

GRÉGORY BOIS

ÉCOPHYSIOLOGIE DE SEMIS DE CONIFÈRES ECTOMYCORHIZÉS EN MILIEU SALIN ET SODIQUE

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Sciences Forestières
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DU BOIS ET DE LA FORÊT
FACULTÉ DE FORESTERIE ET GÉOMATIQUE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2005

Résumé court

La réponse physiologique au stress sodique de semis d'épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss) et de pin gris (*Pinus banksiana* Lamb.) inoculés avec des champignons ectomycorhiziens (ECM) a été évaluée afin de déterminer les bénéfices de l'inoculation pour la croissance et la survie. Ces expériences ont été menées avec un objectif appliqué servant l'amélioration des techniques de production de semis destinés à la végétalisation de sols reconstitués à partir de rejets salins issus de l'exploitation des sables bitumineux dans le Nord-Est de l'Alberta (Canada). Dans un premier volet, nous avons observé que le potentiel inoculant de sols reconstruits d'âges différents ainsi que des matériaux utilisés pour la reconstruction des sols est très faible voire nul. Dans un deuxième temps, la résistance et la réponse physiologique *in vitro* de champignons ecto- et ectendomycorhiziens (*Hymenoscyphus* sp., *Phialocephala* sp., *Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick, *Laccaria bicolor* (Maire) Orton, *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Quel.) de différentes provenances ont été déterminées. Enfin, des semis d'épinette blanche et de pin gris inoculés en serre avec les trois champignons ECM évalués *in vitro* ont été exposés à différents niveaux d'excès de NaCl. La mesure d'un ensemble d'indicateurs physiologiques a montré que les mycobiotés sont capables d'influencer la réponse de l'hôte face à une concentration donnée de NaCl. L'inoculation d'une souche de *S. tomentosus*, isolée d'un site salin et sodique, a permis une augmentation de la production de biomasse des semis et l'inoculation avec une souche de *H. crustuliniforme* a favorisé les capacités d'ajustement osmotique des semis. Ces deux champignons sont des espèces potentielles pour l'inoculation contrôlée en pépinière.

Short abstract

The physiological response of inoculated ectomycorrhizal (ECM) white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) and jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) seedlings to sodic stress was evaluated to determine the benefits of inoculation for growth and survival. These experiments served the improvement of nursery seedling production for revegetation of reconstructed soils from tailing sands originating from the oil sand mining in Northeastern Alberta (Canada). In a first step, we showed that the inoculum potential of reconstructed soils of different ages and materials used in soil reconstruction was very low or null. In a second step, the resistance and physiological response of five ecto- and ectendomycorrhizal fungal species (*Hymenoscyphus* sp., *Phialocephala* sp., *Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick, *Laccaria bicolor* (Maire) Orton, *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Quel.) from different sources were assessed *in vitro*. Finally, white spruce and jack pine seedlings inoculated in greenhouse with the three ECM fungi evaluated *in vitro* were exposed to different concentrations of NaCl. Using several physiological indicators, mycobionts were showed to influence host response to a given NaCl concentration. Under sodic conditions, inoculation with an isolate of *S. tomentosus* from a saline and sodic site increased seedling biomass production and inoculation with an isolate of *H. crustuliniforme* increased seedling osmotic adjustment capabilities. The latter two fungi are potential candidates for tree nursery inoculation.

Résumé long

Salinité et sodicité sont des problématiques majeures pour la restauration des rejets sableux issus de l'exploitation à ciel ouvert des sables bitumineux du Nord-Est de l'Alberta (Canada). Les champignons ectomycorhiziens (ECM) sont reconnus pour réduire certains stress abiotiques affectant leur hôte. Ces champignons sont naturellement associés aux conifères utilisés pour la restauration. La présente thèse porte sur la physiologie de la symbiose ECM en réponse à un stress sodique contrôlé, ceci afin de promouvoir l'intégration de la mycorhization contrôlée en pépinière dans le cadre des programmes de végétalisation de sites présentant un excès de sels.

Dans un premier temps, une expérience de piégeage a été réalisée en serre sur les matériaux composant un sol reconstruit et sur des échantillons non perturbés de sols reconstruits de différents âges. Ceci a servi à donner une image du cortège mycorhizien présent sur les sites à restaurer de Syncrude Canada Ltd. (Alberta). Aucune propagule de champignon ECM viable n'a été détectée dans les rejets sableux. De plus, la tourbe servant d'amendement pour les rejets sableux a montré un faible potentiel inoculant et une faible diversité d'espèces fongiques ECM.

Dans un deuxième temps, des champignons (ecto- et ectendo-) mycorhiziens isolés d'un terrain sodique ou provenant d'une mycothèque, *i.e.*, *Hymenoscyphus* sp., *Phialocephala* sp., *Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick, *Laccaria bicolor* (Maire) Orton, *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Quel., ont été exposés *in vitro* à un gradient de concentrations de NaCl. Tous les champignons ont montré une grande résistance. Toutefois, les champignons isolés du terrain ont montré une plus forte croissance et une accumulation moindre de Na⁺ et de Cl⁻ dans leurs tissus en conditions sodiques.

Dans un troisième temps, trois espèces ECM, *L. bicolor*, *H. crustuliniforme* et *S. tomentosus*, ont été utilisées pour des expériences en serre en association avec des semis de pin gris (*Pinus banksiana* Lamb.) et d'épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss). Ces combinaisons symbiotiques ont été exposées à un gradient de concentrations de NaCl et ont montré que l'inoculation de champignons ECM peut augmenter la croissance et réduire le stress perçu par l'hôte en conditions salines et sodiques.

L'isolat de *S. tomentosus* s'est avéré être le champignon le plus intéressant pour l'inoculation de semis de pépinière destinés à la végétalisation de terrains salins et/ou sodiques. *Hebeloma crustuliniforme* UAMH 5247 est un deuxième choix pour les terrains les plus stressants puisqu'il dynamise l'ajustement osmotique de son hôte.

Long abstract

Salinity and sodicity are major concerns for the reclamation of sand tailings originating from the open-pit mining of oil sand ores in Northeastern Alberta (Canada). Ectomycorrhizal (ECM) fungi are known to reduce certain abiotic stresses affecting their host. These fungi are naturally associated with conifers used for reclamation. The present thesis depicts the physiological response of the ECM symbiosis under controlled sodic conditions. This serves to promote integration of controlled mycorrhization in tree nurseries within revegetation programs for salt-affected sites.

In a first step, a bait experiment was performed on materials constituting reconstructed soil and on undisturbed samples of reconstructed soil of different ages. This served to assess the mycorrhizal inoculum potential present on sites to reclaim at Syncrude Canada Ltd. (Alberta). There were not any viable propagules of ECM fungi on tailing sands. In addition, the peat moss used as amendment for tailing sands exhibited a weak ECM inoculum potential and a low ECM fungal species diversity.

In a second step, (ecto- and ectendo-) mycorrhizal fungi isolated from a sodic site or selected within a fungal collection, *i.e.*, *Hymenoscyphus* sp., *Phialocephala* sp., *Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick, *Laccaria bicolor* (Maire) Orton, *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Quel., were subjected to a gradient of NaCl concentrations. All fungal species exhibited a strong resistance. Nevertheless, species isolated from a sodic site showed a higher growth and a lower Na⁺ et Cl⁻ accumulation in their tissues under sodic conditions.

In a third step, three ECM species, *L. bicolor*, *H. crustuliniforme* and *S. tomentosus*, were used in greenhouse experiment in association with jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) and white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) seedlings. These symbiotic combinations were exposed to a gradient of NaCl concentrations and showed that inoculation of ECM fungi can enhance growth and reduce the stress perceived by the host in saline and sodic conditions.

The *S. tomentosus* isolate was shown to be the most interesting fungus for inoculation of tree-nursery seedlings used for revegetation of saline and/or sodic sites. *Hebeloma crustuliniforme* UAMH 5247 was a second choice for highly affected sites as it stimulates osmotic adjustment of its host.

Avant-Propos

À présent que cette thèse est achevée, sans stress, je voudrais remercier tout spécialement mes parents source de ma physiologie qui m'ont aidé et soutenu tout au long de mon parcours depuis tout petit. Je tiens également à souligner le soutien inestimable de tous mes amis de longue date toujours présents et j'espère que notre partenariat mutualiste s'entretiendra encore longtemps.

Bien entendu, mon parcours initiatique dans la recherche n'aurait pu se faire sans l'aide de mon directeur de thèse Damase Khasa dont le sens des affaires et de la recherche fut un exemple. Sa gentillesse et sa tolérance ont laissé mon indépendance se libérer sans contraintes ni flétrissement. Je tiens également à remercier mon co-directeur, Yves Piché, pour son soutien dans les situations complexes, pour son inégalable sens de l'humour et parce qu'il m'a permis de découvrir le monde des mycorhizes et le Québec. L'achèvement de cette thèse n'aurait pas non plus pu se faire sans Francine Bigras qui m'a donné les outils pour « physiologuer » ainsi qu'une énergie lumineuse pour avancer.

Je remercie également les bailleurs de fonds de ce projet, le CRSNG et la compagnie Syncrude Canada Ltd., telle une ressource minérale essentielle sans qui rien n'aurait été possible, à moins d'un stress extrême. À ce titre, je tiens également à remercier Martin Fung qui m'a donné l'accès aux sites de Syncrude et a ainsi facilité ma tâche.

Je remercie les membres de mon comité, Janusz Zwiazek qui m'a également accueilli dans son laboratoire au cours de l'été 2003, Jacques-André Rioux qui m'a accordé de son temps pour la pré-lecture de cette thèse, et Yves Desjardins pour avoir généreusement accepté de corriger cette thèse.

Un grand merci à Jean-Luc Jany pour toutes ces discussions et réflexions sur la symbiose... En tant que voisin de bureau, il m'a permis de réguler mon homéostasie dans les situations les plus contraignantes. On a planté des semis jusqu'aux dernières heures du jour où la vie sauvage se faisait plus menaçante...

Un merci très spécial à Andrew Coughlan dont les compétences en mycologie et l'anglais savant ont été une aide précieuse au travers de tous ces articles et expériences.

Je suis également redevable envers Alexis Guérin-Laguet qui m'a donné les moyens de maîtriser l'art de l'inoculation. Sans lui, les expériences en pépinière auraient été de « bonnes galères » !

Merci également à Annick Bertrand pour l'ajustement osmotique. Je suis très heureux de notre collaboration, cela a porté ses fruits.

Je tiens également à rendre hommage à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin pour la prise des mesures et la mise en œuvre de mes expériences : Julie Talbot, Erin Bergrand, Sauphie Senneville, Yves Dubuc, Lucette Chouinard, Pierre Lechasseur, Kent Apostol ainsi que Claude Fortin et son pouce vert.

Je ne peux conclure cet avant-propos sans remercier tous mes collègues de travail devenus des amis : Frank, Sylvain, Guillaume, André, Jean-guy, Estelle, Soul, Brice (deux fois papa pendant ma thèse) et Bertrand.

À mes parents, Marie-Thérèse et Dominique

Table des matières

Résumé court	ii
Short abstract	iii
Résumé long	iv
Long abstract	v
Avant-Propos	vi
Table des matières.....	ix
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures	xiv
Liste des encadrés	xvii
Liste des abréviations.....	xviii

Chapitre 1 Introduction générale 1

1.1	Mise en situation	1
1.2	Écosystème forestier boréal	3
1.2.1	Forêt boréale	3
1.2.2	Écologie de la forêt boréale	4
1.3	Exploitation des sables bitumineux et gestion des rejets	6
1.3.1	Ressources en sables bitumineux du Canada et leur exploitation.....	6
1.3.2	Restauration des écosystèmes perturbés	12
1.4	Salinité et sodicité	14
1.4.1	Genèse de conditions salines et/ou sodiques.....	14
1.4.2	Mesures de salinité et de sodicité.....	15
1.4.3	Altérations physico-chimiques des sols affectés par un excès de sel	18
1.5	La réponse physiologique du stress salin/sodique	22
1.5.1	Généralités	22
1.5.2	Adaptation des plantes à l'excès de sel.....	24
1.5.3	Autres processus physiologiques remarquables en réponse à l'excès de sel	29
1.6	La physiologie de la symbiose ectomycorhizienne.....	32
1.6.1	Description de la symbiose mycorhizienne	32
1.6.2	Anatomie et écologie de la symbiose ectomycorhizienne	34
1.6.3	Physiologie de la symbiose ectomycorhizienne.....	35
1.7	Objectifs et hypothèses de recherche	40

Chapitre 2 Mycorrhizal inoculum potentials of pure reclamation materials and revegetated tailing sands from the Canadian oil sand industry 44

2.1	Avant-propos.....	44
2.2	Résumé.....	45
2.3	Abstract	46
2.4	Introduction.....	47
2.5	Materials and methods	49
2.5.1	Substrates	49
2.5.2	Inoculum potential bioassay.....	49
2.5.3	Determination of inoculum potential	52
2.5.4	Morphological description and ITS-RFLP identification of ECM fungi.....	53
2.5.5	Statistical analysis.....	54

2.6	Results.....	55
2.6.1	Plant growth.....	55
2.6.2	Mycorrhizal status and typing.....	57
2.7	Discussion.....	61
2.7.1	Inoculum potential of pure reclamation materials.....	61
2.7.2	Inoculum potentials of reclaimed sites.....	61
2.7.3	ECM fungal identification.....	63
2.8	Acknowledgments.....	65

Chapitre 3 Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations 66

3.1	Avant-propos.....	66
3.2	Résumé.....	67
3.3	Abstract.....	68
3.4	Introduction.....	69
3.5	Materials and methods.....	72
3.5.1	Origin and growth conditions of the fungi.....	72
3.5.2	Radial growth and biomass yield.....	73
3.5.3	Tissue analyses.....	73
3.5.4	Statistical analyses.....	74
3.6	Results.....	75
3.6.1	Growth and water content.....	75
3.6.2	Stress indicators.....	79
3.6.3	Na and Cl content.....	81
3.7	Discussion.....	84
3.8	Acknowledgments.....	88

Chapitre 4 Physiological response to NaCl of nursery-grown *Pinus banksiana* inoculated with *Laccaria bicolor* 89

4.1	Avant-propos.....	89
4.2	Résumé.....	90
4.3	Abstract.....	91
4.4	Introduction.....	92
4.5	Materials and methods.....	94
4.5.1	Plant and fungal materials.....	94
4.5.2	Physiological and morphological measurements.....	95
4.5.3	Experimental design and statistical analysis.....	97
4.6	Results.....	99
4.6.1	NaCl treatment effectiveness.....	99
4.6.2	Colonization rates.....	101
4.6.3	Photosynthetic apparatus and water relations.....	101
4.6.4	Biomass partitioning.....	104
4.6.5	Elemental analyses.....	106
4.7	Discussion.....	108
4.8	Acknowledgements.....	112

Chapitre 5 Differential effect of three ectomycorrhizal fungi on the physiological response of *Picea glauca* and *Pinus banksiana* seedlings exposed to a NaCl gradient

.....	113
5.1 Avant-propos.....	113
5.2 Résumé.....	114
5.3 Abstract.....	115
5.4 Introduction.....	116
5.5 Materials and Methods.....	119
5.5.1 Fungal and plant materials.....	119
5.5.2 NaCl treatment application.....	120
5.5.3 Photochemical response and biomass yield.....	120
5.5.4 Compatible osmolyte analyses.....	122
5.5.5 Experimental design and statistical analysis.....	122
5.6 Results.....	124
5.6.1 Effectiveness of treatments.....	124
5.6.2 Photochemical response.....	125
5.6.3 Seedling biomass yield and water content.....	126
5.6.4 Accumulation of osmolytes.....	128
5.7 Discussion.....	133
5.7.1 Inoculation benefits.....	133
5.7.2 Physiological adaptation strategy.....	134
5.7.3 High stress response.....	136
5.8 Acknowledgments.....	138

Chapitre 6 Réponse physiologique de semis d'épinette blanche (*Picea glauca*) et de pin gris (*Pinus banksiana*) inoculés avec des champignons ECM et exposés à des rejets salins de sables bitumineux..... 139

6.1 Avant-propos.....	139
6.2 Résumé.....	140
6.3 Introduction.....	141
6.4 Matériel et méthodes.....	144
6.4.1 Production des inocula et semis inoculés.....	144
6.4.2 Dispositif expérimental.....	144
6.4.3 Récolte et mesures.....	146
6.4.4 Statistiques.....	147
6.5 Résultats.....	149
6.5.1 Salinité du substrat.....	149
6.5.2 Croissance des semis.....	149
6.5.3 Relations hydriques.....	150
6.5.4 Indicateurs de stress.....	151
6.5.5 Expérience B.....	155
6.6 Discussion.....	157
6.6.1 Expérience A.....	157
6.6.2 Expérience B.....	158
6.7 Conclusion.....	158
6.8 Remerciements.....	159

Chapitre 7 Conclusions générales et perspectives de recherche.....	160
7.1 Récapitulatif des acquis	160
7.2 Sélection <i>in vitro</i>	161
7.3 Inoculation et croissance de semis en conditions contrôlées	162
7.4 Stress sodique et réponse physiologique des semis	164
7.5 Sodicité, sucres et symbiose ectomycorhizienne	167
7.6 Quel champignon utiliser pour la plantation de semis de conifères sur des terrains salins et sodiques ?	168
7.7 Perspectives de recherche	170
Bibliographie générale	173
ANNEXES	187
Annexe I - Illustrations sur l'expérience de piégeage.....	188
Annexe II – Mycélia cultivés <i>in vitro</i> , mycorhization contrôlée et semis d'épinette blanche et de pin gris	189
Annexe III - Croissance de semis inoculés	190

Liste des tableaux

Table 1.1 Seuils de sodicité (ESP, SAR _e) et de salinité (CE _e) utilisés pour un classement général des sols.	17
Table 1.2 Échelle modifiée d'après « <i>Alberta environment</i> » (2001) caractérisant le niveau de stress salin et sodique pour la végétalisation d'un terrain en considérant la conductivité électrique (CE _e) et le ratio d'absorption du sodium (SAR _e).	17
Table 2.1 Planted and naturally occurring plant species on sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99).	50
Table 2.2 Chemical and physical properties of bulked samples of composite tailings (CT), tailing sands (TS), deep overburden (OB), muskeg peat (MK) and soil from sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99).	51
Table 2.3 Plant growth response on control substrate (CTRL), composite tailings (CT), tailing sands (TS), deep overburden (OB), muskeg peat (MK) and soil from sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99).	56
Table 2.4 Correlation analysis of soil properties, mycorrhizal status and plant growth parameters across all substrate types (n = 7).	59
Table 2.5 ITS-RFLP patterns of ECM fungi found in deep overburden (OB), muskeg peat (MK) and soil from sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99).	60
Table 3.1 Significant F values from the two-way analysis of variance of radial growth (n = 4), dry mass (DM), water content and mycelium density (n = 3) of five mycorrhizal species (<i>H. crustuliniforme</i> , <i>L. bicolor</i> , <i>S. tomentosus</i> , <i>Hymenoscyphus</i> sp., <i>Phialocephala</i> sp.) at five NaCl concentrations.	77
Table 3.2 Significant F values from the two-way analysis of variance of trehalose, mannitol, glucose, proline, Na and Cl contents (n = 3) of five mycorrhizal species (<i>H. crustuliniforme</i> , <i>L. bicolor</i> , <i>S. tomentosus</i> , <i>Hymenoscyphus</i> sp., <i>Phialocephala</i> sp.) at five NaCl concentrations.	82
Table 4.1 pH, electrical conductivity (EC) and sodium absorption ratio (SAR) of the growing substrates of inoculated (I) or non-inoculated (NI) seedlings at the end of the experiment.	99
Table 4.2 Main contrast results of physiological parameters.	100
Table 4.3 Means and standard errors of dry mass of growing shoots and roots and their ratio in inoculated (I) and non-inoculated (NI) seedlings in response to increasing NaCl treatments.	105
Table 4.4 Means and standard errors of N and P contents of growing shoots of inoculated (I) and non-inoculated (NI) seedlings in response to increasing NaCl treatments.	107
Table 5.1 pH, electrical conductivity (EC) and sodium absorption ratio (SAR) of the growth substrates at the end of the experiment.	124
Table 5.2 Significant F values from the analysis of variance of dependent variables.	132
Tableau 6.1 Caractéristiques des RC purs avant l'expérience et des substrats de croissance Sable:Turface:Tourbe:Perlite (S:T:To:P) après l'expérience.	149
Tableau 6.2 Valeurs F significatives déterminées par l'analyse de variance des variables dépendantes.	155
Tableau 6.3 Survie de semis d'épinette blanche et de pin gris, inoculés ou non avec <i>L. bicolor</i> sur un sol reconstitué sodique.	156

Liste des figures

Figure 1.1 Boreas, dieu du vent du nord dans la mythologie grecque et le biome boréal.	3
Figure 1.2 Dépôts de sables bitumineux de l'Alberta.	8
Figure 1.3 Profil géologique de la région de l'Athabasca et disposition du dépôt de sables bitumineux.	9
Figure 1.4 Synthèse des étapes d'exploitation des sables bitumineux avec (a) la coupe de la végétation, (b) la collecte des matériaux, (c) un puits d'exploitation à ciel ouvert et les puissants transporteurs U-haul, (d) un profil sur des matériaux de mort-terrain, (e) un pipeline servant à transporter et rejeter les sables, (f) le stockage des matériaux sus-jacents du filon exploité, (g) un terrain/site (dépôt) stabilisé de rejet sableux, (h) la couche d'amendement pour reconstruire le sol et (i) l'étape de végétalisation d'un sol reconstruit.	10
Figure 1.5 Structure des sables bitumineux.	11
Figure 1.6 Illustration représentant l'excavation de sables bitumineux (a) et le remblaiement du puits par les rejets sableux et leur amendement (b).	11
Figure 1.7 Dispersion (domaine de Ca^{2+}) et gonflement des argiles (pénétration du Na^+) (Essington 2004).	19
Figure 1.8 Racine fine de pin gris non mycorhizée (a), mycélium d'une souche de <i>Suillus tomentosus</i> (Kauff.) Sing., Snell and Dick se développant dans un substrat minéral <i>in vitro</i> (b), racines de pin gris mycorhizées par <i>Hebeloma crustuliniforme</i> (Bull) Quel. (c, d, e), <i>Laccaria bicolor</i> (Maire) Orton (f, g), <i>S. tomentosus</i> (h, k) et <i>Phialocephala</i> sp. (i, j).	33
Figure 1.9 Interface plante/champignon constituée de parois cellulaires végétales et fongiques. Le passage des nutriments se fait au travers des membranes plasmiques de la plante et du champignon.	34
Figure 2.1 Percentage colonization by root endophytes observed on plants grown on composite tailings (CT), tailing sands (TS), deep overburden (OB), muskeg peat (MK) and soil from sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99). Root endophytes of red clover and hybrid poplar are AMF. Jack pine colonization includes DS fungi and a fine root endophyte.	56
Figure 2.2 Percentage colonization by ECM fungi on jack pine seedlings grown on composite tailings (CT), tailing sands (TS), deep overburden (OB), muskeg peat (MK) and soil from sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99).	57
Figure 2.3 ECM colonization expressed as the number of mycorrhiza per meter of root on hybrid poplar bioassays grown on composite tailings (CT), tailing sands (TS), deep overburden (OB), muskeg peat (MK) and soil from sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99).	57
Figure 3.1 Growth and water content response of five mycorrhizal species (<i>H. crustuliniforme</i> , <i>L. bicolor</i> , <i>S. tomentosus</i> , <i>Hymenoscyphus</i> sp., <i>Phialocephala</i> sp.) growing at five NaCl concentrations during 21 days: a. maximum radial growth (means $\pm$ standard errors, n = 4), b. dry mass (DM) (means $\pm$ standard errors, n = 3), c. density (means $\pm$ standard errors, n = 3), and d. water content (means $\pm$ standard errors, n = 3).	76
Figure 3.2 Carbohydrate and proline content of five mycorrhizal species (<i>H. crustuliniforme</i> , <i>L. bicolor</i> , <i>S. tomentosus</i> , <i>Hymenoscyphus</i> sp., <i>Phialocephala</i> sp.) growing at five NaCl concentrations during 21 days: a. trehalose content (means $\pm$ standard errors, n = 3), b. mannitol content (means $\pm$ standard errors, n = 3), c. glucose content (means $\pm$ standard error, n = 3) and d. proline content (means $\pm$ standard errors, n = 3).	80
Figure 3.3 Na accumulation (means $\pm$ standard errors, n = 3) (a) and Cl accumulation (means $\pm$ standard errors, n = 3) (b) of five mycorrhizal species (<i>H. crustuliniforme</i> , <i>L. bicolor</i> ,	

S. tomentosus, *Hymenoscyphus* sp., *Phialocephala* sp.) growing at five NaCl concentrations during 21 days.....

83

Figure 4.1 Semi-logarithmic graphs showing (a) Na ($0.26\% \pm 0.01$) and (b) Cl ($0.78\% \pm 0.1$) shoot content, in percentage of dry mass (DM), of growing and mature parts of jack pine seedlings inoculated (I), or not (NI), and treated with 0, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 g Na l ⁻¹ of substrate.	100
Figure 4.2 Semi-logarithmic graph showing colonization rates ($49\% \pm 10$) of root system of jack pine seedlings inoculated (I), or not (NI), and treated with 0, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 g Na l ⁻¹ of substrate.	101
Figure 4.3 Semi-logarithmic graphs showing chlorophyll <i>a</i> fluorescence: (a) F_v/F_m ratio (0.69 ± 0.04) and (b) Φ_{PSII} (0.2 ± 0.03) of growing and mature needles of jack pine seedlings inoculated (I), or not (NI), and treated with 0, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 g Na l ⁻¹ of substrate.	102
Figure 4.4 Semi-logarithmic graphs showing (a) net photosynthesis (2.8 ± 0.8), (b) stomatal conductance (0.04 ± 0.02), and (c) transpiration (0.6 ± 0.3) of needles from mature shoots of jack pine seedlings inoculated (I), or not (NI), and treated with 0, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 g Na l ⁻¹ of substrate.	103
Figure 4.5 Semi-logarithmic graph showing water content, in percentage of fresh mass (FM) of growing shoots ($65.9\% \pm 2.3$) of jack pine seedlings inoculated (I), or not (NI), and treated with 0, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 g Na l ⁻¹ of substrate.	104
Figure 4.6 Semi-logarithmic graph showing growing shoot ($76\% \pm 14$) and root ($80\% \pm 13$) biomass accumulation of seedlings treated with 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 g Na l ⁻¹ of substrate, in percentage of the shoot and root DM of jack pine seedlings in the control NaCl treatment, inoculated (I) or not (NI).	106
Figure 5.1 Sodium content of shoot tissues and its shoot:root ratio for white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated or inoculated with <i>H. crustuliniforme</i> , or with <i>L. bicolor</i> and <i>S. tomentosus</i> , and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl.	125
Figure 5.2 Chlorophyll <i>a</i> fluorescence F_v/F_m ratio of growing and mature needles of white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated or inoculated with <i>H. crustuliniforme</i> , <i>L. bicolor</i> or <i>S. tomentosus</i> , and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl.	126
Figure 5.3 Shoot and root DM of white spruce and jack pine seedlings treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl, and either non-inoculated or inoculated with <i>H. crustuliniforme</i> , <i>L. bicolor</i> or the <i>S. tomentosus</i> , or <i>L. bicolor</i> and <i>S. tomentosus</i> grouped together as one treatment.	127
Figure 5.4 Water content of shoot and root tissues of white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated or inoculated with <i>H. crustuliniforme</i> , <i>L. bicolor</i> and <i>S. tomentosus</i> , and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl.	128
Figure 5.5 Proline content of shoots of white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated or inoculated with <i>H. crustuliniforme</i> , <i>L. bicolor</i> and <i>S. tomentosus</i> , and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl.	129
Figure 5.6 Fructose and glucose content of shoot and root tissues of white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated or inoculated with <i>H. crustuliniforme</i> , or with <i>L. bicolor</i> and <i>S. tomentosus</i> , and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl.	129
Figure 5.7 Pinitol of shoot and root tissues of white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated or inoculated with <i>H. crustuliniforme</i> , or with <i>L. bicolor</i> or <i>S. tomentosus</i> , and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl.	130
Figure 5.8 Sucrose content of root tissues of white spruce seedlings either non-inoculated or inoculated with <i>H. crustuliniforme</i> , <i>L. bicolor</i> or <i>S. tomentosus</i> , and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl.	131

Figure 5.9 Glycerol content of shoot tissues of white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated or inoculated with <i>H. crustuliniforme</i> , or with <i>L. bicolor</i> and <i>S. tomentosus</i> , and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl.....	131
Figure 6.1 Coupe transversale d'une unité expérimentale de l'expérience A (a) et photographie montrant la disposition des quatre blocs (b).....	145
Figure 6.2 Exemple de distribution des unités expérimentales dans deux blocs du dispositif expérimental B.....	146
Figure 6.3 Masse sèche des parties aériennes et racinaires, ainsi que leur ratio chez des semis d'épinette blanche et de pin gris non inoculés (C) ou inoculés avec <i>H. crustuliniforme</i> (Hc), <i>L. bicolor</i> (Lb), ou <i>S. tomentosus</i> (Su) après 28 jours d'exposition à des eaux de RC.....	150
Figure 6.4 Sucres totaux accumulés dans les parties aériennes (cime) et racinaires en pourcentage de la masse sèche respective de ces parties chez des semis d'épinette blanche et de pin gris non inoculés (C) ou inoculés avec <i>H. crustuliniforme</i> (Hc), <i>L. bicolor</i> (Lb), ou <i>S. tomentosus</i> (Su) après 28 jours d'exposition aux eaux de RC.....	152
Figure 6.5 Glucose accumulé dans les parties aériennes (cime) et racinaires en pourcentage de la masse sèche respective de ces parties chez des semis d'épinette blanche et de pin gris non inoculés (C) ou inoculés avec <i>H. crustuliniforme</i> (Hc), <i>L. bicolor</i> (Lb), ou <i>S. tomentosus</i> (Su) après 28 jours d'exposition aux eaux de RC.....	153
Figure 6.6 Saccharose accumulé dans les parties aériennes (cime) et racinaires en pourcentage de la masse sèche respective de ces parties chez des semis d'épinette blanche et de pin gris non inoculés (C) ou inoculés avec <i>H. crustuliniforme</i> (Hc), <i>L. bicolor</i> (Lb) ou <i>S. tomentosus</i> (Su) après 28 jours d'exposition aux eaux de RC.....	154
Figure 6.7 Glycérol accumulé dans les parties aériennes (cime) et racinaires en pourcentage de la masse sèche respective de ces parties chez des semis d'épinette blanche et de pin gris non inoculés (C) ou inoculés avec <i>H. crustuliniforme</i> (Hc), <i>L. bicolor</i> (Lb) ou <i>S. tomentosus</i> (Su) après 28 jours d'exposition aux eaux de RC.....	154
Figure 7.1 Schéma de synthèse décrivant l'augmentation hypothétique du stress chez des semis de pin gris exposés à des concentrations croissantes de NaCl dans le substrat (à l'extérieur des tissus).166	
Figure annexe I - Photographies des sites échantillonnés dans l'expérience 1 (Chapitre 2) comprenant des sables de rejets consolidés (a), des rejets sableux communs (b), un épandage de tourbe Muskeg (c), des matériaux de mort-terrain (d), un site restauré en 1999 (e), un site restauré en 1988 (f) et un site restauré en 1982 (g). Les photos (h) et (i) illustrent l'expérience de piégeage en serre.....	188
Figure annexe II - Photographies des mycélia de (a) <i>Phialocephala</i> sp., (b) <i>Hymenoscyphus</i> sp., (c) <i>Suillus tomentosus</i> (d) <i>Laccaria bicolor</i> (e) <i>Hebeloma crustuliniforme</i> cultivés dans l'expérience 2 (Chapitre 3) ; (f) croissance <i>in vitro</i> de <i>L. bicolor</i> exposé à des concentrations croissantes de NaCl de la gauche vers la droite (0, 50, 100, 200 et 300 mM) ; (g, h) inoculum liquide (<i>L. bicolor</i>) et solide (<i>H. crustuliniforme</i>) ; (i, j, k) mycorhization contrôlée de <i>L. bicolor</i> sur de l'épinette blanche ; (l) semis d'épinette blanche et (m) de pin gris produits pour l'expérience 4 (Chapitre 5).	189
Figure annexe III - Croissance de semis d'épinette blanche (a) et de pin gris (b) inoculés ou non en conditions non-limitantes ; au total, 46,1 g N appliqué par cavités avec du 20-8-20r (Plant Prod Québec, QC, Canada).....	190

Liste des encadrés

Encadré 1.1 Mode de propagation des champignons mycorhiziens.	5
Encadré 1.2 Le pétrole des sables bitumineux.	6
Encadré 1.3 Formation d'un gisement de pétrole.	7
Encadré 1.4 Définitions des termes végétalisation et reboisement.	13
Encadré 1.5 Conductivité électrique.	16
Encadré 1.6 Ratio d'absorption du sodium.	16
Encadré 1.7 Dispersion et gonflement des argiles.	21
Encadré 1.8 Déformations élastique et plastique.	22
Encadré 1.9 Définition de la croissance.	25
Encadré 1.10 Solutés compatibles : définition et fonctions.	27
Encadré 1.11 Indices de résistance.	28
Encadré 1.12 Définition de la symbiose mycorhizienne.	32

Liste des abréviations

AB : Alberta

ABA : *abscisic acid* ou acide abscissique

AM : *arbuscular mycorrhizal*

AMF : *arbuscular mycorrhizal fungi*

BCERN : *British Columbia ectomycorrhizal research network*

CA : Californie

CCF : concentration critique de floculation

CEC : capacité d'échange cationique

CFL : centre de foresterie des Laurentides

ChF1 : *chlorophyll a fluorescence*

Ch1a : *chlorophyll a*

Ch1b : *chlorophyll b*

CRBF : centre de recherche en biologie forestière

CT ou RC : *composite tailings* ou rejets consolidés

CTE : concentration totale en électrolytes

DM ou MS : *dry mass* ou masse sèche

DNA ou ADN : *desoxyribonucleic acid* ou acide desoxyribonucléique

DS : *dark septate*

DW : *dry weight*

EC ou CE : *electrical conductivity* ou conductivité électrique

ECM: *ectomycorrhizal* ou ectomycorhizien

e.g. : *exempli gratia* (par exemple)

EOR : espèces oxygénées radicalaires

ESP : *Exchangeable sodium pourcentage* ou pourcentage de sodium échangeable

FM ou MF : *fresh mass* ou masse fraîche

i.e. : *id est* (c'est-à-dire)

ITS : *internal transcribed spacer*

MA : Massachussetts

MK : tourbe Muskeg

Na⁺, Cl⁻, K⁺, Ca²⁺ : formes ioniques

Na, Cl, K, Ca: éléments

NJ : New Jersey

NY : NewYork

NSERC ou CRSNG ou : *Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada* ou Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada

OB ou MT : *overburden* ou mort-terrain

OR : Orégon

PAR : *photosynthetically active radiation*

PCR : polymérase chain reaction

PFD : *photon flux density*

P:V : peat :vermiculite

PVC: polyvynile de chlorure

QC : Québec

R99, R88 et R82 : sites restaurés respectivement en 1999, 1988 et 1982

RFLP : *restriction fragment length polymorphism*

RH ou HR : *relative humidity* ou humidité relative

SAR : *sodium absorption ratio* ou ratio d'absorption du sodium

S:T:P:Pe ou S:T:To:P: *Sand:Turface®:Peat:Perlite* ou Sable:Turface®:Tourbe:Perlite

TCA: taux de croissance absolue

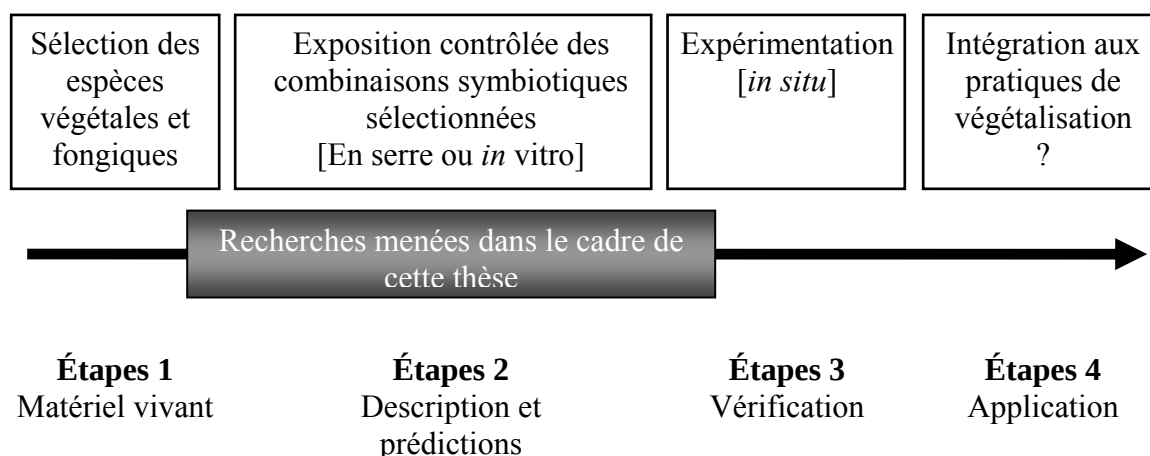
TS ou RS : *tailing sands* ou rejets sableux

UAMH : *university of Alberta microfungus collection and herbarium*

Chapitre 1 Introduction générale

1.1 Mise en situation

Les champignons telluriques ectomycorhiziens en symbiose avec les racines des conifères sont reconnus comme étant des acteurs essentiels au fonctionnement des écosystèmes boréaux. Cette thèse présente des travaux portant sur l'utilisation de ces champignons symbiotiques pour l'amélioration des pratiques de restauration d'écosystèmes sur des terrains infertiles. Les objectifs des expériences présentées dans la suite de ce document sont donc plus appliqués que fondamentaux et servent les besoins de végétalisation de rejets sableux sodiques et/ou salins issus de l'exploitation des sables bitumineux au Nord-Est de l'Alberta (Canada). Ces travaux s'intègrent ainsi dans un plus vaste projet de recherche pour la mise en valeur de l'inoculation de semis destinés à la végétalisation de terrains perturbés :



Depuis la boîte de Pétri jusqu'aux invariables difficultés des mesures *in situ*, les thématiques abordées dans les expériences qui suivent croisent plusieurs disciplines (*e.g.*, physiologie, mycologie, écologie, sciences du sol, foresterie). De fait, pour faciliter la compréhension de la thèse, ce premier chapitre constitue une synthèse permettant de cerner les différents aspects abordés dans les expériences des chapitres suivants. D'un point de vue général, la restauration de terrains perturbés par les activités humaines relève de problématiques environnementales (pollutions) et écologiques (réhabilitation d'écosystèmes). Plus précisément, il s'agit de comprendre le mode d'action du stress et la réponse des organismes exposés (écophysiologie/écotoxicologie). Il faut garder à l'esprit que cette thèse décrit le stress salin généré par l'excès de Na^+ , dit stress sodique, mais qu'il existe une grande variété de

compositions salines possibles. Mentionnons que l'excès de NaCl peut être considéré comme un stress modèle pour décrire la réponse physiologique des plantes, des champignons et des bactéries au stress salin. Dans la suite de ce document, le terme salinité est employé pour l'excès de sel en général et l'emploi du terme sodicité fait référence à l'effet spécifique de l'excès de Na^+ . De fait, l'expression « stress sodique » est employée pour indiquer les effets osmotique et ionique provoqués par l'excès de Na^+ sur la physiologie d'un organisme.

Un excès de sel est d'abord un stress chimique mais qui provoque également un stress physique en limitant la disponibilité de l'eau pour les organismes exposés. C'est pourquoi les composantes explicatives (acteurs du changement) de la réponse physiologique sont plutôt d'ordre biochimique (*e.g.*, ajustement osmotique, protection du métabolisme et des structures) alors que les composantes biophysiques ne sont souvent que des résultantes de ces processus d'adaptation ou de dépérissement (*e.g.*, turgescence, perméabilité membranaire, conductivité hydraulique). Par conséquent, les travaux présentés dans cette thèse se concentrent essentiellement sur l'activité photosynthétique, l'absorption de Na^+ et l'accumulation de solutés compatibles dans les tissus des organismes exposés à un stress sodique. Cette caractérisation écophysiologique de semis inoculés a pour but d'évaluer si l'inoculation de semis peut améliorer la croissance et la survie des plants dans un milieu présentant un excès de Na^+ .

La suite de ce chapitre présente le contexte général de cette thèse, à savoir : l'écosystème forestier boréal, l'exploitation des sables bitumineux, et la problématique de restauration de l'écosystème forestier sur des rejets salins. Dans ce cadre, la description de conditions salines et sodiques, la physiologie des plantes exposées à un excès de sel et l'influence des champignons mycorhiziens sur la physiologie de leur hôte végétal sont détaillées afin d'introduire les expériences décrites dans les chapitres subséquents.

1.2 Écosystème forestier boréal

1.2.1 Forêt boréale

Parmi tous les types de biomes terrestres, existe la vaste forêt nordique subarctique connue sous le nom de forêt boréale (l'adjectif « boréal(e) » est emprunté au latin *borealis*, « du Nord ») (Figure 1.1) ou taïga (en russe). Cette région ou unité biogéographique occupe toute la longueur de l'Amérique du Nord et de l'Eurasie et aucun équivalent n'existe dans l'hémisphère sud. La forêt boréale encercle le globe suivant une extension circumpolaire (Figure 1.1).



Figure 1.1 Boreas, dieu du vent du nord dans la mythologie grecque et le biome boréal.

Source : projet BOREAS, www.borealforest.org/world/world_overview.htm (consulté : janvier 2005) et environnement canada, www.pnr-rpn.ec.gc.ca (consulté : février 2005)

En Amérique du Nord, la ceinture boréale peut atteindre 2000 km de large et représente 28 % du territoire situé au Nord du Mexique (77 % des forêts canadiennes ou 310 millions d'hectares (www.nrcan-rncan.gc.ca/cfs-scf/national/what-quoi/sof/ (consulté : octobre 2005))). Dans ses frontières les plus nordiques (entre lat. 68°N et 58°N pour l'Amérique du Nord), la forêt boréale rencontre le biome des steppes arctiques de la toundra. La frontière Sud de ce biome est plus difficile à définir. La séparation n'est pas aussi distincte qu'avec l'écotone (zone de transition entre deux biomes) de la toundra et, de plus, la transition se fait au sein d'une grande variété de types de végétation. Ainsi, selon

le contexte climatique, la transition se fera avec des forêts caducifoliées mixtes, des forêts sub-alpines ou avec les prairies du centre du Canada (Larsen 1980, Röhrig & Ulrich 1991, Henry 2002).

1.2.2 Écologie de la forêt boréale

La composition végétale de la forêt boréale Nord-américaine varie d'est en ouest sous l'influence des océans et du relief. Ce biome intègre presque l'ensemble des forêts canadiennes et est dominé par des gymnospermes de la famille des Pinaceae. De cette famille, les genres *Pinus* et *Picea* forment de vastes peuplements forestiers, souvent monospécifiques (Read *et al.* 2004). On retrouve également des espèces des genres *Abies* et *Larix*. Dans sa partie Sud, la forêt boréale se compose également d'espèces feuillues des genres *Ulmus*, *Salix*, *Fraxinus*, *Quercus*, *Acer*, *Alnus*, *Betula* et *Populus* (Henry 2002). Les herbacées sont très rares dans cette forêt dense. Quant à la strate arbustive, elle est composée en grande partie d'espèces de la famille des Éricacées (*e.g.*, *Vaccinium* spp. ou *Ledum groenlandicum*).

Étant donné la courte durée de la période de croissance offerte par le climat nordique, les conifères ont un net avantage compétitif provenant de leur capacité à photosynthétiser à l'année longue. En outre, les sols de la forêt boréale sont très pauvres du fait de leur immaturité (fonte tardive du bouclier de glace, il y a 6 à 9000 ans), ce qui offre un autre avantage sélectif pour les conifères. Cet avantage est entretenu notamment par la composition de la litière des forêts de conifères. La litière d'aiguilles favorise des conditions acides qui ralentissent la décomposition de la matière organique. Les sols pauvres en nutriments tendent à favoriser les conifères car ce sont des espèces accumulatrices, en particulier pour le calcium (Ca), l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K). Une grande partie de ces éléments accumulés n'est restituée au sol que lorsque les arbres meurent et se décomposent lentement ou sont brûlés (Henry 2002). Le feu (facteur de perturbation) survient à l'occasion de périodes plus sèches et est un élément clé pour le renouvellement de la forêt.

La capacité des conifères à vivre en milieu difficile tient autant aux qualités de leurs parties aériennes qu'à celles de leurs organes souterrains. Ils disposent de systèmes racinaires multitrophiques hautement dépendant de leur symbiose avec certains champignons telluriques (voir ci-après). L'association la plus commune est réalisée avec des champignons supérieurs de l'embranchement des ascomycètes ou des basidiomycètes. Ceux-ci forment avec les radicelles des conifères des organes symbiotiques appelés ectomycorhizes permettant le partage de ressources entre les deux organismes. La forêt boréale entretient une grande diversité fongique aux fonctions écologiques variées. Parmi les champignons

symbiotiques, les espèces ectomycorhizienne (ECM) et éricoïdes sont dominantes dans les forêts boréale et subalpine (Allen 1991).

Certains champignons très versatiles, tels que les ascomycètes des genres *Phialocephala*, *Phialophora*, *Hymenoscyphus*, se retrouvent essentiellement dans les premières phases de succession suite à la perturbation d'un site. Ils s'associent aux plantes pionnières (*e.g.*, *Ericaceae*, *Betulaceae*) qui viennent recoloniser l'environnement. Ces trouées, où poussent également des herbacées permettent le développement de champignons mycorhiziens arbusculaires (zygomycètes) (Allen 1991). Néanmoins, ces derniers champignons sont possiblement moins adaptés aux conditions des sols de la forêt boréale que les champignons ECM, notamment pour l'absorption du N organique (Northrup *et al.* 1995, Moyersoen *et al.* 2001, Read *et al.* 2004). Par un phénomène de succession, les feuillus de la forêt boréale vont progressivement recouvrir le terrain dénudé et protéger la pousse des jeunes conifères (Kimmins 2004, environnement Canada www.pnr-rpn.ec.gc.ca (consulté : février 2005)). Ceux-ci bénéficient des communautés de champignons ECM pionniers ainsi que probablement des colonisateurs (Encadré 1.1) plus tardifs de stade de succession intermédiaire tels que les basidiomycètes des genres *Thelephora*, *Laccaria*, *Hebeloma*, *Suillus*, *Rhizopogon*, *Tomentella*, etc. Après perturbation, la communauté fongique sous-jacente se complexifie avec l'âge du peuplement (Dighton & Mason 1985, Last *et al.* 1987, Bradbury *et al.* 1998, Frankland 1998, Jumpponen *et al.* 2002) jusqu'à la fermeture de la canopée (Guinberteau & Courtecuisse 1997).

Encadré 1.1 Mode de propagation des champignons mycorhiziens.

Il existe plusieurs vecteurs/propagules asexués pour la propagation des champignons mycorhiziens : hyphes du réseau extraracinaire, racines colonisées émettrices d'hyphes, structures de résistance (*e.g.*, vésicules, sclérotes), cystides ou encore spores. Ce mode de dispersion est très local et peut être éventuellement étendu par les mouvements de sol et d'eau. Alors que les champignons mycorhiziens arbusculaires ne se propagent que de façon asexuée, les champignons ECM, ascomycètes ou basidiomycètes, peuvent se reproduire de façon sexuée par la différenciation d'un carpophore dicaryotique permettant une dispersion de longue distance par le vent ou les animaux mycophages (Abbott & Robson 1991, Brundrett & Abbott 1994, Brundrett *et al.* 1996a,b,c, Brundrett 2002).

