérer les conditions difficiles de ces milieux pollués (Johnson et al. 1997; Stinson et al. 2006; Bell et al. 2013; Yergeau et al. 2014). Les hivers rigoureux et les étés chauds et humides peuvent représenter un obstacle à l'établissement des cultivars qui ne sont pas adaptés à ces conditions (Nicotra et al. 2010). Il faudrait par contre être vigilant et éviter l'utilisation de cultivars qui risquent d'être attaqués par des insectes communs sous nos climats.

La seconde hypothèse proposée statuait que les cultivars les plus performants sur le site non contaminé seraient également ceux qui auraient la meilleure croissance sur le site contaminé et donc qui aurait la plus grande tolérance aux contaminants. Cette hypothèse n'est que partiellement confirmée. Dans la grande majorité des paramètres physiologiques et morphologiques mesurés (hauteur, diamètre, nombre de tiges, taux de chlorophylle et conductance stomatique), le cultivar qui affichait la moyenne la plus élevée sur le site non contaminé affichait également la moyenne la plus élevée sur le site contaminé. Au niveau de la surface foliaire, le cultivar qui possédait la moyenne la plus élevée sur le site contaminé était celui qui possédait la seconde moyenne la plus élevée sur le site non contaminé. Jusqu'à maintenant, notre hypothèse est confirmée, mais les résultats obtenus pour les mesures de biomasse se sont révélées très différentes. Le cultivar SV1 présente la moyenne en production

de biomasse aérienne la plus élevée sur le site non contaminé. Sur le site contaminé par contre, 7 autres cultivars ont produit une moyenne de biomasse supérieure à celui-ci. Le cultivar le plus productif sur le site contaminé est SX61, mais il était loin d'être parmi les plus productifs sur le site non contaminé alors que 6 cultivars ont produit une moyenne de biomasse plus élevée. Ceci est en accord avec les résultats d'ANOVA qui indiquait une forte influence de la contamination sur les valeurs de biomasse (Tableau 4.4) et la présence d'une interaction entre les deux facteurs de l'étude qui indique une différence dans l'effet du traitement, entre les cultivars. Comme la production de biomasse est un critère important de la performance de nos cultivars, nous ne pouvons pas affirmer que les cultivars les plus performants sur le site non contaminé seront également les plus performants sur le site contaminé. Il est néanmoins possible de conclure que les cultivars qui performaient bien au niveau photosynthétique sur le site non contaminé sont également ceux qui performant bien au niveau photosynthétique sur le site contaminé. Le même constat peut être fait lorsqu'on cible les différents paramètres de croissance.

Les mesures de croissances et de paramètres physiologiques ont permis de constater que la contamination avait un impact relativement faible sur la productivité des saules comparativement à l'effet du génotype. Nous nous attendions à observer un impact plus marqué de la contamination sur la croissance des saules et bien que ces résultats ne concordent pas exactement avec ceux attendus, il est intéressant de constater que la totalité des cultivars mis à l'étude tolère relativement bien la présence d'hydrocarbures au niveau de leur rhizosphère. Quelques hypothèses ont été émises afin d'expliquer ce phénomène. D'abord, comme mentionné dans la section 4.4.1, il est possible que les caractéristiques physicochimiques du sol contaminé aient influencé positivement la croissance des saules sur ce site. Certains paramètres du sol (le potentiel de conductivité électrique, la capacité d'échange de cation, et la concentration en phosphore) étaient significativement différents sur les deux sites et convergent pour créer un environnement plus favorable à la croissance des plantes (Tableau 4.2). L'ensemble de ces facteurs a probablement permis aux saules d'avoir un développement adéquat malgré la présence de contaminants. En plus de contribuer au bon développement de la plante, ces caractères favorisent également la prospérité des colonies microbiennes présente dans la rhizosphère, ce qui aurait pu favoriser l'apport de nutriments