Au Canada, de vastes étendues de forêts primaires sont encore intactes de toutes activités humaines. Néanmoins, la demande mondiale croissante en produits forestiers et en énergie augmente la pression de mise en valeur de la forêt boréale. Cet écosystème est ainsi exposé à de fortes perturbations. Par exemple, la coupe forestière de grande envergure progresse sur les zones encore vierges. En second plan, les industries minières ainsi que la prospection et l'exploitation des ressources énergétiques

(pétrole, gaz, hydro-électricité) agissent de façon synergique sur la destruction des écosystèmes boréaux. Le réchauffement climatique stimule cette tendance par l'augmentation des feux de forêts et des ravages par les insectes. Parmi toutes ces agressions, l'exploitation des sables bitumineux, bien que nécessaire, est, dans le contexte technologique actuel, une des plus dévastatrices et polluantes (Sénat du Canada 1999).

1.3 Exploitation des sables bitumineux et gestion des rejets

1.3.1 Ressources en sables bitumineux du Canada et leur exploitation

L'exploration des ressources pétrolifères s'est principalement concentrée sur le pétrole brut et les gaz naturels. Leur facilité d'extraction et leur faible coût ont longtemps inhibé le développement de technologies pour l'exploitation d'hydrocarbures lourds et visqueux tels que ceux des sables bitumineux (autrement appelés asphaltiques, « *oil sands* » en anglais) ou des schistes kérobitumeux (« *oil shale* » en anglais). Au début des années 70, l'impressionnante montée du prix du baril de pétrole ainsi que la crainte d'un épuisement de la ressource ont motivé l'intérêt porté aux vastes réserves d'énergie contenues sous ces formes moins nobles (Encadré 1.2).

Encadré 1.2 Le pétrole des sables bitumineux.

D'un point de vue chimique, le pétrole issu des sables bitumineux se compose de molécules hydrocarbonées plus longues que celles du pétrole brut, le rendant plus visqueux. Ce type de pétrole lourd contient également plus de soufre et de composés aromatiques ainsi que de nombreuses impuretés inorganiques. Le pétrole issu des sables bitumineux est soit moins mature que le pétrole brut, soit dérivé par différents processus de dégradation organiques ou inorganiques (Selley 1985). La qualité du bitume ou pétrole lourd issu des sables est améliorée en enlevant du C et en rajoutant du H pour éliminer les impuretés tels que le N et le S. Le pétrole brut ainsi obtenu est dit synthétique car modifié de son état naturel par des procédés chimiques (Oil sands discovery center www.oilsandsdiscovery.com (consulté : décembre 2004)).

Le Canada possède le deuxième plus grand réservoir de pétrole (Canada : 178,68 milliards de barils, Alberta : 176,1 milliards de barils (« *Alberta Energy and Utilities Board* » www.eub.gov.ab.ca (consulté : décembre 2004)) au monde, derrière l'Arabie Saoudite (> 250 milliards de barils). Un tiers de la production de pétrole canadien provient des sables bitumineux et cette réserve représente également un tiers des ressources mondiales en sables bitumineux (Oil sands discovery center www.oilsandsdiscovery.com (consulté : décembre 2004)). La province de l'Alberta dispose de l'essentiel de la réserve canadienne avec trois gisements principaux (Figure 1.2) couvrant un territoire de 140 800 km² : Peace River, Cold Lake et Athabasca (qui comprend le dépôt de Wabasca).

Les sables bitumineux de l'Alberta trouvent leur origine au Crétacé mais leur formation reste encore controversée (Figure 1.3). On suppose, comme pour d'autres réserves de sables bitumineux, que les hydrocarbures ont migré dans leur réservoir actuel plutôt que de s'y être originellement formés (Selley 1985). Cette migration dans les sables a été vraisemblablement engendrée par la pression de formation de la cordillère des Rocheuses. Avec le temps, le pétrole léger déplacé s'est transformé sous l'action de l'eau et des bactéries (Encadré 1.3). Le réservoir de l'Athabasca est le plus grand mais seulement 20 % (8000 km²) de ce dépôt est accessible par les méthodes conventionnelles d'exploitation à ciel ouvert. Quelques kilomètres au Nord de Fort McMurray (AB, Canada), au cœur de la forêt boréale, là où ce gisement est le plus proche de la surface, trois compagnies se partagent son exploitation : Syncrude Canada Ltd., Suncor Energy Inc. et Albion Sands Energy Inc.

Encadré 1.3 Formation d'un gisement de pétrole.

La formation d'un gisement de pétrole se concrétise par la rencontre de quatre facteurs essentiels : de la matière organique, des bactéries (responsable de l'élimination de l'oxygène et de l'azote), de la chaleur et de la pression (Oil sands discovery center, www.oilsandsdiscovery.com (consulté : décembre 2004)). Cette transformation de la matière organique en pétrole requiert au minimum un million d'années (Oil sands discovery center, www.oilsandsdiscovery.com (consulté : décembre 2004)) et doit prendre naissance dans un réservoir « géologique » adapté (*e.g.*, perméable) (Selley 1985). La matière organique provient le plus souvent de plantes et d'animaux marins, et principalement d'algues (Oil sands discovery center, www.oilsandsdiscovery.com (consulté : décembre 2004)).

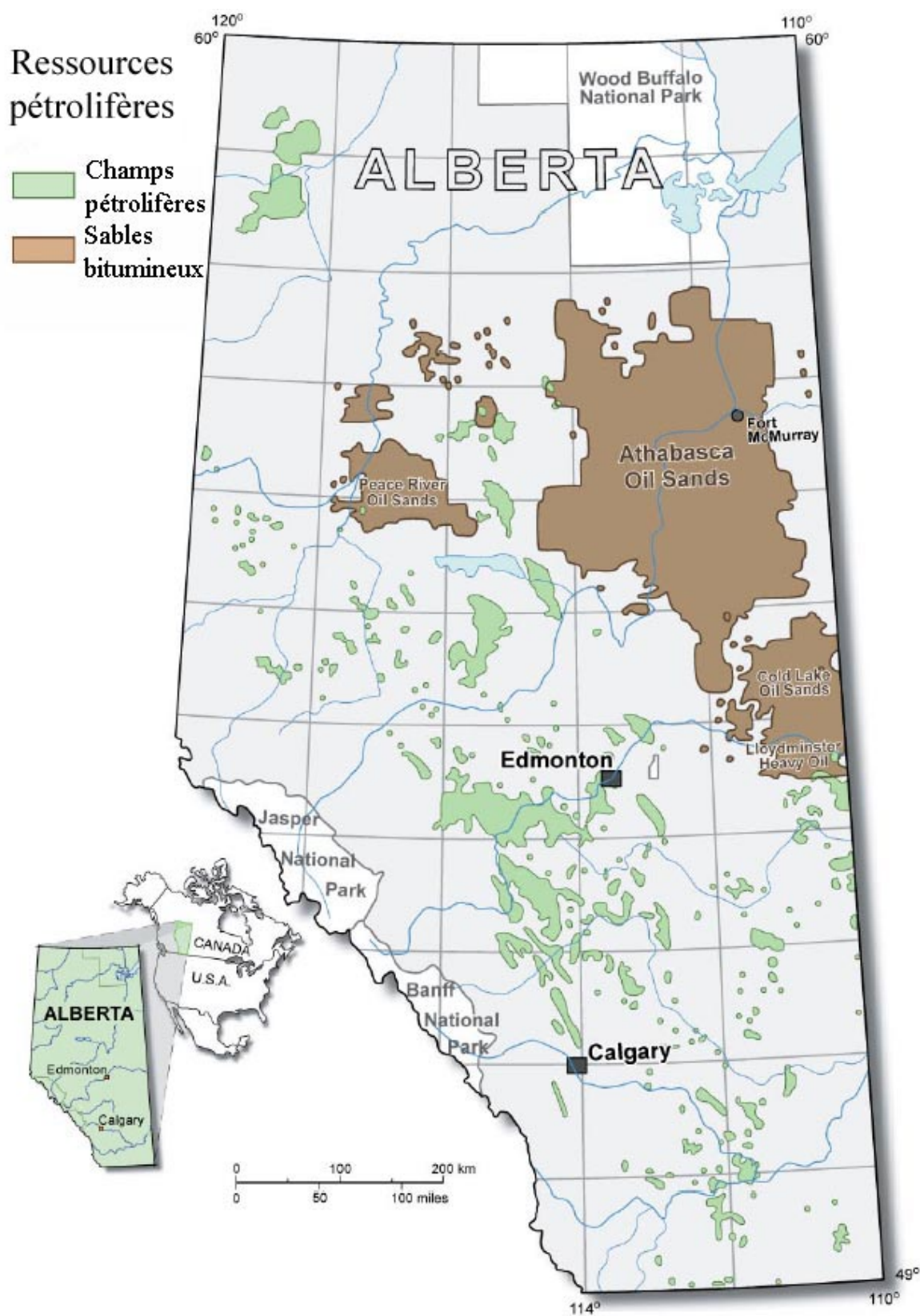


Figure 1.2 Dépôts de sables bitumineux de l'Alberta.

Source : « Alberta energy and utilities board » www.eub.gov.ab.ca (consulté : décembre 2004).

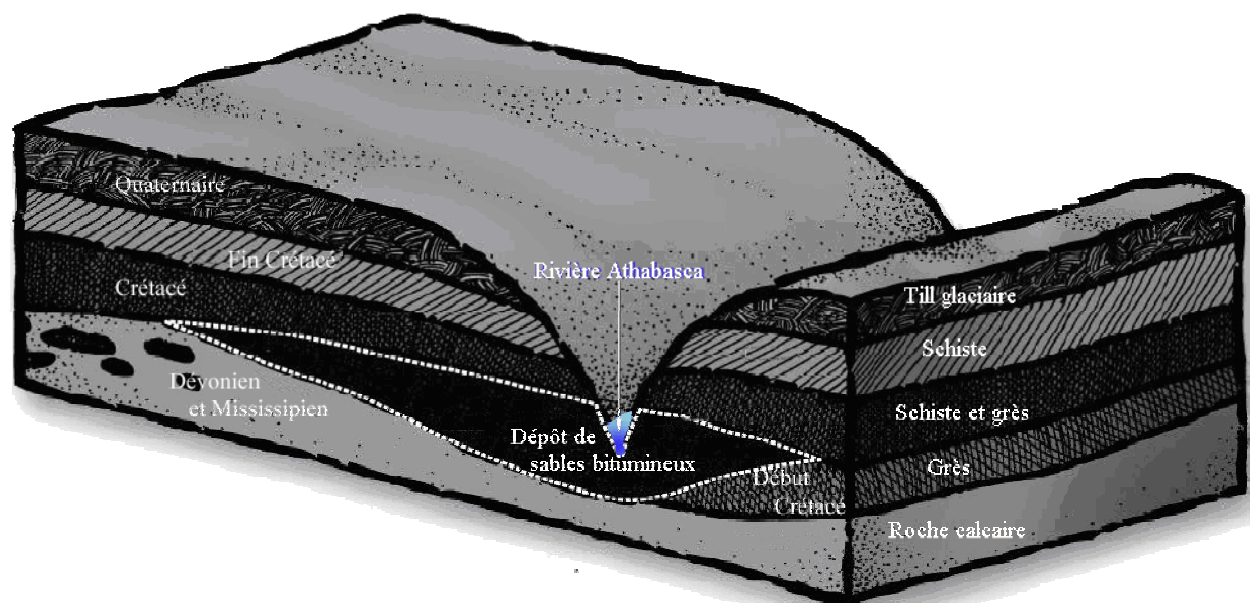


Figure 1.3 Profil géologique de la région de l'Athabasca et disposition du dépôt de sables bitumineux.

Source : Oil sands discovery center www.oilsandsdiscovery.com (consulté : décembre 2004).

La technologie d'extraction et de raffinage du pétrole des sables bitumineux ne cesse désormais de se développer. On considère que les sables contenant 12 % de pétrole sont de haute qualité alors que les sables en contenant 6 % sont qualifiés de pauvres ou non rentables pour l'exploitation. En moyenne, il y a 1 à 20 % d'hydrocarbures dans les sables et il faut 2 t de sables bitumineux pour obtenir 156 L (un baril) de pétrole brut synthétique. En 2010, l'industrie des sables bitumineux devrait atteindre une production de 2 millions de barils par jour (« *Alberta Energy and Utilities Board* » www.eub.gov.ab.ca (consulté : décembre 2004)). À l'heure actuelle, en Alberta, l'exploitation à ciel ouvert reste la méthode conventionnelle. Les parties du réservoir les plus proches de la surface (moins de 80 m, taille de la fosse la plus profonde de la zone exploitée par Syncrude Canada Ltd.) sont mises à nue et récoltées (Fung & Macyk 2000). Ainsi, la forêt est d'abord rasée et la couche superficielle de tourbe Muskeg (1 à 3 m) est déblayée (Figure 1.4). Avant d'atteindre le gisement, la couche de mort-terrain (ou matériau de couverture) sous-jacente à la couche de matière organique, doit également être excavée. Ce matériau est une masse compacte de roche et d'argile très humide. Les sables bitumineux sont ensuite

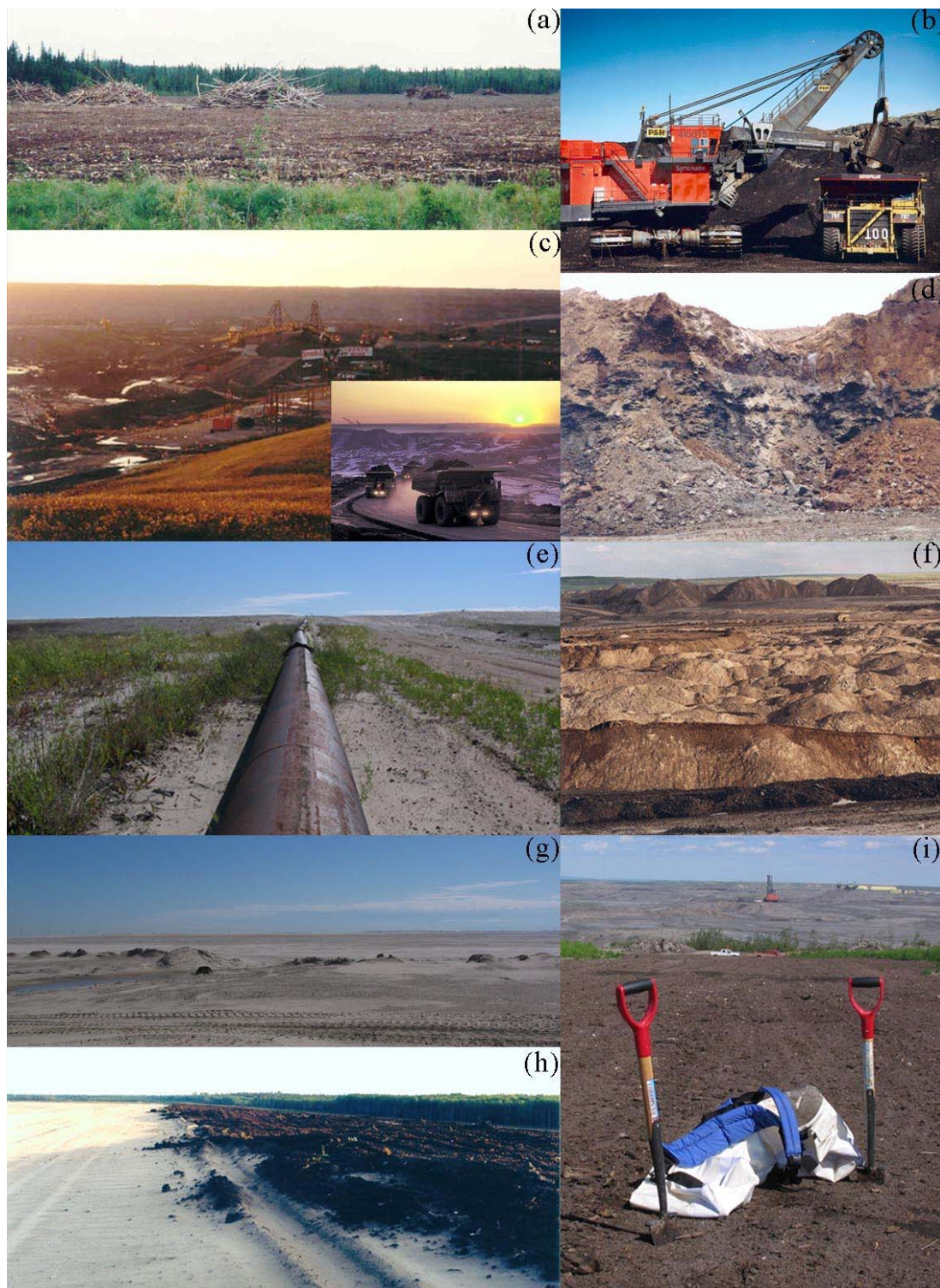


Figure 1.4 Synthèse des étapes d'exploitation des sables bitumineux avec (a) la coupe de la végétation, (b) la collecte des matériaux (source : Syncrude Canada Ltd.), (c) un puits d'exploitation à ciel ouvert et les puissants transporteurs U-haul (source : Syncrude Canada Ltd.), (d) un profil sur des matériaux de mort-terrain, (e) un pipeline servant à transporter et rejeter les sables, (f) le stockage des matériaux sus-jacents du filon exploité (source : Syncrude Canada Ltd.), (g) un terrain/site (dépôt) stabilisé de rejet sableux, (h) la couche d'amendement pour reconstruire le sol et (i) l'étape de végétalisation d'un sol reconstruit.

transportés par des engins de forte capacité (*e.g.*, les larges transporteurs U-haul : 360 t et 3 300 HP (Figure 1.4)), conditionnés (broyé/homogénéisé) et traités à l'eau. Les sables bitumineux sont hydrophiles car chaque particule de sable est entourée d'une fine pellicule d'eau avant d'être entourée par une pellicule de pétrole. Chaque grain est ainsi associé aux autres dans une matrice cohérente d'hydrocarbures (Figure 1.5).

Les sables sont traités à l'eau et/ou à la vapeur d'eau pour séparer efficacement les hydrocarbures par la chaleur et par extraction liquide-liquide. La fine pellicule d'eau saline entourant chaque grain de sable contient des argiles fines en suspension. Celles-ci sont dispersées par l'ajout de soude (NaOH) aux eaux de traitement dans le but d'augmenter le rendement d'extraction du pétrole (Fung & Macyk 2000).

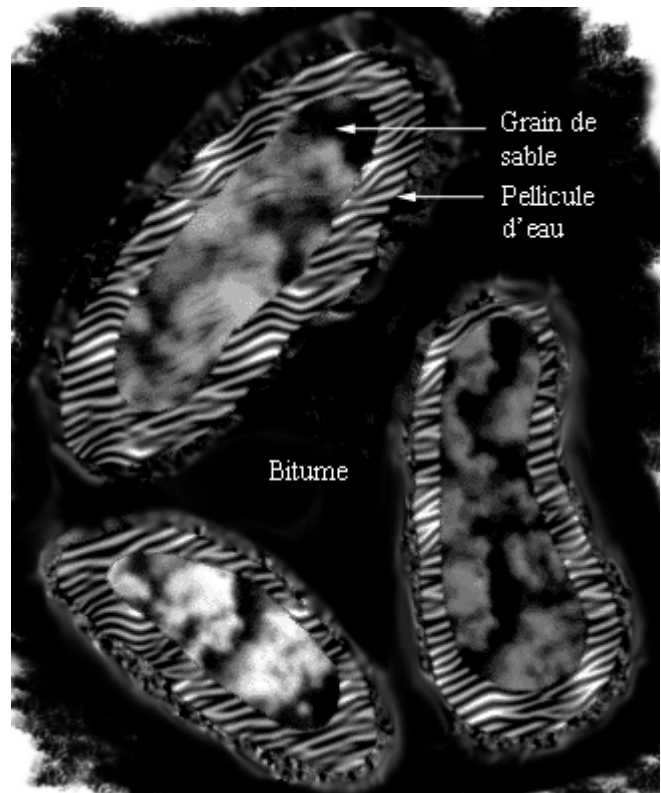
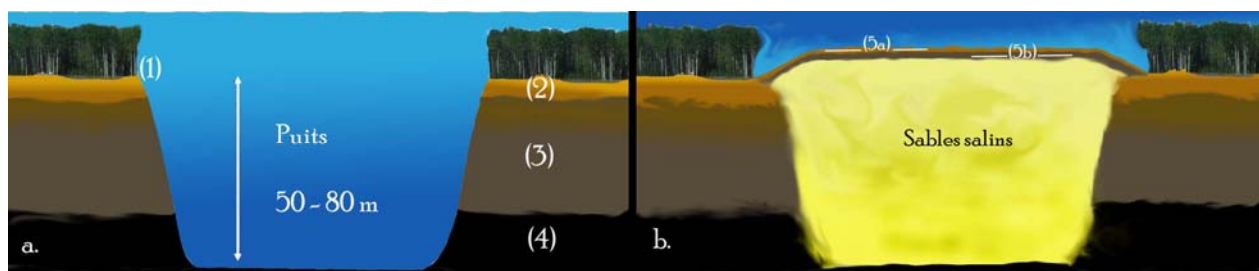


Figure 1.5 Structure des sables bitumineux.

Ces eaux usées, ayant servi lors de l'extraction, sont rejetées pour conduire les sables dans les fosses d'extraction épuisées (Figure 1.6). Par un processus de sédimentation, de l'extérieur du puits vers le centre, le diamètre des particules sableuses et argileuses diminue (Li & Fung 1998). Des talus de sables



(1) forêt boréale, (2) matière organique, (3) mort-terrain, (4) sables bitumineux, (5a) amendement organique, (5b) couche de mort-terrain.

Figure 1.6 Illustration représentant l'excavation de sables bitumineux (a) et le remblaiement du puits par les rejets sableux et leur amendement (b).

grossiers s'amoncellent aux abords du puits et une étendue d'eau peut éventuellement se former au centre du remblai. Cette eau peut ensuite être recyclée à nouveau dans le processus d'extraction (Fung & Macyk 2000).

Les déblais de matière organique provenant des horizons supérieurs des sols excavés (*e.g.*, tourbe Muskeg) et ceux de mort-terrains sont stockés à ciel ouvert en amoncellement et/ou utilisés pour amender les sables stabilisés dans les pratiques courantes de restauration.

1.3.2 Restauration des écosystèmes perturbés

Pour satisfaire aux exigences du « *Environmental Protection and Enhancement Act* » (1992) de la province de l'Alberta (« *Alberta Energy and Utilities Board* », www.eub.gov.ab.ca (consulté : décembre 2004)), Syncrude Canada Ltd. anticipe, à long terme, un retour des terrains perturbés à un état stable et en équilibre biologique : il s'agit de créer un territoire ayant une capacité de production au moins égale à celle qui prévalait au début des opérations. La compagnie envisage ainsi recréer un paysage constitué d'une mosaïque dominée par une forêt productive et des habitats fauniques variés tels que des zones humides et des prairies (élevage de bisons). Plus de \$7 millions sont investis chaque année pour réhabiliter les terrains perturbés. Plus de 2,5 millions de semis ont été plantés sur les sols reconstitués sur les rejets et approximativement 3300 hectares ont été restaurés. Syncrude Canada Ltd. a pour objectif de restaurer 4000 hectares de plus au cours des dix prochaines années (Syncrude Canada Ltd., www.syncrude.com (consulté : décembre 2004)).

Les exigences du gouvernement ainsi que la nature et la dimension de l'espace à réhabiliter conditionnent la nature des efforts de restauration à mettre en œuvre. Les méthodes de restauration sont déterminées sur la base de quatre éléments principaux : les caractéristiques des rejets, la quantité et les caractéristiques des matériaux d'amendements, le climat et les objectifs de restauration (*e.g.*, espace naturel, récréatif, agricole ou forestier) (Fung & Macyk 2000). Réhabiliter un écosystème implique d'accélérer la recolonisation des espaces perturbés par les organismes indigènes. Pour ce faire, il s'agit de développer des techniques de restauration favorisant la stabilisation du substrat tout en réduisant les stress qui limitent le retour des organismes autochtones. Dans ce cadre, les actions peuvent être menées à plusieurs niveaux : améliorer les conditions édaphiques, augmenter et/ou introduire des propagules (*e.g.*, micro-organismes, végétaux) pour favoriser la régénération naturelle ou introduire directement des organismes déjà développés (*e.g.*, semis de pépinière). Par exemple, l'utilisation d'un amendement

organique naturel tel que de la tourbe fournit un substrat adéquat pour la végétalisation des espaces perturbés. Cette pratique permet notamment d'enrichir les rejets en nutriments et en propagules de différents organismes (Zak & Parkinson 1982, Danielson *et al.* 1983b, Danielson & Visser 1989).

Le processus de restauration sur les terrains perturbés issus de l'exploitation des sables bitumineux suit la séquence suivante : (i.) caractérisation des sols naturels préalablement à leur destruction pour déterminer l'amendement le plus cohérent, (ii.) préparation et épandage des matériaux d'amendements après perturbation (et stabilisation des rejets), (iii.) ensemencement avec des herbacés pour stabiliser le terrain et structurer le substrat, (iv.) plantation des semis de pépinière, (v.) entretien et suivi du terrain et (vi.) certification de la bonne réhabilitation du terrain (Fung & Macyk 2000). Les séquences iii et iv peuvent être englobées dans le terme plus général de végétalisation (Encadré 1.4).

Encadré 1.4 Définitions des termes végétalisation et reboisement.

Végétalisation : opération qui permet à des espèces introduites (ou naturellement présentes) dans le milieu naturel la reconquête rapide des terrains dénaturés par l'action de l'homme ou par des catastrophes naturelles (Dictionnaire environnement, www.dictionnaire-environnement.com (consulté : janvier 2005)). Une définition plus large est donnée par le Bureau des traductions du Canada (www.termiumplus.bureaudelatradsuction.gc.ca (consulté : janvier 2005)) : technique de couverture consistant à faire croître des végétaux sur une surface à protéger, à stabiliser ou à décorer. Selon le bureau des traductions, le terme « **reverdissement** » correspond à la traduction du terme anglais « **revegetation** » et se définit comme suit : installation d'une couverture végétale protectrice dont l'extension peut être naturelle ou artificielle.

Pour compléter cette définition, il est nécessaire de mettre en parallèle le terme « végétalisation » avec :

Reboisement (« *Reforestation* ») : Désigne le renouvellement d'un peuplement forestier par des moyens naturels ou artificiels (Dictionnaire environnement, www.dictionnaire-environnement.com (consulté : janvier 2005)). Ce terme est souvent employé ; pourtant il ne peut s'utiliser comme synonyme de végétalisation car aucun peuplement ne s'est jamais installé sur les sols reconstitués au moment de la transplantation des semis, il n'y a donc pas renouvellement mais création d'un peuplement. Un meilleur équivalent au terme « végétalisation » serait donc le **boisement** ou l'**afforestation** (« *aforestation* ») qui désigne la constitution d'un nouveau peuplement sur un terrain susceptible de n'avoir jamais été boisé (Bureau des traductions du Canada, www.termiumplus.bureaudelatradsuction.gc.ca (consulté : janvier 2005)).

Toutes ces définitions étant pour le moins semblables et par souci d'uniformité, seul le terme végétalisation sera utilisé dans la présente thèse.

1.4 Salinité et sodicité

De l'ensemble des sols cultivés du monde, 23 % sont affectés par des problèmes de salinité (Keren 2000). Les sols salins couvrent 397 millions d'hectares et les sols sodiques 434 millions d'hectares (FAO www.fao.org/ag/agl/agll/spush/ (consulté : juillet 2005)). Les plus vastes étendues de sols affectés par l'excès de sel se trouvent en Australie (25-30 %) et sur le territoire de l'ex-URSS (Levy 2000). On retrouve dans les plaines de l'ouest du Canada les sols les plus sodiques en Amérique du Nord (Levy 2000).

1.4.1 Genèse de conditions salines et/ou sodiques

La formation d'un sol salin (parfois dit « salé ») ou sodique résulte généralement de l'accumulation de sels dans les horizons de surface (Churchman *et al.* 1993, Naidu & Rengasamy 1993, Sumner 1993, Keren 2000, Levy 2000, Brady & Weil 2002, Essington 2004). Ce processus dépend essentiellement du régime hydrique du sol et des sources de sel. Lorsque le climat est chaud et sec, entraînés par les eaux capillaires suivant le flux d'évaporation, les sels sont accumulés en surface. Les sels les plus communs présents dans la solution du sol correspondent aux cations Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , et aux anions Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , NO_3^- . D'autres sels moins courants et plus toxiques à faibles concentrations sont également à considérer. Ces éléments traces sont le bore, le sélénium, l'arsenic et le molybdène (Keren 2000, Essington 2004). De façon analogue à la formation d'un sol salin, un sol devient sodique lorsque la proportion d'ions Na^+ dépasse celles des autres électrolytes de plusieurs ordres de grandeur (Sumner 1993, Levy 2000, Essington 2004). Cela dépend de la source de sels mais aussi des conditions physico-chimiques du sol.

Les eaux souterraines, déjà naturellement salines, montrent des concentrations en sels de plus en plus élevées en se rapprochant d'un gisement d'hydrocarbures (indicateur utilisé pour l'exploration) (Selley 1985). Parfois, comme dans le bassin de l'Athabasca en Alberta, des saumures (« brine » en anglais) se forment. Ce sont des eaux sursalées obtenues en principe par l'évaporation de l'eau de mer (Bureau des traductions du Canada, www.termiumplus.bureaudelatradduction.gc.ca (consulté : mars 2005)) et à base essentiellement de Na^+ et Cl^- (Alberta environment 2001). Au cours du procédé d'extraction, ces eaux récoltées avec les sables bitumineux se mélangent aux eaux sodiques utilisées pour la séparation des hydrocarbures et du sable. Les eaux de rejets renferment ainsi une grande variété de sels en excès, tel que rapporté par Renault *et al.* (1999) et Franklin *et al.* (2002a) qui ont mesuré des eaux de rejets

sableux avec des concentrations élevées de Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} et HCO_3^- . Ainsi, l'essentiel des électrolytes en solution dans la matrice sableuse sédimentée proviennent des eaux de rejets. Le sable est caractérisé par une faible capacité de rétention de l'eau (Brady & Weil 2002) et les eaux de rejets s'accumulent donc en principe dans le sous-sol du puits remblayé. Les sels vont se distribuer au travers de la matrice sableuse par diffusion et en fonction des mouvements d'eau. Durant les périodes de sécheresse estivale, cette eau et les électrolytes qu'elle contient vont remonter par capillarité. À ce point, il faut considérer que l'évaporation est d'autant plus forte que ces terrains dénudés subissent une forte exposition aux radiations solaires et au vent. L'eau s'évaporant, les sels vont s'accumuler en surface pour être à nouveau lessivés par la pluie. Avec l'hétérogénéité spatiale et temporelle impliquée dans cette circulation de l'eau entre le sol et l'atmosphère, il est très clair que les concentrations en sels de surface vont montrer une très grande variabilité (qualitativement et quantitativement), et ceci même si le substrat sableux est théoriquement homogène (*i.e.*, construit sur un gradient de particules déposées en groupes de tailles homogènes). Dans ces conditions, les sols reconstitués à partir de rejets sableux pourront être salins et/ou sodiques. Il faut bien noter que l'on peut retrouver au sein d'un même site des conditions salines, sodiques, salin-sodiques et qu'un classement des terrains se base sur des valeurs moyennes issues d'échantillons prélevés à la grandeur de chaque site.

1.4.2 Mesures de salinité et de sodicité

Tel que précisé ci-dessus, on peut distinguer deux grands groupes de sols affectés par l'excès de sels, les sols salins et les sols sodiques. Les premiers ont un excès de sels solubles de toutes sortes, excès suffisant pour affecter la production végétale sans affecter les propriétés physiques. Les seconds ont un niveau de saturation du complexe adsorbant par du Na^+ suffisant pour affecter la structure du sol et la production végétale (Churchman *et al.* 1993, Naidu & Rengasamy 1993, Sumner 1993, Keren 2000, Levy 2000, Brady & Weil 2002, Essington 2004).

La salinité d'un sol se mesure par la conductivité électrique (CE_e) (Encadré 1.5) d'un extrait de pâte saturée. Le « *US Salinity Laboratory Staff* » en 1954 a proposé le seuil de 4 dS m^{-1} pour définir un sol salin (Essington 2004). Dans les années 70, on reconnaissait que la distinction entre un sol non salin et un sol salin est intimement rattachée à la tolérance aux sels des plantes considérées. En effet, puisque la CE est un indicateur du stress osmotique subi par les cultures, le classement d'un sol comme salin dépend de la sensibilité aux sels des plantes qui poussent sur ce sol, *e.g.*, certaines sont sensibles à 2 dS m^{-1} et d'autres à 10 dS m^{-1} (voir partie 1.5.1.2) (Essington 2004).

Encadré 1.5 Conductivité électrique.

Le niveau de **salinité** d'un sol est avant tout caractérisé par la conductivité électrique (CE_e) d'un extrait de pâte saturée (Brady & Weil 2002, Essington 2004). Si l'extrait est dilué dans 2, 5 ou 10 volumes d'eau, la CE en sera d'autant réduite (Kalra & Maynard 1992). La mesure de la CE est réalisée à l'aide d'un conductimètre disposant d'une sonde constituée de deux cellules rectangulaires (ou électrodes) sur lesquelles est appliqué un potentiel électrique. La conductivité électrique (ou électrolytique) correspond au mouvement de particules chargées au travers d'un matériau sous l'action d'un champ électrique : la conductance est une propriété du matériau. La conductance du liquide créant le contact entre les deux cellules est directement proportionnelle à la quantité de sels en solution et définit la CE de la solution. La conductance est inversement proportionnelle à la résistance électrique (ohms) et la mesure brute est donnée en mhos. Suivant le système international, la mesure doit être présentée en $dS\ m^{-1}$ ($1\ mmhos\ cm^{-1} = 1\ dS\ m^{-1}$).

La sodicité d'un sol se décrit par le pourcentage de sodium échangeable ($ESP = (100 \times Na\ échangeable) / CEC$) sur le complexe d'échange cationique en rapport à l'effet dispersif du Na^+ sur les colloïdes structurant un sol (voir point 1.4.3.2). Même si la définition d'un sol sodique ne fait pas encore l'unanimité, un sol est généralement qualifié de sodique si son ESP est supérieur à 15 % tel que défini par le « *US Salinity Laboratory Staff* » en 1954 (Essington 2004). Pour simplifier la mesure de sodicité, le ratio d'absorption du sodium (SAR) a été défini ; le SAR est une propriété de la composition de la solution du sol caractérisant les concentrations en Na^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+} et dépend notamment de l'ESP (Encadré 1.6). Bien que la sodicité soit une propriété de la composition du complexe d'échange cationique, le SAR est préféré à l'ESP de par sa simplicité d'évaluation.

Encadré 1.6 Ratio d'absorption du sodium.

Le **ratio d'adsorption du sodium** (SAR_e) d'un extrait de pâte saturée s'obtient avec le rapport des ions Na^+ et des ions divalents en solution :

$$SAR = \frac{[Na^+]}{\sqrt{[(Ca^{2+} + Mg^{2+})/2]}} \quad (\text{les concentrations sont en } mmol\ L^{-1})$$

En utilisant conjointement les paramètres de salinité et de sodicité pour obtenir des classes basées sur la CE et le SAR, on peut distinguer plus spécifiquement les sols salins et sodiques (Table 1.1). Or, de nombreux travaux tentent de définir des valeurs seuils permettant de mieux classer ces deux types de sols. Ce classement est difficilement généralisable car les valeurs seuils sont influencées par les propriétés des sols ainsi que par l'objectif pour lequel est utilisé ce classement (*e.g.*, amélioration de la fertilité des sols, gestion de l'irrigation, contrôle du rendement). Dans cette thèse, des seuils ont été choisis afin de mettre en lien les résultats expérimentaux sur des substrats artificiels avec des conditions chimiques rencontrées sur le terrain.

Table 1.1 Seuils de sodicité (ESP, SAR_e) et de salinité (CE_e) utilisés pour un classement général des sols.

Classement	ESP* (%)	SAR _e *	CE _e (dS m ⁻¹)*	SAR _{1:5} *	CE _{1:5} ** (dS m ⁻¹)**
Salin	< 15	< 13	> 4	< 10	> 0.2
Salin-sodique	> 15	> 13	> 4	> 10	> 0.2
Sodique	> 15	> 13	< 4	> 10	< 0.2

* à partir des valeurs indiquées dans Essington (2004) ; ** en choisissant un facteur de conversion de 17 de la CE_{1:5} à la CE_e à partir des valeurs présentées dans Slavich & Petterson (1993) pour des sables, des sables limoneux ou des sables argileux.

Il est nécessaire de classer les sols pour distinguer les sols reconstruits salins, sodiques et salins-sodiques et ainsi mieux sélectionner les espèces ou variétés végétales à réintroduire. Bien que la sodicité ait été avant tout définie pour décrire une contrainte à la stabilité de la structure du sol, le SAR peut-être également utilisé comme indice pour prédire des performances des plantes sur un sol. Gardner (2004) propose le SAR comme une variable utile pour expliquer la réponse des plantes ; le SAR est à la fois un indice de perméabilité du sol et un indice du niveau de stress osmotique et ionique perçus par une plante (voir partie 1.5). Ainsi, le SAR et la CE sont utilisés comme critères de qualité des sols reconstruits (avec un seuil de 4 dS m⁻¹ pour la CE_e et de 12 pour le SAR_e) et comme indices de risque intégrés dans les programmes de végétalisation (Table 1.2) recommandés par l'« *Alberta Environment* » (2001).

Table 1.2 Échelle modifiée d'après « *Alberta Environment* » (2001) caractérisant le niveau de stress salin et sodique pour la végétalisation d'un terrain en considérant la conductivité électrique (CE_e) et le ratio d'absorption du sodium (SAR_e).

	Faible	Moyen	Fort	Extrême
CE _e (dS m ⁻¹)	< 2	2 à 4	4 à 8	> 8
SAR _e	< 4	4 à 8	8 à 12	> 12

Réaliser un extrait de pâte saturée est une pratique contraignante. Il s'agit d'obtenir une mesure des sels de la solution du sol à un point de référence correspondant au niveau de saturation du sol (2-3 fois la capacité au champ) et qui dépend de la texture du sol (Slavich & Petterson 1993). Pour réduire les contraintes à la prise de mesures, l'extrait de sol peut être dilué, le plus souvent, au 1:5 (sol:eau, m:v). Il est important de noter que la mesure sur un extrait dilué au 1:5 n'a pas de relation directe avec les

conditions d'humidité du terrain, à l'inverse d'une mesure à partir d'un extrait de pâte saturée (Vorhees & Uresk 2004). Néanmoins, la mesure sur un extrait dilué au 1:5 est commode, efficace et facilement reproductible sans tenir compte de la texture des échantillons. Dans la présente thèse, différents types de substrat sont évalués et, par souci d'uniformité, les mesures de SAR et CE ont été majoritairement effectuées sur un extrait dilué à 1:5 - les correspondances des seuils avec les mesures à partir d'extrait de pâte saturée sont indiquées dans la Table 1.1 -.

1.4.3 Altérations physico-chimiques des sols affectés par un excès de sel

L'excès de sel dans un sol modifie les propriétés physico-chimiques. Cette altération des conditions édaphiques constitue un stress indirect pour la croissance des plantes (*e.g.*, dispersion des colloïdes, déséquilibre nutritionnel). Cet aspect est abordé pour mettre en évidence les conséquences multiples de l'excès de sel dans les rejets sableux.

1.4.3.1 Alcalinité

Lorsque les précipitations sont trop faibles pour lessiver l'excès d'éléments minéraux hydrolysés, la concentration en électrolytes et le pH du sol augmente. Un sol devient alcalin lorsque son pH dépasse 7 (Brady & Weil 2002). Les électrolytes de la solution du sol et du complexe adsorbant sont essentiellement Ca^{2+} , Mg^{2+} (alcalino-terreux bivalents), K^{+} , Na^{+} (alcalino-terreux monovalents) (Keren 2000). Ils sont appelés cations "non acides" ou "non hydrolysables" car ils ne libèrent pas de protons en réagissant avec l'eau. Ils ne libèrent pas non plus d'ions hydroxyles et sont donc neutres (Brady & Weil 2002). Ce sont principalement les anions, et surtout les carbonates et les bicarbonates, qui se comportent en bases. Ils génèrent des ions hydroxyles et provoquent l'augmentation du pH (Brady & Weil 2002).

L'origine et du type de sel en excès sont des déterminants de l'évolution du pH d'un substrat salin. Dans le cas des rejets sableux, les eaux de rejets à base de saumure montrent de fortes concentrations en SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^{-} et de ce fait vont potentiellement provoquer des niveaux d'alcalinité élevés (Renault *et al.* 1999, « *Alberta environment* » 2001). Franklin *et al.* (2002a) ont relevé un pH de 9 dans des eaux de rejets sableux.

1.4.3.2 Altération physique

Dans les sols salins, les transformations chimiques peuvent avoir des répercussions notables au niveau des propriétés physiques. L'accumulation de sels dans le sol déplace l'équilibre chimique entre la fraction solide et la fraction liquide du sol (Sumner 1993, Brady & Weil 2002, Essington 2004). Les propriétés chimiques sont donc bouleversées qualitativement et quantitativement. Les cations Ca^{2+} ou Na^+ montrent le pouvoir floculant ou dispersant le plus important ; Mg^{2+} et K^+ se situent entre les deux, K^+ étant plus dispersant que Mg^{2+} (Sumner 1993). Dans un sol naturel, le niveau de Na^+ échangeable suffisant pour rencontrer des problèmes de sodicité dépend de plusieurs facteurs dont la texture et la minéralogie du sol, notamment la quantité et le type d'argile ainsi que la teneur en matière organique et la présence d'autres électrolytes dans la solution du sol (Churchman *et al.* 1993, Naidu & Rengasamy 1993, Sumner 1993, Levy 2000, Brady & Weil 2002, Essington 2004). L'interaction entre les constituants de la fraction argileuse et la composition de la solution du sol remplissant les pores est essentielle pour expliquer le comportement des sols. Par exemple, en conditions sodiques, l'argile subit deux transformations physiques distinctes, une dispersion et un gonflement (Churchman *et al.* 1993, Sumner 1993, Levy 2000, Brady & Weil 2002, Essington 2004). Ces processus dépendent de l'ESP et de la concentration totale en électrolytes (CTE) dans la solution du sol. Dans un système où Na^+ et Ca^{2+} sont mélangés, le Na^+ n'est pas distribué de façon aléatoire. Les ions Ca neutralisent les charges internes des quasi-cristaux argileux alors que les surfaces externes sont substantiellement enrichies de Na^+ . Ce phénomène a été nommé le « *demixing* » des cations ; d'une autre façon on dit que le Ca^{2+} reste regroupé en domaines dans les tactoïdes. En augmentant l'ESP pour se rapprocher d'un système sodique, ces domaines sont progressivement détruits par la pénétration du Na^+ à l'intérieur des colloïdes argileux (Figure 1.7). Les argiles sont ainsi susceptibles à la dispersion et au gonflement (Encadré 1.7) (Sumner 1993, Levy 2000, Brady & Weil 2002, Essington 2004).

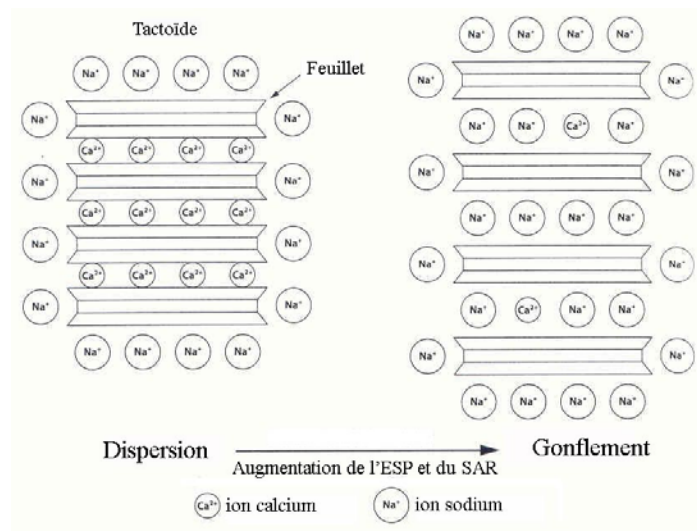


Figure 1.7 Dispersion (domaine de Ca^{2+}) et gonflement des argiles (pénétration du Na^+) (Essington 2004).

Dans le cas des rejets sableux, la fraction argileuse se retrouve dans les rejets composés des particules les plus fines. Du fait notamment de l'ajout de NaOH, ces rejets se stabilisent difficilement puisque les argiles sont extrêmement dispersées. Grâce au pouvoir flocculant du Ca^{2+} , l'addition de gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) accélère le processus de stabilisation de cette fraction des rejets sableux et augmente leur compaction (pour réduire le volume des rejets). Ce processus génère un type de rejets sableux appelé rejets composites ou consolidés (RC) (« *composite tailings* »). Ces rejets montrent des niveaux de salinité et d'alcalinité plus élevés que les autres rejets sableux (Renault *et al.* 1999, Li & Fung 1998, Franklin *et al.* 2002a) et leur végétalisation est encore au stade expérimental.

Les rejets sableux sont réhabilités par un amendement organique principalement à base de tourbe. Outre les argiles, les oxydes de fer et d'aluminium, les matériaux amorphes tels que la matière organique sont des constituants colloïdaux dotés d'une grande surface d'adsorption et d'un potentiel d'échange important (Churchman *et al.* 1993, Brady & Weil 2002). Ces caractéristiques leur confèrent un pouvoir stabilisateur sur le sol car il développe la cohésion entre les particules. Malgré tout, la fraction la plus soluble de la matière organique est rapidement affectée par l'excès de Na^+ et se disperse sous forme de colloïdes organiques hydrophobes. La matière organique est un matériel hautement hétérogène et donc difficile à modéliser ; son effet peut être positif comme négatif. Dans un système sodique, lorsque le SAR est faible, la matière organique stabilise le sol mais, lorsque le SAR est élevé, elle se disperse avec les argiles et favorise la perte de cohésion du sol (Churchman *et al.* 1993, Brady & Weil 2002).

Encadré 1.7 Dispersion et gonflement des argiles.

La **dispersion** intervient en premier puisque ce processus concerne seulement la périphérie des quasi-cristaux argileux. Le Na^+ saturent le complexe adsorbant et monovalents. Ces ions en excès constituent ainsi un ensemble ionique hydraté entourant les colloïdes et épaississant la double couche diffuse. Cet ensemble lâche et "épais" éloigne ainsi suffisamment les colloïdes pour limiter leurs forces de cohésion. Dans ce cas, les forces de van der Waals provoquant l'attraction des colloïdes déclinent au profit des mouvements browniens lorsque les colloïdes sont en suspension. Ces derniers sont alors soumis à un bombardement intense par les molécules d'eau, entretenant ainsi un mouvement constant.

La dominance par des forces d'attraction ou de répulsion détermine si le système est floculé ou dispersé. L'avantage pour les forces de répulsion ou d'attraction est déterminé par la CTE de la solution du sol. Le point seuil se caractérise par la concentration critique de floculation (CCF) et plus la valence des électrolytes est élevée plus cette concentration limite est basse. Le CCF varie également en fonction du type d'argile impliqué.

Lorsque deux colloïdes argileux s'approchent l'un de l'autre, les doubles couches diffuses se chevauchent et une répulsion électrique est générée entre les deux nuages ioniques chargés positivement. Cette force de répulsion est aussi appelée pression de **gonflement** (« *swelling pressure* »). Plus la double couche diffuse est comprimée vers la surface du colloïde, plus la pression de gonflement est faible. Par exemple, le Ca^{2+} permet l'association des feuillets d'argiles en tactoïdes. À l'inverse, en milieu sodique, l'excès de Na^+ dissocie ces associations en pénétrant les couches internes des quasi-cristaux argileux pour y remplacer notamment le calcium. Cette désolidarisation facilite l'intégration de l'eau provoquant un gonflement général à l'échelle de la microstructure argileuse. Lorsque l'ESP est supérieure à 15, le gonflement réduit le rayon des pores et la conductivité hydraulique du sol est alors limitée. Le gonflement est un processus réversible tandis que la dispersion ne l'est pas (déstructuration).