pour la plante et la dégradation des composés organiques de la zone rhizosphérique (Labrecque and Teodorescu 2001; Weih and Nordh 2002; Labrecque and Teodorescu 2003; Sevel et al. 2012). De plus, selon le concept de l'hormèse, décrit au chapitre 2.4, il est possible que la concentration des polluants n'ait pas atteint un niveau suffisamment élevé pour créer des effets négatifs sur la croissance. Dans ce cas, la présence d'un stress va plutôt engendrer l'activation du métabolisme de la plante et favoriser sa croissance. On suppose qu'une faible dose d'agents stressants, dans notre cas de contaminants, activerait les mécanismes de réparation dans les cellules. Ces processus aideraient à la réparation de dommages accumulés chez la plante qui n'auraient pas été en mesure de déclencher les mécanismes de réparation. Ce phénomène aurait pu diminuer l'effet de la contamination sur la croissance en laissant place au facteur génotypique comme principal acteur dans la variabilité entre les cultivars (Laughlin et al. 1981; Calabrese 2004; Calabrese and Blain 2009).

5.2 Implications futures

Le projet que nous avons mené nous a permis de réaliser nos objectifs initiaux et de tester nos hypothèses. Les résultats obtenus soulèvent par contre de nouvelles réflexions et de nouvelles hypothèses qui mettent la table pour de futurs de projet de recherche dans le domaine de la phytoremédiation au Québec.

D'abord, l'évaluation du potentiel de dégradation des contaminants par les différents cultivars n'a pas encore été réalisée, mais sera faite dans quelques mois et constituera une des dernières séries d'analyses du projet Genorem. Nous espérons pouvoir être en mesure de corrélérer la tolérance présentée par certains cultivars, S05 par exemple, à la dégradation de différents hydrocarbures pétroliers présents dans le sol. L'hypothèse soutenant qu'un saule ayant une croissance optimale sur un site contenant divers contaminants serait en mesure de dégrader une plus grande quantité de ces contaminants pourrait également être confirmée ou infirmée selon les résultats obtenus. Pour l'instant, nous ne sommes pas en mesure de nous prononcer sur le potentiel d'un cultivar particulier comme candidat pour de futurs projets. Le cas de S05 est très intéressant et si la corrélation était possible, il pourrait devenir un cultivar

prometteur puisqu'il semble démontrer une forte tolérance à la contamination et qu'il provient d'un génotype qui est indigène au sud du Québec.

Selon nos résultats, les cultivars employés n'ont été que faiblement influencés par la présence de contaminants dans le sol. Ceci porte à croire que les saules pourraient potentiellement tolérer la présence d'une plus grande quantité de pollution. Il serait donc intéressant de refaire le même genre d'expérience, mais en considérant des niveaux de contamination plus élevés afin d'évaluer le seuil limite de polluants que le saule peut tolérer avant de connaître une baisse significative de sa capacité photosynthétique et de son rendement en biomasse. Également, selon le concept de l'hormèse, décrit au chapitre 2.4, il est possible que la concentration des polluants fût suffisamment faible pour activer le métabolisme de la plante sans toutefois être assez fort pour créer de réels dommages. C'est pourquoi il serait bien de faire l'expérimentation avec des plus fortes doses de contaminants afin de voir si la courbe dose/réponse suit cette tendance (Laughlin et al. 1981; Calabrese 2004; van Oijen et al. 2005; Calabrese and Blain 2009).

Finalement, d'autres chercheurs de l'équipe GenoRem travaillent parallèlement à cibler et identifier les gènes chez la plante qui sont impliqués dans la réponse au stress et donc potentiellement impliqués dans les processus de phytoremédiation (González and Joly 2013; Bell et al. 2014). La technique consiste à viser des gènes qui sont différentiellement exprimés entre les arbres ayant poussé sur le site témoin et ceux qui ont poussé sur le site contaminé. Il serait éventuellement intéressant et pertinent de voir si la surexpression ou la sous-expression de certains gènes influence le phénotype, la croissance et la tolérance des saules. Plusieurs études semblent démontrer que les saules n'expriment pas le même ensemble de gènes dépendamment s'ils croissent sur un sol sain ou sur un sol contaminé et l'ensemble de ces gènes surexprimés sur le site contaminé serait probablement relié à la réponse au stress chez les arbres (Sheen and Bogorad 1986; Sheen 1990; McClanahan and Wolfe 1993; Sheen et al. 1999; Morris et al. 2000; Di Baccio et al. 2011; Drzewiecka et al. 2012; He et al. 2013). Il serait donc intéressant de cibler des gènes reliés à la croissance et au bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique (Chloroplast light harvesting chlorophyll a/b binding protein (LHCPs), zeaxanthin epoxidase (ZEP/ABA1), brassinosteroid insensitive 1 protein (BR1),

Shaggy-related protein kinase eta (BIN2)) afin de voir si l'expression des gènes se traduit facilement au niveau physiologique.