1.5 La réponse physiologique du stress salin/sodique

1.5.1 Généralités

1.5.1.1 Notion de stress chez les organismes vivants

Levitt (1980) décrit la physiologie du stress en l'abordant dans son aspect physique. **Le stress est une contrainte** qui peut se résumer à une (ou plusieurs) force(s) de déformation appliquée(s) à un corps (Encadré 1.8). Cette contrainte modifie les dimensions et la forme du corps exposé traduisant sa **tension** intérieure. À la différence d'un stress physique, un stress biologique n'est pas une force à proprement parler et est associé dans le langage commun à une agression possiblement irréversible et donc une déformation plastique du corps exposé.

Encadré 1.8 Déformations élastique et plastique.

Selon la physique classique, il existe la déformation élastique impliquant une modification réversible et linéaire (proportionnelle à l'agent stressant), et la déformation plastique provoquant une modification irréversible. Jusqu'à un certain point, dépendant du corps en question, toute action d'un stress sera réversible et élastique. Au-delà, la tension provoquée par le stress provoquera des changements irréversibles et plastiques.

Par analogie à la physiologie des plantes, une contrainte environnementale va provoquer une tension interne (« *strain* ») dans l'organisme exposé. Le stress perçu par une plante, autrement dit le niveau de tension interne, dépend de la résistance de l'organisme à un type de stress appliqué avec une certaine intensité. En plus du type de stress et de son intensité, il faut également considérer la durée d'exposition. En effet, si l'intensité d'un stress est trop faible pour provoquer des dommages irréversibles à court terme, à long terme, ce stress peut provoquer des changements plastiques, voire la mort de l'organisme (Levitt 1980, Lichenthaler 1996).

1.5.1.2 Halophytes et glycophytes

Le terme halophyte (du grec « *halo* » : sel et « *phyt(o)* » : plante) définit un organisme qui vit, croît et se reproduit naturellement dans un milieu salin alors qu'un glycophyte (du grec « *glyco* » : sucré) ne peut croître en milieu salin. La grande majorité des stress salins est provoquée par des sels de Na, particulièrement le NaCl. De ce fait, les termes halophytes et glycophytes font essentiellement référence aux stress provoqués par un excès de Na⁺ (plus exactement, on devrait parler de plantes natrophyles ou natrophobes). Une plante halophyle obligatoire ne peut pas se développer sans un excès de sel alors qu'une plante halophyle facultative se développera normalement dans des conditions non

stressantes. À l'inverse, une plante glycophyle obligatoire ne se développera jamais en présence d'un excès de sels (Levitt 1980). Les plantes peuvent être regroupées dans des classes de tolérance tel que décrit dans Brady & Weil (2002) : dans chaque classe, désignée par un niveau de tolérance (sensibles à tolérantes) et de salinité (CE de 2 à 12 dS m⁻¹) sont regroupées les espèces dont la croissance est réduite de moins de 10%. Sur cette échelle, les pins (*Pinus* spp.) sont sensibles (2 dS m⁻¹) alors que les peupliers sont modérément tolérants (8 dS m⁻¹).

Il est reconnu que la tolérance à la salinité de certaines enzymes essentielles (*e.g.*, malate déshydrogénase) est similaire chez les glycophytes et halophytes (Flowers *et al.* 1977, Munns 1993). Ainsi, il a été démontré que les plantes supérieures, incluant glyco- et halophytes, n'ont pas un métabolisme tolérant aux excès de sel même si certains organismes montrent une bonne croissance dans de l'eau de mer¹ (Flowers 1972, Greenway & Osmond 1972). L'avantage essentiel des halophytes sur les glycophytes réside dans la gestion des ions en excès dans l'organisme.

1.5.1.3 Principe général d'adaptation et de résistance

À la différence d'un corps inanimé sous la contrainte d'une force, un organisme vivant est capable de s'adapter. En effet, par ce processus les blessures peuvent se résorber et la résistance au stress se modifier (Arnholdt-Schmitt 2004). On distingue deux types d'adaptation (Levitt 1980) :

l'adaptation élastique (ou capacité d'adaptation) concerne un organisme adapté qui peut vivre, croître et réaliser son cycle de vie en présence du stress.

l'adaptation plastique (ou résistance à l'adaptation) inhibe la croissance et ainsi tous dommages irréversibles éventuels jusqu'à la disparition partielle ou complète de l'agent stressant.

Si l'adaptation est élastique, elle engendre des stratégies de résistance particulières. Il existe deux stratégies de résistance (Levitt 1980) :

la résistance par exclusion (« *stress avoidance* » en anglais) souvent réduit au terme de résistance.

L'organisme inhibe ou réduit la pénétration du stress (*e.g.*, substance toxique) dans ses tissus.

L'organisme augmente ainsi le niveau de stress nécessaire pour un même niveau de tension interne,

la résistance par tolérance/inclusion (« *stress tolerance* » en anglais) souvent réduit au terme de tolérance. L'organisme absorbe l'agent stressant pour rétablir l'équilibre thermodynamique avec son environnement sans subir de blessure irréversible tout en poursuivant sa croissance. L'organisme réduit ainsi la tension interne pour un même niveau de stress.

¹ L'eau de mer est une référence en terme de salinité avec une CE moyenne de 46 dS m⁻¹ à 20°C et des concentrations de 500 mM de Na⁺ et Cl⁻ (ions dominant) (Orcutt & Nilsen 2000).

Récemment, Berthomieu *et al.* (2003) ont montré chez *Arabidopsis thaliana* une troisième stratégie à l'intermédiaire entre l'exclusion et l'inclusion : la **recirculation**. Le Na^+ est absorbé et parvient jusqu'aux parties aériennes, mais il est aussitôt "re-pompé" et reconduit par les vaisseaux du phloème vers les racines, qui peuvent excréter les ions à l'extérieur.

La résistance par exclusion semble être une évolution par rapport à la résistance par tolérance puisque ne pas réaliser l'équilibre thermodynamique (en réduisant la tension interne) pour préserver les fonctions métaboliques à leur optimum favorise une meilleure croissance (Levitt 1980).

Pour s'adapter au stress salin, la plante peut éviter les dommages par la réduction de la croissance ou encore par la détoxification des espèces oxygénées radicalaires (EOR). La plante peut ensuite rétablir l'équilibre homéostatique dans le nouvel environnement stressant ; l'homéostasie se définit comme la capacité d'autorégulation d'un organisme pour maintenir un état d'équilibre dynamique constant entre les conditions extérieures et les différentes composantes de son milieu interne (Niu *et al.* 1995). Suite à cette adaptation, la croissance peut reprendre et est possiblement réduite relativement aux conditions antérieures moins stressantes (Yeo 1983, Zhu 2001).

1.5.2 Adaptation des plantes à l'excès de sel

1.5.2.1 Réponse de croissance

Il a été démontré que les réponses physiologiques à divers stress tels que la sécheresse ou l'excès d'eau, la salinité (et autres osmolytes), la compaction du sol et l'hypoxie racinaire ont des caractéristiques similaires. Ils provoquent tous une augmentation de la concentration en acide abscissique (ABA) dans la partie aérienne ou une réduction des concentrations en cytokinine. Ceci résulte en une croissance et une transpiration réduites (Itai 1999). L'effet le plus commun des stress abiotiques sur la physiologie des plantes est ainsi la réduction de la croissance (Zhu 2001) (Encadré 1.9). La réduction de la croissance est une capacité adaptative nécessaire à la survie d'une plante exposée à un stress abiotique (Zhu 2001). En effet, ce retard de développement permet à la plante d'accumuler de l'énergie et des ressources pour combattre le stress avant que le déséquilibre entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme n'augmente jusqu'à un seuil où les dommages sont irréversibles. Pour illustrer cette tendance, dans la nature, la croissance est inversement corrélée à la résistance au stress salin d'une espèce/variété (Zhu 2001). L'essentiel de la recherche portant sur les stress - en l'occurrence, ceux provoqués par la salinité - tend à comprendre l'origine, les processus et les raisons de cette limitation.

Encadré 1.9 Définition de la croissance.

Tel que proposé par Ting (1982), la croissance peut être définie comme un accroissement irréversible de la taille ou du volume accompagné de la biosynthèse de nouveaux composés protoplasmiques. De ce point de vue, la croissance est uniquement quantitative et se mesure par l'accroissement de la taille, de la masse, du nombre de cellules. Si l'on parle plus globalement de développement, la croissance est également qualitative en considérant le processus de différenciation cellulaire qui suit une étape ontogénique par exemple.

En plus du contrôle de la croissance par les signaux hormonaux, la réduction de croissance résulte de la dépense de ressources dans les stratégies d'adaptation. Dans le cas d'un stress salin ou hydrique, la disponibilité de l'eau du sol est réduite. Or une plante pour survivre et croître doit faciliter le flux d'eau conduit par la transpiration contre les forces osmotiques, matricielles et gravitationnelles du sol. Ainsi, pour s'adapter au manque d'eau et maintenir l'hydratation et la turgescence de ses tissus, la plante va par exemple faciliter l'entrée d'eau au niveau des racines. L'absorption d'eau peut être facilitée notamment en augmentant la conductivité hydraulique (composition membranaire) ou en effectuant un ajustement osmotique (contrôle des concentrations en solutés). Ces stratégies mises en œuvre pour maintenir l'homéostasie en condition de stress hydrique ou ionique sont consommatrices d'énergie et de ressources qu'elles détournent au dépend de la croissance.

Pour décrire la réponse de croissance d'une plante exposée à un stress salin Munns & Termaat (1986) et Munns (1993 et 2005) ont défini un modèle bi-phasique :

Phase 1 – Dominance du stress osmotique : la concentration en sel augmente, et donc le potentiel osmotique de la solution du sol diminue. Dans cette phase, le stress physiologique est causé par l'excès d'ions à l'extérieur de la plante et est similaire à un stress hydrique. Un stress osmotique est provoqué dans un milieu où le potentiel hydrique de l'eau est, au moins, réduit de 0,5 à 1,0 bar suite à l'accumulation de sels (Levitt 1980). Lorsqu'il survient, ce stress hyperosmotique entraîne immédiatement une réduction de la pression de turgescence et de façon subséquente de la croissance. Néanmoins, l'essentiel de l'inhibition de la croissance sur l'ensemble de la période d'exposition est régulée par des signaux hormonaux en provenance des racines exposées (Munns & Termaat 1986, Munns 1993, 2002, 2005, Hasegawa *et al.* 2000, Mulholland *et al.* 2003).

Phase 2 – Dominance du stress ionique : pour résorber la sécheresse physiologique et réaliser un ajustement osmotique, la plante accumule éventuellement les osmolytes en excès (*i.e.*, Na⁺ pour un stress sodique) dans ses tissus. L'effet du stress est alors essentiellement dû aux ions à l'intérieur des tissus lorsqu'ils atteignent des concentrations toxiques pour le métabolisme. La croissance est d'autant plus réduite que la plante est sensible à l'effet spécifique de l'ion en excès dans ses tissus (Levitt 1980).

De ce modèle synthétique, de nombreuses stratégies de réponse peuvent être adoptées selon la capacité de résistance de la plante à ces deux stress (*i.e.*, osmotique et ionique). Il s'agit également de considérer que selon la réponse de la plante à la sécheresse physiologique définissant la 1^{ère} phase on observera ou non une réponse typique de la 2^{ème} phase. Par exemple, une plante qui exclue les sels en excès de ses tissus devrait en principe montrer essentiellement une réponse à la sécheresse. Une plante favorisant l'absorption des sels dans ses tissus montrera également une réponse au stress ionique (Munns & Termaat 1986). Il est important de noter à ce point qu'un stress salin, osmotique et ionique, fait référence à un excès et n'inclut pas les stress indirectement causés par les carences minérales (Levitt 1980).

1.5.2.2 Stratégies d'adaptation

1.5.2.2.1 Ajustement osmotique et compartimentation

On retrouve des stratégies d'adaptation communes au stress salin et au stress hydrique. D'une part, il existe des stratégies qui font appel à des modifications plutôt d'ordre physique : réduction de l'hydratation cellulaire, réduction du volume cellulaire, modification du module (« *modulus* ») d'élasticité des parois cellulaires et augmentation de la conductivité hydraulique. D'autre part, il existe des stratégies plutôt d'ordre chimique et en particulier l'ajustement osmotique (Yeo 1983). Cet ajustement se retrouve chez la grande majorité des organismes vivants pour le maintien de l'alimentation hydrique et de la pression de turgescence (Yeo 1983, Niu *et al.* 1995, Bohnert & Shen 1999). Ce processus se fait en modifiant les concentrations de solutés compatibles (Encadré 1.10) dans les tissus de façon à maintenir une concentration ionique plus élevée (hypertonique) dans le protoplasme que dans le milieu extérieur (hypotonique) (Niu *et al.* 1995, Bohnert & Shen 1999, Hasegawa *et al.* 2000).

Encadré 1.10 Solutés compatibles : définition et fonctions.

Osmolytes et osmotica sont des solutés influençant le potentiel osmotique d'une solution, ils sont qualifiés de compatibles lorsqu'ils n'interfèrent pas avec le métabolisme d'un organisme (Brown & Simpson 1972). La sécheresse, une forte osmolarité ou le gel sont des conditions provoquant la réduction de l'hydratation cellulaire chez nombre d'organismes (des bactéries jusqu'aux plantes). Cette stratégie favorise la protection des structures et du métabolisme (Takagi *et al.* 1997). Pendant l'assèchement de l'environnement intracellulaire, des solutés compatibles vont s'accumuler pour protéger les structures cellulaires (Takagi *et al.* 1997). Ainsi, en présence d'un milieu à forte osmolarité, l'absorption/la production et l'accumulation de ces composés seront favorisées. Ces éléments ont une fonction osmoprotectrice et/ou osmorégulatrice, on retrouve parmi eux des éléments minéraux (*e.g.*, K^+), des dérivés quaternaires d'acides aminées (*e.g.*, glutamate, proline, glycine bêtaïne, β -alanine bêtaïne et proline bêtaïne), des composés de sulfonium (*e.g.*, choline O-sulfate, propionate de diméthyle sulfonium), des sucres alcool ou polyols (*e.g.*, glycérol et inositol), des sucres simples (*e.g.*, tréhalose, fructose, glucose et saccharose) et des sucres complexes (*e.g.*, trehalose, raffinose et fructans) (Levitt 1980, Orcutt & Nilsen 2000, Niu *et al.* 1997, Bohnert & Shen 1999).

Le contrôle de l'ajustement osmotique a plusieurs origines : l'augmentation des ressources allouées à la production de solutés compatibles, la réduction du catabolisme de ces osmolytes et/ou la réduction de leur diffusion (*e.g.*, par la composition membranaire) dans le milieu extérieur. En outre, selon la variété/composition des osmolytes accumulés, la dépense d'énergie pour ce processus diffère (Niu *et al.* 1997). Ce contrôle résulte en des capacités d'ajustement variées, et pour une protection des structures cellulaires plus ou moins élevée. Les osmolytes peuvent être d'origine organique (interne), ou inorganique (externe) (Niu *et al.* 1995, Niu *et al.* 1997) (Encadré 1.10). On suppose que l'accumulation des premiers représente un coût plus élevé en énergie et en ressources minérales, alors que les seconds, à l'origine du stress (*e.g.*, Na^+ et Cl^-), sont en excès et donc moins coûteux à accumuler (Niu *et al.* 1997). Néanmoins, Yeo (1983) souligne que cette affirmation n'est pas aussi évidente et qu'on ne peut avoir de certitude. Dans le cas du stress sodique - qui est le plus étudié - l'absorption et l'accumulation de Na^+ , dans le but de rétablir l'équilibre osmotique, doivent être contrôlées pour que la tolérance soit possible et ainsi éviter les dommages dus au stress hyperionique (Encadré 1.11).

Encadré 1.11 Indices de résistance.

Chez les plantes à croissance lente telles que les conifères, plus que le taux de croissance, l'accumulation de Na^+ dans la partie aérienne est un bon indicateur de résistance (Munns 1993). Les végétaux les plus résistants accumulent moins de sels dans leurs tissus et notamment limite l'accumulation dans leur partie aérienne (Orcutt & Nilsen 2000, Renault *et al.* 2001). Un autre indice de tolérance est fourni par le rapport d'accumulation dans les tissus (surtout aériens) du K^+ et Ca^{2+} par rapport au Na^+ (Tyerman & Skerrett 1999)

Un organisme peut difficilement exclure totalement le Na^+ de ses tissus. Chez les plantes, une des stratégies de tolérance à la salinité des plus communes est la compartimentation des ions (*e.g.*, Na^+ , Cl^-) en excès dans les tissus. Cette redistribution contrôlée se fait essentiellement dans les vacuoles (Niu *et al.* 1995, Yeo 1998, Horie & Schroeder 2004) et éventuellement, à l'échelle de la plante entière, dans les organes les plus vieux ou les moins sensibles (Cheeseman 1988, Munns 1993). Pour être contrôlé, le déplacement des ions au travers des membranes implique un transport actif, consommateur d'énergie, qui utilise différents transporteurs (en densité variable) à la surface des membranes cellulaires (Niu *et al.* 1995, Orcutt & Nilsen 2000, Tyerman & Skerrett 1999). Une fois vacuolisé, le Na^+ en excès contribue à l'ajustement osmotique sans altérer les processus métaboliques. Les solutés compatibles accumulés dans le cytoplasme contrebalancent la pression pour contenir le Na^+ dans les vacuoles (Levitt 1980, Yeo 1983, Orcutt & Nilsen 2000, Yeo 1998, Tyerman & Skerrett 1999, Hasegawa *et al.* 2000).

1.5.2.2.2 Contrôle membranaire

Bien que cette thématique soit peu développée dans les travaux présentés ci-après, l'adaptation au stress salin et/ou sodique se met en place également au niveau des membranes cellulaires (*i.e.*, membrane plasmique, tonoplaste). La modification qualitative et quantitative des aquaporines (protéines trans-membranaires) est par exemple un processus capable de modifier la conductivité hydraulique de la plante et de favoriser ou restreindre les mouvements d'eau (Yeo 1998, Chrispeels & Maurel 2001). Les membranes voient également leur composition lipidique modifiée en réponse à un stress de salinité (Mansour & Salama 2004). En terme de transport ionique, la stratégie de résistance à la salinité/sodicité est qualitative et quantitative. La sélectivité des ions à l'entrée constitue la composante qualitative. Elle se définit à partir des différents transporteurs membranaires présents (*e.g.*, antiport Na^+/H^+) (Tyerman & Skerrett 1999). Dans la diffusion facilitée comme dans le transport actif, les protéines membranaires peuvent être très spécifiques de certains solutés. Néanmoins, plusieurs solutés peuvent entrer en compétition pour une même protéine de transport (*e.g.*, Na^+ et K^+). D'un point de vue quantitatif, la perméabilité membranaire au Na^+ ainsi que l'activité / la quantité / la

sensibilité des antiports Na^+/H^+ membranaires évoluent pour s'adapter à un stress sodique à long terme (Niu *et al.* 1995, Tyerman & Skerrett 1999).

Lorsque l'énergie et la matière disponibles pour la croissance sont entièrement détournées pour l'adaptation et la protection, l'organisme ne dispose plus de ressources pour contenir l'excès de Na^+ loin des activités métaboliques sensibles. Si la capacité osmorégulatrice et osmoprotectrice des solutés compatibles en présence est excédé par les concentrations en Na^+ (et Cl^-) dans le cytoplasme, il s'ensuit un dépérissement progressif de l'organisme exposé aux effets spécifiques des ions en excès (Martin & Koebner 1995, Franklin & Zwiazek 2004).

1.5.3 Autres processus physiologiques remarquables en réponse à l'excès de sel

1.5.3.1 Fonctionnement cellulaire

Le fonctionnement cellulaire est modifié pour servir la stratégie d'adaptation de la plante, à l'échelle de la cellule comme de la plante entière. Le niveau de salinité est perçu au niveau des membranes en contact avec la solution saline (Xiong *et al.* 2002) et dans tout l'organisme par la perte de turgescence. Des signaux de transduction sont alors émis. L'ensemble de ces signaux contrôle le rétablissement de l'homéostasie ionique et hydrique des cellules, la réparation et la prévention des dommages et la croissance cellulaire (Zhu 2002). Par exemple, en réponse à la réduction du potentiel osmotique externe, des signaux à base de Ca vont activer des protéines kinases dont dépend la suite de la réponse en aval (Xiong *et al.* 2002, Zhu 2002). Cette information va éventuellement se transmettre via l'émission d'hormones de stress (signal de longue distance) tel que l'ABA (Hetherington & Quatrano 1991, Hartung & Jeschke 1999, Itai 1999, Xiong *et al.* 2002). Mentionnons que l'ABA est largement impliqué dans les relations hydriques et la tolérance au stress des végétaux. Cette hormone contrôle la fermeture stomatique, stimule l'absorption d'eau au niveau des racines et modifie la croissance (*e.g.*, diminue le ratio cime/racine, stimule la formation de racines latérales et de poils absorbants) (Hartung & Jeschke 1999).

Lors d'un stress salin, le dysfonctionnement cellulaire est essentiellement dû à la toxicité ionique croissante. Celle-ci est générée à la fois par l'augmentation des concentrations des solutés non compatibles dans le cytoplasme à cause de la perte d'eau et de l'absorption des ions en excès du milieu extérieur. Tout comme pour le Na^+ , une concentration cytosolique élevée de Cl^- n'est pas compatible avec les processus métaboliques (*e.g.*, forte dépolarisation des structures cellulaires) (Tyerman & Skerrett 1999, Franklin *et al.* 2002b, Franklin & Zwiazek 2004, Mansour & Salama 2004). L'effet

spécifique de ces ions affecte l'intégrité membranaire, l'activité enzymatique, le fonctionnement nucléaire, l'absorption de nutriments ainsi que le fonctionnement de l'appareil photosynthétique (Papageorgiou & Murata 1995, Zhu 2001, Mansour & Salama 2004). Proportionnellement au stress, des EOR sont produites comme signal cellulaire (Hasegawa *et al.* 2000, Vranová *et al.* 2002, Xiong *et al.* 2002) et interagissent avec les signaux hormonaux (van Breugesem *et al.* 2001, Vránova *et al.* 2002). Néanmoins, l'accumulation excessive de EOR provoque des dommages dans la cellule (van Breugesem *et al.* 2001, Vranová *et al.* 2002). Ainsi, certains solutés compatibles (Encadré 1.10) vont être utilisés pour réduire la toxicité de cet excès éventuel (Hasegawa *et al.* 2000, Zhu 2001, Xiong *et al.* 2002).

1.5.3.2 Acquisition d'énergie et de carbone

De façon générale, la salinité tout comme la sécheresse ont pour conséquence de réduire la photosynthèse nette par la réduction des échanges gazeux mais aussi de l'activité photochimique (Eastman & Camm 1995, Orcutt & Nilsen 2000, Godde 1999, Ortega *et al.* 2004). Notons que selon l'argumentation de Munns (1993) la croissance est affectée avant la photosynthèse. En effet, des études sur l'effet d'un stress salin à long terme ont montré que la croissance diminue plus que la photosynthèse. De ce fait, la salinité affecte l'assimilation de C par une surface foliaire réduite plus que par un rendement photosynthétique réduit. La réduction de la photosynthèse est issue en grande partie de la fermeture des stomates et éventuellement la réduction de conductance du mesophylle (parenchyme chlorophyllien) (Orcutt & Nilsen 2000) provoquées par la perte de turgescence et les signaux racinaires (*e.g.*, ABA). En parallèle, si l'utilisation des sucres est réduite pour permettre l'accumulation de réserves et de solutés compatibles, la photosynthèse nette est diminuée du fait d'une demande (puits) en photosynthétats réduite (Munns 1993). C'est pourquoi, la réduction de la photosynthèse peut-être provoquée de façon indirecte par la stratégie de résistance au stress osmotique de l'organisme. En plus des conséquences du stress hydrique initial, si les ions Na^+ s'accumulent à des niveaux toxiques dans la partie aérienne, la photochimie peut-être affectée ainsi que l'activité enzymatique se rapportant à l'ensemble du processus photosynthétique (Papageorgiou & Murata 1995, Orcutt & Nilsen 2000).

1.5.3.3 Acquisition de ressources minérales

De façon indirecte, l'excès de Na^+ provoque également un déséquilibre dans les proportions de concentrations des différents éléments minéraux indispensables à la croissance des plantes (Orcutt &

Nilsen 2000). Par exemple, au niveau de certains transporteurs membranaires peu sélectifs, il y a compétition et l'excès de Na^+ réduit la disponibilité du K^+ (Niu *et al.* 1995, Orcutt & Nilsen 2000, Yeo 1998). En plus, un excès de NaCl augmente la perméabilité membranaire, ce qui augmente la diffusion des électrolytes dans le milieu extérieur et réduit la sélectivité membranaire (Orcutt & Nilsen 2000, Redfield & Zwiazek 2002, Franklin & Zwiazek 2004, Mansour & Salama 2004). Dans les cas extrêmes, l'excès de Na^+ provoque des lésions membranaires, en particulier par le remplacement excessif des ions divalents Ca^{2+} (Cramer *et al.* 1985).

1.6 La physiologie de la symbiose ectomycorhizienne

1.6.1 Description de la symbiose mycorhizienne

Tel que décrit dans la 1^{ère} partie de ce chapitre, la mycorhize (« racine champignon ») est l'organe concrétisant l'association entre un champignon (mycobiote) tellurique et les racines d'une plante hôte. En principe, ce partenariat se définit comme une symbiose mutualiste où les deux partenaires tirent un bénéfice pour leur propre croissance et survie (Encadré 1.12). Dans tout type d'association mycorhizienne, trois composantes sont essentielles : la racine et deux systèmes mycéliens associés, l'un occupant la racine et l'autre le sol. D'après Brundrett (2002), 82 % des plantes connues sont mycorhiziennes et quatre types d'associations sont distingués dans la biocénose. Pour plus de détail, Smith & Read (1997) dénombrent sept grands types d'associations mycorhiziennes. Deux sont très répandues, les mycorhizes arbusculaires et les ectomycorhizes. Dans une moindre mesure, on trouve des ectendomycorhizes et d'autres associations qui se forment spécifiquement chez certaines familles de plantes telles que les espèces des familles *Ericaceae*, *Epacridaceae*, *Monotropaceae* et *Orchideae*. Ces dernières sont le fait de champignons ascomycètes formant des mycorhizes éricoïdes (e.g., *Hymenoscyphus* spp.) et de champignons basidiomycètes formant des mycorhizes arbutoïdes, monotropoïdes ou à orchidées (Smith & Read 1997, Brundrett 2002, Brundrett 2004). En rapport avec les travaux présentés dans cette thèse, une attention particulière est portée aux ectomycorhizes et la suite de cette partie se concentre essentiellement sur cette symbiose.

Encadré 1.12 Définition de la symbiose mycorhizienne.

Le terme symbiose s'applique à toute association d'organismes dissemblables vivant en grande proximité, qu'ils soient antagonistes ou mutualistes (de Bary 1887 cité dans Egger & Hibbett 2004). Le terme mutualiste indique une interaction bénéfique pour les deux organismes (Boucher *et al.* 1982). D'après Egger & Hibbett (2004), l'association mutualiste mycorhizienne devrait être plus précisément qualifiée d'exploitation réciproque (Herre *et al.* 1999) ou de parasitisme réciproque : une association à bénéfices réciproques où des conflits d'intérêts surviennent pour déstabiliser le partenariat.



Figure 1.8 Racine fine de pin gris non mycorhizée (a), mycélium d'une souche de *Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick se développant dans un substrat minéral *in vitro* (b), racines de pin gris mycorhizées par *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Quel. (c, d, e), *Laccaria bicolor* (Maire) Orton (f, g), *S. tomentosus* (h, k) et *Phialocephala* sp. (i, j).

1.6.2 Anatomie et écologie de la symbiose ectomycorhizienne

Les espèces végétales ectomycorhiziennes occupent une surface disproportionnée par rapport à leur nombre : alors que seulement 3% des phanérogames (plantes à graines) sont ectomycorhizés (Meyer 1973 cité dans Orcutt & Nilsen 2000), cette association représente le 2^e type le plus communément rencontré (Smith & Read 1997). Une ectomycorhize se définit anatomiquement par la formation d'un manteau mycélien autour d'une radicelle. Cette dernière reste dans un état juvénile sans aboutir à la subérisation ou au développement de poils absorbants (Figure 1.8). Le manteau fongique est formé d'un réseau d'hyphes qui peut aller d'une structure lâche à un amoncellement de couches cellulaires rappelant un tissu parenchymateux (Orcutt & Nilsen 2000, Agerer 1999, Peterson & Massicotte 2004). La morphologie du manteau est influencée principalement par le mycobiote et permet ainsi d'identifier ce dernier par morphotypage (Agerer 1999).

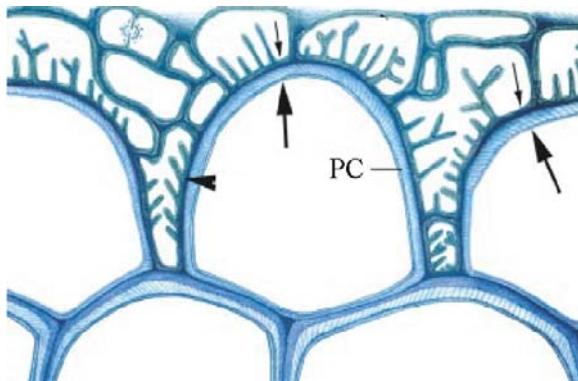


Figure 1.9 Interface plante/champignon constituée de parois cellulaires végétales (PC) et fongiques (pointe de flèche). Le passage des nutriments se fait au travers des membranes plasmiques de la plante (grande flèche) et du champignon (petite flèche).

Source : Peterson & Massicotte 2004

Les hyphes pénètrent l'épiderme de la racine et s'insèrent entre les cellules corticales périphériques pour former un labyrinthe complexe, le réseau de Hartig. Cet entrelacs d'hyphes combiné éventuellement à des excroissances (papillae) des parois cellulaires de l'hôte permet d'augmenter la surface d'échange (membrane plasmique et apoplaste) entre les deux partenaires (Kottke 1992, Smith & Read 1997). L'échange de ressources entre le champignon mycorhizien et la racine de l'hôte est réalisé au travers d'une interface spécialisée résultat du développement coordonné des deux organismes. Cette interface apoplastique, dans les ectomycorhizes, est constituée de parois cellulaires végétales et fongiques (Figure 1.9).

On reconnaît au moins 6000 espèces de champignons capables de réaliser ce type d'association (Molina *et al.* 1992, Brundrett 2002, Read *et al.* 2004) et plus de 2000 espèces se retrouvent en Amérique du Nord (Orcutt & Nilsen 2000). Ce sont essentiellement des basidiomycètes, notamment de genres appartenant à l'ordre des Agaricales (*e.g.*, *Suillus*, *Boletus*, *Russula*, *Lactarius*, *Amanita*, *Tricholoma*, *Hebeloma*, *Laccaria*) mais également de genres appartenant aux ordres des

Sclérodermatales, Hyménogastrales et Aphyllophorales. On retrouve également des ascomycètes (*e.g.*, *Cenococcum geophilum*, *Tuber* spp., *Wilcoxina* spp., *Phialocephala* spp., *Peziza* spp.) et quelques zygomycètes de l'ordre des Endogonales (Orcutt & Nilsen 2000, Smith & Read 1997, Brundrett 2002). Les résultats issus d'études phylogénétiques et de relevés paléontologiques suggèrent que ce type de symbiose est plus récent que la symbiose edomycorhizienne arbusculaire et que la plupart des champignons ectomycorhiziens dérivent d'espèces saprophytes. Ces champignons disposaient des enzymes nécessaires pour dégrader les parois cellulaires des végétaux, ce qui aurait initialement facilité la formation de la symbiose (Brundrett 2002).

Dans la forêt boréale (section 1.2), les espèces végétales dominantes sont principalement ectomycorhiziennes (*i.e.*, *Pinaceae*) (Orcutt & Nilsen 2000, Smith & Read 1997). Un processus de co-évolution veut que l'hétérorhizie des systèmes racinaires des conifères ectomycotrophes soit issue des besoins de la symbiose (Brundrett 2002) ; les tissus racinaires (*i.e.*, racines fines ou courtes) accueillant les champignons sont des tissus qui évoluent lentement pour permettre la lente formation de la mycorhize (Brundrett *et al.* 1996c). Ainsi, les conifères ont développé un système racinaire dimorphique constitué : (i.) par des racines de diamètre supérieur à 2 mm (Read *et al.* 2004) disposant d'un périderme (subérisé) empêchant/limitant la mycorhization ou en croissance (à proximité de la partie apicale) et (ii.) par une multitude de racines fines (ou radicelles) de diamètre inférieur à 2 mm, disponibles pour la colonisation par les hyphes des champignons ECM (Garbaye & Guehl 1997, Brundrett 2002). Lorsqu'il est mycorhizé, l'hétérogénéité du système racinaire est encore plus marquée puisqu'il y a une variation considérable dans la structure et la fonction des racines ectomycorhizées formées par différents champignons (le complexe mycorhizien) sur un même hôte (Cairney & Burke 1996, Garbaye & Guehl 1997, Hodge 2004). Selon la plante ectomycotrophe, le pourcentage de racines courtes associées à un manteau mycelien est variable (de 40-50 % pour l'eucalyptus à 90 % pour le pin Douglas). Ainsi, la proportion de racines dont l'approvisionnement en eau ou en éléments du sol passe par un mycobiote est variable d'une espèce hôte à l'autre (Marschner & Dell 1994). D'après Garbaye & Guehl (1997), « *c'est la complémentarité fonctionnelle de différents symbiotes qui procure aux arbres souplesse et flexibilité pour s'adapter en permanence aux conditions environnementales fluctuantes.* »

1.6.3 Physiologie de la symbiose ectomycorhizienne

Un échange de matière, d'énergie et d'information entre les deux partenaires permet d'entretenir la symbiose ectomycorhizienne. La plante procure à son (ses) symbiote(s) des sucres issus de sa

photosynthèse, un habitat (tissus racinaires) et ainsi les ressources nécessaires pour qu'il complète son cycle de vie (fructification). Ce dernier en retour peut améliorer l'absorption minérale, faciliter l'alimentation hydrique et limiter certains stress abiotiques et biotiques pour son hôte (Smith & Read 1997). Dans une certaine mesure, les mycorhizes représentent une adaptation spéciale des plantes aux stress environnementaux de leur habitat (Kottke 1992). Le mycélium occupant le sol vit dans un environnement hautement variable, alors que le mycélium occupant la racine vit dans un environnement équilibré par l'homéostasie de la plante (Smith & Read 1997). D'une certaine manière, le mycélium isole les radicules du milieu extérieur et constitue un « filtre » aux contraintes édaphiques (Kottke 1992, Lamhamedi *et al.* 1992, Garbaye & Guehl 1997, Jentschke & Godbold 2000, van Tichelen *et al.* 2001, Mushin & Zwiazek 2002, Ortega *et al.* 2004). Le champignon à l'interface entre l'hôte et le sol change ainsi la perception de la plante face à son environnement et peut augmenter potentiellement le « *fitness* » de son partenaire.

1.6.3.1 Croissance des plantes ectomycorhizées

L'augmentation de la croissance végétative (ou de l'accumulation de biomasse) pour la plante hôte est l'effet le plus communément observé de l'ectomycorhization, notamment en conditions limitantes (Smith & Read 1997, Ortega *et al.* 2004). En tant que tel, ce constat fait partie intégrante de la définition fonctionnelle de cette symbiose mutualiste (Orcutt & Nilsen 2000). Les plantes ectomycorhizées sont, en général, plus hautes et leurs parties aériennes comme racinaires montrent une masse sèche plus élevée que des plantes non mycorhizées (Smith & Read 1997). Néanmoins, en conditions peu limitantes, la mycorhization provoque éventuellement une réduction de croissance (Miller *et al.* 1989, Nylund & Wallander 1989, Colpaert & Verstyft 1999, Orcutt & Nilsen 2000). Il a aussi été démontré qu'un temps de latence permettant à un champignon inoculé de s'installer peut réduire le gain de croissance initial de l'hôte par rapport aux individus non inoculés. Néanmoins, avec l'âge de l'hôte, les différences de rendement en biomasse, entre plantes mycorhizées et non mycorhizées, sont beaucoup moins évidentes (Orcutt & Nilsen 2000).

1.6.3.2 Absorption de minéraux

L'amélioration de l'absorption de minéraux est une des raisons principales invoquée pour expliquer l'augmentation de la croissance d'une plante ectomycorhizée. Le champignon ECM augmente la surface d'échange en occupant un plus grand volume de sol et ses hyphes sont capables de se développer dans les pores de toutes tailles. En complément, les racines mycorhizées disposent d'une

durée de vie supérieure à celles non mycorhizées, ce qui augmente leur potentiel d'absorption dans le temps (Read *et al.* 2004). Pour améliorer le potentiel d'absorption des éléments nutritifs, les hyphes vont augmenter la mobilisation des ions en solution et excréter des composés chélatants ou des ectoenzymes (Marschner & Dell 1994). Peu de travaux ont montré un effet positif de l'ectomycorhization sur d'autres éléments minéraux que P et N.

La grande majorité des sols de la forêt boréale présente une déficience en nutriments minéraux. Néanmoins, les réserves en P et N du sol sont significativement plus réduites avec des arbres mycorhizés qu'avec des arbres non mycorhizés. De plus les arbres mycorhizés montrent une croissance et une accumulation du P et N dans leurs tissus plus élevées (Bending & Read 1995a,b, Perez-Moreno & Read 2000). Le phosphore, un des éléments les moins mobiles, est plus facilement exploité par un réseau mycélien extensif que par le simple système racinaire des conifères (Marschner & Dell 1994, Brandes *et al.* 1998). De plus, les champignons sont capables de relâcher des acides organiques pour solubiliser le P immobilisé dans les complexes organiques (*e.g.*, acide phosphatase, phytase) ou par des éléments minéraux tels que Ca, Fe ou Al (*e.g.*, acide oxalique) (Marschner & Dell 1994). Pour ces raisons, l'amélioration de l'absorption du P est un des bénéfices majeurs de la mycorhization avec une influence significative sur la courbe de croissance de l'hôte en milieu limitant (Orcutt & Nilsen 2000, Smith & Read 1997). Par voie de conséquence, dans ce type d'association, l'augmentation de croissance permet également une augmentation de l'absorption de N et des autres ressources du sol.

L'azote est également peu disponible pour les plantes dans les sols de la forêt boréale (Tamm 1991). Néanmoins, dans les forêts d'épinette noire (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) de l'Alaska (USA), les travaux de Ruess *et al.* (2003) suggèrent que, pratiquement, six fois plus de N est recyclé dans les racines fines (100 % des racines de premier ordre étant ectomycorhizées) que dans la litière. Or, les champignons ECM montrent des capacités limitées pour exploiter les éléments emprisonnés dans les composés organiques en décomposition puisqu'ils ont une activité cellulolytique et lignolytique (Chen *et al.* 2001b, Cairney *et al.* 2003) réduite et parce que le C est fourni par l'hôte. De fait, les champignons ECM montrent effectivement de faibles capacités de dépolymérisation de sources de C complexes par comparaison avec les espèces à mycorhizes éricoïdes ou saprophytes (Read *et al.* 2004). Plutôt que dégrader des composés enrichis en C, il semble que les champignons ECM exploitent de façon sélective des polymères enrichis en N. Dans les premiers temps de décomposition, sous l'action des champignons saprophytes, le rapport C/N de la litière va diminuer. Après un certain temps, les résidus descendent à l'horizon FH, où la limitation en C diminue l'activité des saprophytes et avantage

les champignons ECM par un substrat enrichi en N. L'attaque précoce de ces composés dans les horizons superficiels du sol est probablement issue d'une pression de sélection sur les champignons ECM en conséquence de leur faible capacité à libérer l'azote une fois séquestré dans des composés phénoliques (Read *et al.* 2004). En plus de cette forte capacité de dégradation dans l'horizon FH, les hyphes sont également capables d'assimiler les acides aminés libérés, produits de la protéolyse, beaucoup plus rapidement que l'azote minéral (NH_4^+ et NO_3^-) (Read *et al.* 2004). L'occupation intensive de l'horizon FH par un dense réseau mycélien est une des stratégies pour limiter la compétition sur l'absorption de ces acides aminés.

1.6.3.3 Photosynthèse et relations hydriques

Par comparaison à des plantes non mycorhizées, la mycorhization provoque souvent une réduction de la biomasse racinaire (Dosskey *et al.* 1992, Colpaert *et al.* 1996). Dosskey *et al.* (1992) suggèrent que le flux de photosynthétats dérivé vers le développement des hyphes du mycobiote limite l'élongation racinaire de l'hôte en détournant des ressources du métabolisme des cellules racinaires, et en réduisant leur turgescence (la concentration en osmolytes est réduite) et donc leur potentiel de croissance. Le développement du réseau mycélien extra-racinaire est un puits élevé pour les sucres issus de la photosynthèse (Miller *et al.* 1989, Dosskey *et al.* 1992, Colpaert *et al.* 1996). On suppose que la demande en photosynthétats (puits) du symbiote est un des facteurs entraînant une photosynthèse nette accrue par rapport à une plante non mycorhizée. Le gain pour l'hôte n'est pas obligatoire étant donné qu'une partie (jusqu'à 20 %, Jakobsen & Rosendahl 1990) de la production de photosynthétats est utilisée pour entretenir la symbiose. Par exemple, Dosskey *et al.* (1990) ont observé que des semis de pin Douglas colonisés par du *Rhizopogon vinicolor* AH Smith montraient une photosynthèse nette plus élevée et une production de biomasse réduite par rapport à des semis non mycorhizés. Dans cette même expérience, les plants mycorhizés ou non ne montrent pas non plus de différences nutritionnelles bien que, dans d'autres conditions, l'augmentation de la photosynthèse nette puisse également s'expliquer par l'amélioration de l'absorption de nutriments tels que P et N, voire d'autres éléments essentiels.

Le mycobiote peut éventuellement améliorer/faciliter l'alimentation hydrique. Plusieurs études ont montré que la mycorhization permettait d'augmenter la résistance de l'hôte à la sécheresse (Lamhamedi *et al.* 1992, Davies *et al.* 1996, Augé 2001). L'amélioration de la nutrition de l'hôte, notamment en P, est possiblement liée à ce gain de résistance. Plus directement, l'influence du champignon porte sur la conductivité hydraulique racinaire et/ou sur le taux de transpiration. Au niveau racinaire, la structure du réseau d'hyphes (*e.g.*, exploration étendue du substrat, augmentation de la

surface d'échange, rhizomorphes), la composition membranaire (*e.g.*, aquaporines) ou encore la modification de l'ajustement osmotique sont des caractères capables d'abaisser la résistance à la conduction d'eau des racines vers la partie aérienne. Au niveau de la partie aérienne, la surface transpirante peut augmenter ainsi que la photosynthèse et les échanges gazeux (augmentation de la force du puits de C). Le champignon peut également avoir une influence sur la conductance stomatique (Dosskey *et al.* 1991, Lamhamedi *et al.* 1992, Davies *et al.* 1996, Augé 2001). De plus, comme on l'a vu, le champignon peut altérer les signaux hormonaux et modifier ainsi la réponse de l'hôte à la sécheresse (Davies *et al.* 1996, Augé 2001).

Pour conclure, les champignons ECM ont une influence indubitable sur le développement des plantes qui les accueillent. En résumé, le champignon porte son action de façon indirecte et directe. L'influence indirecte est à base de relations sources-puits entre les deux organismes. La croissance et l'allocation des ressources ainsi que tous les processus sous-jacents (*e.g.*, photosynthèse) sont influencés par la quantité de ressources mises à la disposition de la plante par le champignon. De façon directe, le champignon est à l'interface entre la plante et son environnement et peut donc altérer la perception de l'hôte. L'équilibre phyto-hormonal est à la tête de la hiérarchie des déterminants coordonnant la réponse d'une plante à un stress et est ainsi le reflet de la perception d'un organisme face à un environnement donné (Itai 1999). Si le partenaire fongique (filtre environnemental) est capable d'altérer les signaux membranaires et/ou l'équilibre hormonal, alors il peut intervenir sur la stratégie d'exploitation des ressources de son hôte et est donc un déterminant de sa croissance et de sa survie.

1.7 Objectifs et hypothèses de recherche

Initialement, l'objectif de cette recherche était de démontrer que des champignons ECM sont capables d'améliorer la croissance et la survie de semis de pin gris et d'épinette blanche sur des RC (voir la sous-partie 1.4.3.2). Plusieurs contraintes inévitables sont rapidement apparues. Plus que d'autres rejets sableux, les RC sont caractérisés par une grande complexité de stress physiques (*e.g.*, compaction, excès ou manque d'eau) et chimiques (*e.g.*, grande variété d'électrolytes, alcalinité élevée, résidus d'hydrocarbures). Ainsi, il est difficile de simuler les contraintes du terrain en milieu contrôlé (*i.e.*, *in vitro*) ou semi-contrôlé (*i.e.*, serre) pour évaluer avec certitude la réponse de semis mycorhizés. Il était donc nécessaire de faire des expériences *in situ* ; néanmoins les RC étant encore en développement, aucun sol reconstitué à partir de ce type de rejet n'a pu être encore réalisé (*i.e.*, instabilité du terrain, excès d'eau, forte érosion). Pour ces raisons, il a été choisi de concentrer les efforts de recherche en milieu contrôlé sur un facteur de stress parmi tous les autres, l'excès de Na⁺. Cet élément n'est pas nécessaire à la croissance des plantes et il représente une problématique mondiale, notamment pour les terrains agricoles. De plus, l'abondante bibliographie sur l'excès de Na⁺ dans les sols est un précieux recours pour l'analyse des résultats face à un stress aux implications si complexes.

Les semis produits pour la végétalisation de sols reconstruits par la compagnie Syncrude Canada Ltd. sont majoritairement colonisés par des champignons ECM adaptés aux conditions non limitantes des pépinières (*e.g.*, *T. americana*, *Amphinema byssoides* (Persoon:Fries) J. Eriksson., *Wilcoxina* spp. (Kernaghan *et al.* 2003)). Après plantation des semis, ces champignons sont éventuellement rapidement remplacés par des champignons indigènes adaptés aux conditions des terrains. Si le potentiel inoculant du terrain à végétaliser est faible, il est probable que le semis manque de partenaires fongiques adaptés au moment où il est le plus sensible aux stress post-plantation. Dans ce contexte, l'inoculation contrôlée en pépinière de champignons ECM sélectionnés montre son intérêt (Kropp & Langlois 1990).

On peut poser l'hypothèse générale **qu'un champignon adapté aux stress salin et sodique peut réduire l'effet du choc de transplantation et améliorer la croissance et la survie de semis sur des terrains affectés par un excès de sel.**

Ainsi, les objectifs de cette thèse se concentrent sur l'amélioration, par l'inoculation de champignons ECM sélectionnés, des conditions de croissance et de survie de semis de conifères suite à leur transplantation dans un milieu salin et sodique. Peu de recherches ont encore porté sur le gain potentiel

de résistance au stress sodique conféré par l'inoculation de semis de pépinière avec un champignon ECM résistant. Or, les champignons ECM ont une position stratégique à l'interface entre la plante et son substrat ainsi qu'une influence remarquable sur la physiologie de leur hôte en situation de stress. C'est pourquoi, les champignons ECM sont une composante fonctionnelle écosystémique essentielle à maîtriser pour améliorer la résistance des semis produits et ainsi faciliter la végétalisation de sols reconstitués à partir de rejets sableux salins et/ou sodiques.

Voici les objectifs détaillés des six expériences présentées dans cette thèse :

- I. **Objectif 1** (Expérience 1 - Chapitre 2) : définir le potentiel inoculant des RC en contraste des potentiels inoculants de matériaux utilisés pour la reconstruction de sols et de sols déjà reconstruits par la compagnie Syncrude Canada Ltd. ;

Cette expérience avait pour objectif secondaire d'inventorier des espèces ECM tolérantes aux perturbations extrêmes subies par les matériaux utilisés pour la reconstruction des sols lors de leur déblayage, stockage et épandage.

- II. **Objectif 2** (Expérience 2 - Chapitre 3) : évaluer *in vitro* la résistance à l'excès de NaCl de différentes souches de champignons mycorhiziens et caractériser leur réponse physiologique, ii) évaluer si des champignons isolés d'un sol reconstruit affecté par un excès de sel montrent une plus grande résistance au stress sodique que des espèces sélectionnées à partir d'une mycothèque de champignons de la forêt boréale ;

- III. **Objectif 3** (Expérience 3 - Chapitre 4) : i) inoculer un champignon ECM (*L. bicolor*) dans des conditions courantes de production en pépinière de semis (*Pinus banksiana* Lamb.) destinés à végétaliser des terrains perturbés à Syncrude Canada Ltd., ii) évaluer l'influence du champignon inoculé sur la survie, la croissance et la physiologie de son hôte exposé à un gradient de NaCl en conditions semi-contrôlées (simulation d'une transplantation en milieu salin et sodique en serre) ;

Cette expérience avait pour objectifs secondaires : i) d'évaluer la croissance de semis inoculés en pépinière, ii) de définir des indicateurs de stress suffisants pour évaluer l'influence du champignon inoculé.

- IV. **Objectif 4** (Expérience 4 - Chapitre 5) : évaluer l'influence de trois champignons ECM (*L. bicolor*, *H. crustuliniforme* et *S. tomentosus*) sur la réponse physiologique à l'excès de NaCl

de deux espèces de conifères (*Picea glauca* (Moench) Voss et *P. banksiana*) communément utilisés dans les pratiques de végétalisation à Syncrude Canada Ltd. ;

- V. **Objectif 5** (expérience 5 - Chapitre 6) : évaluer la réponse physiologique des combinaisons plante-champignon de l'expérience 4 exposées à des eaux de RC en conditions semi-contrôlées.

Les expériences 4 et 5 ont pour objectif de sélectionner un ou des champignons pour l'inoculation de semis destinés à la végétalisation de sites salins et/ou sodiques à Syncrude Canada Ltd.

- VI. **Objectif 6** (expérience 6 - Chapitre 6) : évaluer la survie et la croissance de semis inoculés sur un sol reconstruit affecté par un excès de sel à Syncrude Canada Ltd. dans la poursuite de l'expérience 3.

Les expériences présentées dans cette thèse peuvent ainsi être regroupées en trois grandes parties :

1 : Inventaire fongique des sols reconstruits à végétaliser

Pour promouvoir l'inoculation contrôlée, il est nécessaire de démontrer le manque de mycobiotas disponibles en évaluant le potentiel inoculant de sols reconstruits. Le chapitre 2 se concentre sur cet objectif. L'abondance et la diversité des champignons mycorhiziens à arbuscules ou ectomycorhiziens dans les déblais miniers à amender ou servant à l'amendement sont faibles en principe (Danielson *et al.* 1983b, Abbott & Robson 1991, Bellgard 1993, Malajczuck *et al.* 1994, Pflieger *et al.* 1994, Gould *et al.* 1996). Ainsi, l'expérience 1 se base sur l'hypothèse que les matériaux de reconstruction des sols ont un faible potentiel inoculant, et qu'une fois végétalisés les sols reconstruits montrent un potentiel inoculant plus élevé. Dans ce cadre, on suppose que les sables de rejets, notamment les RC, issus du sous-sol et stérilisés par les procédés d'extraction du pétrole vont montrer les potentiels inoculants les plus faibles (voire nuls).

2 : Sélection d'espèces fongiques *in vitro*

Pour obtenir des résultats prometteurs, il s'agit de sélectionner de façon cohérente les espèces ECM utilisées pour réaliser des tests d'inoculation. Le chapitre 3 se concentre sur cet objectif. Parmi la grande diversité de champignons ECM que l'on rencontre dans la forêt boréale, il existe naturellement des souches potentiellement résistantes aux stress que l'on retrouve sur les rejets sableux. Pour restreindre ce choix, on peut s'intéresser aux espèces disponibles dans les mycothèques (*i.e.*, « *University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium* » (UAMH), Sigler & Flis 1998,

www.devonian.ualberta.ca/uamh/ (consulté : décembre 2004)) ou bien aux espèces que l'on retrouve en milieu salin. Pour éviter l'introduction de souches exogènes, il s'agit de trouver des milieux salins en forêt boréale. Certains sols de la région de l'Athabasca sont naturellement salins et font l'objet de projets similaires à celui-ci.

Plusieurs travaux portant sur la tolérance aux métaux d'espèces ECM ont montré des différences de croissance inter- et intra-spécifiques entre des isolats provenant de sites pollués et non pollués (Colpaert *et al.* 2000, Sharples *et al.* 2000, Formina *et al.* 2005). Néanmoins, peu d'études ont porté sur la sélection d'espèces ECM pour l'augmentation de la résistance au stress sodique. Ainsi, l'expérience 2 répond à l'hypothèse que des champignons isolés d'un terrain sodique vont montrer une résistance similaire ou plus élevée par rapport à des espèces issues d'une mycothèque sélectionnées pour leur résistance à l'excès de sel en conditions *in vitro*.

3 : Bio-essais en conditions semi-contrôlées et *in situ*

Pour promouvoir l'intégration de l'inoculation contrôlée dans un programme de végétalisation, il est nécessaire de montrer son effet sur la résistance des semis en milieu contrôlé et *in situ* ainsi que son application en conditions de pépinière. Les chapitres 4, 5 et 6 se concentrent sur ces aspects qui définissent les objectifs appliqués généraux de cette thèse (voir ci-dessus). Ainsi, les expériences 3, 4, 5 et 6 se basent sur l'hypothèse dominante : l'inoculation en pépinière de semis de conifères avec des champignons ECM sélectionnés pour leur résistance au stress sodique peut limiter les effets négatifs des stress liés à l'excès de sel sur la croissance et la survie des semis.

Chapitre 2 Mycorrhizal inoculum potentials of pure reclamation materials and revegetated tailing sands from the Canadian oil sand industry

2.1 Avant-propos

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans le volume 15 de la revue *Mycorrhiza*, pages 149 à 158 (Bois, Piché, Fung & Khasa 2005d). Les professeurs Damase Khasa et Yves Piché ont fourni l'encadrement scientifique et Martin Fung est intervenu pour la définition des besoins de l'industrie et fut la personne ressource au sein du bureau des affaires environnementales à Syncrude Canada Ltd. Une partie des résultats a fait l'objet d'une affiche présentée à la conférence internationale sur les mycorhizes en août 2003 (ICOM 4, Montréal, QC, Canada). L'expérience de piégeage présentée dans ce chapitre fut réalisée en serre pour évaluer le potentiel inoculant de matériaux issus de l'exploitation des sables bitumineux à Syncrude Canada Ltd. L'évaluation du potentiel inoculant précède la sélection d'espèces fongiques pour l'amélioration de la croissance et de la survie de semis par l'inoculation. La suite logique de cette expérience en serre, le piégeage *in situ*, a débuté au cours de cette thèse mais les résultats seront évalués et analysés par Ali Quoreschi dans la poursuite du projet. Cette évaluation en conditions *in situ* devrait montrer une image plus juste des potentiels inoculants par rapport au résultats préliminaires obtenus en serres dans l'expérience qui suit.

2.2 Résumé

Des avancées récentes dans la gestion des rejets de sables bitumineux issus de l'activité de l'industrie pétrolière canadienne ont abouti à la formation de rejets sableux consolidés (RC) ; ce matériau représente un nouveau défi pour le travail de restauration. Des plants de pin gris (*Pinus banksiana* Lamb.), de peuplier hybride (*Populus deltoides* Bartr. ex Marsh. × *Populus nigra* L.) et de trèfle rouge (*Trifolium pratense* L.) ont été utilisés dans une expérience en serre d'une durée de huit semaines pour évaluer le potentiel inoculant mycorhizien de RC. Ce potentiel inoculant a été comparé avec celui de trois autres matériaux utilisés en restauration (sables de rejets communs (SR), mort-terrain (MT) et tourbe Muskeg (MK)) et de trois sites restaurés en 1982 (R82), 1988 (R88) et 1999 (R99). Les RC étaient dépourvus de propagules mycorhiziennes actives alors que tous les autres matériaux ont montré un certain potentiel inoculant. Des champignons mycorhiziens à arbuscules ont été observés sur les racines de trèfle ou de peuplier s'étant développées sur du SR, MT et tous les substrats comprenant de la tourbe (MK, R82, R88 et R99). Les racines de pin gris furent également colonisées par les hyphes, formant des vésicules, d'un endophyte non identifié et par un champignon dit « *dark septate* ». Des ectomycorhizes ont été observées sur les pins et les peupliers qui ont poussé sur du MT, MK et le sol des deux sites restaurés les plus vieux (R82 et R88). Au moyen, d'un typage morphologique et moléculaire, six champignons ectomycorhiziens (ECM) ont été identifiés au niveau du genre ou de l'espèce : *Laccaria* sp., *Thelephora americana* Lloyd, *Wilcoxina* sp. (dite souche E), *Tuber* sp. (type I), une espèce de Sebacinoides et une de Pezizales. Les champignons des genres *Laccaria* et *Wilcoxina* étaient les espèces ECM les plus fréquemment observées.

2.3 Abstract

Recent improvements in the management of oil sand tailings used by the Canadian oil sand industry have resulted in the production of composite tailing sands (CT): a new challenging material for reclamation work. Jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.), hybrid poplar (*Populus deltoides* Bartr. ex Marsh. × *Populus nigra* L.) and red clover (*Trifolium pratense* L.) plants were used in an eight weeks greenhouse bioassay to evaluate the mycorrhizal inoculum potential of CT. This inoculum potential was compared with that of three other reclamation materials (common tailing sands (TS), deep overburden (OB) and muskeg peat (MK)) and with three sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99). CT was deprived of active mycorrhizal propagules while all other materials showed some level of inoculum potential. Arbuscular mycorrhizal fungi were observed on roots of clover and poplar grown in TS, OB and all substrates containing peat (MK, R82, R88 and R99). Pine roots were also colonized by vesicle forming hyphae of an unidentified fine endophyte and by dark septate fungi. Ectomycorrhizas were observed on pine and poplar grown in OB, MK, and in soils from the two older reclaimed sites (R82 and R88). Using morpho- and molecular typing, six ectomycorrhizal (ECM) fungi were identified to the genus or species level: *Laccaria* sp., *Thelephora americana* Lloyd, *Wilcoxina* sp. (E-strain), *Tuber* sp. (I-type), a Sebacinoid, and a Pezizales species. Fungi of the genus *Laccaria* and *Wilcoxina* were the most frequently observed ECM species.

2.4 Introduction

In northeastern Alberta (Canada), surface mining of oil sands creates large areas of disturbed land that require reclamation (Fung & Macyk 2000). In 1998, Syncrude Canada Ltd. alone produced 75 million m³ of tailings (Li & Fung 1998), including common tailing sands (TS) and composite tailings (CT). Opencast extraction of oil sands implies removing the organic layer (muskeg peat (MK)) and the deep geological overburden (OB). These spoils are retained and used to amend stabilized tailings in order to reconstruct the soil before revegetation (Danielson *et al.* 1983a, Danielson & Visser 1989, Li & Fung 1998, Fung & Macyk 2000).

According to soil remediation standards, a reclaimed growing medium should support a healthy plant community that will evolve toward an ecosystem comparable to that of neighboring natural areas. Revegetation of TS is now routinely conducted at an operational scale (Fung & Macyk 2000), whereas the reclamation of CT is still in the research phase (Khasa *et al.* 2002). Common TS are deposits of tailing slurry containing significant quantity of water, residual bitumen, and coarse-grained and fine-grained materials. CT are composed of the finest material fraction of these slurries that hardly consolidate and to which CaSO₄ is added to enhance compaction and stabilization rates. Composite tailings are challenging materials to reclaim because of their inherently low nutrient levels, and high alkalinity ($\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} > 8$) and salinity (Fung & Macyk 2000). Furthermore, CT may lack certain components of the soil microbial community essential for plant growth and survival. One such component, mycorrhizal fungi, plays a critical role in ecosystem dynamics and productivity (van der Heijden *et al.* 1998, Baxter & Dighton 2001, Dahlberg 2001, Leake 2001, Jonsson *et al.* 2001). In return for photosynthates (Smith & Read 1997), plants, as individuals or as a community, benefit from symbiotic mycorrhizal fungi through enhanced mineral nutrition and water status, and resistance toward pathogens (Kropp & Langlois 1990). Moreover, mycorrhizal fungi buffer host plants against environmental stresses and alter interplant competition (Malajczuk *et al.* 1994). Therefore, symbiotic fungi should be considered as an essential component of soil reclamation programs.

The level of occurrence of arbuscular mycorrhizal (AM) and ectomycorrhizal (ECM) fungi in highly disturbed mine spoils is low (Danielson *et al.* 1983b, Abbott & Robson 1991, Bellgard 1993, Malajczuk *et al.* 1994, Pflieger *et al.* 1994, Gould *et al.* 1996). Several authors have

reported the presence of mycorrhizal fungi in different materials (TS, MK, OB and sewage sludge) used to reconstruct soil from oil sand tailings (Zak *et al.* 1982, Zak & Parkinson 1982, Danielson *et al.* 1983b, Zak & Parkinson 1983, Danielson *et al.* 1984, Danielson & Visser 1989). Thus, amending CT with OB and MK could provide a source of indigenous mycorrhizal fungal propagules. However, the inoculum potential of these materials is reduced during storage and by subsequent dilution with tailing sands (Danielson *et al.* 1983b, Malajczuck *et al.* 1994, Pflieger *et al.* 1994).

Most studies on the diversity and inoculum potential of AM and ECM fungi occurring in tailings from the oil sand industry were done in the 1980's (Zak *et al.* 1982, Zak & Parkinson 1982, Danielson *et al.* 1983b, Zak & Parkinson 1983, Danielson *et al.* 1984, Danielson & Visser 1989). However, reclamation practices have evolved, producing new types of tailing sands (*e.g.*, composite tailings) and new technologies are available for the identification of mycorrhizal fungi (*e.g.*, molecular tools). Identification of any ECM fungi using morphology alone, is hampered by several drawbacks (Danielson 1984, Gardes *et al.* 1991, Sakakibara *et al.* 2002), but the use of molecular techniques provide greater precision for ecological studies. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) is one of the simplest techniques, that usually allows identification to the species level using the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of rDNA (White *et al.* 1990, Egger 1995, Egger *et al.* 1996, Horton & Bruns 2001).

In this context, the present study used a modified bait plant system (Brundrett *et al.* 1996c) to: (1) evaluate the AM and ECM inoculum potential of CT compared to that of TS, OB and MK and soil from reclaimed sites of different ages; and (2) identify the ECM species present in those materials using molecular typing (ITS-RFLP and sequencing).

2.5 Materials and methods

2.5.1 Substrates

The substrates used were CT, TS, MK, OB, and undisturbed soil cores taken from sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88), and 1999 (R99) (see “*Annexe I*”). The samples were collected in May 2001 on the Syncrude Canada Ltd. mining area, 30 km north of Fort McMurray (56°39’N / 111°130’W, alt.: 369 m). Tailings (CT and TS) were collected from landfills. Soil cores of OB were randomly collected from a pile of geologic material freshly excavated from a depth of 30-40 m, and cores of MK were collected from freshly spread material. Reclaimed sites comprised TS amended with a layer of OB covered with a layer of MK. Fifteen soil cores were collected per site. Soil samples were collected at 10 m intervals along three parallel 40 m transects; transects were 20 m apart. Bulk soil samples were collected at both ends of each transect (six samples per site). Because fungal propagules are concentrated in the top 20 cm of the soil profile (Brundrett *et al.* 1996b), cores were taken using PVC tubes of 8 × 20 cm (d × h). Soil cores were then stored at 4°C prior to processing. To describe site conditions, plants occurring on reclaimed sites were listed (Table 2.1) and soil chemical and physical properties were analyzed from bulked samples (Table 2.2).

2.5.2 Inoculum potential bioassay

To evaluate the AM and ECM inoculum potential of each substrate, soil cores were planted with red clover (*Trifolium pratense* L., provided by BIOVISION Seed Labs Research, Edmonton, AB, Canada), hybrid poplar (*Populus deltoides* Bartr. ex Marsh. × *Populus nigra* L., supplied by CRBF, Université Laval) and jack pine (*Pinus banksiana* Lamb., Syncrude source provided by Alberta tree improvement and seed center, Smoky Lake, AB, Canada). Red clover and jack pine seeds were surface sterilized for 2 min in 1% bleach and rinsed six times with distilled water, and sown on a sand, Turface® MVP (Profile™, Buffalo Grove, IL, USA) and loamy subsoil mix (1:1:1, v:v:v). The substrate was sterilized (121°C, 45 min) twice with a 24 h interval between

Table 2.1 Planted (†) and naturally occurring plant species on sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99).

R82	R88	R99
Tree	Tree	Tree
<i>Populus tremuloides</i> Michx.	<i>Populus tremuloides</i> Michx.	<i>Populus tremuloides</i> Michx.†
<i>Pinus banksiana</i> Lamb.†	<i>Populus balsamifera</i> L.	<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss.†
<i>Amelanchier alnifolia</i> (Nutt.) Nutt. ex M. Roemer†	<i>Pinus banksiana</i> Lamb.†	
Shrubs	Shrubs	Shrubs
<i>Cornus stolonifera</i> Michx.	<i>Cornus stolonifera</i> Michx.†	<i>Fragaria vesca</i> L.
<i>Fragaria virginia</i> Duchesne	<i>Fragaria virginia</i> Duchesne	<i>Salix</i> sp.
<i>Rubus idaeus</i> L.	<i>Rosa acicularis</i> Lindl.	
<i>Shepherdia canadensis</i> (L.) Nutt.	<i>Salix</i> sp.	
forbs and grasses	forbs and grasses	forbs and grasses
<i>Achillea millefolium</i> L.	<i>Arnica cordifolia</i> Hook.	<i>Agropyron trachycaulum</i> (Link) Malte ex H.F. Lewis
<i>Calamagrostis canadensis</i> (Michx.) Beauv.	<i>Bromus inermis</i> Leyss.	<i>Artemisia absinthium</i> L.
<i>Corydalis aurea</i> Willd.	<i>Dactylis glomerata</i> L.	<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.
<i>Epilobium angustifolium</i> L.	<i>Melilotus alba</i> Medikus	<i>Corydalis aurea</i> Willd.
<i>Medicago sativa</i> L.	<i>Taraxacum officinale</i> G.H. Weber ex Wiggers	<i>Draba nemorosa</i> L.
<i>Taraxacum officinale</i> G.H. Weber ex Wiggers	<i>Vicia americana</i> Muhl. ex Willd.	<i>Epilobium angustifolium</i> L.
		<i>Equisetum arvense</i> L.
		<i>Hordeum jubatum</i> L.
		<i>Medicago sativa</i> L.
		<i>Melilotus alba</i> Medikus
		<i>Phleum pratense</i> L.
		<i>Senecio eremophilus</i> Richards.
		<i>Sonchus arvensis</i> L.
		<i>Taraxacum officinale</i> G.H. Weber ex Wiggers
		<i>Trifolium repens</i> L.
		<i>Vicia americana</i> Muhl. ex Willd.

Table 2.2 Chemical and physical properties of bulked samples of composite tailings (CT), tailing sands (TS), deep overburden (OB), muskeg peat (MK) and soil from sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99).

Soil types	S	P	Ca	Mg	Na	K	Organic C	N	pH _{H2O}	EC	Clay	Silt	<i>Sand</i>
			cmol ⁺ kg ⁻¹				%	%		μS.cm ⁻¹	%	%	%
<i>CT</i>	0.9 ^b	0.6 ^c	3.6 ^d	2.9 ^d	0.8 ^c	0.3 ^d	0.3 ^d	0.01 ^c	7.8 ^a	30 ^c	3.8 ^c	4.7 ^b	91.5 ^a
<i>TS</i>	0.7 ^b	0.5 ^c	4.2 ^d	1.5 ^d	0.04 ^c	0.4 ^{cd}	0.3 ^d	0.01 ^c	6.9 ^c	29 ^c	3.3 ^c	3 ^b	93.7 ^a
<i>OB</i>	168.9 ^a	0.5 ^c	136.3 ^c	28.8 ^{bc}	19.6 ^a	1.5 ^b	1.1 ^d	0.04 ^c	7.7 ^a	876 ^a	32.2 ^a	24.3 ^a	43.5 ^c
<i>MK</i>	64.6 ^b	5.3 ^a	276.7 ^{ab}	133.6 ^a	11.7 ^b	2.8 ^a	28 ^a	0.7 ^a	5.1 ^d	407 ^b			
<i>R99</i>	166.7 ^a	1.8 ^b	332.6 ^a	46.9 ^b	2.4 ^c	1.3 ^b	16 ^b	0.6 ^a	7.3 ^{bc}	758 ^a	12 ^b	21.2 ^a	66.8 ^b
<i>R88</i>	3.8 ^b	1.3 ^{bc}	107.7 ^c	19.7 ^{cd}	0.4 ^c	2.4 ^a	1.6 ^d	0.1 ^c	7.4 ^{ab}	98 ^c	13 ^b	20.5 ^a	66.5 ^b
<i>R82</i>	22.7 ^b	1.4 ^{bc}	241 ^b	39.7 ^{bc}	1.4 ^c	1.2 ^{bc}	6.7 ^c	0.3 ^b	7.1 ^{bc}	188 ^{bc}	12 ^b	19.5 ^a	68.5 ^b

EC (electrical conductivity) and pH_{H2O} were recorded from 1:2 (substrate:dH₂O, v:v) slurries for all except MK, where they were recorded from 1:10 slurries (Kalra & Maynard 1992). Means followed by the same letter are not significantly different at the 5% level according to Duncan's multiple range test.

each treatment. Seedlings were grown for three weeks before transplanting to the cores. The same sterile substrate was used for control treatments to check for contamination by greenhouse mycorrhizal fungi. Hybrid poplar cuttings were inserted directly into the soil cores.

The first bioassay experiment consisted of 64 soil cores with eight replicates per substrate type (CT, TS, OB, MK, R82, R88, R99 and control); each core was planted with one jack pine and one red clover seedling. The second bioassay consisted of 56 soil cores with seven replicates per substrate type; each core was planted with one hybrid poplar cutting and one clover seedling. All plants were watered as required. Seedlings were grown for eight weeks under a 16 h photoperiod at 27/22°C (day/night) and 32% relative humidity. Plants growing on CT and TS showed nutrient deficiencies and were given four 20 mg applications of ammonium nitrate ($\text{NH}_4^+\text{NO}_3^-$) during the experiment.

At the end of the experiment, plants were harvested and the root systems washed. Fresh roots were weighed and large root systems sub-sampled (Brundrett *et al.* 1996c). Root length measurements were obtained by image analysis using WinRhizo 5.0A (Regent instruments Inc., QC, Canada). Measurements performed on sub-samples were extrapolated to the whole sample using the weight ratio. Each root system was stored in 50% ethanol at 4°C (Brundrett *et al.* 1996c) prior to further analyses. Fresh and dry (65°C, 48 h) shoot weights were recorded.

2.5.3 Determination of inoculum potential

Substrate inoculum potentials were defined as the percentage colonization by AM and ECM fungi of each bioassay plant (Brundrett & Abbott 1994) and represented development of active propagules in a specific substrate under greenhouse conditions. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) within red clover and poplar roots were stained using a slightly modified version of the method described by Vierheilig *et al.* (1998). Briefly, red clover and poplar roots were cleared for 5 and 20 min respectively using 10% KOH at 100°C, rinsed three times with distilled water before staining in a 5% solution of black ink (Sheaffer® Skrip® Ink) in white vinegar (5% acetic acid). Clover roots were stained for 4 min and poplar roots for 20 min. Root endophytes in jack pine roots were stained using a modified version of the method described by Koske & Gemma (1989). Briefly, roots were cleared for 75 min in 10% KOH at 100°C and rinsed three times with distilled water prior to immersion in hydrogen peroxide (H_2O_2 10%) for 30 min. Roots were

acidified in a 1% HCl solution for 10 min and then stained with 0.05% trypan blue. Stained roots were examined under a dissecting microscope, and the percentage colonization was scored using the gridline intersect method (Giovannetti & Mosse 1980, Brundrett *et al.* 1996c). The presence of ECM fungi was assessed on whole root systems of jack pine and hybrid poplar. Colonization rates of jack pine seedlings were defined as the proportion of mycorrhizal roots relative to the total number of short roots. Because of the limited number of ECM tips and their patchy distribution over the large root systems of hybrid poplar, colonization rates were expressed as the total number of ECM per meter of root.

2.5.4 Morphological description and ITS-RFLP identification of ECM fungi

Both morphological and molecular methods were used to identify ectomycorrhizal root tips. Morphotyping was done to group mycorrhizas within each soil core using branching patterns, tip shape, color, texture, lustre, emanating hyphae, outer mantle anatomy and cystidias (Goodman *et al.* 1996, Agerer 1999). For each morphotype in a given soil core, molecular typing was performed on duplicate samples of 3-4 root tips. Total DNA was extracted following the method of Kårén *et al.* (1999). ITS amplification was done using ITS1 (White *et al.* 1990) and either the ascomycetes specific NL6Amum or basidiomycetes specific NL6Bmum primer (Egger 1995). Amplifications were carried out as follows: 0.1 to 10 ng of DNA were added to a mix containing 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.1 mg/mL BSA (LaRoche, Basel, Switzerland), 0.2 µM of each primer (Qiagen-Operon, Alameda, CA, USA) and 0.025 U/µL of Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The PCR was done using a PTS-225 thermocycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) and the following cycles: initial denaturation at 95°C for 2.5 min followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 57°C for 55 s and extension at 72°C for either 45 s (cycles 1 to 13), 2 min (cycles 14 to 26), or 3 min (cycles 27 to 30), and a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were examined on a 1% agarose gel with 0.5% Synergel (Diversified Biotech, Boston, MA, USA). A second amplification, using 1 µL of the first PCR product, was done when the first PCR yielded weak signals. Eight microliters of PCR products were digested at 37°C for 60 min using 3 units of *Hinf* I, *Alu* I, and *Rsa* I (La Roche Ltd., Basel, Switzerland). Restriction product lengths were evaluated on a 1% agarose gel with 0.5% Synergel (Diversified Biotech). The primers ITS1 and ITS4 (Operon-Qiagen, Alameda, CA, USA) were used to amplify and to sequence the ITS of

DNA extracts for which the PCR-RFLP results did not match with any referenced patterns. Sequencing was done using the BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) and an ABI genotype 3100 automated sequencer (Applied Biosystems, CA, USA).

2.5.5 Statistical analysis

The two bioassays were set up as completely random designs (Steel *et al.* 1997) according to the linear model $Y_{ij} = \mu + S_i + \varepsilon_{ij}$ where Y_{ij} was the j^{th} observation of the i^{th} soil type treatment, μ was the overall mean, S_i was the effect of the i^{th} soil type treatment and ε_{ij} was the experimental error. Data were analyzed with a one-way ANOVA, and a Duncan's multiple range test was performed to evaluate pairwise comparisons between the means (Steel *et al.* 1997). In addition, Pearson correlation coefficients (Steel *et al.* 1997) were calculated to detect linear relationship between soil properties, mycorrhizal status and plant growth parameters.

2.6 Results

2.6.1 Plant growth

Basic plant growth parameters (Table 2.3) and soil properties were measured to provide complementary information concerning evaluation of site inoculum potentials (Figure 2.1, Figure 2.2 and Figure 2.3). Bearing this in mind, the N amendment of CT and TS was considered to have had a negligible effect on the results obtained as these substrates exhibited the lowest N content (0.01%). Clover growth in terms of total fresh biomass, root length and shoot:root ratio were ranked low for plants grown in CT, TS and OB. Clover growth was slightly improved on MK and highest on soil from the reclaimed sites. Biomass, root length and shoot:root ratio of clover seedlings were strongly positively correlated with percentage AMF colonization (Table 2.4). By contrast, there was no significant correlation with substrate texture, mineral content, EC or pH. Jack pine grown in MK had the highest total fresh biomass and root length. Jack pine shoot dry mass was strongly positively correlated with ECM fungal colonization (data not shown). Total fresh biomass and root length of jack pine were positively correlated with substrate C/N and phosphorus content (Table 2.4). Poplar plants grown in CT and TS had the highest total fresh biomass which together with root length were positively correlated with sand content and negatively correlated with calcium, potassium, clay and silt content. The shoot:root ratio of poplar showed no significant difference between soil types. Nevertheless, this parameter was positively correlated with ECM fungal colonization, phosphorus, calcium, magnesium and potassium content, and negatively correlated with silt and sand content.

Table 2.3 Plant growth response on control substrate (CTRL), composite tailings (CT), tailing sands (TS), deep overburden (OB), muskeg peat (MK) and soil from sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99).

Soil Type	Jack pine			Hybrid poplar			Red clover		
	Shoot:Root	Total fresh biomass (g/plant)	Root length (cm)	Shoot:Root	Total fresh biomass (g/plant)	Root length (m)	Shoot:Root	Total fresh biomass (g/plant)	Root length (m)
CTRL	0.6 ^b	0.5 ^a	138 ^a	1.6	6.4 ^b	67 ^a	0.5 ^{ad}	13.7 ^a	160 ^a
CT	1 ^{ab}	0.2 ^b	40 ^c	1.8	10.2 ^a	52 ^{ab}	0.6 ^{ad}	0.4 ^d	5 ^c
TS	0.7 ^b	0.3 ^b	91 ^b	1.7	10.7 ^a	65 ^a	0.6 ^{ad}	0.6 ^d	6 ^c
OB	0.7 ^b	0.2 ^b	46 ^c	1.9	5.2 ^b	32 ^b	0.3 ^d	0.6 ^d	8 ^c
MK	0.8 ^{ab}	0.5 ^a	130 ^a	2.2	6.2 ^b	38 ^{ab}	0.6 ^c	2.5 ^c	20 ^c
R99	1.2 ^a	0.1 ^b	31 ^c	1.9	6.2 ^b	39 ^{ab}	1 ^b	7 ^b	64 ^b
R88	0.9 ^{ab}	0.2 ^b	55 ^c	1.9	6.2 ^b	43 ^{ab}	1.3 ^a	9.6 ^{ab}	63 ^b
R82	1.1 ^a	0.2 ^b	51 ^c	2	7 ^b	39 ^{ab}	1.1 ^b	6.5 ^b	54 ^b

Means followed by the same letter are not significantly different at the 5% level according to Duncan's multiple range test.

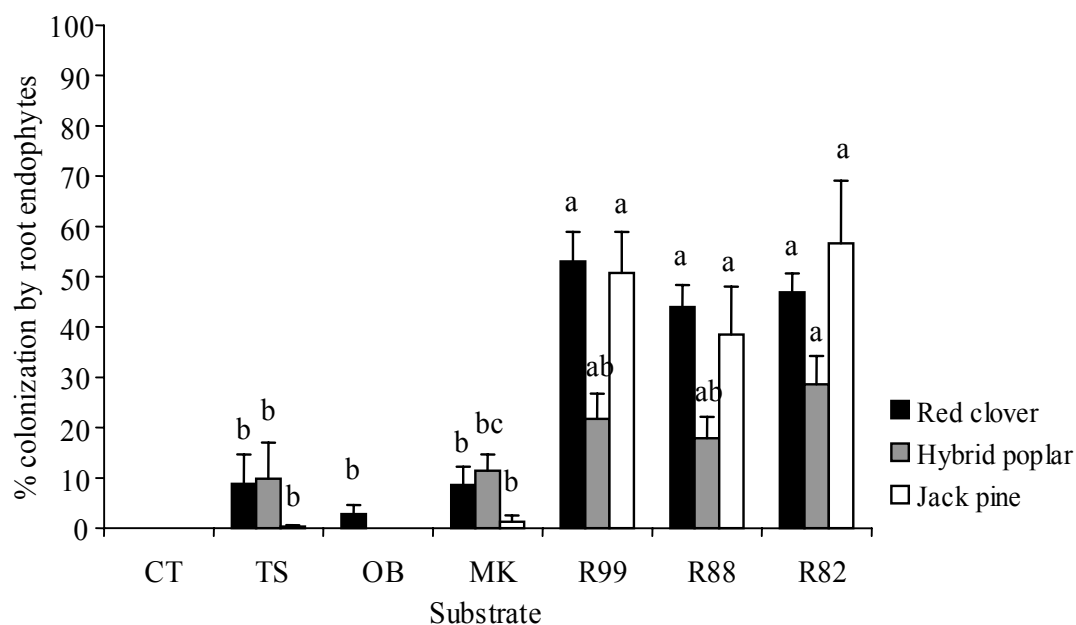


Figure 2.1 Percentage colonization by root endophytes observed on plants grown on composite tailings (CT), tailing sands (TS), deep overburden (OB), muskeg peat (MK) and soil from sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99). Root endophytes of red clover and hybrid poplar are AMF. Jack pine colonization includes DS fungi and a fine root endophyte. Means within a plant species with the same letter are not significantly different at the 5% level according to Duncan's multiple range test.

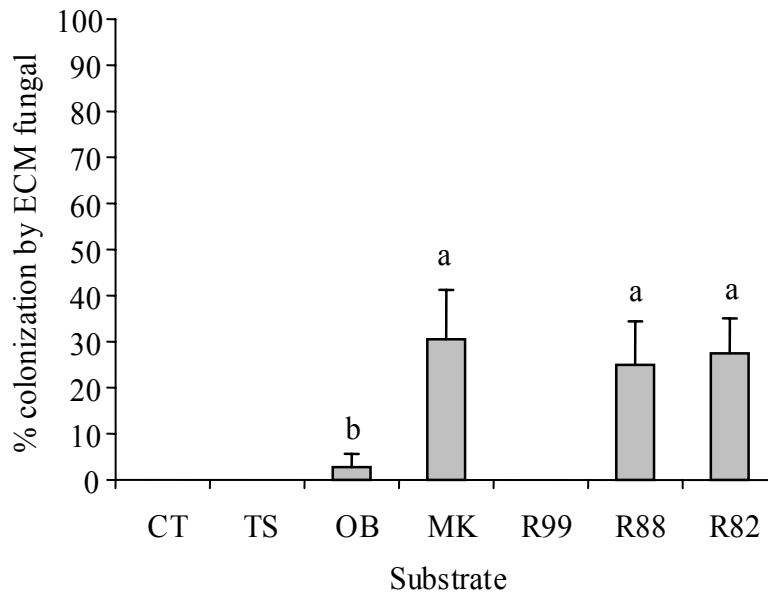


Figure 2.2 Percentage colonization by ECM fungi on jack pine seedlings grown on composite tailings (CT), tailing sands (TS), deep overburden (OB), muskeg peat (MK) and soil from sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99).

Means with the same letter are not significantly different at the 5% level according to Duncan's multiple range test.

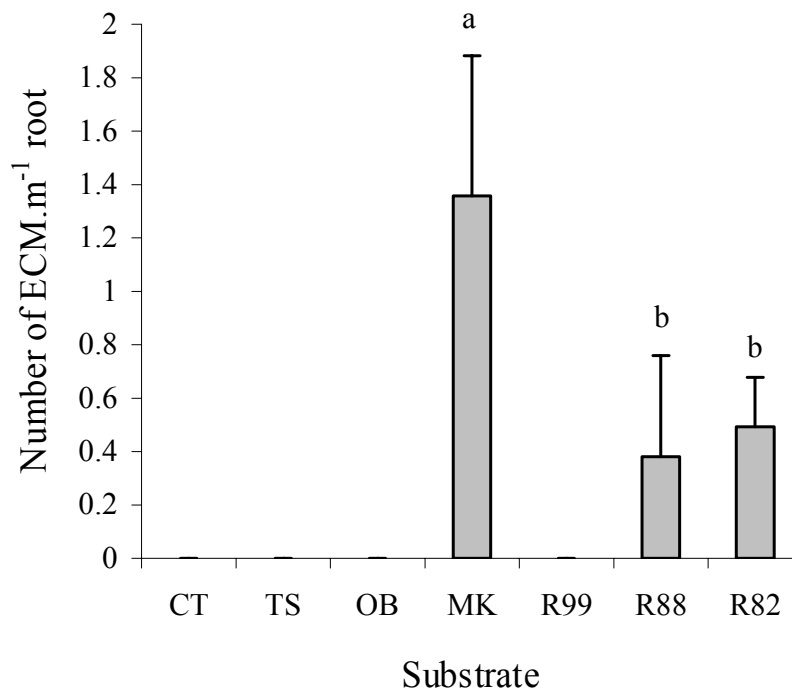


Figure 2.3 ECM colonization expressed as the number of mycorrhiza per meter of root on hybrid poplar bioassays grown on composite tailings (CT), tailing sands (TS), deep overburden (OB), muskeg peat (MK) and soil from sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99).

Means with the same letter are not significantly different at the 5% level according to Duncan's multiple range test.

2.6.2 Mycorrhizal status and typing

All control seedlings were non-mycorrhizal and none of the bioassay species formed AM or ECM structures when grown on CT. Typical *Arum*-type (Gallaud 1905, Smith & Read 1997) colonization was observed on roots infected by AMF. Arbuscules were frequently observed in

red clover roots, however fewer arbuscules and higher numbers of vesicles were observed on poplar roots (data not shown). Cortical cells of jack pine and poplar roots grown in R82, R88 and R99 were colonized by an unidentified fine endophyte with non-septate hyphae, from which developed small vesicles (20 µm diam.) but no arbuscules. Of those substrates where AM were observed, OB, TS and MK had AMF colonization levels lower than 10% (Figure 2.1). Reclaimed sites had the highest AM inoculum potential of all substrates tested. In addition, dark septate (DS) fungi (based on the presence of microsclerotia) were recorded in jack pine roots grown in R82 and R99.

With regards to ECM fungi, one should consider that molecular typing using PCR-RFLP and sequencing analyses of the ITS region is not an absolute identification and some degrees of uncertainty remain. Overall, six ribotypes were distinguished using ITS-RFLP (Table 2.5) and sequencing. By comparison with RFLP patterns from the in-house and BCERN database (www.pfc.forestry.ca/biodiversity/bcern/), three of the six fungi were identified at least to the genus level. These species were *Thelephora Americana* Lloyd, *Laccaria* sp. and *Tuber* sp. For the other three, an E-strain fungus (*Wilcoxina* sp.) was identified using the patterns presented by Sakakibara *et al.* (2002) and the last two species were identified to the family level by sequencing. Of the latter, one was a Sebacinoid species (97% homology with the 18S-28S subunit; accession number: AF440656) and the other a Pezizales species (92% identity with the 18S-28S subunit and 100% homology in the ITS1 region; accession number: AF266709). While molecular identification of *Laccaria* sp., *Tuber* sp., Pezizales and Sebacinoid species agreed with

Table 2.4 Correlation analysis of soil properties, mycorrhizal status and plant growth parameters across all substrate types (n = 7).

Soil properties and mycorrhizal status	Jack pine					Hybrid poplar					Red clover			
	Shoot:Root	Total fresh biomass	Root length	ECM	Root endophytes	Shoot:Root	Total fresh biomass	Root length	ECM	AMF	Shoot:Root	Total fresh biomass	Root length	AMF
S	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P	ns	0.799**	0.723*	ns	ns	0.887***	ns	ns	0.927***	ns	ns	ns	ns	ns
Ca	ns	ns	ns	ns	ns	0.679*	-0.719*	-0.714*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Mg	ns	0.731*	ns	ns	ns	0.942***	ns	ns	0.892**	ns	ns	ns	ns	ns
Na	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
K	ns	ns	ns	0.752*	ns	0.809*	-0.764**	ns	0.763**	ns	ns	ns	ns	ns
C/N	ns	0.808**	0.850**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
EC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.725*	-0.730*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Clay	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.818**	-0.805*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Silt	ns	ns	ns	ns	ns	-0.860**	-0.996***	-0.940***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sand	ns	ns	ns	ns	ns	-0.768*	0.953***	0.918***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ECM	ns	ns	ns	1.000	na	0.916***	ns	ns	1.000	na	na	na	na	na
AM	na	na	na	na	na	ns	ns	ns	na	1.000	0.887***	0.932***	0.980***	1.000
Root endophytes	0.820**	ns	ns	na	1.000	na	na	na	na	na	na	na	na	na

*, **, ***: significantly different at 10%, 5%, 1% level respectively; ns = not significant; na = not applicable.

S, P, Ca, Mg, Na, K = $\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1}$; EC (electrical conductivity) = $\mu\text{S cm}^{-1}$; Clay, Silt, Sand = % soil mass; ECM fungi (jack pine) = % root tips colonized; ECM fungi (hybrid poplar) = number of ECM m^{-1} root; AMF, root endophytes = % root length colonized; total fresh biomass = grams/ plant; root length (jack pine) = cm; root length (hybrid poplar, red clover) = m.

morphotype grouping, mycorrhizas of *T. americana* and *Wilcoxina* sp. were variable in appearance, which lead to occasional inconsistencies between the analyses. Composite tailings, TS and R99 had no ECM inoculum potential (Figure 2.2 and Figure 2.3). Among soil with ECM fungi, deep OB had the lowest ECM inoculum potential with the Sebacinoid species lightly colonizing roots (not higher than 14%) of jack pines. Muskeg peat and reclaimed sites had the highest ECM inoculum potentials of all substrates tested. The ECM status of jack pine was positively correlated with potassium and the ECM status of poplar plants was positively correlated with phosphorus, magnesium and potassium content.

Table 2.5 ITS-RFLP patterns of ECM fungi found in deep overburden (OB), muskeg peat (MK) and soil from sites reclaimed in 1982 (R82), 1988 (R88) and 1999 (R99).

Fungal species	Host	Soil type	Primer pair**	Enzymes	Molecular weight (bp)						
Sebacinoid sp.	Pine	OB, R88	ITS 1/NL6Bmun	HinfI	325	160	105				
				AluI	675	175	110				
				RsaI	470	(340)*	260	225			
<i>Thelephora americana</i>	Pine	MK	ITS 1/NL6Bmun	HinfI	(545)	325	265	175	160	(110)	
				AluI	(715)	555	190	155	120		
				RsaI	780	(445)	(330)	210			
<i>Laccaria</i> sp.	Pine	MK	ITS 1/NL6Bmun	HinfI	(440)	(360)	290	215	155	135	
	Poplar	MK, R82		AluI	435	240	190	(115)			
				RsaI	980	185					
Pezizales sp.	Pine	R82	ITS 1/NL6Bmun	HinfI	365	280	175	110			
	Poplar	R82		AluI	405	195	155	115			
				RsaI	460	215	170	105			
<i>Wilcoxina</i> sp. (E-strain)	Pine	R82, R88	ITS 1/NL6Bmun	HinfI	500	185	170	(135)			
	Poplar	R82	ITS 1/NL6Amun	AluI	400	260	180	(115)			
				RsaI	685	185					
<i>Tuber</i> sp. (I-type)	Pine	R82, R88	ITS 1/NL6Bmun	HinfI	300	270	180	135			
	Poplar	R88	ITS 1/NL6Amun	AluI	450	185	145	125			
				RsaI	330	300	260				

* Molecular weights in parenthesis correspond to low intensity bands.

** NL6Bmun appeared to be able to amplify ascomycetes DNA even though it worked preferentially on basidiomycete DNA. The same RFLP patterns were recovered with NL6Amun or NL6Bmun. These primer pairs specifically amplified fungal DNA as the same RFLP patterns were obtained from pine or poplar mycorrhizas.

2.7 Discussion

2.7.1 Inoculum potential of pure reclamation materials

Symbiotic fungi are not expected to occur in tailing sands, which originate from deep old geologic materials that are further sterilized by the oil extraction processes. This is supported by our results which showed that CT lacked mycorrhizal propagules. By contrast, TS cores, which came from an older landfill site than the CT, showed a low inoculum potential. Zak & Parkinson (1982, 1983) also reported re-colonization of TS. In the present study, TS cores were collected 20 m from the edge of R99 and the vicinity to this site with a high AM inoculum potential probably accounted for the colonization of TS by AM propagules. Deep OB materials also originate from deep below the soil surface, and showed a low AM and ECM inoculum potential. The Sebacinoid species found in OB might have originated from topsoil residues remaining in the vehicles used to transport OB to the dump site. The low biomass of clover grown in OB was probably induced by the low AM inoculum potential as these two variables were strongly correlated. Furthermore, plant survival together with the negative correlation between poplar biomass and clay and silt content and EC indicates that OB was the most unfavorable substrate for plant growth. One should consider that CT and TS were slightly enriched with mineral N what could have enhanced their fertility compared to OB. Muskeg peat, the only pure material collected from the top of the geologic profile, had the highest ECM inoculum potential. This peat originated from mature stands dominated by ectomycotrophic plant species, which probably explains the high ECM and the low AM fungal inoculum potentials observed. Peat is a slow decaying organic substrate and probably benefits ECM fungi rather than AM fungi (Marschner & Dell 1994), the former being able to access organic nitrogen, which is the dominant nitrogen form in peat (Abuzinada & Read 1989, Vogt *et al.* 1991, Finlay *et al.* 1992, Marschner & Dell 1994, Northup *et al.* 1995).

2.7.2 Inoculum potentials of reclaimed sites

The AM status of clover plants was highly correlated with plant biomass, which was higher on reclaimed sites with high AM inoculum potentials than on MK with a low AM inoculum potential. Reclaimed sites were colonized by pioneer herbaceous species capable of maintaining a high AM inoculum potential. Time since reclamation did not affect clover biomass or AM

inoculum potentials. Although percentage colonization was equivalent between the reclaimed sites, effect of site age could have an impact on the diversity of AMF encountered on these sites. The youngest reclaimed site, R99, was characterized by the highest richness of invading forbs and grasses while older sites, R82 and R88, had a lower number of forbs and grass species. According to van der Heijden *et al.* (1998), increasing plant biodiversity is concomitant with increasing AMF species richness; therefore, R99 had the potential to support a higher diversity of AMF.

The two older reclaimed sites, R82 and R88, had high inoculum potentials of both ECM and AM fungi, whereas MK and R99 had high inoculum potentials of only one of these fungal types. The site reclaimed in 1999 was the only one revegetated with *Picea glauca* (Moench) Voss and *Populus tremuloides* Michx. and not with *P. banksiana*, which may have reduced the number of ECM species compatible with the jack pine bait plants. Nevertheless, these three host species share a number of mycorrhizal species (*e.g.*, *T. americana*, *Wilcoxina* sp.) that we encountered on the older reclaimed sites. Therefore, difference in host species used for revegetation could not alone account for the difference between sites. By contrast with AM inoculum potentials, ECM inoculum potentials seemed to be dependent on the age of reclaimed sites and the plant community successional stage. The two-year-old reclaimed site (R99) was colonized by early succession plant species such as *Draba nemorosa* L. (non-mycorrhizal), while the 14- and 20-year-old sites (R88 and R82) were dominated by ectomycotrophic species (Table 2.1). Therefore, the vegetation succession present on R88 and R82 (age of trees and plant community composition) probably enhanced the presence of ECM fungi as suggested in a review by Malajczuk *et al.* (1994). Once ECM host species are able to successfully establish on a site, they produce a “stable” inoculum source through the maintenance and support of a dynamic hyphal network. This network is thought to represent the principal mechanism by which individual mycorrhizal fungi expand in undisturbed natural systems (Brundrett *et al.* 1996b). In addition to plant community succession, differences between reclaimed sites may also have been generated by three uncontrollable factors: (i.) differences in the origin of tailings and their management due to technological developments; (ii.) variability in application rates (or dilution rates) of the amending materials, OB and MK; and (iii.) the new revegetation practice used for the R99 site which comprised planting barley following the amendment to stabilize the substrate before tree planting. The latter practice could favor AM and limit ECM inoculum potential.