Nous savons que l'utilisation des plantes pour décontaminer des sols est faisable. Les résultats que nous avons recueillis, même s'il ne démontre pas le potentiel de décontamination, et les diverses études réalisées sur ce sujet semblent laisser croire que tout est encore possible. Lorsqu'on la compare aux méthodes traditionnelles, la phytoremédiation a de nombreux avantages et les avancements apportés par notre équipe ne peuvent que faire bénéficier le domaine des phytotechnologies et de l'ingénierie verte au Québec. Il importe grandement que ce travail se poursuive et que la population soit sensibilisée aux enjeux des sols contaminés et aux solutions durables que nous tentons d'apporter et de développer.

6 Bibliographie

- Adegbidi HG, Volk T a., White EH, et al. (2001) Biomass and nutrient removal by willow clones in experimental bioenergy plantations in New York State. *Biomass and Bioenergy* 20:399–411.
- Argus GW (1986) The genus *Salix* (Salicaceae) in the Southeastern United States. *American Society of Plant Taxonomists* 9:1–170.
- Aronsson P, Perttu K (2001) Willow vegetation filters for wastewater treatment and soil remediation combined with biomass production. *The Forestry Chronicle* 77:293–299.
- Di Baccio D, Galla G, Bracci T, et al. (2011) Transcriptome analyses of *Populus euramericana* clone I-214 leaves exposed to excess zinc. *Tree Physiology* 31:1293–1308.
- Bard D (2006) Loi canadienne sur la protection de l'environnement Liste des substances d'intérêt prioritaire Rapport d'évaluation Hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés. EMC 1:76.
- Bell TH, El-Din Hassan S, Lauron-Moreau A, et al. (2013) Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny. *ISME Journal* 1–13.
- Bell TH, Joly S, Pitre FE, Yergeau E (2014) Increasing phytoremediation efficiency and reliability using novel omics approaches. *Trends in biotechnology* 32:271–80.
- Bollmark, L., Sennerby-Forsse, L., & Ericsson, T. (1999). Seasonal dynamics and effects of nitrogen supply rate on nitrogen and carbohydrate reserves in cutting-derived *Salix viminalis* plants. *Canadian Journal of Forest Research*, 29(1), 85-94
- Bosma TNP, Middeldorp PJM, Schraa G, Zehnder AJB (1997) Mass Transfer Limitation of Biotransformation: Quantifying Bioavailability. *Environmental Science & Technology* 31:248–252.
- Branch CD of the EEPsIP, Centre CURDR (1988) National Overview of Abandoned Coal Gasification Works in Canada. 41.
- Bulman T (1985) The Persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil. *Petroleum Association for Conservation of the Canadian Environment*, Ottawa
- Calabrese EJ (2004) Hormesis: from marginalization to mainstream: a case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 197:125–36.
- Calabrese EJ, Blain RB (2009) Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution* 157:42–8.