Jack pine is one of the main species used for revegetation of reclaimed mine sites in Alberta. However, R99 which was reclaimed to support tree revegetation, generated pine seedlings with the lowest biomass production. Three reasons may explain poor growth of jack pine on R99. Firstly, the absence of ECM fungal propagules in this soil would be expected to result in a lower biomass production (Jonsson *et al.* 2001) than those of trees growing on reclaimed sites having a higher ECM inoculum potential. Furthermore, as no arbuscules were observed on the “fine endophyte” colonizing pine roots, there was no evidence of a mutualistic association between the host and the fungus which could simply occupy the root without benefiting the plant (Johnson *et al.* 1997). Even if the association was symbiotic, this endophyte species might not be able to access nutrients from complex organic substrates. Moreover, it could be parasitic during early stages of the association (Johnson *et al.* 1997). Secondly, Jumpponen & Trappe (1998) showed that DS fungi may be pathogenic. Therefore, DS fungi colonizing jack pine seedlings on R99 could have a neutral or negative effect on pine growth. Thirdly, a soil parameter, such as the significantly higher level of sulfate salt (Table 2.2), could limit jack pine growth in R99 (Apostol *et al.* 2002).

2.7.3 ECM fungal identification

Because of imprecision in the ITS-RFLP and sequencing techniques used (Glen *et al.* 2001), fungal identification was limited to the family or genus level rather than to the species level. In spite of this limitation, of the six fungi ribotyped, four were of taxa commonly found on disturbed sites (*e.g.*, Danielson *et al.* 1983b, Danielson & Visser 1989, Danielson 1984, 1991, Visser 1995). In the present study, *Laccaria* sp. and *Wilcoxina* sp. were the most frequently recorded. Danielson (1984) reported that *Laccaria proxima* (Boud.) Pat. was one of the most common symbionts encountered on disturbed sites in northern Alberta and this species possibly corresponds to the *Laccaria* sp. observed in this study. *Thelephora americana* is an early-stage fungus on disturbed sites in the boreal forest with a wide host range, however in the present study it was observed on pine roots but not on poplar.

The Pezizales species found in our study corresponds to a *Pyronemataceae* sp. recorded on plants grown in soil of ancient forests of *Pinus longaeva* DK Bailey located at an elevation of 2800-3500 m in the White Mountains of California (Bidartondo *et al.* 2001). The authors found this

fungus to be dominant on substrates of low inoculum potential from harsh environments. These ancient forest soils were alkaline, which suggests that this ECM species is tolerant to high pH. The Sebacinoid species was recovered from OB, the second most alkaline substrate used. Sebacinoid species belong to the *Rhizoctonia* group of the heterobasidiomycetes and were traditionally considered as mycoparasitic and/or saprophytic fungi. Selosse *et al.* (2002) reported two species able to form symbiotic associations with orchids and ECM host plants. One of these species corresponds to the species found on jack pine roots in the present study. To the best of our knowledge this species has never been described as an early-stage disturbance tolerant mycorrhizal species. Furthermore, the Sebacinoid ecotype recorded in the present study has eventually undergone ecological adaptation (Molina *et al.* 1992) allowing tolerance to salinity and is therefore of interest for future CT revegetation programs.

The ectendomycorrhizal E-strain fungus and the I-type fungus (the *Tuber* sp. found in the present study may correspond to the I-type fungi described by Danielson & Visser (1989)) have already been recorded in this area (Danielson 1982, Danielson *et al.* 1983b, Danielson & Visser 1989, Visser 1995). Danielson *et al.* (1983b) found that mixing sand or OB with MK enhanced colonization by E-strain and that the I-Type fungus was the main colonizer on pure MK. In the present study, both fungi occurred on plants grown in reclaimed soil from R82 and R88, but were absent in R99.

In conclusion, CT and TS were devoid of active ECM propagules. However, native mycorrhizal fungi occurring in MK enhanced ECM inoculum potentials of TS reclaimed in 1982 and 1988. Nevertheless, all substrates were characterized by low levels of diversity and percentage colonization (< 50%) by ECM. This greenhouse bioassay gives minimum value for inoculum potential of the substrates assessed (Brundrett *et al.* 1996a). Such an experiment was inherently limited to the pool of fungal species that would colonize seedlings in greenhouse conditions following soil sampling disturbance on the mycelial network. Hence, colonization rates and species diversity from *in situ* bioassay studies would be expected to be higher. This is supported by results from an on going greenhouse bioassay experiment, using soil from other reclaimed sites in the same area, which indicates the presence of *Cenococcum geophilum* Fr., *Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick and *Suillus luteus* (L. ex Fr.) SF Gray. Although jack pine is commonly used in the revegetation of reclaimed TS, it requires colonization by ECM

fungi in order to survive and grow in natural conditions. On hostile substrates such as saline alkaline CT, controlled inoculation of seedlings in the nursery with selected strains of mycorrhizal fungi could compensate for the low natural inoculum potential and improve survival and growth of tree seedlings after outplanting.

2.8 Acknowledgments

This research was funded by Syncrude Canada Ltd. and NSERC (CRDPJ 250448-01 to D.P.Khasa). We want to thank Jean-Luc Jany for stimulating discussions and advices; Andrew Coughlan, Sylvain Lerat and Neree Oguene Awana for critically readings an earlier version of the manuscript. Field work was done with the assistance of Robert Proudfoot. André Gagné was of a critical importance for molecular analysis. Soil analyses were performed by Alain Brousseau (Laval University, Quebec, Canada). Julie Samson provided advice for hybrid poplar cultivation and we would like to thank Julie Talbot for all her support.

Chapitre 3 Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations

3.1 Avant-propos

Les résultats présentés dans ce chapitre sont sous presse dans le journal *Mycorrhiza* (Bois, Bertrand, Piché, Fung & Khasa 2005a). Les analyses biochimiques ont été réalisées en collaboration avec Annick Bertrand (Agriculture Canada, Québec). Les professeurs Damase Khasa et Yves Piché ont fourni l'encadrement scientifique. Martin Fung est intervenu pour la définition des besoins de l'industrie et fut la personne ressource au sein du bureau des affaires environnementales à Syncrude Canada Ltd. L'expérience précédente (Chapitre 2) a montré que les substrats à végétaliser ne disposent que d'un faible potentiel inoculant et ainsi que la sélection de champignons résistants est une solution intéressante pour l'inoculation de semis de pépinière. Pour faire suite à ce résultat, l'expérience 2, présentée dans ce chapitre, a permis de décrire la stratégie d'adaptation du mycélium en culture pure en réponse au stress sodique et ainsi de suggérer que les isolats provenant du terrain ont un meilleur potentiel pour la sélection que des champignons issus d'une mycothèque.

3.2 Résumé

L'industrie exploitant les sables bitumineux dans le Nord-Est de l'Alberta produit de vastes étendues de terrains fortement perturbés. La sodicité de ces sols anthropiques est une des principales contraintes freinant leur végétalisation. Précédemment, des études *in vitro* ont montré que les champignons ectomycorhiziens (ECM), *Laccaria bicolor* (Maire) Orton UAMH 8232 et *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Quel. UAMH 5247, présentent certains traits de résistance à l'excès de sel et qu'ils sont donc des espèces potentielles pour l'inoculation de semis destinés à la végétalisation de terrains sodiques. Dans la présente recherche, le développement *in vitro* de ces champignons a été comparé à celui de trois champignons mycorhiziens (*Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick, *Hymenoscyphus* sp. & *Phialocephala* sp.) isolés d'un terrain sodique généré par Syncrude Canada Ltd. Leur croissance et leur contenu en osmolytes organiques, en Na et en Cl ont été évalués en présence d'une gamme de concentrations en NaCl (0, 50, 100 et 200 mM) dans le milieu de croissance. Après 21 jours, les deux ascomycètes (*Hymenoscyphus* sp. and *Phialocephala* sp.) ont montré une plus grande résistance aux traitements de NaCl que les trois espèces de basidiomycètes. Des basidiomycètes, *L. bicolor* était le plus sensible au stress engendré par le NaCl alors que *H. crustuliniforme* a montré une plus grande résistance au stress, tandis que l'isolat de *S. tomentosus* a dévoilé la plus grande capacité de filtration du Na^+ et du Cl^- tout en favorisant le plus grand rendement en biomasse pour le gradient de NaCl testé. Les deux ascomycètes ont utilisé des mécanismes autres que l'accumulation de sucres pour pallier le stress induit par le NaCl. Alors que l'isolat d'*Hymenoscyphus* sp. a accumulé de la proline en réponse aux traitements de NaCl, l'isolat de *Phialocephala*, plus sombre, a pu employer des composés tels que la mélanine. Les espèces basidiomycètes ont accumulé principalement du mannitol et/ou de la proline en réponse aux concentrations croissantes de NaCl.

3.3 Abstract

The oil sand industry in northeastern Alberta produces vast areas of severely disturbed land. The sodicity of these anthropic soils is one of the principal constraints that impedes their revegetation. Previous *in vitro* studies have shown that the ectomycorrhizal (ECM) fungi, *Laccaria bicolor* (Maire) Orton UAMH 8232 and *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Quel. UAMH 5247, have certain salt resistant traits and thus, are candidate species for the inoculation of tree seedlings to be outplanted on salt-affected soil. In this study, the *in vitro* development of these fungi was compared to that of three mycorrhizal fungi (*Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick, *Hymenoscyphus* sp. and *Phialocephala* sp.) isolated from a sodic site created by Syncrude Canada Ltd. Their growth and their organic osmotica, Na and Cl contents were assessed over a range (0, 50, 100 and 200 mM) of NaCl concentrations in the growth medium. After 21 d, the two ascomycetes (*Hymenoscyphus* sp. and *Phialocephala* sp.) were shown to be more resistant to the NaCl treatments than the three basidiomycete species. Of the basidiomycetes, *L. bicolor* was the most sensitive to NaCl stress while *H. crustuliniforme* showed greater water stress resistance and the *S. tomentosus* isolate exhibited greater Na⁺ and Cl⁻ filtering capacities and had a better biomass yield over the NaCl gradient tested. Both ascomycetes used mechanisms other than carbohydrates accumulation to palliate NaCl stress. While the *Hymenoscyphus* isolate accumulated proline in response to NaCl treatments, the darker *Phialocephala* isolate may have used compounds such as melanin. The basidiomycete species accumulated mainly mannitol, and/or proline in response to increasing concentrations of NaCl.

3.4 Introduction

Naturally or anthropically created soil sodicity is a cosmopolitan edaphic stress that reduces soil fertility and that drastically affects growth and survival of glycophytes (Brady & Weil 2002, Essington 2004). Living cells are affected by salt stress through disturbance of their osmotic homeostasis. Hyperosmotic stress in plants and fungi are associated with inhibition of cell wall extension and cellular expansion, leading to a reduction in growth (Yeo 1983, Luard 1985, Coleman *et al.* 1989, Clipson & Jennings 1992, Niu *et al.* 1995, Hasegawa *et al.* 2000). Cells under salt stress initially accumulate salts as free osmotica; however, a toxic specific ion effect appears once a certain threshold level of Na and/or Cl accumulation has been reached. An excess of these ions may alter membrane integrity, enzymatic activity, and protein and nucleic metabolism (Yeo 1983, Gadd 1993, Niu *et al.* 1995, Niu *et al.* 1997, Hasegawa *et al.* 2000, Posas *et al.* 2000, Zhu 2001, 2002, Mansour & Salama 2004). A living organism is considered resistant by avoidance to a given physico-chemical stress if it is able to exclude, either partially or completely, the intracellular penetration of the toxicant. By contrast, providing that the organism grows and survives, it is resistant by tolerance if it allows penetration of the toxicant and uses this process to reduce the external stress effects on its metabolism (Levitt 1980, Segner & Braunbeck 1998). Strategies conveying salt tolerance are thought to involve protection of cell metabolism functions by compartmentalization (*e.g.*, vacuolization) of excess ions while using the available salts (in a controlled amount) and small organic solutes for osmotic adjustment (Clipson & Jennings 1992, Niu *et al.* 1995, Niu *et al.* 1997, Yeo 1998, Posas *et al.* 2000). Organic compounds used as osmotica are often referred to as compatible solutes, because they can accumulate to high concentrations, but do not interfere with cell metabolism (Brown & Simpson 1972). Polyols, such as mannitol, arabitol and glycerol, and non-reducing saccharides, such as trehalose, are the main soluble carbohydrates found in basidiomycetes and ascomycetes (Lewis & Smith 1967) including those species forming ectomycorrhiza (Lewis & Harley 1965, Söderström *et al.* 1988). Levels of mannitol, glycerol and trehalose, and some other metabolites, such as the proline imino-acid, have been observed to increase in fungi under osmotic stress (Lewis & Smith 1967, Jennings & Burke 1990, Shen *et al.* 1999) and freezing (Takagi *et al.* 1997, Tibbett *et al.* 2002). In fungi, trehalose is used as a reserve carbohydrate. However, it also serves as a protectant against cell damage induced by nutrient limitation, heat shock, oxidative stress and reduced osmotic potential (Arguelles 2000) as it favors stabilization of membranes and proteins

(Crowe *et al.* 1984, Wiemken 1990). Mannitol and glycerol are also potential osmoprotectants (Shen *et al.* 1999, Tibbett *et al.* 2002). The latter is known to accumulate in the yeast *Saccharomyces roxii* in response to decreased external osmotic potential (Brown & Simpson 1972), and in response to salinity in a number of other fungi (Jennings 1983, 1984). The water-like hydroxyl group of polyols allows them to form an artificial sphere of hydration around macromolecules, thus preventing metabolic inactivation under conditions of low osmotic potential (Galinsky & Truper 1994).

The majority of higher plants forms mutualistic symbiosis with mycorrhizal fungi. In return for a carbohydrate supply from the host, the root-inhabiting fungi enhance plant mineral nutrition (Read 1991) and facilitate plant establishment in sites subjected to various edaphic stressors. Osmotic stress (*e.g.*, drought) or toxicity by certain elements (*e.g.*, heavy metals) in the soil can be reduced by associations with ectomycorrhizal (ECM) fungi (Kropp & Langlois 1990, Kottke 1992, Malajczuk *et al.* 1994, Marschner & Dell 1994, Pflieger *et al.* 1994, Smith & Read 1997, Jentschke & Goldbold 2000). In northeastern Alberta (Canada), the mining activities of the oil sand industry create vast amounts of sodic sand tailings. The latter are reclaimed by overlaying with local topsoil material, and then revegetated by planting nursery grown trees. However, due to manipulations and stockpiling, the organic material used to amend the sites has a low ECM inoculum potential (Bois *et al.* 2005d). Therefore, the inoculation of coniferous trees with salt resistant ECM fungi prior to outplanting on salt-affected sites could favor host growth and survival. Dixon *et al.* (1993) showed that other ECM basidiomycetes such as *Laccaria laccata* (Scop.: Fr.) Cooke and *Pisolithus tinctorius* (Mich.: Pers.) Coker & Couch, could help improve host tolerance to saline conditions. In addition, Chen *et al.* (2001a) showed, *in vitro*, that most of 18 isolates of Australian *Pisolithus* spp. tested were tolerant of concentrations of NaCl and Na₂SO₄ exceeding 200 mM.

Several studies investigating metal tolerance of mycorrhizal fungi have shown inter- and intra-specific growth differences between ECM fungal isolates from unpolluted and polluted sites (Colpaert *et al.* 2000, Sharples *et al.* 2000, Formina *et al.* 2005). By contrast, little work has been done on ECM fungal ecotypes from salt-affected sites. An *in vitro* study by Kernaghan *et al.* (2002), suggested that *Laccaria bicolor* (Maire) Orton UAMH 8232 and *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Quel. UAMH 5247 were potential candidate species for use under

conditions of salt stress. Nonetheless, these species were selected from isolates originating from non-saline sites. In a preliminary study, we isolated three ECM / ectendomycorrhizal fungal species from a sodic site at Syncrude Canada Ltd.: *Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick, *Hymenoscyphus* sp. and *Phialocephala* sp. As these latter three fungal isolates have potentially undergone selection for adaptation to excess salt and other stresses found on sodic sites, it was hypothesized that these isolates be similarly or more resistant to NaCl than the two previous species selected from an existing *in vitro* collection (Kernaghan *et al.* 2002). To test this hypothesis, growth of all fungi was assessed over a range of NaCl concentrations. The species were compared using *in vitro* radial growth and biomass yields. Furthermore, their individual salt resistance strategies were characterized by evaluating the water, Na, Cl, trehalose, mannitol, glycerol and proline content of the mycelia at the different NaCl concentrations used.

3.5 Materials and methods

3.5.1 Origin and growth conditions of the fungi

Laccaria bicolor UAMH 8232 and *H. crustuliniforme* UAMH 5247 were obtained from the University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium (Sigler & Flis 1998). The *Suillus*, *Hymenoscyphus* and *Phialocephala* isolates were obtained from mycorrhizal root tips of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) and white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) bait plants grown under greenhouse conditions in soil collected from a sodic site at Syncrude Canada Ltd. (AB, Canada). Control plants that were grown in sterile soil with the same conditions were non-mycorrhizal. The genera were identified by sequencing purified amplicons using DNA extracts from pure mycelium amplified with the primers ITS1 and ITS4 (Operon-Qiagen, Alameda, CA, USA). Sequencing was done using the BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) and an ABI genotype 3100 automated sequencer (Applied Biosystems, CA, USA). The sequences obtained were subjected to the Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) sequence homologies search engine. The *Suillus* isolate showed 99% homology with *S. tomentosus* (accession number U74614) and 98% homology with *Suillus varietagus* (Schwein.) Kuntze (accession number AJ272418). Phylogenetic analyses confirmed this species to be *S. tomentosus*, a species morphologically and genetically (ITS) very similar to the European taxon *S. varietagus* (den Bakker personal communication). The *Hymenoscyphus* isolate showed 93 % homology with an unidentified *Hymenoscyphus* sp. (accession number AF081435). The *Phialocephala* isolate showed 99% homology with *Phialocephala fortinii* Wang & Wilcox (accession number AY078134).

The fungi were grown on modified Melin-Nokrans medium (MNM) (Marx 1969), which contains in one liter of distilled water: 0.05 g CaCl₂, 0.025 g NaCl, 0.5 g KH₂PO₄, 0.25 g (NH₄)₂HPO₄, 0.15 g MgSO₄·7H₂O, 0.03 g FeCl₃, 100 µg thiamine-HCl, 3 g malt extract, 10 g glucose, and 10 g agar. To allow sampling of the mycelia without contamination by sugars or NaCl contained within the medium, a disc of sterilized cellophane was placed on the solidified medium prior to inoculation with a plug of mycelium. The sodic stress was applied by amending MNM to either 0, 50, 100, 200 or 300 mM NaCl. These concentrations are in addition to the 0.025 g of NaCl (or

0.5 mM) found in the MNM medium. Fungal cultures were incubated for 21 d in the dark at 23°C.

3.5.2 Radial growth and biomass yield

The radial growth of each species was monitored on four replicates every 3 d for 21 d. For each colony, radii were measured on two perpendicular axes bisecting the center of the colony and the mean calculated. At the end of the experimental period, all mycelia were detached from the cellophane and the fresh biomass measured. Each sample was oven-dried at 65°C for 3 d and the dry biomass recorded. Colony density was calculated as a function of the dry biomass and of the average surface area of the colony for each NaCl treatment. The surface area was calculated using the mean radius of the colony. Growth of the latter was assumed to be circular. The weight of the inoculum plug was included in dry biomass measures but was considered a negligible bias for between treatments comparisons.

3.5.3 Tissue analyses

Trehalose, mannitol, glycerol and proline contents were evaluated from 0.3 g of fresh mycelium. The mycelium from three colonies was pooled to give a single replicate and three replicates per fungus were analyzed for each NaCl treatment. The mycelium was ground in liquid N prior to extraction in 6 ml of a methanol:chloroform:water (12:5:3, v/v/v) solution. The samples were incubated (30 min) at 65°C to stop enzymatic activity. Tubes were centrifuged (10 min at 14 000 x g) and 1 ml of the supernatant was collected. To induce phase separation, a 0.250 ml aliquot of water was added to the extract. After shaking, the tubes were centrifuged (10 min at 13 000 x g) and the aqueous phase collected. A 1 ml subsample was collected for proline determination and a second was evaporated to dryness on a rotary evaporator, solubilized in 1 ml of water and stored at -80°C prior to analysis by HPLC. Samples were centrifuged (3 min at 13 000 x g) prior to HPLC analysis. The HPLC analytic system was controlled by WATERS Millennium³² software (WATERS, Milford, MA, USA) and comprised a Model 515 pump and a Model 717^{plus} autosampler. Sugars were separated on a WATERS Sugar-Pak column (6.5 × 300 mm) eluted isocratically at 85°C at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹ with EDTA (Na⁺, Ca²⁺, 50 mg L⁻¹) and detected on a refractive index detector (Waters, Model 2410). The WATERS Sugar-Pak column could not easily discriminate between sucrose and trehalose, thus all samples were

subsequently separated on a Bio-Rad Aminex HPX-87P column (7.8×300 mm) eluted isocratically with water at 85°C and detected on a refractive index detector (Waters, Model 2410). Peak identity and sugar quantity were determined by comparison to standards.

For proline determination, a $500\ \mu\text{l}$ aliquot of the $1\ \text{ml}$ subsample was mixed with $300\ \mu\text{l}$ of a ninhydrine solution ($0.125\ \text{g}$ of ninhydrine dissolved in $5\ \text{ml}$ of H_3PO_4 ($6\ \text{M}$):glacial CH_3COOH , $2:3$, v/v) and $200\ \mu\text{l}$ glacial CH_3COOH) (Paquin & Lechasseur 1979). Each sample was thoroughly mixed and incubated at 100°C for $45\ \text{min}$. Samples were cooled prior to the addition of $800\ \mu\text{l}$ of toluene. After $45\ \text{min}$, the optical density (OD) of the upper phase (toluene) was assessed by spectrophotometry at $515\ \text{nm}$. The proline content was calculated from the regression curve of OD obtained from standard solutions of pure proline, ranging from 0 to $10\ \mu\text{g}$.

The mycelium of two dried colonies were pooled for each of three replicates and their Na and Cl contents were analyzed. Each replicate was crushed in $25\ \text{ml}$ of distilled water and incubated for $1\ \text{h}$ at room temperature. The Na and Cl content of the water was measured using an Optima 4300DV ICP (Perkin-Elmer ®).

3.5.4 Statistical analyses

The five fungal species and the five NaCl treatments were distributed according to a completely randomised factorial design. Data from response variables were analyzed as a two-way ANOVA using PROC GLM (SAS system, The SAS Institute, Cary, NC, USA). Assumptions of the ANOVA were checked prior to all analyses. Analysis of radial measurements included time repeat measurements. Contrast analyses were used to compare the different species responses along the sodicity gradient used. The NaCl effect was analyzed using polynomial contrasts. The fungal isolates were analyzed using the following contrasts: (i) *L. bicolor*, *H. crustuliniforme* (from an existing *in vitro* collection) vs *S. tomentosus*, *Hymenoscyphus* sp., *Phialocephala* sp. (isolated from a sodic site), (ii) *L. bicolor* vs *H. crustuliniforme*, (iii) *S. tomentosus* (basidiomycete) vs *Phialocephala* sp. and *Hymenoscyphus* sp. (ascomycetes), and (iv) *Phialocephala* sp. vs *Hymenoscyphus* sp.

3.6 Results

3.6.1 Growth and water content

All five species exhibited growth over all NaCl concentrations tested, however, there was a significant difference in colony size ($P < 0.001$), biomass yield ($P < 0.01$), mycelium density ($P < 0.001$) and water content ($P < 0.001$) (Figure 3.1, Table 3.1). The order in radial size (Figure 3.1a), for the different species, did not change over time and was identical to that observed at the time of harvest. Time had a significant ($P < 0.001$) linear interaction with the fungal isolate and NaCl concentration. Growth parameters measurements indicated that *L. bicolor* was the most sensitive fungus, with a strong decrease in radial growth and biomass yield in response to increasing NaCl concentrations. By contrast, the two ascomycete isolates showed a high resistance over all NaCl treatments. *Hebeloma crustuliniforme* and *S. tomentosus* exhibited similar growth response patterns to the NaCl gradient and were less sensitive to NaCl than *L. bicolor*.

Hebeloma crustuliniforme which, like *S. tomentosus*, showed planar as well as aerial hyphal development exhibited the lowest radial growth. By contrast, the remaining three species only exhibited planar growth. In treatments with less than 200 mM NaCl, *L. bicolor* exhibited a higher or similar radial growth to that of the *Hymenoscyphus* isolate and a much lower growth than the *Phialocephala* isolate. In the 200 mM and 300 mM NaCl treatments, radial growth of *L. bicolor* declined and became similar to, or lower than, that of the other basidiomycetes. Both of the ascomycete isolates maintained a high radial growth over all treatments compared to the basidiomycetes. The *Phialocephala* isolate tested exhibited the highest radial growth in all treatments. With the exception of *H. crustuliniforme*, the radial growth of the basidiomycete

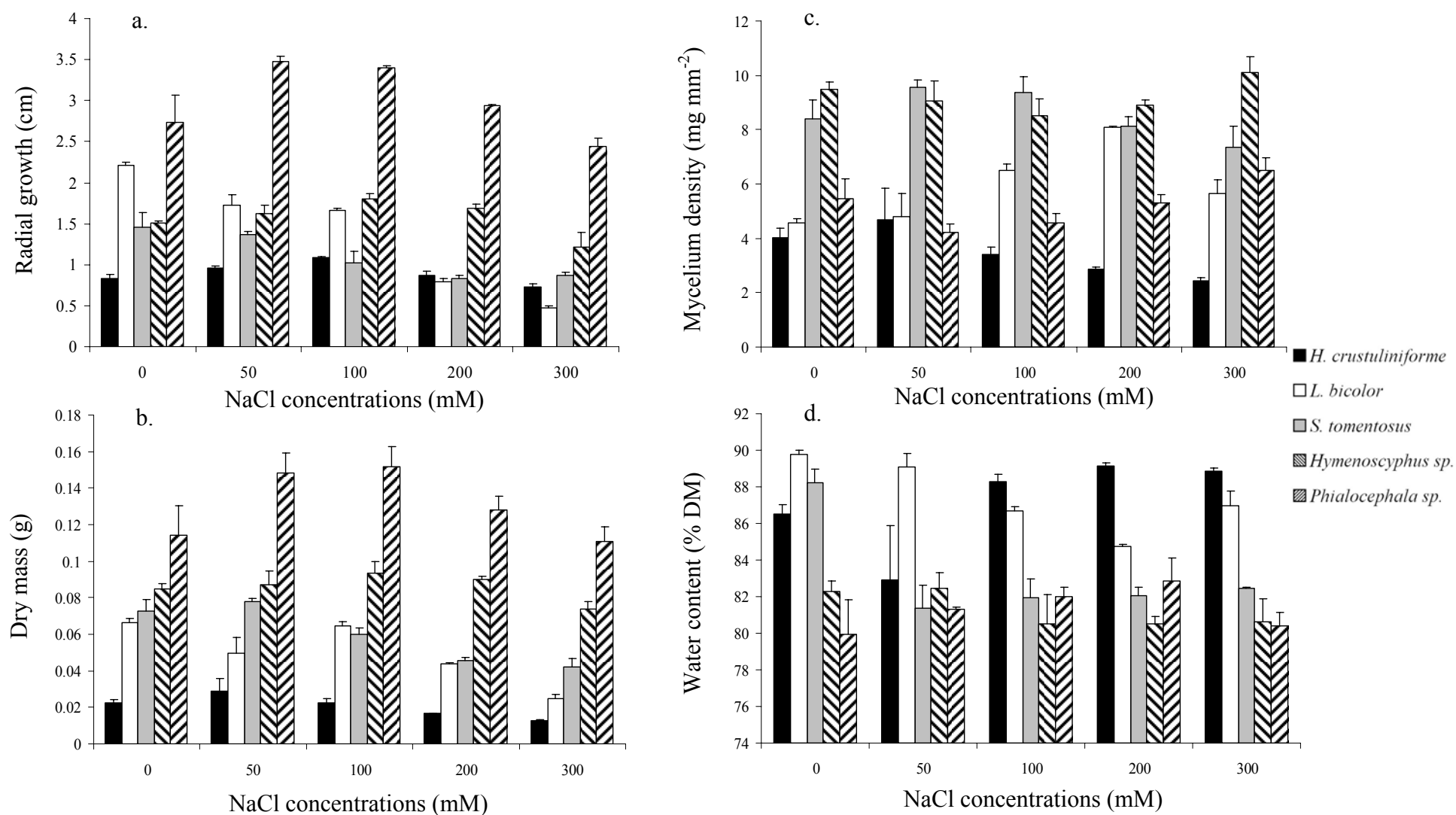


Figure 3.1 Growth and water content response of five mycorrhizal species (*H. crustuliniforme*, *L. bicolor*, *S. tomentosus*, *Hymenoscyphus* sp., *Phialocephala* sp.) growing at five NaCl concentrations during 21 days: a. maximum radial growth (means $\pm$ standard errors, $n = 4$), b. dry mass (DM) (means $\pm$ standard errors, $n = 3$), c. density (means $\pm$ standard errors, $n = 3$), and d. water content (means $\pm$ standard errors, $n = 3$).

Table 3.1 Significant F values from the two-way analysis of variance of radial growth (n = 4), dry mass (DM), water content and mycelium density (n = 3) of five mycorrhizal species (*H. crustuliniforme*, *L. bicolor*, *S. tomentosus*, *Hymenoscyphus* sp., *Phialocephala* sp.) at five NaCl concentrations

Sources of variation	DF	Radial growth	DM	Water content	Density
Between-subject variables					
Species (Sp)	4	372.64 ***	223.28 ***	48.01 ***	105.59 ***
<i>C1</i>	<i>1</i>	<i>693.07 ***</i>	<i>502.35 ***</i>	<i>179.07 ***</i>	<i>195.64 ***</i>
<i>C2</i>	<i>1</i>	<i>22.26 ***</i>	<i>55.59 ***</i>	<i>ns</i>	<i>55.28 ***</i>
<i>C3</i>	<i>1</i>	<i>220.83 ***</i>	<i>204.87 ***</i>	<i>12.82 ***</i>	<i>22.74 ***</i>
<i>C4</i>	<i>1</i>	<i>581.62 ***</i>	<i>130.31 ***</i>	<i>ns</i>	<i>148.69 ***</i>
Salt (Sa)	4	75.74 ***	15.17 ***	ns	ns
<i>S1</i>	<i>1</i>	<i>287.77 ***</i>	<i>45.08 ***</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>S2</i>	<i>1</i>	<i>9**</i>	<i>11.66 **</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>S3</i>	<i>1</i>	<i>6.12*</i>	<i>3.91 *</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>S4</i>	<i>1</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Sp × Sa	16	15.25 ***	2.67 **	4.62 ***	4.48 ***
<i>C1*S1</i>	<i>1</i>	<i>38.16 ***</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>C1*S2</i>	<i>1</i>	<i>14.6 ***</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>9.67 **</i>
<i>C1*S3</i>	<i>1</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>C1*S4</i>	<i>1</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>C2*S1</i>	<i>1</i>	<i>15.04 ***</i>	<i>4.81 *</i>	<i>18.14 ***</i>	<i>17.82 ***</i>
<i>C2*S2</i>	<i>1</i>	<i>8.7 **</i>	<i>ns</i>	<i>5.02 *</i>	<i>8.48 **</i>
<i>C2*S3</i>	<i>1</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>5.06 *</i>	<i>5.13 *</i>
<i>C2*S4</i>	<i>1</i>	<i>6.17 *</i>	<i>ns</i>	<i>6.43 *</i>	<i>ns</i>
<i>C3*S1</i>	<i>1</i>	<i>108.48 ***</i>	<i>5.62 *</i>	<i>ns</i>	<i>11.98 ***</i>
<i>C3*S2</i>	<i>1</i>	<i>25.62 ***</i>	<i>10.35 **</i>	<i>13.45 ***</i>	<i>10.22 **</i>
<i>C3*S3</i>	<i>1</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>5.15 *</i>	<i>ns</i>
<i>C3*S4</i>	<i>1</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>4.36 *</i>	<i>ns</i>
<i>C4*S1</i>	<i>1</i>	<i>13.68 ***</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>C4*S2</i>	<i>1</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>5.77 *</i>	<i>ns</i>
<i>C4*S3</i>	<i>1</i>	<i>ns</i>	<i>6.13 *</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>C4*S4</i>	<i>1</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Residual	72 (50)				
Within-subject variables					
time	6	2548.27 ***			
time*Sp	24	150.64 ***			
time*Sa	24	11.59 ***			
time*Sp*Sa	96	5.68 ***			
Residual (time)	432				

ns = not significant, * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$

DF residual: 50 for DM, water content, mycelium density.

Contrast on species effect: C1: selected species vs isolated species; C2: *L. bicolor* vs *H. crustuliniforme*; C3: *S. tomentosus* (basidiomycete) vs *Phialocephala* sp. and *Hymenoscyphus* sp. (ascomycetes); C4: *Phialocephala* sp. vs *Hymenoscyphus* sp.

Contrast on salt effect: S1: linear; S2: quadratic; S3: cubic; S4: residual

species was reduced with increasing concentration of NaCl. The radial growth of the *Hymenoscyphus* isolate tested was increased with increasing NaCl concentration and it exhibited the highest growth in the 100 mM NaCl treatment. The *Phialocephala* isolate showed the highest radial growth in the 50 mM NaCl treatment. All fungi exhibited reduced radial growth rates in the 300 mM NaCl treatment compared to the control treatment.

Hebeloma crustuliniforme had the lowest dry biomass (Figure 3.1b) production in all NaCl treatments. *Suillus tomentosus* and *L. bicolor* had similar and intermediate dry biomass values, and the two ascomycetes had the highest biomass yield. Dry biomass production of *H. crustuliniforme* and that of *S. tomentosus* were stimulated in the 50 mM NaCl treatment but were inhibited in the 100, 200 and 300 mM NaCl treatments. The dry biomass yield of *L. bicolor* declined with increasing NaCl concentrations. By contrast, the two ascomycetes were only inhibited in the 300 mM treatment. In the context of this study, growth stimulation occurred when the amount of dry biomass produced was superior to that of the control; inhibition indicated a reduction of the dry biomass produced compared to the control.

Hebeloma crustuliniforme had the lowest density (Figure 3.1c) of all fungi, while the *S. tomentosus* and *Hymenoscyphus* isolates had the highest. Mycelium densities of *H. crustuliniforme* and of *S. tomentosus* were highest in the 50 mM treatment, while that of *L. bicolor* was highest in the 200 mM treatment. The highest density values for ascomycete isolates were obtained in the 300 mM treatment.

On average, the three basidiomycetes tested had a higher water content (Figure 3.1d) than the ascomycete isolates tested, over all NaCl concentrations. In the 50 mM treatment, *H. crustuliniforme* had a lower water content than *L. bicolor*, however, in the other treatments the reverse was observed. The water content of *L. bicolor* generally decreased with increasing NaCl. In the control treatment, the water content of *S. tomentosus* was similar to that of *L. bicolor* and *H. crustuliniforme*. However, for the other treatments, its water content decreased, and stabilized at 81% and was similar to the values obtained for the ascomycete isolates. The water content of the *Hymenoscyphus* and *Phialocephala* isolates were significantly different ($P < 0.05$). For the *Hymenoscyphus* isolate, the water content tended to decrease with increasing salinity, while the water content of the species of *Phialocephala* rose slightly with increasing NaCl concentrations up to 200 mM (significant interaction $C4 \times S2$, $P < 0.05$, Table 3.1).

3.6.2 Stress indicators

Trehalose and mannitol were the two main carbohydrates detected in the tissue samples. In addition, significant amounts of glucose were detected in all five fungi and therefore glucose concentrations were included in the analyses. Small amounts of glycerol and fructose were recorded in most of the species but concentrations were too low for accurate analysis. Compared to the three isolates from the sodic site, both *L. bicolor* and *H. crustuliniforme* had a significantly ($P < 0.001$) higher level of trehalose (Figure 3.2a, Table 3.2). *Laccaria bicolor* had a significantly ($P < 0.0001$) higher trehalose content than *H. crustuliniforme*, although this pattern was reversed in the 300 mM NaCl treatment. Trehalose content of species isolated from the field was not affected by changes in NaCl concentration and was similar for the three fungi. *Hebeloma crustuliniforme* had the highest mannitol (Figure 3.2b, Table 3.2) content and the amount present increased sharply with increasing NaCl concentrations. By contrast, no mannitol was detected in *L. bicolor* tissues. The *S. tomentosus* isolate had the second highest mannitol content and also exhibited increased content with increasing NaCl concentrations. The *Hymenoscyphus* and *Phialocephala* isolates showed similar and constant mannitol levels over the NaCl gradient tested. All three isolates from the sodic site had a basal level of mannitol at the 0 mM treatment. By contrast, at this level, no mannitol was detected in either *L. bicolor* or *H. crustuliniforme*. Although, glucose was present in tissues of all species and at all NaCl concentrations, the levels were not affected by the different treatment (Figure 3.2c, Table 3.2). *Laccaria bicolor* and *H. crustuliniforme* had a significantly higher glucose content than the fungi isolated from the sodic site.

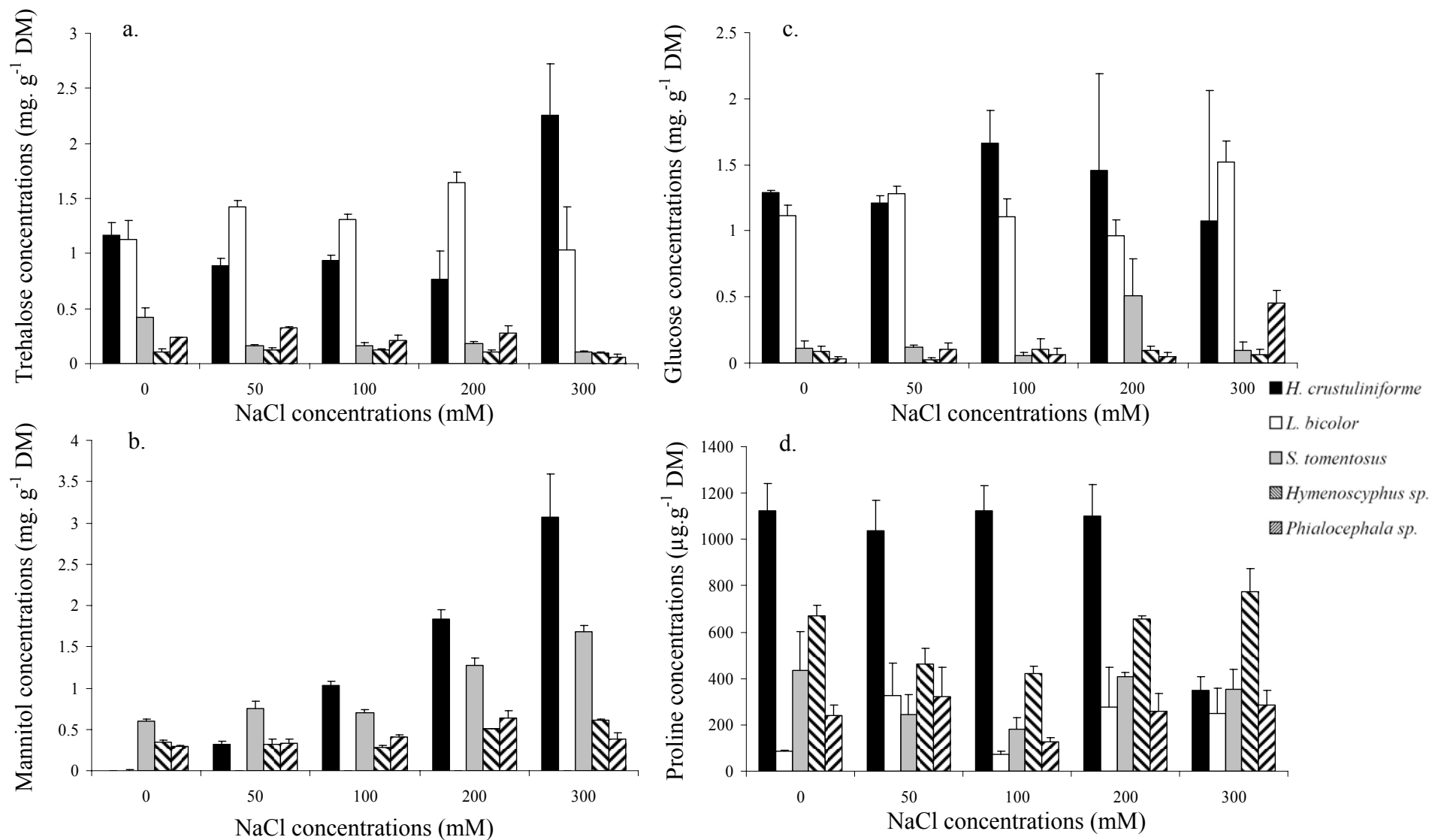


Figure 3.2 Carbohydrate and proline content of five mycorrhizal species (*H. crustuliniforme*, *L. bicolor*, *S. tomentosus*, *Hymenoscyphus sp.*, *Phialocephala sp.*) growing at five NaCl concentrations during 21 days: a. trehalose content (means $\pm$ standard errors, n = 3), b. mannitol content (means $\pm$ standard errors, n = 3), c. glucose content (means $\pm$ standard error, n = 3) and d. proline content (means $\pm$ standard errors, n = 3).

The proline content of tissues differed significantly ($P < 0.001$) between *L. bicolor* and *H. crustuliniforme*, and the three fungi isolated from the sodic site (Figure 3.2d, Table 3.2). This difference was explained mainly by the proline content of *H. crustuliniforme* which ranked the highest at all NaCl treatments except 300 mM. The lowest proline content occurred in the *L. bicolor* and *Phialocephala* isolates and both had in average the lowest proline contents. Although, the proline content of *S. tomentosus* did not differ from that of the ascomycete isolates, it was closer to the values in the *Phialocephala* isolate than to those in the *Hymenoscyphus* isolate. The latter had a significantly higher proline content ($P < 0.001$) compared to that of the *Phialocephala* isolate. The three isolates from the sodic site tended to exhibit reduced levels of proline between the control and the 100 mM NaCl treatments. However, levels increased at higher NaCl concentrations. The highest proline content occurred in the *Hymenoscyphus* isolate in the 300 mM NaCl treatment.

3.6.3 Na and Cl content

All species accumulated increasing amounts of Na and Cl with increasing concentration of NaCl in the growth media (Figure 3.3a and b respectively, Table 3.2). *Laccaria bicolor* and *H. crustuliniforme* accumulated significantly more Na^+ ($P < 0.0001$) and Cl^- ($P < 0.001$) than the isolates from the sodic site. *Hebeloma crustuliniforme* accumulated more Na^+ and Cl^- than *L. bicolor*. In all treatments, *H. crustuliniforme* had between two and five times as much Cl as any of the other fungi. All three isolates from the sodic site showed similar Na^+ and Cl^- accumulation levels.

Table 3.2 Significant F values from the two-way analysis of variance of trehalose, mannitol, glucose, proline, Na and Cl contents (n = 3) of five mycorrhizal species (*H. crustuliniforme*, *L. bicolor*, *S. tomentosus*, *Hymenoscyphus* sp., *Phialocephala* sp.) at five NaCl concentrations.

Sources of variations	DF	Trehalose	Mannitol	Glucose	Proline	Na	Cl
Species (Sp)	4	83.4 ***	98.19 ***	27.89 ***	55.94***	76.78 ***	13.98 ***
<i>C1</i>	<i>1</i>	330.61 ***	ns	110.47 ***	23.77***	230.3 ***	51.43 ***
<i>C2</i>	<i>1</i>	ns	303.55 ***	ns	160.71***	63.34 ***	4.43 *
<i>C3</i>	<i>1</i>	ns	89.04 ***	ns	ns	3.81 *	ns
<i>C4</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	35.66***	ns	ns
Salt (Sa)	4	ns	54.53 ***	ns	2.59*	96.59 ***	771.78 ***
<i>S1</i>	<i>1</i>	ns	216.72 ***	ns	ns	385.96 ***	2531.45 ***
<i>S2</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	ns	ns	373.86 ***
<i>S3</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	6.54*	ns	115.22 ***
<i>S4</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	ns	ns	9.51 **
Sp × Sa	16	5.17 ***	20.95 ***	ns	4.14***	2.37 *	3.04 **
<i>C1*S1</i>	<i>1</i>	12.99 ***	60.91 ***	ns	11.65**	6.47 *	ns
<i>C1*S2</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	13.74***	ns	7.63 **
<i>C1*S3</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	ns	6.72 *	ns
<i>C1*S4</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>C2*S1</i>	<i>1</i>	15.47 ***	237.11 ***	ns	21.97***	ns	15.47 ***
<i>C2*S2</i>	<i>1</i>	38.74 ***	ns	ns	6.61*	ns	ns
<i>C2*S3</i>	<i>1</i>	5.4 *	ns	ns	ns	ns	ns
<i>C2*S4</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>C3*S1</i>	<i>1</i>	ns	25.23 ***	ns	ns	ns	ns
<i>C3*S2</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>C3*S3</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	ns	6.43 *	ns
<i>C3*S4</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>C4*S1</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	ns	ns	8.31 **
<i>C4*S2</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	ns	ns	9.77 **
<i>C4*S3</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	ns	11.13 **	ns
<i>C4*S4</i>	<i>1</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Residual	50						

ns = not significant, * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$

Na and Cl values were log-transformed to fit with the assumptions of the ANOVA.

Contrast on species effect: C1: selected species vs isolated species; C2 : *L. bicolor* vs *H. crustuliniforme*; C3 : *S. tomentosus* (basidiomycete) vs *Phialocephala* sp. and *Hymenoscyphus* sp. (ascomycetes); C4 : *Phialocephala* sp. vs *Hymenoscyphus* sp.

Contrast on salt effect: S1 : linear; S2 : quadratic; S3 : cubic; S4 : residual

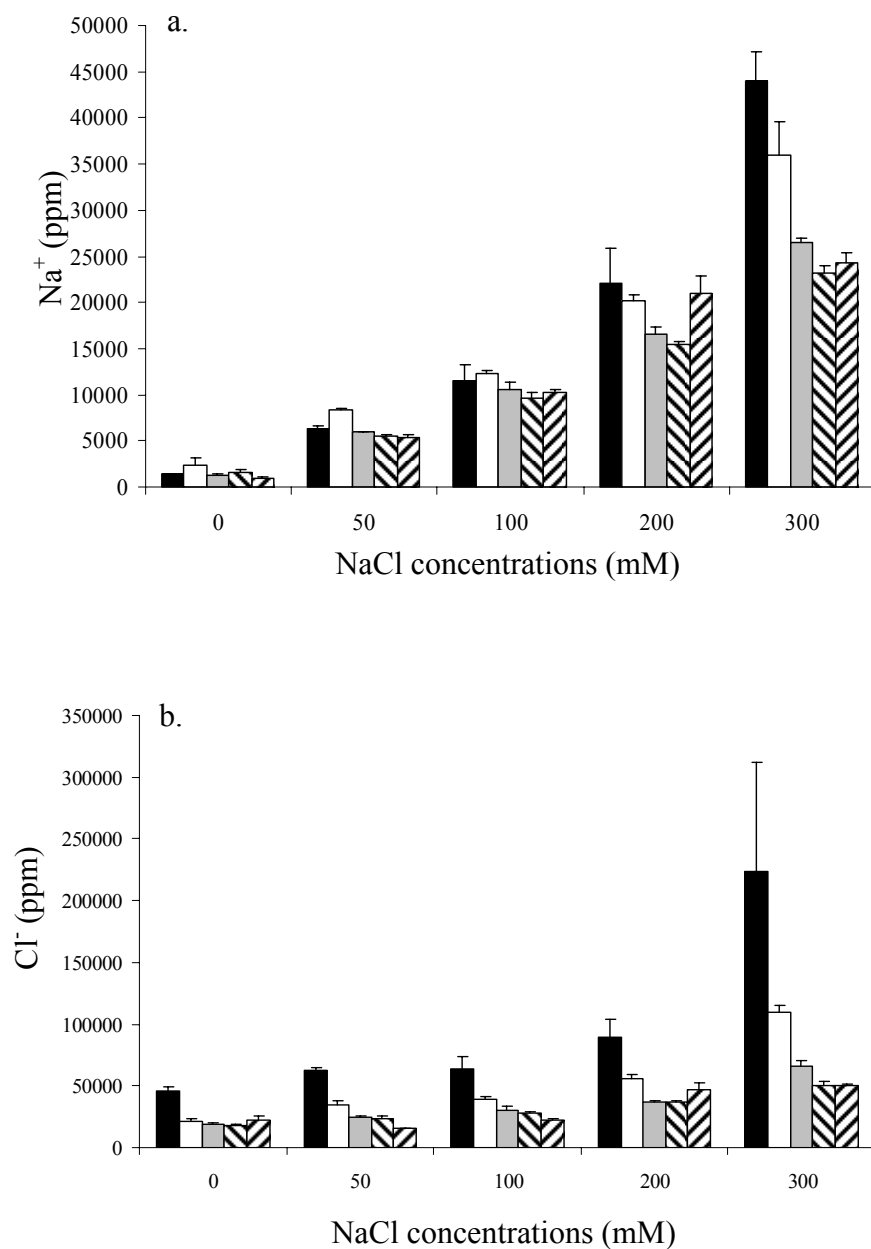


Figure 3.3 Na accumulation (means $\pm$ standard errors, $n = 3$) (a) and Cl accumulation (means $\pm$ standard errors, $n = 3$) (b) of five mycorrhizal species (*H. crustuliniforme*, *L. bicolor*, *S. tomentosus*, *Hymenoscyphus* sp., *Phialocephala* sp.) growing at five NaCl concentrations during 21 days.

3.7 Discussion

Our results clearly show that the three isolates from the sodic site were more resistant to NaCl than *L. bicolor* UAMH 8232 and *H. crustuliniforme* UAMH 5247. The former three species isolates exhibited a significantly higher dry biomass yield and accumulated less Na⁺ and Cl⁻ than the two fungal isolates selected from an existing *in vitro* collection. The isolates from the sodic site showed a strategy of toxic ion avoidance when subjected to osmotic stress. By contrast, *L. bicolor* and *H. crustuliniforme* exhibited a preferential ion accumulation tolerance mechanism to osmotic stress. The Na and/or Cl toxicity threshold level for the fungi tested could not be determined as all species grew at the highest NaCl concentration tested. Nevertheless, the NaCl threshold concentration between stimulation and inhibition of growth could be approximated. Considering dry biomass yield results, the inhibitory NaCl level of each species should indicate the outset of ionic toxicity. At the inhibiting NaCl levels, water stress cannot be compensated for with available inorganic ions from the external environment, and cells start using organic compounds as osmotica at the expense of growth (Clipson & Jennings 1992, Niu *et al.* 1997).

Our results showed that the two ascomycete isolates did not counteract the osmotic effect of NaCl by increasing the concentration of sugars. The *Hymenoscyphus* isolate used proline as an osmotica to prevent NaCl stress at 200 mM and 300 mM. At these concentrations, growth declined, and Na and Cl content of the tissues reached their highest levels. In treatments below 200 mM NaCl, the proline content decline gradually from the control level to 100 mM NaCl. If inorganic osmotica such as Na⁺ or K⁺ are not present in the growth medium in sufficient amount to achieve osmotic homeostasis, the fungus might compensate by accumulating proline but at the expense of growth. Therefore, under the conditions tested, 100 mM NaCl appeared to offer the optimum concentration of inorganic osmotica for growth of the *Hymenoscyphus* isolate: proline content was the lowest at this NaCl concentration and biomass yield was maximum. The *Phialocephala* isolate exhibited melanized cell walls. Therefore, this species possibly used other stress metabolites such as melanin as observed by Gadd (1993) on fungal species in response to toxic metals. Fungal melanins in cell walls are known to act as a protective interface between fungal metabolism and biotic and abiotic environmental stressors (Bell & Wheeler 1986, Butler & Day 1998). The *Hymenoscyphus* isolate was a white morphotype but may have also produced lipidic stress metabolites related to melanin as other members of this genus produce such

compounds (Vrålstad *et al.* 2002). Other mechanisms including ion transport and compartmentalization, and oxidative protection (Yeo 1998), may also explain the resistance shown by these isolates. The most abundant carbohydrate in both ascomycete isolates was mannitol. However, the carbohydrate reserves remained low compared to the three basidiomycetes, even without addition of NaCl in the growing media. As fast growing species, both fungi may have rapidly converted carbohydrates into new organic matter. Sugar from the growing medium was either rapidly used for growth, or stored by complexation/conjugation with other cell compounds (*e.g.*, melanin or phenolic stress metabolites). By contrast, *S. tomentosus*, the only basidiomycete isolated from the sodic site, relied mainly on mannitol and trehalose as reserve carbohydrates. When subjected to increased NaCl levels, the trehalose content of the *S. tomentosus* isolate decreased, whereas the mannitol content increased. The latter was possibly used as a compatible solute to counteract osmotic stress. Sun *et al.* (1999) described mannitol as an osmotically potent polyol that accumulates in active hyphal tips of *Suillus bovinus* (L.: Fr.) O. Kuntze. The active mannitol loading and the consequent build up of osmotic pressure drive translocation of water to hyphal tips and so promote growth. The surplus water and its solutes would be discriminately exuded from the tips and released into the medium (Unestam & Sun 1995, Sun *et al.* 1999). The *S. tomentosus* isolate also accumulated proline in conjunction with mannitol at NaCl treatments of 200 and 300 mM NaCl. As discussed above on the *Hymenoscyphus* isolate, the stimulatory effect of NaCl on the growth of *S. tomentosus* could be related to the reduced production of proline, or other unmeasured organic osmotica, with accumulation of inorganic osmotica. In the present study, *S. tomentosus* released yellowish phenolic-like compounds (*e.g.*, extracellular melanin (Gadd 1993, Bell & Wheeler 1986)) into the medium around the mycelium. Visual estimation suggested that the concentration of this substance increased with increased NaCl concentrations. Droplets of the same color appeared on the surface of the mycelium. The production and exudation of metabolites could be used for external osmotic adjustment to avoid the need of internal adjustment by the accumulation of Na⁺ and/or Cl⁻. Sun *et al.* (1999) showed evidence that *S. bovinus* exudes mannitol and other osmotica, thereby conditioning the hyphal environment. This exudation-absorption process could possibly be common to a number of *Suillus* species.

Trehalose was abundant in *L. bicolor* and *H. crustuliniforme*. Its concentration was at least three times higher in both species than in the three isolates from the sodic site. This sugar is most likely

a reserve carbohydrate as its content varied little in response to NaCl increase for *L. bicolor* and *H. crustuliniforme* in all treatments except the 300 mM treatment. In *L. bicolor*, the trehalose content increased slightly with increasing NaCl concentration, which could enhance cell protection in this species. In the 200 mM and 300 mM NaCl treatments, the proline content of *L. bicolor* increased and may be used as a complementary osmoticum to counteract NaCl stress. As for the other four fungal isolates, *L. bicolor* accumulated Na^+ and/or Cl^- as free osmotica but without stimulatory effects. This suggests that, in this fungus, Na^+ and/or Cl^- were toxic even at the 50 mM treatment, and/or that other unmeasured stress metabolites were produced which resulted in reduced growth potential. As water stress is the primary stress prior to the onset of any ion specific effect, most of the response of *L. bicolor* may have been due to its sensitivity to water stress as shown by Coleman *et al.* (1989). Therefore, the cytoplasmic protection potential of *L. bicolor* against osmotic stress (*e.g.*, organic osmotica) was constrained by species-specific limitations, however, its metabolism was highly sensitive to Na^+ and/or Cl^- specific ion effect. Under *in vitro* conditions, *L. bicolor* may have relatively few means of overcoming water stress but its response may be different when in symbiosis (*e.g.*, different carbohydrates sources). By contrast, *H. crustuliniforme* used mannitol as an osmoprotectant to combat NaCl stress. This is supported by the fact that the mycelium of this species readily accumulated mannitol in response to increasing NaCl levels. Furthermore, in *H. crustuliniforme* trehalose reserves were reduced in response to increasing NaCl levels and these only increased in the 300 mM NaCl treatment. In the latter treatment, the proline content of *H. crustuliniforme* fell drastically, indicating a probable switch of resource allocation to sugars that may be better adapted as organic osmotica. Protein synthesis involves more energy than production of carbohydrates (Niu *et al.* 1997) and the latter may represent better cost/benefits for the fungal growth at high NaCl concentrations. This result is in accordance with Tibbett *et al.* (2002), who observed increasing level of mannitol and trehalose in several isolates of *Hebeloma* under increasing cold stress.

The composition of the growth medium had an important influence on the response of the mycelia (Lewis & Smith 1967, Pfyffer & Rast, 1988) to NaCl stress and, although these fungi may react differently when in symbiosis, we can still make inferences about their potential use for inoculation of seedlings produced for the revegetation of sodic sites. Among the three fungi isolated from the sodic site, the *Hymenoscyphus* and the *Phialocephala* isolates exhibited the best NaCl resistance potential. This confirms the salt stress tolerance abilities of pioneer symbiotic

species and suggests that certain *Hymenoscyphus* species may have a number of physiological and biochemical attributes allowing them to withstand a wide range of environmental stresses (Hashem 1995, Read & Kerley 1995, Read 1996, Souto *et al.* 2000, Vrålstad *et al.* 2000). However, the *Hymenoscyphus* and *Phialocephala* isolates obtained in the present study are probably not of primary interest for revegetation purposes. Firstly, their mutualistic association with coniferous trees is not clear (Jumpponen & Trappe 1998, Jumpponen 1999, Vrålstad *et al.* 2000, Vrålstad *et al.* 2002): species of *Hymenoscyphus* are known to associate with pioneer plant species (*e.g.*, species of the *Ericaceae*) and species of *Phialocephala* show little host specificity (Jumpponen & Trappe 1998, Jumpponen *et al.* 1998, Jumpponen 1999, Vrålstad *et al.* 2000). Nevertheless, Jumpponen *et al.* (1998) showed that *Pinus contorta* Dougl. colonized by *Phialocephala fortinii* gave a typical mycorrhizal growth response on an environmentally stressed (low N and organic matter) glacier forefront. Secondly, these two pioneer species might not persist on coniferous roots in the long term. By contrast, the *S. tomentosus* isolate is of greater interest. *Suillus* species are known to be ECM associate of pine and spruce species during early and middle successional stages and thus would likely persist on transplanted seedling roots. In addition, its biomass production under NaCl stress was similar to or better than that of *L. bicolor* and *H. crustuliniforme*. Moreover, like the other fungi isolated from the sodic site, it might also have certain abilities to tolerate other stresses found on the study site. It is likely that strains of ECM fungi surviving in oil sand tailings have undergone severe selection pressure and eventually eoadaptation (*e.g.*, epigenetic processes and genome rearrangement (Niu *et al.* 1997, Lerner 1999, Arnholdt-Schmitt 2004)) to many of the physico-chemical stresses characterizing such environments (*e.g.*, excess salt, water stress, temperature extremes and toxic oil residues). Although, the *S. tomentosus* isolate would probably have better Na and Cl filtering capacities when in symbiosis compared to *L. bicolor* and *H. crustuliniforme*, the latter showed a high osmotic adjustment potential which allowed it to maintain its water content. This capacity came possibly from the apparent diversity of organic and inorganic osmotica accumulated by this species. Indeed, different osmotica work in coordination avoiding crystallization caused by excessively high concentrations of a single osmoticum in case of severe stress (Niu *et al.* 1997). This observation tends to confirm the conclusion of Mushin & Zwiazek (2002), that *H. crustuliniforme* improves the water flux of its host. Such a characteristic makes this fungus another good candidate for inoculation of nursery seedlings. Nevertheless, it readily accumulated

Na⁺ and Cl⁻, which might be deleterious for its host in the long term. From the results obtained, *L. bicolor* UAMH 8232 may not have the qualities necessary for revegetation of sodic sites: it accumulated more Na⁺ and Cl⁻ than the *S. tomentosus* isolate and was the most sensitive fungi to increasing NaCl concentrations. To confirm these results, the NaCl resistance of the three basidiomycetes must be tested in symbiosis.

3.8 Acknowledgments

This research was funded by Syncrude Canada Ltd. and NSERC (CRDPJ 250448-01 to D.P.Khasa). We would like to thank Henk den Bakker for valuable help with the phylogenetic analyses of the *Suillus* and *Hymenoscyphus* isolates, Alain Brousseau for mineral analyses (Centre de Recherche en Biologie Forestière, Univ. Laval, Canada), and Lucette Chouinard and Pierre Lechasseur for biochemical analyses (Agriculture and Agri-Food Canada). Furthermore, we wish to thank Andrew Coughlan and Jean-Luc Jany for helpful comments and manuscript revision, and Michèle Bernier-Cardou (Laurentian Forestry Center, Canada).

Chapitre 4 Physiological response to NaCl of nursery-grown *Pinus banksiana* inoculated with *Laccaria bicolor*

4.1 Avant-propos

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été exploités pour la publication d'un chapitre de livre (Bois, Bigras, Piché, Fung, Khasa 2005c) et ont été présentés (affiche) à la conférence internationale sur les mycorhizes en août 2003 (ICOM 4, Montreal, QC, Canada). L'ensemble des mesures écophysologiques fut réalisé avec la collaboration du Dr Francine Bigras (Ressources naturelles Canada, CFL, Québec). Les professeurs Damase Khasa et Yves Piché ont fourni l'encadrement scientifique. Martin Fung est intervenu pour la définition des besoins de l'industrie et fut la personne ressource au sein du bureau des affaires environnementales à Syncrude Canada Ltd. L'expérience 3, qui suit, porte sur l'association *Pinus banksiana* Lamb. et *Laccaria bicolor* (Maire) Orton UANH 8232. Elle fut réalisée sur des semis inoculés produits pour l'expérience 6 (expérience B, Chapitre 6). Ces deux expériences furent mises en place dans un souci d'application immédiate pour obtenir des résultats sur le potentiel d'inoculation d'un champignon ECM dans des conditions courantes de végétalisation (pépinière et plantation). La souche de *L. bicolor* fut choisie suite à la sélection en conditions *in vitro* réalisée par Kernaghan *et al.* (2002) en contradiction avec les résultats de l'expérience 2, cette dernière ayant été réalisée postérieurement aux expériences 3 et 6. Malgré le fait que cette souche se soit finalement avérée sensible au stress sodique, *L. bicolor* est une espèce modèle qui a servi dans l'expérience qui suit à démontrer l'influence du mycobiote sur la physiologie de son hôte en conditions stressantes. De plus, cette expérience a permis de sélectionner des indicateurs physiologiques pertinents pour réaliser les expériences des chapitres 5 et 6 plus complexes par une plus vaste gamme de traitements (plusieurs espèces fongiques et végétales).

4.2 Résumé

Une étude détaillée sur la réponse physiologique au stress sodique de semis de *Pinus banksiana* Lamb. (pin gris) inoculés avec *Laccaria bicolor* (Maire) Orton UAMH 8232 en conditions de pépinière a été effectuée. Cette souche de champignon ectomycorhizien (ECM) fut sélectionnée préalablement en conditions *in vitro* pour sa résistance à différents sels. Ce champignon peut potentiellement apporter une plus grande résistance à son hôte par rapport à *Thelephora americana* Lloyd, le champignon ECM colonisateur dominant dans les pépinières. Pour vérifier cette hypothèse, des semis de pépinière de un an, inoculés ou non avec *L. bicolor*, ont été exposés à 0, 0,5, 1,0, 2,5 ou 5,0 g Na l⁻¹ de substrat. Après 30 jours, la colonisation par des champignons ECM, la biomasse, la photosynthèse, la fluorescence de la chlorophylle *a*, le potentiel hydrique, l'hydratation et la composition minérale des tissus ont été mesurés. L'inoculation de semis de pin gris a fait augmenter l'accumulation de biomasse de l'hôte dans les traitements 0,5 et 1,0 g Na l⁻¹ de substrat ; l'efficacité photosynthétique, la croissance racinaire et la colonisation fongique des semis inoculés ont été stimulées, et l'accumulation de Na⁺ et de Cl⁻ a été réduite par comparaison avec des semis colonisés par *T. americana*. Au-delà de 1,0 g Na l⁻¹ de substrat, les plantes inoculées ou non ont desséché et montré une perturbation photochimique élevée. Sur le long terme, l'influence de *L. bicolor* peut améliorer la croissance et la survie de semis de pin gris exposés à des niveaux de NaCl inférieurs à ceux obtenus avec 2,5 g Na l⁻¹ de substrat.

4.3 Abstract

A comprehensive study was performed on the physiological response to sodic stress of *Pinus banksiana* Lamb. (jack pine) inoculated with *Laccaria bicolor* (Maire) Orton UAMH 8232 under nursery conditions. This ectomycorrhizal (ECM) strain was selected *in vitro* for its tolerance to different salts and, therefore may confer a higher resistance to jack pine seedlings than does *Thelephora americana* Lloyd, the dominant nursery colonizer. To test this hypothesis, one-year-old tree nursery grown seedlings, inoculated or not with *L. bicolor*, were exposed to 0, 0.5, 1.0, 2.5 or 5.0 g Na l⁻¹ of substrate. After 30 days, colonization by ECM fungi, biomass, photosynthesis, chlorophyll *a* fluorescence, water potential and content, and mineral composition were characterized. Inoculation of jack pine seedlings improved biomass accumulation in the 0.5 and 1.0 g Na l⁻¹ of substrate; photosynthetic efficiency, root growth and fungal colonization of inoculated seedlings were stimulated, and Na⁺ and Cl⁻ accumulation was lower compared to *T. americana*-colonized seedlings. Above 1.0 g Na l⁻¹ of substrate, both inoculated and non-inoculated seedlings dehydrated and showed high photochemical disturbance. In the long-term, the influence of *L. bicolor* is likely to promote better growth and survival of jack pine seedlings at NaCl exposure levels lower than that of the 2.5 g Na l⁻¹ of substrate treatment.

4.4 Introduction

Glycophytic organisms living in or on sodic soils are adversely affected by the presence of excess Na^+ in the soil solution. High sodicity affects plant physiology by causing both hyperosmotic and hyperionic stresses (Levitt 1980, Yeo 1983, Munns & Termaat 1986, Cheeseman 1988, Munns 1993, Neumann 1997, Hasegawa *et al.* 2000). As an integrative process of all metabolic process acting in response to the stress, growth is generally reduced by salt stress (Levitt 1980). The osmotic stress induces stomatal closure and drought stress signaling (Hasegawa *et al.* 2000, Zhu 2001, 2002). For osmotic adjustment of the water potential, osmolyte contents must increase in the tissues of the plant exposed. As a result, Na^+ and Cl^- , being in excess in the environment, are used as low cost osmotica to counteract osmotic deficiencies (Yeo 1983, Niu *et al.* 1995, Niu *et al.* 1997, Hasegawa *et al.* 2000). These ions may accumulate in the cytoplasm and become toxic for cell functioning. In such a case, specific ion effects of Na^+ and Cl^- may lead to phytohormonal imbalance, alter enzymatic activity and cell membrane integrity, dysfunction of metabolism pathways, and reduce net photosynthesis (Munns 1993, Kozlowski 1997, Neumann 1997, Hasegawa *et al.* 2000, Mansour & Salama 2004). The resistance of a given plant depends mainly on its ability to vacuolize excess ions and/or to allocate them to mature tissues (Levitt 1980, Niu *et al.* 1995, Hasegawa *et al.* 2000), and on the plant's potential to synthesize compatible osmolytes for osmoregulation and osmoprotection (Yeo 1983, Niu *et al.* 1997, Yeo 1998, Bohnert & Shen 1999).

The mycorrhizal symbiosis is a plant-fungal association in which the fungus favors mineral nutrition of the host plant in return for energy in the form of sugars (Smith & Read 1997). Mycorrhiza may be considered as a special adaptation of land plants to stresses such as nutrient deficiency (Marschner & Dell 1994, Smith *et al.* 1994, Read *et al.* 2004), heavy metal toxicity (Kottke 1992, Hartley *et al.* 1997, Jentschke & Goldbold 2000, Schützendübel & Polle 2002), and physical constraints such as water deficit (Dosskey *et al.* 1991, Lamhamedi *et al.* 1992, Augé 2001), on various plant species. Al-Karaki (2000) and Al-Karaki *et al.* (2001) showed that arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can improve NaCl stress tolerance of tomato plants grown under high saline conditions (*e.g.* $\text{EC}_e = 7.4 \text{ dS m}^{-1}$). Ectomycorrhizal (ECM) fungi may also be able to reduce the effect of salt stress on their host plant's physiology. Dixon *et al.* (1993) showed improved growth and mineral nutrition (*i.e.*, P) of *Pinus taeda* L. (loblolly pine) colonized by

Laccaria laccata (Scop.: Fr.) Cooke and *Pisolithus tinctorius* (Mich.: Pers.) Coker & Couch grown at five NaCl concentrations (up to 80 mM NaCl) compared to seedlings inoculated with *Thelephora americana* Lloyd (formerly *terrestris*). In a ten week experiment, Mushin & Zwiazek (2002) observed improved NaCl tolerance (following application of a 25 mM solution) of *Picea glauca* (Moench) Voss (white spruce) seedlings colonized by *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Quel. The later fungi reduced Na⁺ accumulation in shoot, increased N and P acquisition and increased root hydraulic conductance of its host.

Pinus banksiana Lamb. (jack pine) is a common species used for reclamation of salt (essentially Na⁺ and Cl⁻) affected lands produced by the oil sand industry's activity in northeastern Alberta, Canada (Fung & Macyk 2000); however, compared to other boreal forest species, jack pine has been shown to be sensitive to salt stress (Renault *et al.* 1999). When exposed to NaCl dissolved in the soil solution, jack pine seedlings readily accumulate Na⁺ and Cl⁻ and show a weak root control on shoot accumulation, especially for Cl⁻ (Apostol *et al.* 2002, 2004, Franklin *et al.* 2002a,b, Franklin & Zwiazek 2004). To help overcome this, seed sources of jack pine have been selected for their salt tolerance (Khasa *et al.* 2002). Considering the inherent properties of ECM fungi, we hypothesized that certain fungal species should be able to further reduce the salt stress experienced by jack pine. *Laccaria bicolor* (Maire) Orton is a model ECM fungal species and the salt tolerance of the strain UAMH 8232 has already been reported (Kernaghan *et al.* 2002). The jack pine - *L. bicolor* association may be interesting for the revegetation of challenging salt affected soils where ECM inoculum potential is low (Bois *et al.* 2005c). In order to draw a picture of the “whole plant” physiological response to sodicity - including growth, water relations, net photosynthesis and mineral composition - jack pine seedlings inoculated or not with *L. bicolor* were subjected to a range of Na⁺ concentrations. Sodium was provided as NaCl as it has a higher stress potential than when applied as Na₂SO₄ (Franklin *et al.* 2002b). This is the first insight into the physiological response of the jack pine - *L. bicolor* symbiosis to a sodic environment.

4.5 Materials and methods

4.5.1 Plant and fungal materials

The mycelium of *L. bicolor* UAMH 8232 was grown for 30 d in a bioreactor in a modified Melin Nokrans (MMN) (Marx 1969) liquid medium. After harvesting, the mycelium was washed with sterilized distilled water to remove any remaining nutrients, and was chopped in a blender. The mycelium was resuspended in 1 l of distilled water (approx. 880 000 active propagules per liter) and stored for 10 d at 4°C prior to use. The mycelium of *L. bicolor* was incorporated to the growing medium prior to sowing. The concentrated liquid inoculum was diluted in water (1:39, v:v) and incorporated into a peat based (19:1, peat:perlite, v:v) potting compost (2:3, water borne inoculum: potting compost, v:v). The substrate used for non-inoculated control plants was mixed with water. All seedlings were grown under normal tree nursery conditions. However, the watering and fertilization rates were reduced by one third of the operational fertigation regime to favor root colonization by *L. bicolor* rather than by other ECM fungi commonly found on nursery stock (e.g. *T. americana*) which are adapted to wet and nutrient rich conditions (Hacskeylo 1965, Marx 1991). Jack pine seedlings (Syncrude seed source, provided by Alberta Tree Improvement and Seed Center, Smoky Lake, AB, Canada) were grown in 112-77 styrofoam containers, under greenhouse conditions at the Smoky Lake Forest Nursery (AB, Canada). Six months after sowing, height and total dry mass (DM) were recorded on 20 seedlings sampled among inoculated and non-inoculated plants. After eight months of growth, seedlings were transferred to a growth chamber at Université Laval (QC, Canada). In order to induce dormancy and simulate winter conditions, the temperature was progressively reduced from 18/10°C (day/night) to 8/4°C over a two week period. The photoperiod was also reduced from 12 to 8 h (RH 60%). The seedlings were kept dormant for 14 weeks. During this period, they were lightly watered and fertilized with 4 mg of N (20-8-20r (Plant Prod Québec, Laval, QC, Canada)). Seedlings were then transplanted into 1 l pots filled with a sand:Turface® MVP (Profile™, Buffalo Grove, IL, USA) mix (1:1, v:v) saturated with tap water (380 ml) which contained: 0.03 mM of K⁺, 0.90 mM of Ca²⁺, 0.20 mM of Mg²⁺ and 0.80 mM of Na⁺. A mineral medium was chosen to avoid the bias generated by the high buffering capacity of peat-based organic substrates. Any residual peat was washed off of the seedling roots before transplanting dormant plants in the new substrate. Seedlings were transferred to a greenhouse (30% RH, 16 h photoperiod, 24-18°C

day/night, photon flux density (PFD) of 100-150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and for the first 14 d, plants were watered every 2 d with 100 ml of tap water to maintain the growing medium at field capacity. During the next 14 d, seedlings were watered every 2 d with 100 ml of a NaCl solution such that at day 28, the selected amount of Na (0, 0.5, 1.0, 2.5 or 5.0 g Na l⁻¹ of substrate) was reached for each treatment. The seedlings were grown for an additional 14 d, during which they were watered with tap water; care was taken to avoid loss of elements by percolation.

4.5.2 Physiological and morphological measurements

At the end of the experimental period, shoot height, *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence (ChFl) and net photosynthetic rates were measured. A portable fluorometer (model PAM-2000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) was used to evaluate ChFl of growing and mature needles. Growing needles were sampled from the part of the plant above the scar of the last dormant apical bud, and mature needles were sampled below this point. Plants were kept in the dark for 1 h prior to fluorescence induction. The dark-adapted minimal fluorescence (F_0) was obtained under a modulated light. A saturating pulse (0.8 s) of light was applied to obtain the dark-adapted maximal fluorescence (F_m). The dark-adapted variable fluorescence was calculated using these two parameters ($F_v = F_m - F_0$) in order to determine the F_v/F_m ratio. For the purpose of the quenching analysis, the photosystems were light-adapted by illumination with an actinic red light (photosynthetic active radiation (PAR) of 340-350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 20 min. The actual fluorescence (F_t) at this steady state and the light-adapted maximal fluorescence (F_m'), induced by a saturating pulse of light at this point, were used to calculate the effective quantum yield of PSII ($\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_t) / F_m'$). Needles were then illuminated with far red light to obtain the light-adapted minimal fluorescence (F_0'). From this value, the photochemical quenching coefficient ($qP = (F_m' - F_t) / (F_m' - F_0')$) was calculated.

Net photosynthesis, stomatal conductance and transpiration were measured using a gas exchange system (model Licor 6400, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) on mature needles; needles of growing parts were too small for such measurement. Mature needles were enclosed in a 250 ml cuvette (Model LI-6400-05, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) and illuminated with a PFD of 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The projected area of needles used for this measure was determined (Winseedle v. 2002A, Regent Instruments Inc., Montréal, Québec, Canada) after removing all

necrotic tissues. Afterward, a branch was removed from each seedling to evaluate water potential with a Scholander pressure chamber (PMS Instrument Co., Corvallis, OR, USA).

For Chla and Chlb contents of needles, 0.1 g of growing and of mature green needles were sampled from each seedling, placed in 15 ml screw-topped plastic tubes containing 10 ml of an 80% acetone solution, and stored at 4°C. Chlorophyll extraction was improved by grinding the needle tissues using a polytron (Kinematica GmbH, Brinkman Instruments, Switzerland). Tubes were kept at 4°C for 24 h prior to spectrophotometric measurements at 647 nm and 664 nm (zero at 750 nm) as indicated by Arnon (1949). Chla and Chlb contents were determined using the Photosynthesis Assistant software v. 1.1.2 (Dundee Scientific, Dundee, UK).

Survival was evaluated at the time of harvest and totally dehydrated seedlings were considered dead. Roots and shoots of seedling were divided into growing and mature parts, and the fresh mass (FM) recorded. Growing roots were white and grew into the experimental rooting medium beyond the ball of mature roots. The latter were brown due to build up of phenolics and corresponded to root development during the period of growth in the 112-77 containers. Sub-samples of each tissue were oven dried at 65°C for 48 h in order to calculate the dry mass (DM). The growth rate was calculated as the percentage of DM of the growing parts of NaCl treated seedlings relative to the average DM of growing parts of the controls. The percentage of water in fresh tissues was calculated from FM and DM measurements. Level of root colonization by ECM fungi was evaluated on fresh root sub-samples. A minimum of 300 root tips were counted per plant and percentage colonization was determined as the proportion of mycorrhizal root tips to the total number of short root tips. Mycorrhizas were sorted into different morphotypes using criteria described by Agerer (1999). To confirm species identification, molecular typing (ITS-RFLP) was done using the method outlined in Bois *et al.* (2005d).

Dried tissues were ground and the amount of N, P, K, Ca, Mg, Na and Cl present in mature (produced prior to dormancy) and growing (after dormancy) shoot tissues was determined. Mineral analyses were performed following the standard methods outlined by Kalra (1998). After harvest of the seedlings, the electrical conductivity (EC), the sodium absorption ratio ($SAR = [Na^+] / \sqrt{([Ca^{2+}] + [Mg^{2+}]) / 2}$) and the pH_{H_2O} of the growth substrate were measured to ensure the effectiveness of the NaCl treatments. The EC and SAR are relevant soil parameters and have

predictive abilities for plant performance on saline soil (Gardner 2004); the EC describes the osmotic stress and the SAR is a measure of the potential sodicity hazard. These indicators were measured on 1:5 (w:v) soil:water extracts ($EC_{1:5}$ and $SAR_{1:5}$) a more convenient method than on saturated paste extracts (EC_e and SAR_e). Soil analyses were performed following the standard methods outlined for Canadian forest soils by Kalra and Maynard (1992).

4.5.3 Experimental design and statistical analysis

The five NaCl treatments (0, 0.5, 1.0, 2.5 or 5.0 g Na l⁻¹ of substrate) were chosen accordingly to Lichtenthaler's (1996) concept of plant stress: once the threshold of stress resistance is passed, the damage from long-term low-stress exposure is similar to that from short-term high-stress exposure. Although, NaCl exposure, in the present study, lasted four weeks, the highest treatment corresponded to a concentration of Na⁺ ranging between 500 mM and 600 mM when the substrate was at field capacity, a concentration equivalent to that of sea water. Glycophytes exhibit intolerance at soil concentrations higher than 50 mM (Orcutt & Nilsen 2000). This latter concentration was reached in the 0.5 g Na l⁻¹ of substrate treatment when the substrate was at field capacity. The 1.0 and 2.5 g Na l⁻¹ substrate corresponded approximately to 110 mM Na⁺ and 280 mM Na⁺ when the substrate was at field capacity. Pots were layed out according to a factorial design comprising four completely randomized blocks. Each experimental unit was a pot containing either an inoculated or non-inoculated plant exposed to one of the five levels of NaCl treatments. In total, the experiment comprised 40 plants: 20 inoculated and 20 non-inoculated. Fluorescence and carbon exchange measurements of seedlings within a block were assessed on the same day. Main and interaction effects of inoculation and the gradient of NaCl treatments were investigated using two-way ANOVA analyses (PROC GLM, SAS system, The SAS Institute, Cary, NC, USA) with the following effect model: $y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \delta_k + \varepsilon_{ijk}$ where y_{ijk} is the response, μ is the mean of the response variable, τ_i is the effect of the i th level of the inoculation treatment, β_j is the effect of the j th level of the NaCl treatment, $(\tau\beta)_{ij}$ is the effect of the interaction between τ_i and β_j , δ_k is the effect of the k th block, and ε_{ijk} is the error term $((\tau\delta)_{ik} + (\beta\delta)_{jk} + (\tau\beta\delta)_{ijk})$ (Steel *et al.* 1997). Where measurements were performed on different parts of each experimental unit (*e.g.* growing vs mature parts), data were considered as time repeated and that effect was included in the model. Results of polynomial contrasts and linear

regression were used to detect differences between inoculated and non-inoculated seedlings in all NaCl treatments. In order to reduce distortion of regression coefficients due to the unequal difference between NaCl doses, the NaCl treatment independent variable was log transformed. The SAS type IV sum of squares was used to evaluate data sets with missing values. All data from variables with non-significant treatment effects were pooled to simplify analysis and graphical presentation.

4.6 Results

The following results are given in the light of the growing part response which reflected past growth conditions and response to the NaCl treatment of the seedlings. Mature part responses were used only to complement and to contrast growing part responses.

4.6.1 NaCl treatment effectiveness

The pH of the growing medium varied between 5 and 5.7 across all NaCl treatments (Table 4.1). A sandy saline soil has approximately an $EC_{1:5} > 0.2 \text{ dS m}^{-1}$ (equivalent to an $EC_e > 4 \text{ dS m}^{-1}$ using a conversion factor of 17 (Slavich & Petterson 1993)) and a sodic soil has an $SAR_{1:5} > 10$ (equivalent to an exchange sodium percentage higher than 15% (Sumner *et al.* 1998)). In control NaCl treatment (0 g Na l^{-1} of substrate), the substrate showed neither sodic nor saline conditions. With the addition of NaCl, the $EC_{1:5}$ and the $SAR_{1:5}$ increased (Table 4.1) and the growth substrate exhibited saline and sodic conditions in all NaCl treatments.

Table 4.1 pH, electrical conductivity (EC) and sodium absorption ratio (SAR) of the growing substrates of inoculated (I) or non-inoculated (NI) seedlings at the end of the experiment.

NaCl Dose (g Na / l of substrate)	pH	$EC_{1:5}$ (dS.m^{-1})	$SAR_{1:5}$
0	5.7	0.08	1.7
0.5	5.2	0.6	12
1.0	5.1	1.0	18
2.5	5.0	1.8	33
5.0	5.1	3.4	55

A significant ($P < 0.05$) increase in the Na and Cl content of the shoot of both inoculated and non-inoculated seedlings was recorded with increasing amounts of NaCl applied. However, inoculated plants accumulated, on average, significantly ($P < 0.05$) less Na^+ and Cl^- in their shoot tissues than non-inoculated plants (Table 4.2, Figure 4.1a,b). In treatments below 2.5 g Na l^{-1} of substrate, growing parts of inoculated plants tended to accumulate Na^+ and Cl^- at an equal or lower rate than that of mature parts. In the 5.0 g Na l^{-1} of substrate treatment, growing parts of inoculated seedlings had the highest Na (2.5% DM) and Cl (5.5% DM) contents.

Table 4.2 Main contrast results of physiological parameters.

Physiological parameters	Main contrast results [†]
Na ⁺ accumulation	SP × IN × NaCl ($P < 0.05$)
Cl ⁻ accumulation	SP × IN × NaCl ($P < 0.05$)
Colonization rates	RP × NaCl ($P < 0.001$) and IN × NaCl ($P < 0.05$)
F_v/F_m	SP × IN ($P < 0.01$) and IN × NaCl ($P < 0.05$)
Φ_{PSII}	SP × NaCl ($P < 0.01$) and IN × NaCl ($P < 0.05$)
Net photosynthesis	IN ($P < 0.05$) and NaCl ($P < 0.001$)
Transpiration	NaCl ($P < 0.001$)
Stomatal conductance	NaCl ($P < 0.001$)
Water content	SP × IN × NaCl ($P < 0.05$)
Shoot biomass accumulation	NaCl ($P < 0.05$)
Root biomass accumulation	IN × NaCl ($P < 0.05$)

[†]SP/RP: shoot parts/root parts (growing vs mature parts) IN: inoculation (*L. bicolor* vs *T. americana*)

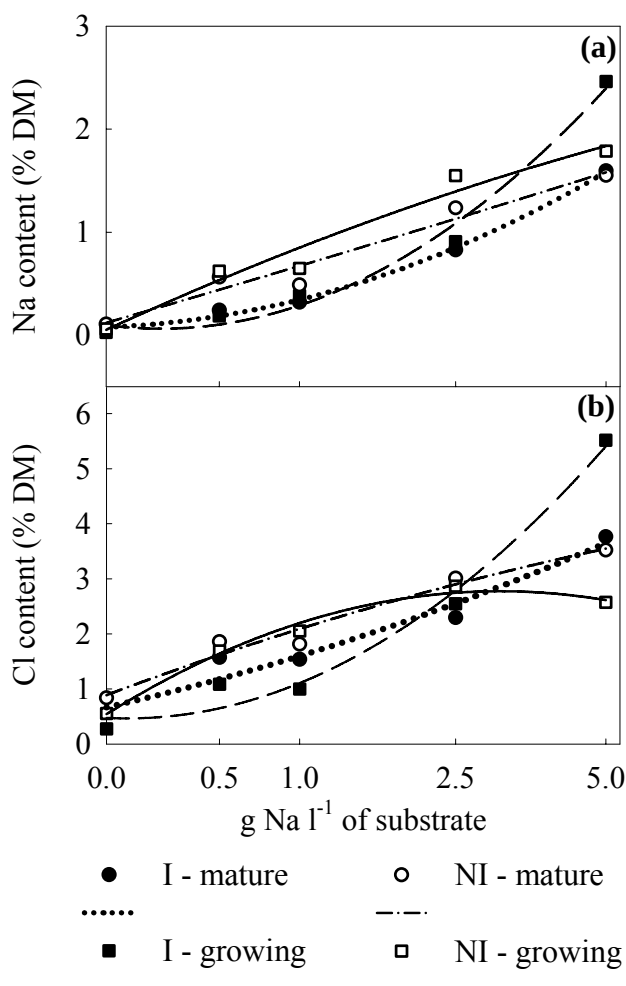


Figure 4.1 Semi-logarithmic graphs showing (a) Na ($0.26\% \pm 0.01$) and (b) Cl ($0.78\% \pm 0.1$) shoot content, in percentage of dry mass (DM), of growing and mature parts of jack pine seedlings inoculated (I), or not (NI), and treated with 0, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 g Na l⁻¹ of substrate. Axis labels are non-transformed.

4.6.2 Colonization rates

At harvest, of the short roots produced by inoculated plants after transplantation, 65% were colonized by *L. bicolor* (as confirmed by ITS-RFLP analyses) in the control NaCl treatment and no other fungus was detected. By contrast, in non-inoculated seedlings in the control NaCl treatment, 50% of the fine roots from growing parts were colonized by *T. americana* (Figure 4.2). Less than 1% of short roots from non-inoculated seedlings were associated with a species of *Wilcoxina*. Colonization of fine roots by ECM fungi on the growing parts of the root system significantly decreased with increasing NaCl treatments ($P < 0.01$) (Table 4.2), reaching a minimum (approx. 10%) in the 5.0 g Na l⁻¹ of substrate treatment. Nevertheless, *L. bicolor* maintained a significantly higher level of colonization than the concert of common nursery fungi along the NaCl gradient tested ($P < 0.05$). In treatments of 1.0 g Na l⁻¹ of substrate or less, colonization by *L. bicolor* was stimulated and was approximately 80%.

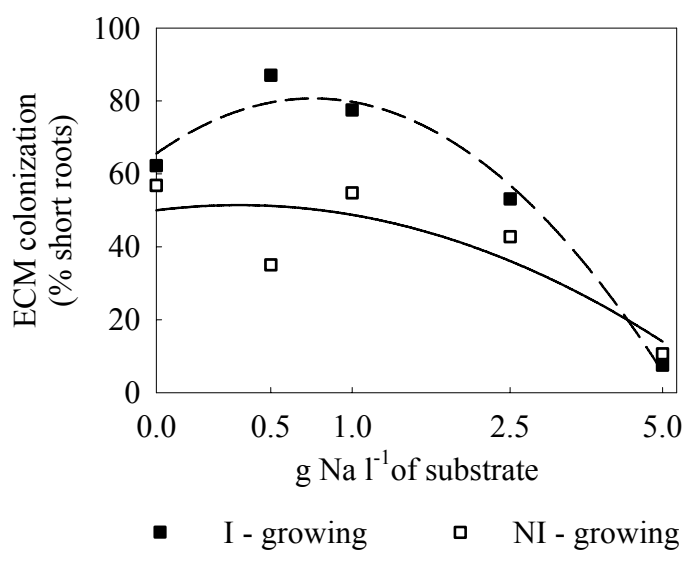


Figure 4.2 Semi-logarithmic graph showing colonization rates ($49\% \pm 10$) of root system of jack pine seedlings inoculated (I), or not (NI), and treated with 0, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 g Na l⁻¹ of substrate. Axis labels are non-transformed.

4.6.3 Photosynthetic apparatus and water relations

Chlorophyll a fluorescence and net photosynthesis – In the 0.5 and 1.0 g Na l⁻¹ of substrate treatments, inoculated and non-inoculated plants exhibited a nearly constant F_v/F_m ratio close to 0.84 (Figure 4.3a). In the 2.5 and 5.0 g Na l⁻¹ of substrate treatments, the F_v/F_m ratio declined significantly with increasing sodicity ($P < 0.01$) and inoculated seedlings showed higher stress than non-inoculated seedlings in the 5.0 g Na l⁻¹ of substrate treatment (Table 4.2). The values of Φ_{PSII} significantly decreased with increased sodicity ($P < 0.01$). Needles from growing parts had a significantly higher quantum yield than those of mature parts ($P < 0.01$) (Table 4.2, Figure

4.3b). In treatments below the 2.5 g Na l⁻¹ of substrate, inoculated seedlings showed significantly higher values of Φ_{PSII} ($P < 0.05$). This benefit was reduced with increasing NaCl concentrations. Beyond a threshold level between the 1.0 and 2.5 g Na l⁻¹ of substrate treatments, differences in quantum capture efficiency between inoculated and non-inoculated seedlings became minimal. The photochemical quenching coefficient, qP , gave the same response pattern as for Φ_{PSII} (data not shown).

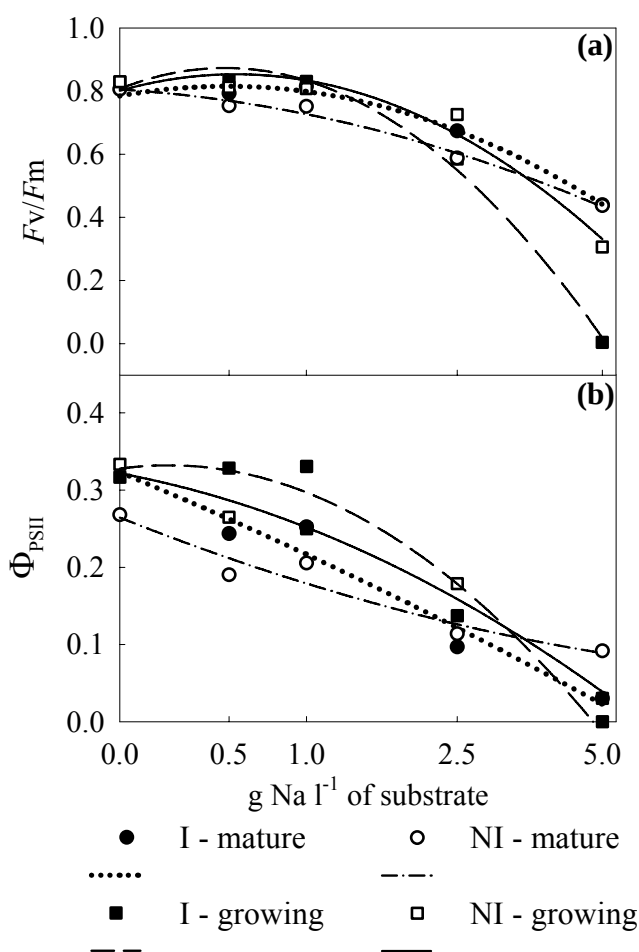


Figure 4.3 Semi-logarithmic graphs showing chlorophyll *a* fluorescence: (a) F_v/F_m ratio (0.69 ± 0.04) and (b) Φ_{PSII} (0.2 ± 0.03) of growing and mature needles of jack pine seedlings inoculated (I), or not (NI), and treated with 0, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 g Na l⁻¹ of substrate.

Axis labels are non-transformed.

The net photosynthesis of mature needles was significantly higher (by up to 31% in the control NaCl treatment) in inoculated seedlings ($P < 0.05$) compared to non-inoculated seedlings (Table 4.2, Figure 4.4a). However, that difference decreased while net photosynthesis decreased with increasing NaCl treatments ($P < 0.001$): net photosynthesis of inoculated and non-inoculated plants was close to zero in the 2.5 and 5.0 g Na l⁻¹ of substrate treatment. Stomatal conductance

(Figure 4.4b) and transpiration (Figure 4.4c) significantly decreased with increasing NaCl application ($P < 0.001$) and were similar in inoculated and non-inoculated seedlings (Table 4.2). The Chla and Chlb shoot content significantly decreased ($P < 0.001$) in mature parts and remain unchanged in growing parts with increasing NaCl treatments (data not shown).

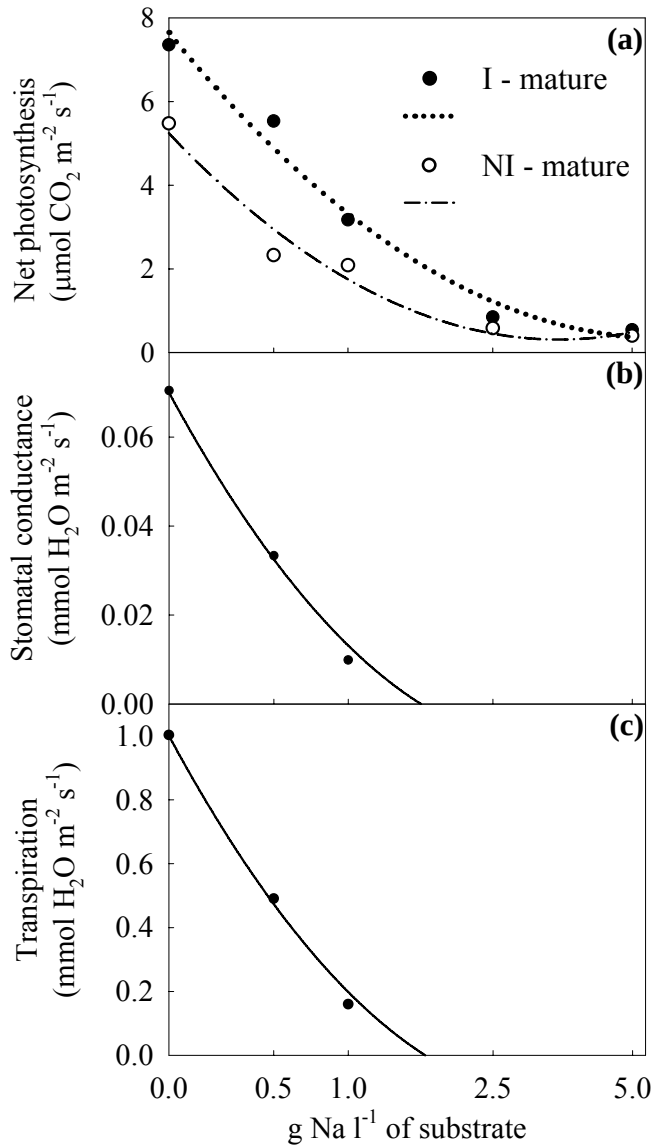


Figure 4.4 Semi-logarithmic graphs showing (a) net photosynthesis (2.8 ± 0.8), (b) stomatal conductance (0.04 ± 0.02), and (c) transpiration (0.6 ± 0.3) of needles from mature shoots of jack pine seedlings inoculated (I), or not (NI), and treated with 0, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 g Na l⁻¹ of substrate.

Axis labels are non-transformed.