- Chen C, Huang D, Liu J (2009) Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects. *CLEAN – Soil, Air, Water* 37:304–313.
- Cloutier-Hurteau B, Turmel M-C, Mercier C, Courchesne F (2013) The sequestration of trace elements by willow (*Salix purpurea*)-which soil properties favor uptake and accumulation? *Environmental Science and Pollution Research International*. 21:4759-4771 19
- Conger R (2003) Black willow (*Salix nigra*) use in phytoremediation techniques to remove the herbicide bentazon from shallow groundwater. Louisiana State University
- Consultants B, Environment PA for C of the C (1981) Landspreading of Sludges at Canadian Petroleum Facilities. The Association
- Cornelissen G, van Noort PCM, Govers HAJ (1998) Mechanism of Slow Desorption of Organic Compounds from Sediments: A Study Using Model Sorbents. *Environmental Science & Technology* 32:3124–3131.
- Corseuil HX, Moreno FN (2001) Phytoremediation potential of willow trees for aquifers contaminated with ethanol-blended gasoline. *Water Research* 35:3013–3017.
- Cunningham SD, Berti WR, Huang JW (1995) Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology* 13:393–397.
- Cunningham SD, Ow DW (1996) Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* 110:715.
- Di Baccio D, Galla G, Bracci T, et al. (2011) Transcriptome analyses of *Populus euramericana* clone I-214 leaves exposed to excess zinc. *Tree Physiology* 31:1293–1308.
- Dickmann, D. I., & Kuzovkina, J. (2008). Poplars and willows in the world. Chapter 2. Poplars and willows of the world, with emphasis on silviculturally important species. Boston MA ;Rome: International Poplar Commission Thematic Papers. FAO.
- Drzewiecka K, Mleczek M, Gąsecka M, et al. (2012) Changes in *Salix viminalis* L. cv. “Cannabina” morphology and physiology in response to nickel ions – Hydroponic investigations. *Journal of Hazardous Materials* 217–218:429–438.
- Ericsson T (1981) Effects of varied nitrogen stress on growth and nutrition in three *Salix* clones. *Physiologia Plantarum* 51:423–429.
- Von Fircks Y, Ericsson T, Sennerby-Forsse L (2001) Seasonal variation of macronutrients in leaves, stems and roots of *Salix dasyclados* Wimm. grown at two nutrient levels. *Biomass and Bioenergy* 21:321–334.
- Von Fircks Y, Sennerby-Forsse L (1998) Seasonal fluctuations of starch in root and stem tissues of coppiced *Salix viminalis* plants grown under two nitrogen regimes. *Tree Physiology* 18:243–249.

- Gąsecka M, Mleczek M, Drzewicka K, et al. (2012) Physiological and morphological changes in *Salix viminalis* L. as a result of plant exposure to copper. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 47:548–557.
- Gerhardt KE, Huang X-D, Glick BR, Greenberg BM (2009) Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science* 176:20–30.
- Gilbert M, Walsh G (1996) Conséquences potentielles d'un déversement de BPC provenant de la barge Irving Whale sur le milieu marin du golfe du Saint-Laurent. *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* 21 13 : xiv + 62 p. Ministère des Pêches des Océans
- González E, Joly S (2013) Impact of RNA-seq attributes on false positive rates in differential expression analysis of de novo assembled transcriptomes. *BMC Research Notes* 6:503.
- Gouvernement du Canada SCD de la sécurité des milieux, B de la gestion du risque (2006) Biphényles polychlorés (BPC) - Les substances chimiques d'intérêts aux canadiens.
- Gouvernement du Canada (2004) Évaluation des substances de la première Liste des substances d'intérêt prioritaire (LSIP1) - Programme d'évaluation des substances d'intérêt prioritaire - Contaminants environnementaux.
- Grosser RJ, Friedrich M, Ward DM, Inskeep WP (2000) Effect of Model Sorptive Phases on Phenanthrene Biodegradation: Different Enrichment Conditions Influence Bioavailability and Selection of Phenanthrene-Degrading Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2695–2702.
- Guidi W, Pitre FE, Labrecque M (2013) Short-Rotation Coppice of Willows for the Production of Biomass in Eastern Canada. *Biomass Now – Sustainable Growth and Use*, Chapter 17
- Harvey, R. G. (1991). Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry and carcinogenicity. CUP Archive.
- He J, Li H, Luo J, et al. (2013) A transcriptomic network underlies microstructural and physiological responses to cadmium in *Populus canescens*. *Plant Physiology* 162:424–439.
- Hébert J (2006) Bilan sur la gestion des terrains contaminés en date du 1er février 2005. Ministère du Développement durables, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP) 77 p.
- Hermle S, Vollenweider P, Günthardt-Goerg MS, et al. (2007) Leaf responsiveness of *Populus tremula* and *Salix viminalis* to soil contaminated with heavy metals and acidic rainwater. *Tree Physiology* 27:1517–31.
- Hirose T (1988) Modelling the relative growth rate as a function of plant nitrogen concentration. *Physiologia Plantarum* 72:185–189.