Water status - There was no effect of inoculation on shoot xylem water potential and this parameter showed a linear decrease ($P < 0.001$) with increasing NaCl treatments (data not shown). That parameter exhibited values of -0.4 MPa in the control NaCl treatment and decreased until -0.8 in the 5.0 g Na l^{-1} of substrate treatment. Water content decreased with increasing NaCl treatments, and it was lower in growing and mature shoots of inoculated plants than in those of non-inoculated seedlings ($P < 0.05$) (Table 4.2, Figure 4.5). Of the 40 plants assessed in the present experiment, two inoculated seedlings dehydrated and died in the 5.0 g Na l^{-1} of substrate treatment. Non-inoculated seedlings at this treatment level showed similar water content but were still alive at the end of the experimental period.

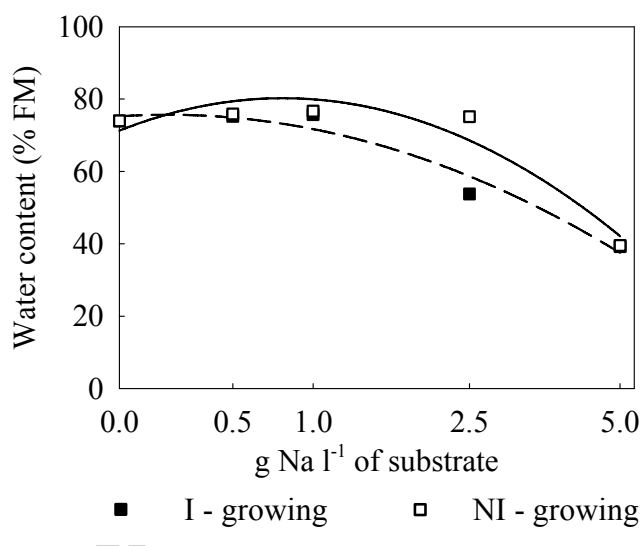


Figure 4.5 Semi-logarithmic graph showing water content, in percentage of fresh mass (FM) of growing shoots ($65.9\% \pm 2.3$) of jack pine seedlings inoculated (I), or not (NI), and treated with 0, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 g Na l^{-1} of substrate. Axis labels are non-transformed.

4.6.4 Biomass partitioning

Six months after sowing (during the tree nursery growth phase), inoculated seedlings were significantly smaller (11.9 cm and 1.6 g DM) than non-inoculated seedlings (12.7 cm and 2 g DM) ($P < 0.05$). At the time of harvest following the experiment, inoculated seedlings were still smaller (data not shown) and their growing shoots and roots (Table 4.3) exhibited a lower DM than non-inoculated seedlings ($P < 0.05$). In general, increasing NaCl treatments significantly reduced both height ($P < 0.05$) and DM of shoots ($P < 0.05$) and roots ($P < 0.05$) (Table 4.3). However, the height of inoculated seedlings showed a slight increase with increasing NaCl treatments and the values observed converged with those of non-inoculated seedlings. Although increased NaCl did not significantly affect the shoot:root ratio, *L. bicolor*-inoculated seedlings invested more in biomass accumulation of growing roots (in percentage of the control

NaCl treatment), which resulted in a significantly ($P < 0.001$) lower shoot:root ratio of growing parts (Table 4.3). Shoot biomass accumulation significantly decreased with increasing NaCl treatments ($P < 0.05$) and was similar in inoculated and non-inoculated seedlings (Table 4.2, Figure 4.6). Root biomass accumulation declined linearly by increasing the amount of NaCl applied and inoculated seedlings maintained a higher accumulation than non-inoculated seedlings ($P < 0.05$) (Table 4.2, Figure 4.6). The regression curves indicated that biomass accumulation in roots was stimulated ($> 100\%$) in inoculated seedlings in the 0.5 g Na I^{-1} of substrate treatment. Above this treatment, root biomass accumulation of both inoculated and non-inoculated seedlings was repressed and converged in the highest NaCl treatment (around 50-60%) (Figure 4.6).

Table 4.3 Means and standard errors of dry mass of growing shoots and roots and their ratio in inoculated (I) and non-inoculated (NI) seedlings in response to increasing NaCl treatments.

NaCl treatment (g Na l ⁻¹ of substrate)	I	NI	Main significant contrast [†]
<i>Growing shoots DM^{††} (g)</i>			
0	0.73 (0.3)	1.57 (0.2)	SP × NaCl (<i>P</i> < 0.01) and IN × NaCl (<i>P</i> < 0.05)
0.5	0.83 (0.3)	1.35 (0.1)	
1.0	0.64 (0.2)	1.35 (0.2)	
2.5	0.61 (0.2)	0.78 (0.1)	
5.0	0.40 (0.1)	0.73 (0.1)	
<i>Growing roots DM (g)</i>			
0	0.36 (0.03)	0.46 (0.05)	RP × IN × NaCl (<i>P</i> < 0.05)
0.5	0.55 (0.04)	0.37 (0.04)	
1.0	0.32 (0.04)	0.37 (0.04)	
2.5	0.30 (0.06)	0.19 (0.03)	
5.0	0.21 (0.07)	0.25 (0.05)	
<i>Shoot:root ratio (DM)</i>			
Mature	0.7 (0.04)	0.6 (0.03)	PP × IN (<i>P</i> < 0.001)
Growing	2.1 (0.3)	3.8 (0.2)	

[†]SP/RP: shoot parts/root parts (growing vs mature parts); PP: plant parts (mature vs growing); IN: inoculation (*L. bicolor* vs *T. americana*)

^{††}DM: dry mass

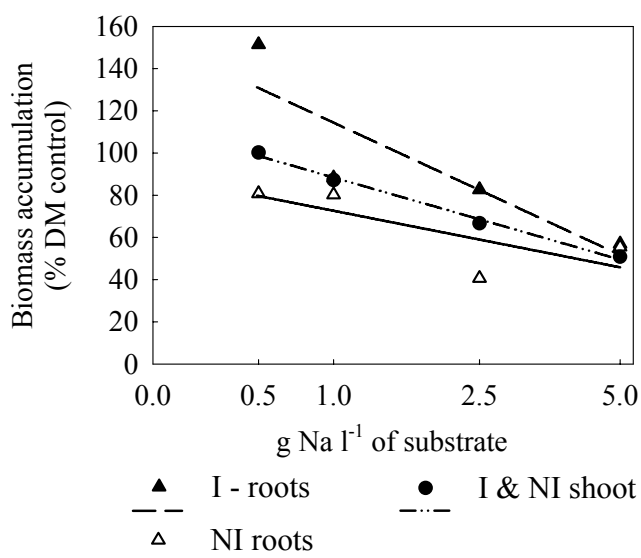


Figure 4.6 Semi-logarithmic graph showing growing shoot ($76\% \pm 14$) and root ($80\% \pm 13$) biomass accumulation of seedlings treated with 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 g Na l⁻¹ of substrate, in percentage of the shoot and root DM of jack pine seedlings in the control NaCl treatment, inoculated (I) or not (NI). Axis labels are non-transformed.

4.6.5 Elemental analyses

The N, P, K, Ca, Mg content significantly (with at least $P < 0.05$) increased in shoot tissues with increasing NaCl treatment (data not shown). The main effect of *L. bicolor* on mineral accumulation was a significantly ($P < 0.001$) higher P content in shoot tissues of inoculated seedlings in all NaCl treatments (Table 4.4). In a lesser extent, N content was significantly higher in growing shoots of inoculated seedlings in the 0.5 and 1.0 g Na l⁻¹ of substrate treatments (Table 4.4). The K content was also higher in inoculated seedlings than in non-inoculated seedlings although it was not significant. Growing and mature shoot parts of non-inoculated seedlings exhibited a significantly higher Na/Cl ratio than that of inoculated plants ($P < 0.001$) (data not shown). The ratios of Na/P, Cl/P, Na/K, Cl/K, Na/Ca, Cl/Ca, Na/Mg and Cl/Mg indicated that, relatively to the other elements, significantly more Na⁺ and Cl⁻ were absorbed with increasing NaCl stress (data not shown). These ratios were also significantly higher (with at least $P < 0.05$) in non-inoculated than in inoculated seedlings.

Table 4.4 Means and standard errors of N and P contents of growing shoots of inoculated (I) and non-inoculated (NI) seedlings in response to increasing NaCl treatments.

NaCl treatment (g Na I ⁻¹ of substrate)	I	NI	Main significant contrast [†]
<i>N content (% of DM^{††}) of growing shoots</i>			
0	0.99 (0.07)	1.03 (0.03)	SP × IN × NaCl (<i>P</i> < 0.001)
0.5	0.97 (0.05)	0.95 (0.07)	
1.0	1.37 (0.09)	1.04 (0.12)	
2.5	1.37 (0.27)	1.28 (0.16)	
5.0	1.03 (0.02)	1.45 (0.05)	
<i>P content (% of DM) of growing shoots</i>			
0	0.21 (0.03)	0.16 (0.02)	SP × NaCl (<i>P</i> < 0.001) and IN (<i>P</i> < 0.01)
0.5	0.22 (0.02)	0.20 (0.01)	
1.0	0.23 (0.01)	0.20 (0.02)	
2.5	0.28 (0.03)	0.23 (0.01)	
5.0	0.33 (0.40)	0.33 (0.01)	

[†]SP: shoot parts (growing vs mature parts); IN: inoculation (*L. bicolor* vs *T. americana*)

^{††}DM: dry mass

4.7 Discussion

Inoculation with *L. bicolor* UAMH 8232 increased the resistance of nursery-grown jack pine seedlings to sodic stress until a threshold amount of NaCl applied. The photosynthetic, ChFI (*i.e.*, F_v/F_m and Φ_{PSII}) and water relation parameters indicated the level of stress (Kramer & Boyer 1995, Lichtenthaler 1996, Rohacek & Bartak 1999, Maxwell & Johnson 2000) and the rest of the measured variables served to describe the response of seedlings to each level of NaCl application. From this, three patterns of responses were detected in *L. bicolor*-inoculated seedlings compared to *T. americana*-colonized seedlings along the gradient of NaCl. First, in the control NaCl conditions, inoculated seedlings showed a lower biomass accumulation than non-inoculated seedlings while they exhibited a higher net photosynthesis and mineral acquisition (*e.g.*, P). Second, in saline (hyperosmotic) and sodic (excess Na^+) conditions below a threshold level situated somewhere between 1.0 and 2.5 g Na l^{-1} of substrate, inoculated seedlings showed increased root biomass accumulation, increased *L. bicolor* colonization, higher C fixation, light energy and mineral acquisition, and they accumulated less Na^+ and Cl^- in shoot tissues. Third, beyond that threshold level, the stress was intense and *L. bicolor*-inoculated seedlings tended to dehydrate faster than *T. americana* colonized seedlings.

In non-limiting conditions, roots colonized by *L. bicolor*, when compared to those of seedlings colonized by common nursery ECM fungi (*e.g.*, *T. americana*), seemed to be a greater sink for fixed C. The host-fungus source-sink relationship is already widely accepted (Dosskey *et al.* 1990, 1991, Wu *et al.* 2002). It is possible that the sink effect was driven by fungal growth as suggested by seedling responses in the control NaCl treatment, in which, higher net photosynthetic rates and photochemical quenching values of mature needles of inoculated seedlings were not correlated with increased plant growth. The induced growth depression of jack pine seedlings following colonization with *L. bicolor* was also described by Kropp & Mueller (1999). A similar response has been recorded in other host - ECM fungus associations: *L. laccata* and *H. crustuliniforme* reduced *Pinus sylvestris* L. (scots pine) growth (Nylund & Wallander, 1989), and *H. crustuliniforme* reduced *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Douglas fir) growth (Dosskey *et al.* 1990, 1991). *Laccaria bicolor* is a fast growing fungus that can develop an extensive energy demanding extraradical phase and may be a greater sink than *T. americana*. Furthermore, the higher derivation of resources from plant growth may have been generated by

the larger portion of seedling short roots colonized by *L. bicolor* in inoculated seedlings. The present results suggest that inoculated seedlings allocated more resources to maintaining the efficiency of their resource collecting organs (*i.e.*, chloroplasts and mycorrhizas) in mature and growing parts. By contrast, non-inoculated seedlings growing in non-limiting conditions showed increased shoot and root DM, with a higher investment of resources in shoot growth.

Without taking into consideration the inoculation effect, the general response of jack pine seedlings for the range of treatments from 0 to 1.0 g Na l⁻¹ of substrate in the present experiment confirmed the results obtained by Apostol *et al.* (2002, 2004), Franklin *et al.* (2002a,b), and Franklin & Zwiazek (2004). Within the above range, the root biomass accumulation and physiological state of inoculated seedlings were greater than those of non-inoculated seedlings. There are three main reasons which may explain the potential beneficial effects of inoculation on the host physiology. Firstly, Na⁺ and Cl⁻ contents were lowered in shoots of seedlings inoculated with *L. bicolor*. The *L. bicolor* membranes may have either exhibited a higher ion selectivity (Kottke 1992) or the fungal mycelium may have accumulated excess ions in its tissues (*e.g.*, by vacuolization). It is also possible that the influence of the inoculated fungus modified the organic osmolyte (*e.g.*, sugars) accumulation in its host tissues (Wedding & Harley 1976, Pfeffer *et al.* 2001) which favored the limited accumulation of excess ions in shoot (Niu *et al.* 1995, 1997). Secondly, in conjunction with the lower Na⁺ and Cl⁻ shoot content, the growth improvement of inoculated seedlings was likely to be promoted by the higher production of carbohydrates. As stomatal conductance was similar, the main factor for the improvement of photosynthetic efficiency was possibly the higher quantum capture efficiency (Φ_{PSII}) of the photochemical system of inoculated seedlings. Thirdly, *L. bicolor* increased content of N and P in growing shoots. The higher N (a major constituent of chlorophyll and rubisco) and P content of growing tissue of inoculated seedlings possibly indicated a higher potential for growth and metabolic activity under excess NaCl conditions. A consequence of this may be an improvement in the photochemical efficiency (*i.e.*, Φ_{PSII} , qP) of inoculated seedlings compared to non-inoculated controls.

Photosynthetic and Chl responses, and Na⁺ and Cl⁻ accumulation patterns changed at a threshold situated somewhere between 1.0 and 2.5 g Na l⁻¹ of substrate. Above this threshold, the strategy of resistance (adaptive consequences) was obscured by the outset of degeneration of overly

stressed seedlings (pathological consequences). As net photosynthesis nearly ceased above this threshold, it can be considered that the seedlings were in a different physiological state. Validity of statistical inference about plant resistance to lethal levels of NaCl was compromised as not all plants may have started to die off at the same rate and/or moment. Nevertheless, some conclusions can be drawn as the highest disturbance of the chlorophyll antenna coincided with a greater increase of Na and Cl contents in shoots of inoculated seedlings compared to non-inoculated ones. Possibly, to avoid a high physiological dehydration, inoculated seedlings accumulated toxic levels of Na⁺ and Cl⁻ (Apostol *et al.* 2002, Franklin *et al.* 2002b, Franklin & Zwiazek 2004), which in turn affected photochemistry and eventually other essential mechanisms (Hasegawa *et al.* 2000, Papageorgiou & Murata 1995). Therefore, we suggest that this threshold corresponds to the physiological point where osmotic stress becomes intolerable and where Na⁺ and Cl⁻ reach toxic concentration levels in shoot tissues (*i.e.*, between 1.0 and 1.5% DM of Na, and/or between 2 and 3% DM of Cl). Beyond this point, toxicity increases or the plant dies from dehydration.

Beyond that hypothetical threshold, the production of organic osmolytes was possibly reduced to a minimum as a result of limited C fixation and disturbance of the light harvesting system. Inorganic osmolyte (*e.g.*, Na⁺ and Cl⁻) contents of inoculated and non-inoculated seedling shoots differed with increasing NaCl treatments but xylem water potentials between the two types of seedlings kept similar. As *L. bicolor*-colonized roots may have maintained a stronger sink for sugars (which are potential osmolytes) from the shoot than *T. americana*-colonized roots, the importance of osmoregulation in the shoot via Na⁺ and Cl⁻ may have increased faster in inoculated plants to maintain a similar xylem water potential. *Laccaria bicolor* is known to be sensitive to water stress (Coleman *et al.* 1989). This trait may have entered into conflict with the host's requirements and thus limited benefits of the symbiosis once the fungus reached its limit of resistance to osmotic stress. Our study suggests that *L. bicolor* may be, in certain conditions, an exploitative ECM fungus (Bronstein 2001, Egger & Hibbet 2004). In addition, *T. americana* may have favored better water relations at these high osmotic stress levels. Guelh *et al.* (1992) observed that, although *L. laccata* improved turgor potential of inoculated Douglas fir, seedlings colonized with *T. americana* exhibited a higher hydraulic conductance and showed more resistance to drought stress. Furthermore, inoculated seedlings were also disadvantaged in the 5.0 g Na l⁻¹ of substrate treatment by their smaller size at the outset of the experiment.

Finally, the present results highlight the need to consider using mycorrhizal inoculum in nursery stock production for revegetation of salt-affected sites. *Thelephora americana* and *Wilcoxina* sp. are common ECM fungi in tree nursery that readily colonize non-inoculated plants (Kernaghan *et al.* 2003). These fungi are adapted to the wet and nutrient rich conditions prevalent in nurseries (Hacskeylo 1965, Marx 1991) and should be considered as opportunistic species capable of colonizing roots of plants grown in inoculum poor substrate. They could be rapidly out competed after out-planting (Marx 1991). We suggest that, in the short-term, *L. bicolor*-inoculated nursery seedlings outplanted on sites in the range of tolerable sodicity and salinity (SAR_{1:5} of 12 to 18 and EC_{1:5} of 0.6 to 1 dS m⁻¹, in the present study) will show increased root growth, mineral acquisition and improved light energy capture and net photosynthesis. Site adapted fungi have the capability to reduce those stresses perceived by plants at transplantation (Trappe 1977, Kropp & Langlois 1990, Malajczuk *et al.* 1994). Therefore, a potentially salt resistant fungus such as *L. bicolor*, should improve plant survival under saline and sodic conditions (dispersion of soil colloids sets apart) and thus compensate for the initially smaller size of inoculated seedlings. If the fungus used is more resistant/tolerant to the main site stressor, it has the potential to rapidly colonize the new adjacent substrate and both protect and enhance the nutrient content of its host. Considering that soil resources and edaphic stressors are the main constraints for revegetation of degraded lands, the depressed biomass accumulation from the nursery phase may, with time, be compensated for by the greater overall efficiency of the mycorrhizal plant (Trappe 1977, Kropp & Langlois 1990). That strategy is likely to improve survival and overall growth in the long-term if drought periods (major determinant of salt concentration in the top soil) are not too long and/or intense. Otherwise, if the suggested threshold of Na⁺ and Cl⁻ concentrations in the substrate and in the tissues is passed, *L. bicolor* inoculation would accelerate wilting of seedlings. *T. americana*-colonized seedlings were also likely to die off at these lethal levels of stress, being bigger they had resources to survive longer to extreme NaCl stress but not to grow. Therefore, revegetation of sites showing excess NaCl above the detected threshold or lightly salt-affected sites exposed to intense drought periods will require inoculation with a more resistant fungus.

4.8 Acknowledgements

This research was funded by Syncrude Canada Ltd. and NSERC (CRDPJ 250448-01 to D.P. Khasa). We wish to thank Julie Talbot and Yves Dubuc for all their help with plant physiological measurements, Alain Brousseau for elemental analysis, Michèle Bernier-Cardou for advices in statistical analyses, and Andrew Coughlan and Jean-Luc Jany for help in solving scientific problems. We also wish to thank Erin Bergrand and Claude Fortin for technical help and advice.

Chapitre 5 Differential effect of three ectomycorrhizal fungi on the physiological response of *Picea glauca* and *Pinus banksiana* seedlings exposed to a NaCl gradient

5.1 Avant-propos

Les résultats de l'expérience présentée dans ce chapitre ont été soumis pour publication dans un journal international avec comité de lecture (Bois, Bigras, Bertrand, Piché, Fung & Khasa 2005b). L'ensemble des mesures écophysologiques fut réalisé avec la collaboration du Dr Francine Bigras (Ressources naturelles Canada, CFL, Québec). Les analyses biochimiques ont été réalisées en collaboration avec Annick Bertrand (Agriculture Canada, Québec). Les professeurs Damase Khasa et Yves Piché ont fourni l'encadrement scientifique. Martin Fung est intervenu pour la définition des besoins de l'industrie et fut la personne ressource au sein du bureau des affaires environnementales à Syncrude Canada Ltd. L'expérience 4, qui suit, a été conçue à partir des résultats obtenus dans les expériences 2 (Chapitre 3) et 3 (Chapitre 4). Ainsi, les travaux présentés dans ce chapitre portent sur les combinaisons des trois champignons basidiomycètes de l'expérience 2 avec les hôtes *Pinus banksiana* Lamb. et *Picea glauca* (Moench) Voss. Intégrant la combinaison *Laccaria bicolor* (Maire) Orton UAMH 8232 et *P. banksiana*, l'expérience 4 permet de rendre compte de la réponse physiologique de cette combinaison dans d'autres conditions d'inoculation et de croissance. À la différence de l'expérience 3, les semis ont été produits à Québec dans les serres du centre de foresterie des Laurentides (CFL). Ils ont ainsi été inoculés, fertilisés et irrigués afin d'obtenir les meilleurs résultats de mycorhization (Annexes II et III).

5.2 Résumé

Une expérience en serre a été réalisée pour évaluer l'effet de la mycorhization contrôlée de semis utilisés pour la végétalisation de rejets sableux sodiques issus de l'exploitation des sables bitumineux dans le Nord-Est de l'Alberta (Canada). Des semis d'épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss) et de pin gris (*Pinus banksiana* Lamb.) ont été inoculés avec trois champignons ECM, et la réponse physiologique de ces associations à un gradient de concentrations de NaCl (solutions de traitements de 0, 50, 100 et 200 mM de NaCl) a été déterminée au cours des quatre semaines de traitement. Les champignons ECM, *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Qué. UAMH 5247, *Laccaria bicolor* (Maire) Orton UAMH 8232 et un isolat de *Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick provenant d'un terrain sodique ont été sélectionnés pour leur résistance *in vitro* à l'excès de Na^+ et Cl^- . La réponse des plantes à l'excès de NaCl a été caractérisée à l'aide de : (i.) l'accumulation et la répartition du Na^+ , (ii.) la fluorescence de la chlorophylle *a*, (iii.) la croissance du plant, (iv.) l'hydratation des tissus et (v.) l'accumulation d'osmolytes organiques. Les semis de pin gris se sont montrés plus sensibles que les semis d'épinette blanche à l'augmentation des concentrations en Na^+ et en Cl^- . Les deux espèces ont présenté une croissance réduite avec l'augmentation des concentrations de NaCl ainsi qu'une accumulation croissante d'osmolytes organiques et de Na^+ . Les semis d'épinette blanche inoculés avec l'isolat de *S. tomentosus* ont présenté la meilleure réponse de croissance à toutes les concentrations de NaCl testées. Bien que les semis de pin gris inoculés avec *L. bicolor* ou l'isolat de *S. tomentosus* aient montré la plus forte croissance avec les traitements de 50 et 100 mM de NaCl, les deux champignons ont augmenté le stress photochimique et la déshydratation des tissus de leur hôte à 200 mM de NaCl. À cette concentration, les semis de pin gris inoculés avec *H. crustuliniforme* ont montré la plus forte résistance.

5.3 Abstract

A greenhouse experiment was set up to test the effect of ectomycorrhizal (ECM) inoculation on tree seedlings to be used in the revegetation of salt-affected tailing sands resulting from the exploitation of oil sand in northeastern Alberta (Canada). White spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) and jack pine (*Pinus banksiana* L.) seedlings were inoculated with three ECM fungi, and the physiological response of these associations to a gradient of NaCl concentration (0, 50, 100 and 200 mM) was assessed over four weeks. The ECM fungi *Hebeloma crustuliniforme* UAMH 5247, *Laccaria bicolor* UAMH 8232, and a *Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick isolate from a sodic site, were selected for their *in vitro* resistance to excess Na^+ and Cl^- . The plant response to excess NaCl was characterized by: (i) Na^+ accumulation and allocation, (ii) chlorophyll *a* fluorescence, (iii) growth, (iv) water content, and (v) organic osmolyte accumulation. Jack pine seedlings were more sensitive than white spruce seedlings to increasing Na^+ and Cl^- concentrations. Both species showed decreasing biomass accumulation, and increasing contents of organic osmotica and Na with increasing NaCl treatment. White spruce seedlings inoculated with the *S. tomentosus* isolate showed the best growth response over all NaCl concentrations assessed. Although jack pine seedlings inoculated with either *L. bicolor* or the *S. tomentosus* isolate exhibited the highest growth in the 50 and 100 mM treatments, both fungi increased photochemical stress and dehydration of their hosts in the 200 mM NaCl treatment. At this concentration, *H. crustuliniforme* inoculated jack pine seedlings showed a higher resistance.

5.4 Introduction

The ability of a given plant to cope with fluctuating or permanent soil salinity or sodicity is dependent upon certain factors: the continued capacity to absorb water, the ability to cope with excess Na^+ , and the capacity to maintain ionic homeostasis with respect to essential ions (Levitt 1980, Cheeseman 1988, Munns 1993, 2005, Orcutt & Nilsen 2000, Kozłowski 1997, Hasegawa *et al.* 2000, Zhu 2001, 2002). Halophytes and adaptable glycophytes generally rely on osmotic adjustment and ionic compartmentalization to exclude and/or partition excess Na^+ (Yeo 1998, Hasegawa *et al.* 2000). To withstand the physiological drought caused by high Na^+ concentration within the soil solution, plants have to either counterbalance osmotic deficiencies with organic osmotica, or to accumulate Na^+ or other ions in excess, as a low cost inorganic osmoticum (Yeo 1983, Niu *et al.* 1995, 1997, Bohnert & Shen 1999). In the latter case, the negative specific ion effects of Na^+ and Cl^- may take place once a critical concentration threshold is exceeded. Sodium and Cl^- toxicity affects the plant's phytohormonal balance, alters the enzymatic activity and the cell membrane integrity, causes protein and nucleic metabolism dysfunction, and reduces net photosynthesis and gaseous exchange (Munns 1993, 2005, Kozłowski 1997, Neumann 1997, Hasegawa *et al.* 2000, Mansour & Salama 2004).

Coniferous trees of the boreal forest generally form ectomycorrhizas with a range of fungi from the basidiomycetes and ascomycetes (Read *et al.* 2004). The resulting mutualistic symbiosis is essential for the completion of the life cycle of both partners in natural conditions. In return for enhanced mineral nutrition and survival (Smith & Read 1997), the host plant channels from 5 to 30% of its net photosynthetic production to its mycobionts (Söderström 1992). In the ectomycorrhizal (ECM) association, the fungal partner ensheathes the tree's short roots and develops a Hartig net between the cortical cells; emanating hyphae explore the soil matrix for nutrients and water (Smith & Read 1997). The fungus being at the interface between the plant and the edaphic environment can reduce stresses such as nutrient deficiency (Marschner & Dell 1994, Smith *et al.* 1994, Read *et al.* 2004), drought (Dosskey *et al.* 1991, Lamhamedi *et al.* 1992), and heavy metal pollution (Kottke 1992, Jentschke & Goldbold 2000). However, little is known about the salt tolerance of the ECM association. In theory, the identification of salt tolerant strains of ECM fungi could help enhance tree survival and growth in saline and sodic environments. In an axenic experiment, Chen *et al.* (2001a) showed that, of 18 isolates of

Pisolithus spp. from Australia tested, most were resistant to NaCl and Na₂SO₄ treatments of 200 mM. In a similar experiment, Kernaghan *et al.* (2002) showed that different ECM fungi isolated from the boreal forest, exhibited different resistance levels to a range of concentrations of various salts. The two most resistant isolates were the basidiomycetes *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Quel. UAMH 5247 and *Laccaria bicolor* Maire (Orton) UAMH 8232. *Hebeloma crustuliniforme* has also been shown to increase water conductance and to limit accumulation of Na⁺ in shoots of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) seedlings grown in the presence of 25 mM NaCl (Mushin & Zwiazek 2002). Furthermore, biomass accumulation and net photosynthesis of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) colonized by *L. bicolor* was greater than that of non-inoculated controls exposed to excess NaCl (Bois *et al.* 2005c). In addition, a closely related species, *Laccaria laccata* (Scop.: Fr.) Cooke, has been shown to improve the salt stress tolerance of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) (Dixon *et al.* 1993).

In the Athabasca region of northeastern Alberta (Canada), oil companies have cleared thousands of hectares of boreal forest, removed the overlying organic ('topsoil') and sedimentary layers (overburden), and excavated the oil sand ores. The emptied pits are filled with a mix of water and sand tailings issued from the oil extraction process and covered with the above mentioned spoil (Li & Fung 1998, Fung & Macyk 2000). The resulting reconstructed soils may be highly saline, alkaline and often sodic, and also contain oil residues (Li & Fung 1998, Fung & Macyk 2000). These substrates also lack certain components of the soil microbial community essential for natural reforestation (Danielson *et al.* 1983b, Bois *et al.* 2005d). The stabilized sand tailings amended with overburden and peat are revegetated with indigenous herbaceous, shrub and tree species (Fung & Macyk 2000). Jack pine and white spruce are the two main coniferous tree species used.

In a previous experiment, we assessed the influence of inoculation of *L. bicolor* UAMH 8232 on the growth of jack pine seedlings during the nursery phase, and its effect on salt resistance after exposure to excess NaCl as would occur after transplantation in a salt-affected reconstructed soil. *Laccaria bicolor* positively influenced the physiology of jack pine seedlings exposed to excess NaCl below a threshold concentration of toxicity lying between 100 and 300 mM NaCl (Bois *et al.* 2005c). However, the fungus increased Na and Cl content in shoot tissues and increased photochemical disturbance above this threshold. Moreover, using axenic culture conditions, we

also showed that *L. bicolor* UAMH 8232 was more sensitive than isolates of *Phialocephala* sp., *Hymenoscyphus* sp., *H. crustuliniforme*, *Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick to a range of NaCl concentrations (0 – 300 mM NaCl) (Bois *et al.* 2005a). To identify more reliable ECM fungal species, the present experiment sought to compare the physiological responses of jack pine and white spruce seedlings inoculated either with *H. crustuliniforme*, *L. bicolor* or a *Suillus tomentosus* (isolate from a sodic reconstructed soil (Bois *et al.* 2005a)), to a range of NaCl treatments. The combination of jack pine and *L. bicolor* was included in this experiment to assess the physiological response of the host in different growth and NaCl exposure conditions and to contrast the response of the other plant-fungus combinations. The first objective was to compare the growth response of inoculated seedlings since that parameter is used to assess nursery stock quality. The growth parameters are also good indicators of short-term stress resistance/tolerance after transplantation. As certain ECM fungi show a degree of host specificity (Molina *et al.* 1992), the response of different host plants inoculated with the same fungus may differ. Depending on the host species, the mycobiont conveying the greatest degree of resistance to an excess of NaCl may differ and the strategies of resistance may not be the same. The second objective was to investigate osmotic adjustment patterns and allocations of some resources, and to assess the efficiency of the photochemical apparatus. This will help to unravel the effect of each mycobiont on its host resistance mechanisms. Finally, soil salinity (electrical conductivity (EC)) and sodicity (sodium absorption ratio (SAR)) indicators were used to relate the physiological response to *in situ* chemical conditions -Na⁺ dispersion effects on soil colloids set apart-.

5.5 Materials and Methods

5.5.1 Fungal and plant materials

The *L. bicolor* UAMH 8232 inoculum was produced in batch culture in 1 l Erlenmeyer flasks containing 100 ml of modified Melin-Nokran (MMN) medium (Marx 1969). The *H. crustuliniforme* UAMH 5247 and *S. tomentosus* solid inocula were grown in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 250 ml sterile Peat:Vermiculite (P:V) (1:28, v:v) amended with 125 ml of MMN. Cultures were incubated for 28 d in the dark at 23°C. Prior to the present experiment, identification of the three fungal species was performed by sequencing the ITS region of the rDNA (obtained from pure mycelium) following the method outlined by Bois *et al.* (2005d). The sequences were then subjected to the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sequence homologies search engine.

Seeds of jack pine and white spruce were pre-germinated under greenhouse conditions (30-40% RH, 8/16 h night/day, 18/23°C night/day, photon flux density (PFD) of 100-150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in trays containing Turface® MVP (Profile™, Buffalo Grove, IL, USA). To favor short root development and ectomycotrophy, seedlings of both species were grown in the same trays for six weeks without fertilization prior to inoculation (Guérin-Laguet personal communication). The seedlings were subsequently transferred to IPL 15-320 plastic containers (IPL, St-Damien, Québec, Canada). Prior to transplantation, each cavity was half filled with a growth substrate consisting of a Sand:Turface®:Peat:Perlite (S:T:P:Pe) (16:16:1.2:1.75, v:v:v:v) mix. For the *L. bicolor* treatment, roots of seedlings were dipped into a suspension (in sterile distilled H₂O) of rinsed (to remove any trace of the MMN medium) and chopped hyphae. Seedlings were placed singly in the cavities and the roots covered with 20 ml of sterile P:V (see above) amended with 5 ml of the suspension before filling the cavity with further growth substrate (Guérin-Laguet personal communication). For seedlings inoculated with *H. crustuliniforme* and *S. tomentosus*, the sterile P:V (see above) was replaced by 20 ml of solid inoculum. Control seedlings received 20 ml of sterile P:V (see above). The seedlings were grown for 21 weeks under the greenhouse conditions described previously. The seedlings were watered every two days and fertilized weekly with 20-8-20r (Plant Prod Québec, Laval, Québec, Canada) (total N applied: 46 mg per cavity). At the end of this period, fertilization was stopped and dormancy was induced over 17 d

by reducing the photoperiod (16/8 h night/day). During the last seven days, seedlings were placed in the dark in a cold room at 4°C for the night periods. Seedlings were held dormant for six weeks in the dark at 4°C prior to the NaCl treatment application.

5.5.2 NaCl treatment application

The seedling height was measured, and individuals lying between the second and third quartiles were selected for the experiment and transplanted into 1 l pots containing the S:T:P:Pe substrate mix. To preserve the integrity of the mycelial network and limit transplantation shock, care was taken to keep the root plugs intact. To break dormancy, seedlings were returned to the greenhouse and exposed to a long photoperiod (30-40% RH, 6/18 h night/day, 18/23°C night/day, PFD of 100-150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). During the first two weeks following transplantation, seedlings were fertigated weekly by immersion of the pots (15 min) in a solution of 20-8-20r (0.5 g l⁻¹). During the subsequent four weeks, NaCl was applied weekly with the fertigating solution to obtain and maintain concentrations in the growth substrate of either 0, 50, 100 or 200 mM. To limit fluctuations in NaCl concentration, direct evaporation from the growth substrate was reduced by a plastic mulch. The choice for short-term exposure to these levels of NaCl application was determined based on Lichtenthaler's (1996) views of the plant stress concept: when the threshold of stress-tolerance or stress-resistance has been passed, a short-term high-level stress can induce the same damage as a long-term low-level stress. Glycophytes tend to be sensitive to salt stress in NaCl concentration close to 50 mM (Orcutt & Nilsen 2000) and, as described above, jack pine seedlings were shown to reach a threshold of resistance between 100 and 300 mM NaCl (Bois *et al.* 2005c).

5.5.3 Photochemical response and biomass yield

At the time of harvest, measurements of the chlorophyll *a* fluorescence (ChFl) of photosystem II (PSII) were performed on five needles (still attached) from growing (produced after dormancy) and mature (produced prior to dormancy) sections of stem, using a portable fluorometer (model PAM-2000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). The effective quantum yield ($\Phi_{\text{PSII}} = (F_{\text{m}'} - F_{\text{t}}) / F_{\text{m}'}$) was evaluated on light-adapted (steady state) needles at 23°C in a ventilated room. The actual fluorescence (F_{t}) induced by an actinic red light illumination (photosynthetic active radiation (PAR) of 340-350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and the light-adapted maximal fluorescence ($F_{\text{m}'}$)

induced by a saturating pulse (0.8 s) of light (PAR of $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were recorded. Seedlings were subsequently held in a dark ventilated room for 1 hour prior to measuring dark-adapted ChFI on growing and mature needles. The dark-adapted minimal fluorescence (F_0) was obtained using a modulated light of low intensity (PAR less than $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A saturating pulse (0.8 s) of light was applied to obtain the dark-adapted maximal fluorescence (F_m). The dark-adapted variable fluorescence ($F_v = F_m - F_0$) was calculated and used to obtain the F_v/F_m ratio.

Following ChFI measurements, shoots were harvested and the fresh mass (FM) determined. Roots were rinsed under running water to remove any adhering growth substrate and the FM determined. Weighed sub-samples of at least 300 viable root tips were collected to evaluate the level of ECM fungal colonization for each seedling. Percentage colonization was determined as the proportion of mycorrhizal root tips to the total number of short root tips. Mycorrhizas were sorted into different morphotypes using criteria described by Agerer (1999). To confirm species identification, molecular typing (ITS-RFLP) was done using the method outlined in Bois *et al.* (2005d). A 0.3 g subsample of growing shoot and root tissues were collected and stored at -20°C prior to biochemical analyses (see below). Shoots and the remaining roots were oven dried ($65^\circ\text{C} \pm 2$, 72 h) and the dry mass (DM) determined. The percentage of water in shoot and root tissues at harvest was calculated as $(\text{FM} - \text{DM}) / \text{FM}$.

After harvest, the electrical conductivity (EC), the sodium absorption ratio (SAR) and the $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ of the growth medium were measured to insure the reliability of the NaCl treatments. The EC and SAR ($\text{SAR} = [\text{Na}^+] / \sqrt{([\text{Ca}^{2+}] + [\text{Mg}^{2+}]) / 2}$) were determined as indicators of the soil solution characteristics and were used in this experiment to relate artificial conditions to revegetation site characteristics. These parameters were measured on a 1:5 soil:water (w:v) extract ($\text{EC}_{1:5}$ and $\text{SAR}_{1:5}$) which is a more convenient method than on saturated paste extract (EC_e and SAR_e). As only the chemical conditions of saline or sodic soils were intended to be reproduced, this experiment used an almost inert artificial substrate comparable to that of semi-hydroponic systems.

5.5.4 Compatible osmolyte analyses

The shoot and root tissues (0.3 g) were ground separately in liquid N and compatible osmolytes extracted by adding a 6 ml aliquot of a methanol:chloroform:water (12:5:3, v:v:v) solution. The samples were incubated at 65°C (30 min) to halt enzymatic activity. Tubes were centrifuged (13 000 x g) for 10 min and 1 ml of supernatant was collected. To induce phase separation, a 0.250 ml aliquot of water was added to the extract. After shaking, the tubes were centrifuged (13 000 x g) for 10 min and the aqueous phase collected. A 1 ml sub-sample was used for proline determination and 1 ml was evaporated to dryness on a rotary evaporator, re-solubilized in 1 ml of water, and centrifuged (13 000 x g) for 3 min prior to HPLC analysis. The HPLC analytic system was controlled by WATERS Millennium³² software (WATERS, Milford, MA, USA) and was composed of a Model 515 pump and a Model 717^{plus} autosampler. Stachyose, raffinose, sucrose and fructose were separated on a WATERS Sugar-Pak column (6.5 × 300 mm) eluted isocratically with EDTA (Na⁺, Ca²⁺, 50 mg l⁻¹) at 85°C (flow rate of 0.5 ml min⁻¹) and detected on a refractive index detector (Waters, Model 2410). Pinitol, glucose, glycerol and mannitol were separated on a Bio-Rad Aminex HPX-87P column (7.8 × 300 mm) eluted isocratically with water at 85°C and detected on a refractive index detector (Waters, Model 2410). Carbohydrate peaks were identified and concentrations determined by comparison with standards.

For proline determination, a 500 µl aliquot of the 1 ml subsample was mixed with 300 µl of a ninhydrine solution (0.125 g ninhydrine in 5 ml of a solution of 6 M H₃PO₄:glacial CH₃COOH (2:3, v:v)) and 200 µl glacial CH₃COOH (Paquin & Lechasseur 1979). Each sample was thoroughly mixed, incubated at 100°C for 45 min, cooled, and a 800 µl aliquot of toluene added. After 45 min the optical density (OD) of the upper phase (toluene) was assessed by spectrophotometry at 515 nm. The proline content was calculated from the regression curve of the OD obtained for a range (0-10 µg) of standard solutions of pure proline.

All dried shoot and root tissues were ground and the K, Ca and Na content analyzed following the methods outlined by Kalra & Maynard (1992).

5.5.5 Experimental design and statistical analysis

The experiment consisted of a factorial design comprising three completely randomized blocks. Each block comprised 32 experimental units (a pot) representing three factors in combination: (i)

the host plant species (two levels), (ii) the inoculation treatments (four levels), and (iii) the NaCl treatments (four levels). A three-way ANOVA was done to analyze the physiological responses of the seedlings using the procedure PROC GLM (SAS system, The SAS Institute, Cary, NC, USA). Main effects of the inoculation and the NaCl treatments and their interaction were assessed using the following model: $y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \alpha_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\alpha)_{ik} + (\beta\alpha)_{jk} + (\tau\beta\alpha)_{ijk} + \delta_l + \varepsilon_{ijkl}$ (where y_{ijkl} is the response, μ is the mean value of the response, τ_i is the effect of the i th level of the host species, β_j is the effect of the j th level of the inoculation treatment, α_k is the effect of the k th level of the NaCl treatment, $(\tau\beta)_{ij}$, $(\tau\alpha)_{ik}$, $(\beta\alpha)_{jk}$ and $(\tau\beta\alpha)_{ijk}$ are interactions between the three controlled factors, δ_l is the effect of the l th block, and ε_{ijkl} is the error term $((\tau\delta)_{il} + (\beta\delta)_{jl} + (\alpha\delta)_{kl} + (\tau\beta\delta)_{ijl} + (\tau\alpha\delta)_{ikl} + (\beta\alpha\delta)_{jkl} + (\tau\beta\alpha\delta)_{ijkl})$ (Steel *et al.* 1997)). In a preliminary *in vitro* study, we observed that, under non-stressed conditions, *H. crustuliniforme* UAMH 5247 was a slow growing isolate, while *L. bicolor* UAMH 8232 and the *S. tomentosus* isolate grew faster. Therefore, the following contrasts were used: (i) control plants vs inoculated plants (C1), (ii) the *H. crustuliniforme* treatment vs the *L. bicolor* and the *S. tomentosus* isolate treatments (C2), (iii) and the *L. bicolor* treatment vs the *S. tomentosus* isolate treatment (C3). The NaCl gradient effect was analyzed using polynomial contrasts.

5.6 Results

5.6.1 Effectiveness of treatments

For comparative purposes, a naturally saline soil has an EC_e higher than 4 dS m^{-1} (approximately equivalent to an $EC_{1:5} > 0.2 \text{ dS m}^{-1}$ for a sandy-like substrate (Slavich & Petterson 1993)) and an exchangeable sodium percentage higher than 15% (Sumner 1993) (approximately equivalent to an $SAR_{1:5} > 10$ (Sumner *et al.* 1998)). In the NaCl control treatment, the growth substrate was lightly saline (possibly from fertilisation salts) but did not show sodic soil chemical conditions. Addition of increasing amount of NaCl increased substrate $EC_{1:5}$ and $SAR_{1:5}$ and all substrates reached levels comparable to that of saline and sodic soil, in all NaCl treatments (Table 5.1).

Table 5.1 pH, electrical conductivity (EC) and sodium absorption ratio (SAR) of the growth substrates at the end of the experiment

NaCl treatment (mM)	pH	EC dS m^{-1}	SAR
0	6	0.2	0.3
50	5.9	0.8	12.5
100	5.9	1.2	19.7
200	6.1	2	32.5

Non-inoculated seedlings were not contaminated by fungi from the other inoculation treatments; however, certain seedlings exhibited low levels of contamination by *Thelephora americana* Lloyd, an ECM fungus commonly encountered in tree nurseries (Marx 1991). Of the inoculated seedlings, all root systems were colonized by the ECM species chosen for the treatments. The NaCl treatments had little influence on percentage colonization, which ranged between 80 and 100% (data not shown).

Increasing the amount of NaCl applied increased the Na content of shoot (Figure 5.1, Table 5.2) and root tissues of both inoculated and non-inoculated seedlings. Jack pine seedlings showed significantly higher Na^+ concentration in their tissues than white spruce seedlings ($P < 0.001$). In white spruce inoculated with *H. crustuliniforme*, higher amounts of Na^+ were allocated to shoots than to roots compared to the other inoculated seedlings, in all but the 200 mM treatment. By contrast, jack pine seedlings inoculated with *H. crustuliniforme* had significantly lower amounts

of Na^+ in shoot tissues than in roots when compared to the other inoculation treatments ($P < 0.05$) (Figure 5.1, Table 5.2). The K/Na and the Ca/Na ratios significantly ($P < 0.001$) decreased with increasing NaCl concentrations (data not shown) and were significantly ($P < 0.001$) lower in jack pine seedlings than in white spruce seedlings.

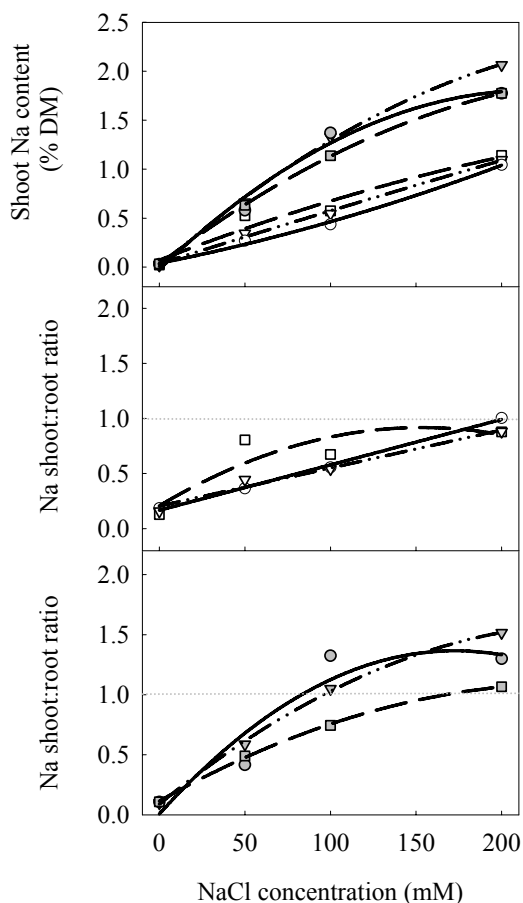


Figure 5.1 Sodium content of shoot tissues and its shoot:root ratio for white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated ($\circ$ and $\square$, —) or inoculated with *H. crustuliniforme* ($\square$ and $\square$, — — —), or with *L. bicolor* and *S. tomentosus* (∇ and ∇ , — . . —), and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl.

Open symbols represent white spruce seedlings and solid symbols represent jack pine seedlings.

5.6.2 Photochemical response

The F_v/F_m ratio decreased in the 100 mM and 200 mM treatments (Figure 5.2). White spruce seedlings showed significantly ($P < 0.001$) less photochemical stress than jack pine seedlings and the difference was greatest in the 200 mM treatment (Figure 5.2, Table 5.2). Growing parts of jack pine seedlings showed significantly higher F_v/F_m ratio values in the 100 and 200 mM NaCl treatments than did mature parts ($P < 0.01$); white spruce seedlings did not exhibit such a difference. Most of the differences between inoculation treatments were observed in jack pine seedlings. In the 200 mM treatment, jack pine seedlings inoculated with *L. bicolor* and the *S. tomentosus* isolate showed the lowest F_v/F_m ratio of growing and mature needles, respectively.

The *H. crustuliniforme* treatment reduced the F_v/F_m ratio of mature needles of white spruce seedlings in the 200 mM NaCl treatment but increased it in mature needles of jack pine seedlings in all NaCl treatments. The Φ_{PSII} parameter exhibited a linear decrease with increasing NaCl concentrations in the growth substrate (data not shown). This parameter showed a similar response to that of the F_v/F_m ratio. The inoculated seedling response was similar and showed significantly ($P < 0.05$) lower yields with increasing NaCl treatments than did non-inoculated seedlings.