- Hoffmann D, Weih M (2005) Limitations and improvement of the potential utilisation of woody biomass for energy derived from short rotation woody crops in Sweden and Germany. *Biomass and Bioenergy* 28:267–279.
- Huang X-D, El-Alawi Y, Gurska J, et al. (2005) A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchemical Journal* 81:139–147.
- Hurlbert SH (1984) Pseudoreplication and the Design of Ecological Field Experiments. *Ecological Engineering* 54:187–211.
- Inzé D, Montagu M Van (1995) Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 6:153–158.
- Isebrands, J. G., & Richardson, J. (Eds.). (2014). *Poplars and Willows: Trees for Society and the Environment*. CABI.
- Jackson R (1985) Hydrogéologie des contaminants organiques toxiques à un site d'enfouissement, Gloucester, Ontario. Environnement Canada, Ottawa
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA (1997) Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135:575–585.
- Jordahl JL, Foster L, Schnoor JL, Alvarez PJJ (1997) Effect of hybrid poplar trees on microbial populations important to hazardous waste bioremediation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:1318–1321.
- Keoleian GA, Volk TA (2005) Renewable Energy from Willow Biomass Crops: Life Cycle Energy, Environmental and Economic Performance. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* 24:385–406.
- Komives T, Gullner G (2006) Dendroremediation: the use of trees in cleaning up polluted soils. *Phytoremediation Rhizoremediation*. Springer, pp 23–31
- Kopinga J, Burg J Van Den (1995) Using soil and foliar analysis to diagnose the nutritional status of urban trees. *Journal of Arboriculture* 21:17–24.
- Kopp R., Abrahamson L., White E., et al. (2001a) Willow biomass production during ten successive annual harvests. *Biomass and Bioenergy* 20:1–7.
- Kopp RF, Smart LB, Maynard CA, et al. (2001b) The development of improved willow clones for eastern North America. *The Forestry Chronicle* 77:287–292.
- Kukkola E, Rautio P, Huttunen S (2000) Stress indications in copper- and nickel-exposed Scots pine seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 43:197–210.
- Kuzovkina YA, Knee M, Quigley MF (2004) Cadmium and copper uptake and translocation in five willow (*Salix* L.) species. *International Journal of Phytoremediation* 6:269–87.

- Kuzovkina YA, Quigley MF (2005) Willows Beyond Wetlands: Uses of *Salix* L. Species for Environmental Projects. *Water, Air, & Soil Pollution* 162:183–204.
- Labrecque M, Teodorescu TI (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 Ecology and Management* 150:223–239.
- Labrecque M, Teodorescu TI (2005) Field performance and biomass production of 12 willow and poplar clones in short-rotation coppice in southern Quebec (Canada). *Biomass and Bioenergy* 29:1–9.
- Labrecque M, Teodorescu TI (2003) High biomass yield achieved by *Salix* clones in SRIC following two 3-year coppice rotations on abandoned farmland in southern Quebec, Canada. *Biomass and Bioenergy* 25:135–146.
- Labrecque M, Teodorescu TI, Daigle S (1997) Biomass productivity and wood energy of *Salix* species after 2 years growth in SRIC fertilized with wastewater sludge. *Biomass and Bioenergy* 12:409–417.
- Laughlin RB, Ng J, Guard HE (1981) Hormesis: a response to low environmental concentrations of petroleum hydrocarbons. *Science* 211:705–7.
- Laureysens I, Bogaert J, Blust R, Ceulemans R (2004) Biomass production of 17 poplar clones in a short-rotation coppice culture on a waste disposal site and its relation to soil characteristics. *Forest Ecology and Management* 187:295–309.
- Macek T, Macková M, Káš J (2000) Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* 18:23–34.
- Mandre M, Tullus H, Tamm Ü (1998) The partitioning of carbohydrates and the biomass of leaves in *Populus tremula* L. canopy. *Trees* 12:160–166.
- Mastral AM, Callén MS (2000) A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Emissions from Energy Generation. *Environmental Science & Technology* 34:3051–3057.
- McIntyre T (2003) Phytoremediation of heavy metals from soils. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 78:97–123.
- Michalak A (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15:523.
- Mirck J, Isebrands JG, Verwijst T, Ledin S (2005) Development of short-rotation willow coppice systems for environmental purposes in Sweden. *Biomass and Bioenergy* 28:219–228.

- Mleczek M, Rutkowski P, Rissmann I, et al. (2010) Biomass productivity and phytoremediation potential of *Salix alba* and *Salix viminalis*. *Biomass and Bioenergy* 34:1410–1418.
- Morris K, Mackerness SAH, Page T, et al. (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal* 23:677–685.
- Mosseler A, Major JE, Labrecque M (2014a) Genetic by environment interactions of two North American *Salix* species assessed for coppice yield and components of growth on three sites of varying quality. *Trees* 28:1401–1411.
- Mosseler A, Major JE, Labrecque M, Larocque GR (2014b) Allometric relationships in coppice biomass production for two North American willows (*Salix* spp.) across three different sites. *Forest Ecology Management* 320:190–196.
- Newman LA, Reynolds CM (2004) Phytodegradation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 15:225–230.
- Newsholme, C. (1992). *Willows: the genus Salix*. (p. 224). Timber Press, Inc. Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, et al. (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends Plant Sci* 15:684–92. doi: 10.1016/j.tplants.2010.09.008
- Ogram A V, Jessup RE, Ou LT, Rao PS (1985) Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid in soils. *Applied Environmental Microbiology* 49:582–587.
- Perttu KL, Kowalik PJ (1997) *Salix* vegetation filters for purification of waters and soils. *Biomass and Bioenergy* 12:9–19.
- Punshon T, Gaines KF, Jenkins Jr RA (2003) Bioavailability and trophic transfer of sediment-bound Ni and U in a southeastern wetland system. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44:30–5.
- Reilley KA, Banks MK, Schwab AP (1996) Dissipation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Rhizosphere. *Journal of Environment Quality* 25:212.
- Rejšková A, Patková L, Stodůlková E, Lipavská H (2007) The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *Journal of Plant Physiology* 164:174–184..
- Roitto M, Rautio P, Julkunen-Tiitto R, et al. (2005) Changes in the concentrations of phenolics and photosynthates in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings exposed to nickel and copper. *Environmental Pollution* 137:603–609.
- Rönnerberg-Wästljung AC (2001) Genetic structure of growth and phenological traits in *Salix viminalis*. *Canadian Journal of Forest Research* 31:276–282.
- Rooney DC, Killham K, Bending GD, et al. (2009) Mycorrhizas and biomass crops: opportunities for future sustainable development. *Trends in Plant Science* 14:542–549.

- Schaper H, Chacko EK (1991) Relation between Extractable Chlorophyll and Portable Chlorophyll Meter Readings in Leaves of Eight Tropical and Subtropical Fruit-Tree Species. *Journal of Plant Physiology* 138:674–677.
- Schnoor JL, (1997). Phytoremediation. GWRTAC
- Schnoor JL, Licht LA, McCutcheon SC, et al. (1995) Phytoremediation of Organic and Nutrient Contaminants. *Environmental Science & Technology* 29:318A–323A.
- Sevel L, Nord-Larsen T, Raulund-Rasmussen K (2012) Biomass production of four willow clones grown as short rotation coppice on two soil types in Denmark. *Biomass and Bioenergy* 46:664–672.
- Sheen J (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell Online* 2:1027–1038.
- Sheen J, Zhou L, Jang J-C (1999) Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology* 2:410–418.
- Sheen J-Y, Bogorad L (1986) Differential expression of six light-harvesting chlorophyll a/b binding protein genes in maize leaf cell types. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83:7811–7815.
- Smart LB, Lin J, Kopp F, Phillips IS (2005). Genetic improvement of shrub willow (*Salix* spp.) crops for bioenergy and environmental applications in the United States. *UNASYLVA-FAO-*, 56(2), 51.
- Stinson KA, Campbell SA, Powell JR, et al. (2006) Invasive plant suppresses the growth of native tree seedlings by disrupting belowground mutualisms. *PLoS Biology* 4:e140.
- Susarla S, Bacchus ST, Harvey G, McCutcheon SC (2000) Phytotransformations of Perchlorate Contaminated Waters. *Environmental Technology* 21:1055–1065.
- Susarla S, Medina VF, McCutcheon SC (2002) Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18:647–658.
- Tesar M, Reichenauer TG, Sessitsch A (2002) Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel. *Soil Biology and Biochemistry* 34:1883–1892.
- Tharakan PJ, Volk TA, Nowak CA, Abrahamson LP (2005) Morphological traits of 30 willow clones and their relationship to biomass production. *Canadian journal of forest research*, 35(2), 431:421–431.
- Tholen D, Pons TL, Voeselek LACJ, Poorter H (2007) Ethylene Insensitivity Results in Down-Regulation of Rubisco Expression and Photosynthetic Capacity in Tobacco. *Plant Physiology* 144:1305–1315.

- Thygesen RS, Trapp S (2002) Phytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to willow trees. *Journal of Soils and Sediments* 2:77–82.
- Trapp S, Karlson U (2001) Aspects of phytoremediation of organic pollutants. *Journal of Soils Sediments* 1:37–43.
- Tsang EW, Bowler C, Hérouart D, et al. (1991) Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell Online* 3:783–792.
- Ucisik AS, Trapp S (2008) Uptake, removal, accumulation, and phytotoxicity of 4-chlorophenol in willow trees. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54:619–27.
- Ucisik AS, Trapp S (2006) Uptake, removal, accumulation and phytotoxicity of phenol in willow trees (*Salix viminalis*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:2455.
- Uddling J, Gelang-Alfredsson J, Piikki K, Pleijel H (2007) Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis research* 91:37–46.
- Vandermeulen J (1989) PAH and heavy metal pollution of the Sydney Estuary : summary and review of studies to 1987. Fisheries and Oceans Canada, Dartmouth N.S.
- Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, et al. (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater : lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* 16(7), 765-794..
- Vervaeke P, Luysaert S, Mertens J, et al. (2003) Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial. *Environmental Pollution* 126:275–282.
- Verwijst T (2001) Willows: An underestimated resource for environment and society. *The Forestry Chronicle* 77:281–285.
- Volk T, Abrahamson L, Nowak C, et al. (2006) The development of short-rotation willow in the northeastern United States for bioenergy and bioproducts, agroforestry and phytoremediation. *Biomass and Bioenergy* 30:715–727.
- Wan MT (1991) Railway Right-of-Way Contaminants in the Lower Mainland of British Columbia: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality* 20:228.
- Wan MT (1994) Utility Right-of-Way Contaminants: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality* 23:1297.
- Weih M, Nordh N-E (2002) Characterising willows for biomass and phytoremediation: growth, nitrogen and water use of 14 willow clones under different irrigation and fertilisation regimes. *Biomass and Bioenergy* 23:397–413.

- Wild SR, Berrow ML, Jones KC (1991) The persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge amended agricultural soils. *Environmental Pollution* 72:141–157.
- Wild SR, Jones KC (1993) Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils freshly amended with sewage sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12:5–12.
- Wingler A, Purdy S, MacLean JA, Pourtau N (2006) The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 57:391–399.
- Wu F, Yang W, Zhang J, Zhou L (2010) Cadmium accumulation and growth responses of a poplar (*Populus deltoids* x *Populus nigra*) in cadmium contaminated purple soil and alluvial soil. *Journal Hazardous Materials* 177:268–273.
- Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18:339–353.
- Yergeau E, Sanschagrin S, Maynard C, et al. (2014) Microbial expression profiles in the rhizosphere of willows depend on soil contamination. *ISME Journal* 8:344–58.
- Yu X-Z, Gu J-D, Li L (2008) Assimilation and physiological effects of ferrocyanide on weeping willows. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71:609–615.
- Zalesny RS, Bauer EO, Hall RB, et al. (2005) Clonal variation in survival and growth of hybrid poplar and willow in an in situ trial on soils heavily contaminated with petroleum hydrocarbons. *International journal of phytoremediation* 7:177–97.
- Zhou GF, Peng S a., Liu YZ, et al. (2013) The physiological and nutritional responses of seven different citrus rootstock seedlings to boron deficiency. *Trees* 28:295–307.
- Zhu J, Tremblay N, Liang Y (2012) Comparing SPAD and atLEAF values for chlorophyll assessment in crop species. *Canadian Journal of Soil Science* 92:645–648.