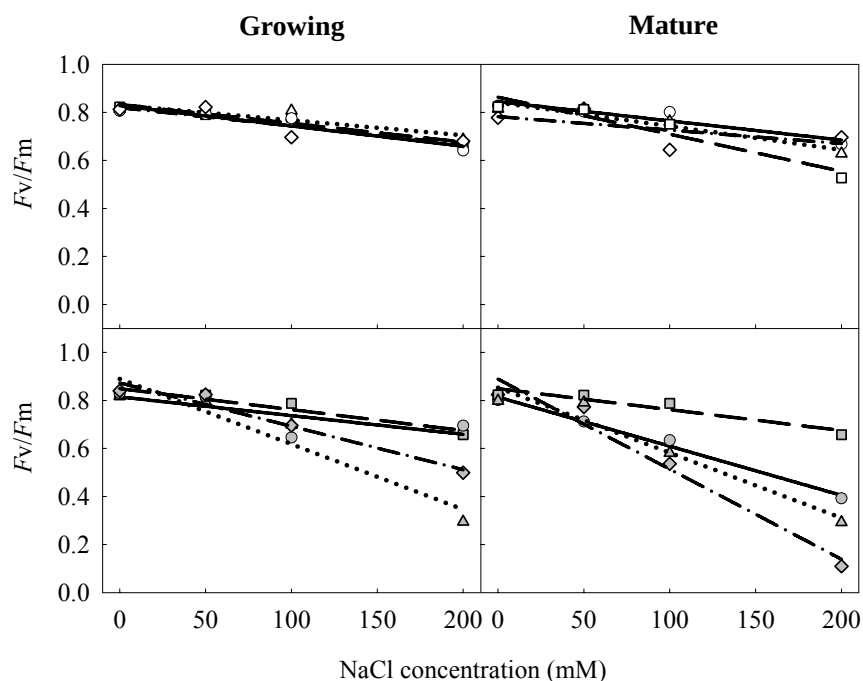


Figure 5.2 Chlorophyll *a* fluorescence F_v/F_m ratio of growing and mature needles of white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated ($\circ$ and $\bullet$, —) or inoculated with *H. crustuliniforme* ($\square$ and $\blacksquare$, — —), *L. bicolor* ($\triangle$ and $\blacktriangle$,), or *S. tomentosus* ($\diamond$ and $\blacklozenge$, — . —), and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl. Open symbols represent white spruce seedlings and solid symbols represent jack pine seedlings.

5.6.3 Seedling biomass yield and water content

In general, seedlings exhibited a significant ($P < 0.001$) linear decrease in shoot and root biomass with increasing NaCl concentration (Figure 5.3, Table 5.2). Non-inoculated controls were significantly ($P < 0.001$) smaller (data not shown), and had lower shoot and root DM than inoculated seedlings ($P < 0.001$). Seedlings inoculated with the *S. tomentosus* isolate showed the highest biomass, with *L. bicolor*-inoculated seedlings ranking second and those inoculated with *H. crustuliniforme* ranking third. Although, white spruce seedlings inoculated with *H. crustuliniforme* exhibited the lowest shoot DM compared to the other inoculation treatments, those inoculated with *L. bicolor* showed the greatest decrease with increasing NaCl concentration. The shoot:root ratio of both host species increased with increasing NaCl

concentration (data not shown). The shoot:root ratio of white spruce seedlings (1.5) was significantly ($P < 0.001$) higher than that of jack pine seedlings (1.1). Moreover, the shoot:root ratio of white spruce seedlings increased to a greater extent with NaCl increase than did that of jack pine seedlings (significant linear interaction, $P < 0.05$). Inoculation treatments did not affect the shoot:root ratio response.

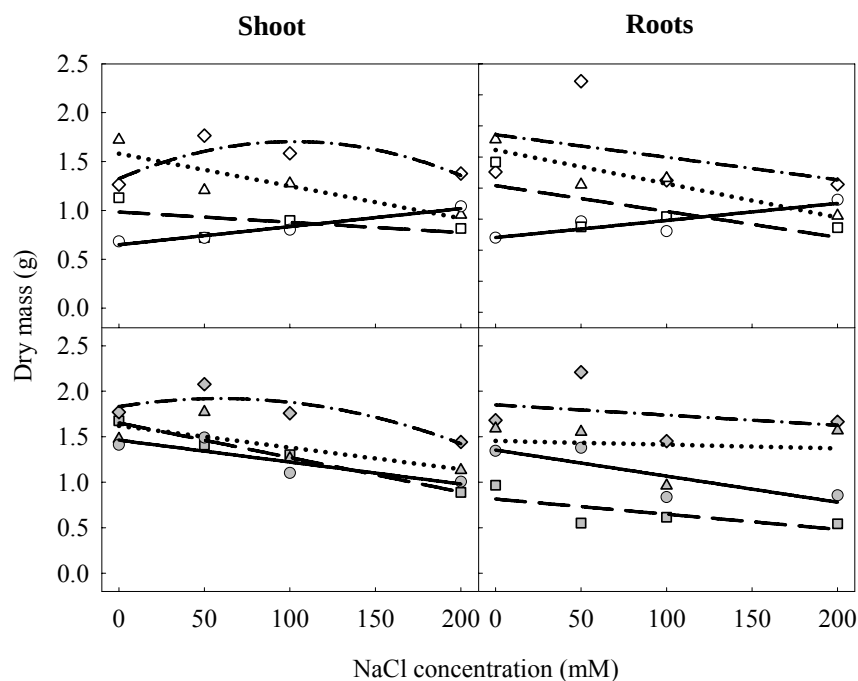


Figure 5.3 Shoot and root DM of white spruce and jack pine seedlings treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl, and either non-inoculated ($\circ$ and $\bullet$, —) or inoculated with *H. crustuliniforme* ($\square$ and $\blacksquare$, — —), *L. bicolor* ($\triangle$ and $\blacktriangle$,), or the *S. tomentosus* ($\diamond$ and $\blacklozenge$, — . —), or *L. bicolor* and *S. tomentosus* grouped together as one treatment (∇ and $\blacktriangledown$, — . . —). Open symbols represent white spruce seedlings and solid symbols represent jack pine seedlings.

Jack pine seedlings exhibited the greatest decrease in shoot water content with increasing NaCl, dropping to 65% in the 200 mM NaCl treatment when inoculated with either *L. bicolor* or the *S. tomentosus* isolate (Figure 5.4, Table 5.2). White spruce seedlings either non-inoculated or inoculated with *L. bicolor* or the *S. tomentosus* isolate showed a decrease in root water content with increasing NaCl treatments. By contrast, seedlings of both species inoculated with *H. crustuliniforme* had a significantly ($P < 0.01$) higher root water content in all NaCl treatments, and it increased with increasing NaCl treatments.

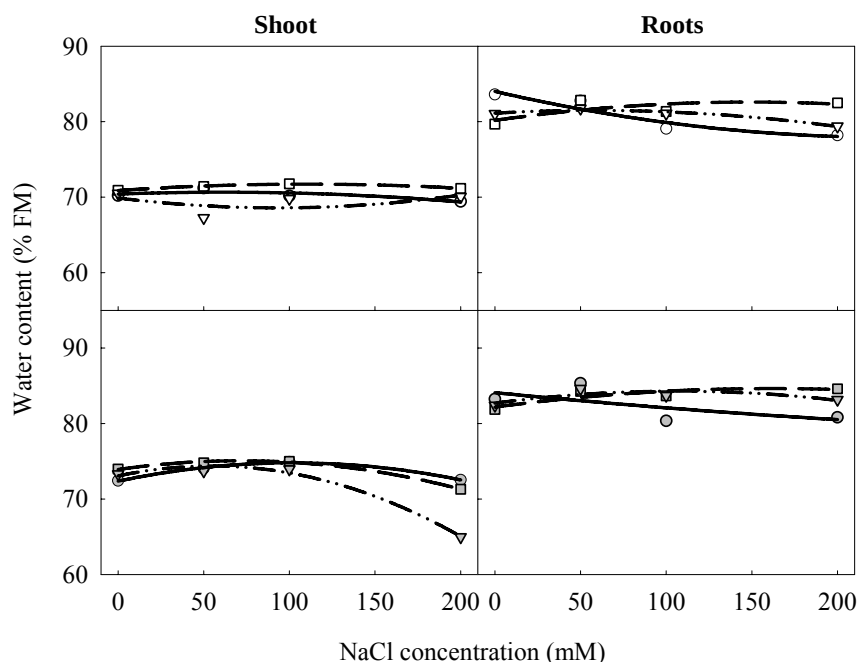


Figure 5.4 Water content of shoot and root tissues of white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated ($\circ$ and $\square$, —) or inoculated with *H. crustuliniforme* ($\square$ and $\square$, — —), *L. bicolor* and *S. tomentosus* (∇ and ∇ , — . .), and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl. Open symbols represent white spruce seedlings and solid symbols represent jack pine seedlings.

5.6.4 Accumulation of osmolytes

Host response - Inoculation significantly affected concentration of proline and sugars (except raffinose) between shoot and/or root tissues (Figure 5.5 to Figure 5.9). Proline (Figure 5.5, Table 5.2) and total sugar content (the sum of all sugar assessed, data not shown), increased in shoots of both host species with increasing NaCl concentration ($P < 0.001$). However, these osmolytes tended to remain constant or to increase slightly in root tissues. This response was most evident in the 200 mM NaCl treatment, which induced the highest host tissue content of proline and total sugar content. White spruce and jack pine seedlings showed significantly ($P < 0.001$) higher amounts of fructose, glucose (Figure 5.6, Table 5.2), pinitol (Figure 5.7, Table 5.2), mannitol (negligible in roots), and glycerol in shoots than in roots. Both host species also showed significantly ($P < 0.001$) higher sucrose content in roots (Figure 5.8, Table 5.2) than in shoots (data not shown). The predominant sugars of the total sugar content were glucose, fructose and pinitol, and to a lesser extent sucrose and glycerol. White spruce seedlings tended to maintain higher level of glucose and fructose, while jack pine seedlings showed a higher accumulation of pinitol.

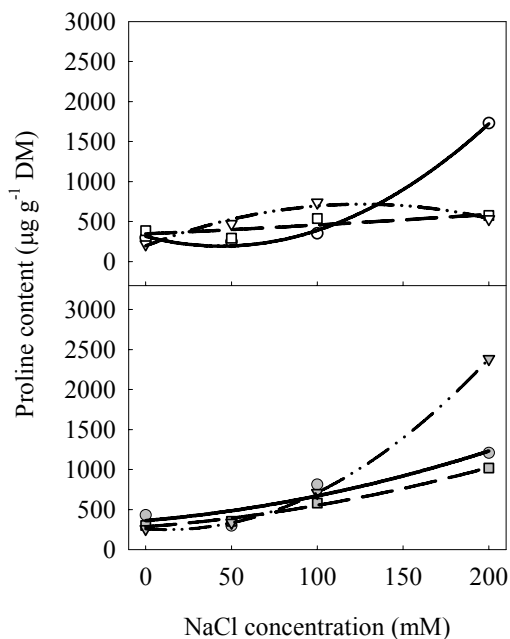


Figure 5.5 Proline content of shoots of white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated (○ and ○, —) or inoculated with *H. crustuliniforme* (□ and □, — — —), *L. bicolor* and *S. tomentosus* (▽ and ▽, — . . —), and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl. Open symbols represent white spruce seedlings and solid symbols represent jack pine seedlings.

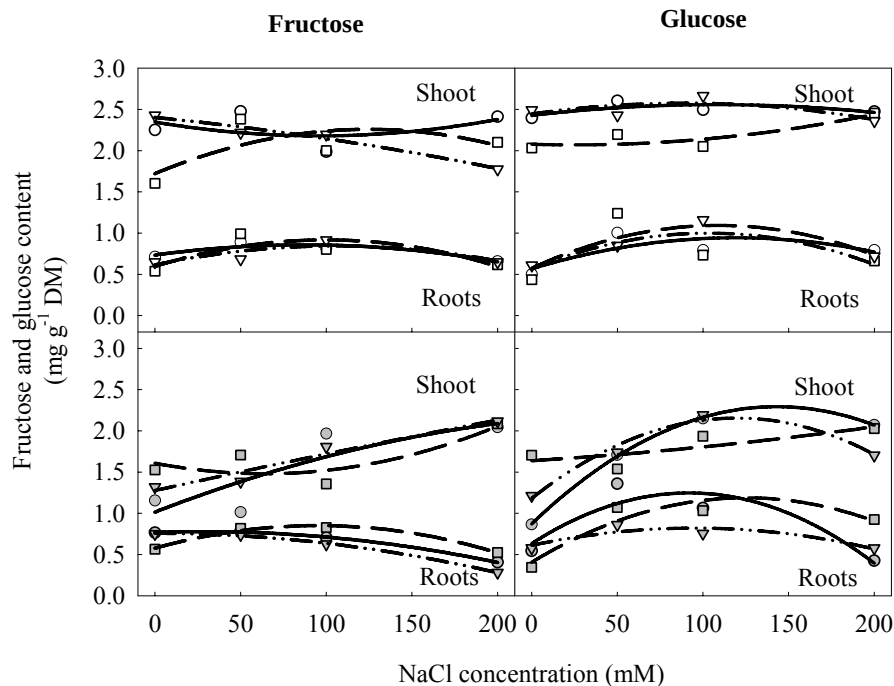


Figure 5.6 Fructose and glucose content of shoot and root tissues of white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated (○ and ○, —) or inoculated with *H. crustuliniforme* (□ and □, — — —), or with *L. bicolor* and *S. tomentosus* (▽ and ▽, — . . —), and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl. Open symbols represent white spruce seedlings and solid symbols represent jack pine seedlings.

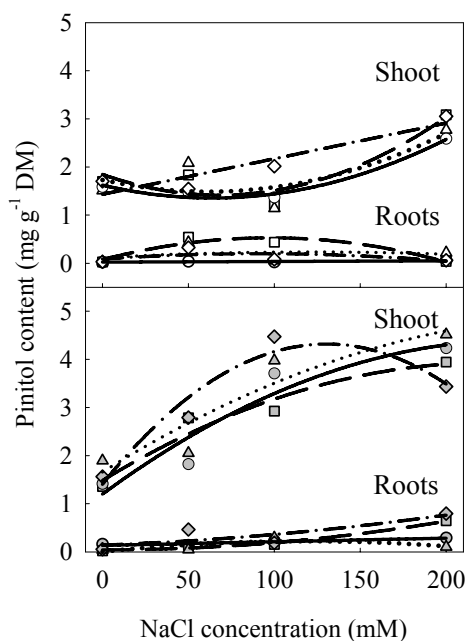


Figure 5.7 Pinitol of shoot and root tissues of white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated ($\circ$ and $\diamond$, —) or inoculated with *H. crustuliniforme* ($\square$ and $\diamond$, — —), or with *L. bicolor* ($\triangle$ and $\triangle$,), or *S. tomentosus* ($\diamond$ and $\diamond$, — . —), and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl.

Open symbols represent white spruce seedlings and solid symbols represent jack pine seedlings.

Mycobiont influence - With increasing NaCl concentration, significantly ($P < 0.001$) higher amounts of proline were accumulated in non-inoculated white spruce seedlings and in jack pine seedlings inoculated with *L. bicolor* and *S. tomentosus* (Figure 5.5, Table 5.2). The pinitol content of shoots was significantly ($P < 0.05$) higher in seedlings of both species inoculated with *S. tomentosus*. In addition, the sucrose content in roots of white spruce seedlings inoculated with *S. tomentosus* exhibited a significantly ($P < 0.05$) higher increase with increasing NaCl concentrations (Figure 5.8). Increases in glycerol, mannitol and stachyose with increased NaCl treatments were specifically linked to certain host-fungus combinations: *H. crustuliniforme* inoculated white spruce seedlings showed significantly ($P < 0.05$) higher levels of stachyose in root tissues in the 100 mM NaCl treatment (data not shown) and showed increased glycerol in shoot tissues in all NaCl treatments (Figure 5.9, Table 5.2); with increasing NaCl concentration, the shoot mannitol content was significantly ($P < 0.05$) higher in shoots of inoculated jack pine seedlings than in shoots of non-inoculated seedlings (data not shown).

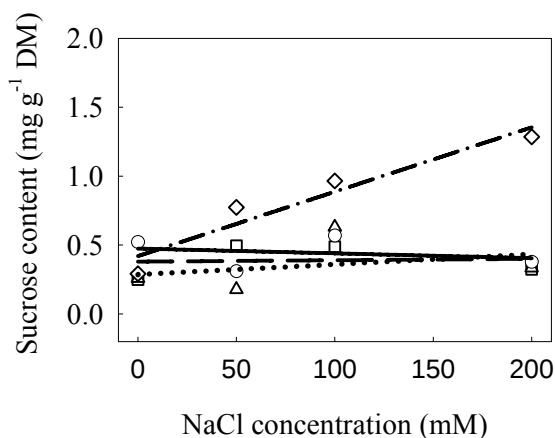


Figure 5.8 Sucrose content of root tissues of white spruce seedlings either non-inoculated (○, —) or inoculated with *H. crustuliniforme* (□, - - -), *L. bicolor* (△,), or *S. tomentosus* (◇, — · —), and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl.

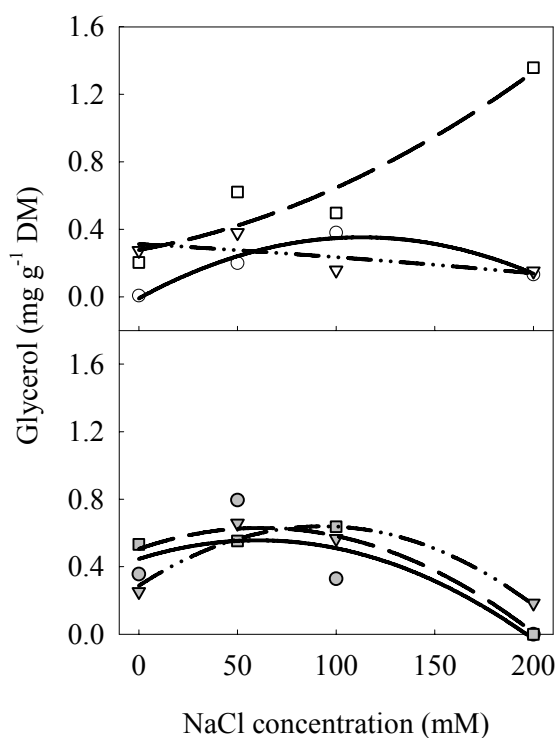


Figure 5.9 Glycerol content of shoot tissues of white spruce and jack pine seedlings either non-inoculated (○ and ●, —) or inoculated with *H. crustuliniforme* (□ and ■, - - -), or with *L. bicolor* and *S. tomentosus* (▽ and ▼, — · —), and treated with 0, 50, 100 or 200 mM NaCl. Open symbols represent white spruce seedlings and solid symbols represent jack pine seedlings.

Table 5.2 Significant F values from the analysis of variance of dependent variables

	Na content	Na s:r	F _v /F _m	DM	Water content	Proline content	Fructose content	Glucose content	Pinitol content	Sucrose content	Glycerol content
<i>Between-subject variables</i>											
NaCl (S)	37.17*** (Quad)	7.36** (Quad)	297.63*** (Lin)	13.29*** (Lin)	10.30** (Quad)	32.76*** (Quad)	5.83* (Quad)	29.18*** (Quad)	58.97*** (Lin)	4.17* (Lin)	4.05* (Quad)
Host (H)	98.19***	12.95***	44.43***	47.62***	60.57***	26.50***	31.80***	21.88***	34.40***	56.86***	ns
ECM (E)	ns	ns	5.33* (C2)	18.05*** (C1) 17.60*** (C2) 7.89** (C3)	11.95** (C2)	ns	ns	ns	ns	7.19** (C3)	ns
S×H	7.62** (Quad)	11.38** (Lin)	54.37*** (Lin)	ns	9.26** (Quad)	37.59*** (Lin)	ns	ns	11.82** (Lin)	6.04* (Lin)	ns
S×E	ns	ns	6.69* (Lin)(C1)	ns	7.96** (Lin)(C2)	14.61*** (Lin)(C2)	7.64** (Resid)(C2)	ns	ns	ns	ns
H×E	ns	4.37* (C2)	7.77** (C2)	ns	ns	8.26** (C1) 7.22** (C2)	ns	4.21* (C2)	ns	5.09* (C3)	ns
S×H×E	ns	ns	5.31* (Lin)(C1) 11.24** (Lin)(C2)	ns	5.72* (Lin)(C1)	11.37** (Quad)(C1) 22.19*** (Lin)(C2)	ns	ns	6.66* (Resid)(C3)	ns	ns
<i>Within-subject variables</i>											
Parts [†] (P)	35.58*** (PP)		21.04*** (SP)	80.23*** (PP)	1029.87*** (PP)	17.92*** (PP)	376.76*** (PP)	418.33*** (PP)	1466.57*** (PP)	52.38*** (PP)	57.29*** (PP)
P×S	15.78*** (Quad)		17.13*** (Lin)	7.83** (Quad)	ns	15.13*** (Quad)	11.01** (Lin)	ns	29.32*** (Lin)	7.78** (Quad)	ns
P×H	4.41*		12.44***	42.67***	ns	30.09***	ns	14.50***	15.89***	9.75**	ns
P×E	ns		ns	ns	ns	4.87* (C2)	ns	ns	ns	6.82* (C3)	ns
P×S×H	19.94*** (Lin)		8.35** (Lin)	6.14* (Quad)	4.95* (Quad)	28.18*** (Lin)	16.91*** (Lin)	ns	21.22*** (Quad)	ns	4.53* (Lin)
P×S×E	ns		ns	ns	11.91** (Lin)(C1)	8.49** (Quad)(C2)	ns	ns	ns	ns	ns
P×H×E	5.44* (C2)		ns	7.04* (C1) 7.63** (C2)	ns	4.94* (C1) 11.61** (C2)	ns	ns	4.06* (C3)	4.10* (C3)	ns
P×S×H×E	ns		6.52* (Lin)(C3)	4.51* (Quad)(C3)	ns	38.93*** (Lin)(C1) 6.97* (Lin)(C2)	4.40* (Lin)(C2)	ns	ns	ns	5.26* (Lin)(C2)

***: P < 0.001; **: P < 0.01; *: P < 0.05; ns: not significant / [†]Parts indicate either shoot parts (SP: growing vs mature) or plant parts (PP: shoot vs roots) / Text in brackets indicates the contrasts for which F values are given: (Lin) = linear, (Quad) = quadratic, and (Resid) = residual ; (C1): contrast of control plants vs inoculated plants, (C2): contrast of the *H. crustuliniforme* treatment vs the *L. bicolor* and *S. tomentosus* treatments and (C3): contrast of the *L. bicolor* treatment vs *S. tomentosus* treatment

5.7 Discussion

5.7.1 Inoculation benefits

Inoculation improved the growth and/or reduced NaCl stress in white spruce and jack pine seedlings. This result is in accordance with the results obtained by Dixon *et al.* (1993) with loblolly pine inoculated with three selected ECM fungi. White spruce seedlings inoculated with *S. tomentosus* exhibited the highest biomass and low photochemical disturbance over the range of NaCl concentrations tested. We can infer from this result that, under saline and/or sodic site conditions, white spruce seedlings inoculated with the *S. tomentosus* isolate would probably show the highest biomass accumulation and should be considered in future revegetation work. The *S. tomentosus* isolate originated from a sodic reconstructed soil prepared for revegetation at Syncrude Canada Ltd. (AB, Canada). Therefore, this fungus is likely to be more suitable for this type of reclamation work and should be more resistant to other site-specific stresses (*e.g.*, toxic oil residues). This in turn would make it more competitive and persistent than species isolated from undisturbed boreal forest soil (Kropp & Langlois 1990). Furthermore, *Suillus* species exhibit a high degree of host specificity to conifer trees and are easy to culture axenically for inoculum production (Dahlberg & Finlay 1999). In field situation where the excess of Na⁺ and salinity are less than in the 200 mM NaCl treatment (approx. SAR_{1:5} = 32 and EC_{1:5} = 2 dS m⁻¹), high biomass production may be obtained with *L. bicolor* which could be another good candidate for inoculation of white spruce seedlings produced for revegetation of saline and/or sodic sites.

The ChFl, water content and Na⁺ accumulation/allocation results suggest that two ranges of NaCl concentrations should be distinguished for jack pine seedlings: (i) from 0 to 100 mM and (ii) from 100 to 200 mM NaCl. Sodic sites in the first range of NaCl concentrations may be revegetated with jack pine seedlings inoculated with either the *L. bicolor* or the *S. tomentosus* isolates. Danielson & Visser (1989) observed that species of *Suillus* were the major indigenous fungi colonizing jack pine seedlings used for revegetation of oil sand tailings; Visser (1995) found species of *Suillus* associated with jack pine over a wide range of stand ages following wildfire disturbance in Alberta. Furthermore, Danielson (1991) observed that *Suillus* species may colonize container-grown jack pine seedlings in tree nurseries. This suggests that the

S. tomentosus isolate used in this study may also be a good candidate for mass inoculation of jack pine seedlings in tree nurseries.

Under high NaCl stress (200 mM), *H. crustuliniforme* was the most beneficial fungus for jack pine seedlings, whereas the two other fungi induced higher photochemical stress. Seedlings inoculated with *H. crustuliniforme* grew at a slower rate than the other inoculated plants and this may be an advantage in highly stressful conditions (Orcutt & Nilsen 2000, Zhu 2001). White spruce seedlings inoculated with *H. crustuliniforme* did not show any resource limitations (similar biomass accumulation to that of controls) and the fungus developed an extensive extraradical mycelium (visual estimation at harvest on undisturbed substrate). This indicates a net advantage in terms of resource exchange toward the mycobiont (Colpaert *et al.* 1992) as ECM growth did not benefit plant growth (Tinker *et al.* 1994). Moreover, jack pine seedlings showed a lower root DM when colonized by *H. crustuliniforme*, indicating a probable strong fungal sink for resources. In given nutritional conditions, a special phytohormonal balance and resource exchange dynamic may be set up between each partner to maintain the symbiosis, while favoring the growth of either the host or the mycobiont (Nylund & Wallander 1989, Colpaert & Verstyuyft 1999). Miller *et al.* (1989) reported that *H. crustuliniforme* was a strong sink for C when it was associated with *Pinus sylvestris* L. in substrates with low biotic activity (*e.g.*, little existing mycelia or pathogenic organisms), and as such, with little competition. By contrast, the increased energy demand for the development of the extraradical mycelium resulted in a reduction of host growth (Miller *et al.* 1989, Tinker *et al.* 1994). *In vitro*, the *L. bicolor* and *S. tomentosus* isolates grew faster than the *H. crustuliniforme* isolate even with excess NaCl in the growth medium (Bois *et al.* 2005a). In the present study, the former two species may have been less dependent on host C for substrate colonization and may have been weaker sinks for photosynthate.

5.7.2 Physiological adaptation strategy

Although both species accumulated increasing amounts of Na with increased NaCl concentrations, in the 50 and 100 mM treatments neither host species exhibited photochemical stress. In these NaCl treatments, toxic effects were likely avoided by vacuolization of excess ions and by a higher concentration of organic osmolytes in shoot tissues (Niu *et al.* 1995, Hasegawa *et al.* 2000). While white spruce seedlings did not show a higher accumulation of the compatible

osmolytes measured, they showed a higher capacity to exclude Na^+ from its tissues. This confirms the results obtained by Renault *et al.* (1999) that reported a lower accumulation of Na^+ in shoots of white spruce seedlings exposed to saline conditions than in shoots of jack pine seedlings. In white spruce, the higher retention of excess ions (or control of Na^+ allocation) at the root level, compared to jack pine seedlings, also helped to avoid toxic effects on essential shoot mechanisms (*e.g.*, photochemistry) compared to jack pine seedlings.

In jack pine seedlings, the *S. tomentosus* isolate induced the greatest changes in the quantity and diversity of accumulated organic osmotica. Similarly, white spruce seedlings were more responsive to colonization by *H. crustuliniforme*. In both cases, these ECM fungi caused an increased accumulation of the major sugars by their hosts (*i.e.*, glucose and fructose for white spruce and pinitol for jack pine seedlings) with increasing NaCl concentration. There is a certain degree of specificity between host and mycobionts (Molina *et al.* 1992) that may be reflected at both the phyto-hormonal and biochemical level, *i.e.*, each of the two symbionts may influence carbohydrate metabolism of the other (Wedding & Harley 1976, Pfeffer *et al.* 2001). A specific osmolyte balance could be set up for each symbiotic combination which would result in a specific potential of resistance to NaCl stress. It is well known that a particular solute may have more than one function and that different compatible solutes may have different functions (Bohnert & Shen 1999). In general, the multitude of compatible solutes which accumulate in response to osmotic stress are considered to play an osmoregulatory function (Bohnert & Shen 1999). In the present study, proline, glucose, fructose and pinitol were the major shoot organic osmoregulators. Sucrose is both a stress signal and the principal form in which C is transported. This molecule can be broken down by invertase to give glucose and fructose (Kleinschmidt *et al.* 1998, Koch 2004) which could be used as the substrate from which other sugars are synthesized (Bohnert *et al.* 1995). Proline, pinitol, mannitol, glycerol and stachyose are all known to have osmoprotective functions (Thomas *et al.* 1992, Shen *et al.* 1997, 1999, Kleinschmidt *et al.* 1998, Bohnert & Shen 1999, Sundblad *et al.* 2001). Some of these compounds could exert osmoprotective functions even at low osmotically insignificant concentrations by scavenging radical oxygen or by maintaining membrane integrity (Bohnert & Shen 1999). Moreover, the accumulation of such compatible osmolytes could prevent the inhibitory effects of potentially toxic ions on enzyme activity and the dissociation of the oxygen evolving system of photosystem II (Papageorgiou & Murata 1995). Sucrose and stachyose accumulated specifically in white spruce roots, and the

accumulation of these sugars was enhanced by the *S. tomentosus* and the *H. crustuliniforme* isolates, respectively. Sucrose concentration was significantly higher in roots of white spruce seedlings than in those of jack pine seedlings and as such, may play a role in the exclusion of Na^+ from roots (and subsequently shoot) of white spruce seedlings. For both conifer species, the overall strategy in the presence of excess Na^+ in the soil solution was to allow the accumulation of a certain amount of Na^+ in roots, while protecting cell membranes, organelles, and general metabolism by the accumulation of osmoprotectant solutes. The osmotic potential of shoots was lowered by accumulation of compatible osmoregulatory solutes, along with the accumulation of non-toxic levels of Na^+ . The resulting lower osmotic potential in shoots compared to roots may facilitate water flux through the plant.

5.7.3 High stress response

In our study, the accumulation of Na^+ was greater in jack pine than in white spruce seedlings indicating a higher resistance of white spruce to high NaCl stress (Renault *et al.* 1999). Low accumulation of Na^+ in shoots and high K/Na and Ca/Na ratio have been shown to be good indicators of resistance to sodic stress in many plant species (Niu *et al.* 1995, Orcutt & Nilsen 2000, Tyerman & Skerrett 1999). The negative effect of Na^+ accumulation was most evident in the 200 mM NaCl treatment in which jack pine seedlings inoculated with either the *L. bicolor* or the *S. tomentosus* isolates exhibited the highest Na^+ accumulation in shoots and the highest photochemical disturbance and the lowest shoot water content. Interestingly, toxic effects occurred at a level of Na^+ in shoot tissues lying between 1 and 1.5% DM which was also observed at higher NaCl treatments in a previous experiment (Bois *et al.* 2005c) on similar sized jack pine seedlings inoculated with *L. bicolor*. Furthermore, beyond that threshold (above 100 mM NaCl) jack pine seedlings inoculated with the *L. bicolor* or the *S. tomentosus* isolates switched partitioning of excess toxic ions towards the shoot, which accumulated 1.5-time more Na^+ than the roots. Marcum & Murdoch (1992) reported a similar pattern of increasing Na^+ -regulated osmotic adjustment in the shoot in function of the NaCl concentration of the substrate for the perennial halophytic grass *Sporobolus virginicus* L. Kunth. This species exhibited a K^+ -regulated shoot osmotic adjustment under 1 mM NaCl concentrations; however, this was progressively replaced by a Na^+ -regulated shoot osmotic adjustment with increasing NaCl concentration, up to 450 mM NaCl. Proline accumulation was another good indicator of the

higher stress level in jack pine seedlings inoculated with the *L. bicolor* and the *S. tomentosus* isolates in the 200 mM NaCl treatment. The proline amino acid is one of the most widely distributed compatible osmolyte and it accumulates in a wide range of organisms from bacteria to higher plants as a resistance mechanism against water deficit and salinity (Marcum & Murdoch 1992, Thomas *et al.* 1992, Taylor 1996). Proline acts as an organic N reserve (for recovery after stress period), as an osmoprotectant for membranes and proteins (against accumulation of inorganic ions), as a cryoprotectant and as a radical scavenger (Santarius 1992, Thomas *et al.* 1992, Taylor 1996, Bohnert & Shen 1999). As a consequence, accumulation of proline indicates either more efficient protection mechanisms (damage prevention) or higher stress effects (damage salvation) (Shah *et al.* 1990, Kohl 1997). In jack pine seedlings inoculated with either the *L. bicolor* or the *S. tomentosus* isolates, proline content increased markedly in shoots in response to high stress but did not deter damage to the light harvesting antenna (Santarius 1992).

The ChFI results suggest that the inner threshold of toxicity may be specific to a plant-fungus combination with a specific osmotic stress tolerance. The threshold for white spruce seedlings or for *H. crustuliniforme* inoculated jack pine seedlings was not reached in the range of NaCl concentrations assessed in the present study. White spruce seedlings or *H. crustuliniforme* inoculated jack pine seedlings exhibited shoot:root ratios of Na^+ lower than one and may have been more efficient in resisting osmotic stress as they avoided an Na^+ -dominant osmotic adjustment mechanism. White spruce seedlings exhibited only slight photochemical disturbance in the 200 mM NaCl treatment but showed lower inorganic osmolyte accumulation (*e.g.*, shoot Na^+), and accumulated only certain organic osmolytes (*i.e.*, sucrose, glycerol and stachyose) to a greater extent than in jack pine seedlings. This indicates a more efficient osmotic adjustment strategy for white spruce than for jack pine seedlings at high NaCl concentrations. Bledsoe & Rygiewicz (1986) reported that *H. crustuliniforme* inoculated Douglas fir exhibited reduced Na^+ uptake compared to non-mycorrhizal seedlings. Furthermore, in a previous *in vitro* experiment (Bois *et al.* 2005a), *H. crustuliniforme* was shown to be resistant to absorption of high concentrations of Na^+ and Cl^- (above 4% and 20% DM, respectively), and to produce high amounts of mannitol and trehalose in response. Therefore, when inoculated on jack pine, this fungus could have increased the root's capacity to accumulate Na^+ and so limited the release of excess Na^+ toward the shoot in the 200 mM NaCl treatment. Seedlings of both species inoculated with *H. crustuliniforme* showed high shoot and root water content in all NaCl treatments. This

fungus, which was also shown to improve root hydraulic conductance (Mushin & Zwiazek 2002), may favor osmotic adjustment and improve osmotic stress resistance of its host in highly sodic conditions.

Overall, it is important to bear in mind that in terms of growth *S. tomentosus* would be the best ECM fungal candidate for seedlings to be used for the revegetation of saline and/or sodic reconstructed soils. Nonetheless, although, jack pine seedlings inoculated with either the *L. bicolor* or the *S. tomentosus* isolates showed higher biomass yield, shoot metabolism protection by compatible osmolytes was possibly overloaded in the 200 mM NaCl treatment. By contrast, jack pine seedlings inoculated with *H. crustuliniforme* showed lower biomass yield but were more resistant to high osmotic and ionic stress. Thus, *H. crustuliniforme* would be the best candidate in terms of survival for jack pine seedlings to be used for revegetation of highly saline and/or sodic sites. To confirm conclusions drawn from this greenhouse experiment, it will be necessary to monitor seedling response to long-term exposure to saline and/or sodic conditions *in situ*.

5.8 Acknowledgments

This research was funded by Syncrude Canada Ltd. and NSERC (CRDPJ 250448-01 to D.P.Khasa). The authors wish to thank Alexis Guérin-Laguet for his help with fungal inoculation, Yves Dubuc for all his help with plant physiological measurements, Lucette Chouinard and Pierre Lechasseur for biochemical analyses, Alain Brousseau for elemental analyses, and Michèle Bernier-Cardou for advices in statistical analyses. The authors also thank Andrew Coughlan and Jean-Luc Jany for help in solving scientific problems and preparing the manuscript. The authors are grateful to Erin Bergrand and to Claude Fortin for technical help and advice.

Chapitre 6 Réponse physiologique de semis d'épinette blanche (*Picea glauca*) et de pin gris (*Pinus banksiana*) inoculés avec des champignons ECM et exposés à des rejets salins de sables bitumineux

6.1 Avant-propos

Ce chapitre a pour but de présenter les résultats obtenus sur des semis inoculés exposés à des rejets salins en conditions semi-contrôlées (expérience A) et *in situ* (expérience B). Ces résultats n'ont fait l'objet d'aucune publication car le stress infligé ne fut pas assez intense ou au contraire trop intense. Bien que mitigés, ces résultats montrent une tendance similaire au comportement des semis évalués au cours des expériences 3 (Chapitre 4) et 4 (Chapitre 5). L'expérience A fut réalisée en serre à partir du même lot de semis et en parallèle de l'expérience 4. Les mêmes combinaisons plante-champignon ont donc pu être exposées à des eaux de rejets consolidés (RC). Les semis d'épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss) et de pin gris (*Pinus banksiana* Lamb.) produits et inoculés en pépinière commerciale pour l'expérience B ont été plantés sur un sol reconstruit affecté par un excès de sel à Syncrude Canada Ltd. Les semis de pin gris évalués dans l'expérience 3 sont issus du lot produit pour l'expérience B et, de fait, les résultats du terrain peuvent être mis en lien avec les résultats en conditions semi-contrôlées. Tel que décrit dans l'avant-propos du Chapitre 4, les expériences 3 et B ont été planifiées avant d'avoir obtenu les résultats des expériences 2 (Chapitre 3) et 4 (Chapitre 5), ce qui explique pourquoi seule la souche *Laccaria bicolor* (Maire) Orton UAMH 8232 a été utilisée. L'expérience B a été réalisée afin de faire un suivi de la survie et de la croissance de semis inoculés sur plusieurs années. Elle constitue un premier essai *in situ* et a permis d'évaluer la réponse des combinaisons épinette blanche – *L. bicolor* et pin gris – *L. bicolor*.

6.2 Résumé

Des semis d'épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss) et de pin gris (*Pinus banksiana* Lamb.) ont été exposés à des eaux de rejets sableux salins afin d'évaluer le potentiel des champignons ECM à réduire le stress et à augmenter la croissance et la survie de leur hôte dans ces conditions. Dans une expérience A conduite en serre, les semis étaient inoculés ou non avec *Laccaria bicolor* (Maire) Orton UAMH 8232, *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Quél. UAMH 5247 ou un isolat de *Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick provenant du site d'expérimentation salin et relativement sodique de l'expérience B. Ces semis ont été exposés à des eaux de rejets consolidés (RC). Les semis utilisés pour l'expérience B étaient non inoculés ou inoculés avec *L. bicolor* UAMH 8232 en pépinière avant d'être plantés sur un terrain salin et relativement sodique à Syncrude Canada Ltd. Concernant l'expérience A, la durée d'exposition fut trop brève et le bénéfice de l'inoculation face au stress n'a pu être évalué. Néanmoins, les semis ont montré un comportement semblable aux plants exposés aux faibles concentrations de NaCl des expériences 3 et 4. L'expérience B a permis de constater que les stress multiples rencontrés sur le terrain génèrent des conditions extrêmes. Le taux de survie fut très faible et aucune conclusion fiable n'est possible. Néanmoins, d'après les résultats bruts, l'inoculation a amélioré la survie des semis d'épinette blanche et dans une moindre mesure celle des semis de pin gris.

6.3 Introduction

Au Nord-Est de l'Alberta (Canada), l'exploitation à ciel ouvert et les méthodes d'extraction du pétrole des sables bitumineux génèrent de gros volumes de rejets de sables et d'eaux salines et alcalines. En 1998, la compagnie exploitante Syncrude Canada Ltd. a produit à elle seule 75 million m³ de rejets (Li & Fung 1998). Ces derniers sont déversés dans les fosses épuisées et, une fois stabilisés, les sables sédimentés doivent être réhabilités pour permettre une restauration plus rapide des écosystèmes prévalents. Pour la reconstitution d'un sol à partir de rejets sableux, une couche de matériaux de couverture recouverts d'une couche de matière organique (récoltées pendant le fossoyage) sont épandues en surface (Danielson *et al.* 1983a, Danielson & Visser 1989, Li & Fung 1998, Fung & Macyk 2000). Les méthodes d'extraction actuelles consistent à traiter les sables bitumineux récoltés avec un mélange sodique à base de soude (NaOH). À ceci, s'ajoutent les sels naturellement associés aux particules sableuses en augmentant d'autant la salinité des eaux de rejets. Celles-ci sont caractérisées par un excès de plusieurs ions, dont Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^- (Renault *et al.* 1999, Franklin *et al.* 2002a). Ces eaux remplissent la réserve hydrique des sables sédimentés à restaurer. Ces terrains peuvent donc être très salins, sodiques et/ou alcalins. Parmi tous les types de rejets sableux, les rejets composés des particules les plus fines, incluant les argiles, sont les plus difficiles à stabiliser du fait que leur sédimentation est très lente. Pour accélérer ce processus et augmenter la compaction de ce type de rejet, une méthode récemment développée propose d'ajouter un coagulant inorganique (gypse - $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Li & Fung 1998). Ce nouveau procédé crée des rejets dits « composites » ou « consolidés » (RC) plus salins et plus compacts que d'autres rejets sableux (Li & Fung 1998, Fung & Macyk 2000).

La réhabilitation d'un écosystème à partir de RC est un défi du fait d'une faible fertilité, *i.e.*, déficiences nutritives (*e.g.*, 1 ppm N, 6 ppm P), alcalinité ($\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} > 8$) et salinité (1 à 4 dS m⁻¹ d'après des mesures *in situ*) élevées (Fung & Macyk 2000). L'excès de sel, et notamment d'ions Na^+ , limite la croissance et la survie des végétaux (Levitt 1980, Orcutt & Nilsen 2000). En conditions salines ou sodiques, les stress hyperosmotique et hyperionique conduisent à l'assèchement et/ou à l'accumulation excessive d'ions à des niveaux toxiques pour les plantes. Pour s'adapter au déficit osmotique, les glycophytes concentrent le plus souvent des osmolytes dans leurs tissus de façon à faciliter le flux d'eau provoqué par la transpiration stomatique (Levitt

1980, Cheeseman 1988, Munns 1993, Kozłowski 1997, Hasegawa *et al.* 2000, Zhu 2001, 2002). À cet effet, si le Na^+ est absorbé, il doit être compartimenté hors du cytoplasme, le plus souvent dans les vacuoles, pour éviter les effets toxiques. Pour que les ions en excès soient contenus dans la vacuole, des osmolytes compatibles avec les activités métaboliques, inorganiques (*e.g.*, K^+) et organiques (*e.g.*, protéines et sucres) sont accumulés en compensation (Yeo 1983, Niu *et al.* 1995, 1997, Bohnert & Shen 1999, Hasegawa *et al.* 2000). Si le potentiel de compartimentation est atteint, la concentration excessive de Na^+ dans les compartiments métaboliquement actifs provoque l'altération de l'activité phyto-hormonale et enzymatique, l'altération du métabolisme nucléaire et protéique, la perte d'intégrité membranaire et la réduction des capacités photosynthétiques (Munns 1993, Kozłowski 1997, Neumann 1997, Hasegawa *et al.* 2000, Mansour & Salama 2004).

Par ailleurs, certaines composantes de la communauté microbienne du sol essentiels à la croissance et à la survie des plantes sont absents des RC de même que d'autres types de rejets sableux et déblais miniers (Danielson *et al.* 1983b, Abbott & Robson 1991, Bellgard 1993, Malajczuck *et al.* 1994, Pflieger *et al.* 1994, Gould *et al.* 1996, Bois *et al.* 2005d). Une de ces composantes, les champignons ectomycorhiziens (ECM), joue un rôle majeur dans la dynamique et la productivité des écosystèmes (van der Heijden *et al.* 1998, Baxter & Dighton 2001, Dahlberg 2001, Jonsson *et al.* 2001, Leake 2001, Read *et al.* 2004). Dans la forêt boréale, les racines fines des conifères sont en grande majorité colonisées par des mycobiotas ECM (Read *et al.* 2004). La symbiose entre ces deux organismes est en principe mutualiste (Egger & Hibbett 2004) : le champignon améliore l'alimentation minérale (*e.g.*, N et P) (Marschner & Dell 1994, Read *et al.* 2004) et en retour la plante fournit le C essentiel à la croissance et à l'accomplissement du cycle de vie du champignon (Smith & Read 1997). De plus, le mycélium, étant à l'interface entre l'hôte et son environnement édaphique, agit comme organe tampon capable de limiter les effets négatifs de nombreux stress biotiques et abiotiques, *e.g.*, excès de métaux lourds (Kottke 1992, Jentschke & Goldbold 2000), sécheresse (Dosskey *et al.* 1991, Lamhamedi *et al.* 1992). Bien que les basidiomycètes soient considérés comme des champignons intolérants aux excès de sel (Tresner & Hayes 1971), les résultats d'expériences *in vitro* indiquent que des souches de champignons ECM, comme *Pisolithus tinctorius* (Mich. : Pers.) Coker & Couch. (Chen *et al.* 2001a), *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Quél., *Laccaria bicolor* (Maire) Orton et *Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick peuvent résister à des concentrations

en NaCl supérieures à 200 mM NaCl (Kernaghan *et al.* 2002, Bois *et al.* 2005a). Certaines souches ont ainsi amélioré la résistance ou la stratégie d'adaptation au stress sodique de leur hôte : *e.g.*, épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss), pin gris (*Pinus banksiana* Lamb.), pin à encens (*Pinus taeda* L.) (Dixon *et al.* 1993, Mushin & Zwiazek 2002, Bois *et al.* 2005c).

Augmenter la résistance au stress salin et/ou sodique des semis de pépinière est du plus grand intérêt pour la végétalisation de terrains perturbés tels que les sols reconstruits à partir de rejets sableux issus de l'exploitation des sables bitumineux. Ceci peut être obtenu par l'inoculation des semis avec des souches de champignons ECM (Kropp & Langlois 1990, Read 1991, Malajczuk *et al.* 1994). Deux expériences, A et B, sont présentées pour valider cette suggestion. L'expérience A teste l'hypothèse que l'inoculation de semis de pin gris et d'épinette blanche avec des souches sélectionnées de *H. crustuliniforme*, de *L. bicolor* et de *S. tomentosus* améliore la croissance et réduit les stress provoqués par l'exposition à des eaux de RC. Ces stress sont multiples et indissociables, entre autres, la toxicité de résidus d'hydrocarbures, l'alcalinité, la salinité et la sodicité. Il n'est donc pas réaliste de chercher à obtenir une explication exhaustive des processus physiologiques impliqués dans la réponse d'adaptation. Par contre, il est possible de relever des indicateurs physiologiques caractéristiques du stress salin lequel, on le suppose, demeure le stress dominant. Parmi ces indicateurs, une esquisse de la réponse d'adaptation à l'échelle de la plante entière peut être obtenue en évaluant la croissance, l'activité photosynthétique et l'accumulation de minéraux et d'osmolytes organiques des semis. L'expérience A fait suite aux travaux de Bois *et al.* (2005b) (Chapitre 5). L'expérience B est une étude *in situ* sur la croissance et la survie de semis de pépinière d'épinette blanche et de pin gris préalablement inoculés avec le champignon *L. bicolor*. Cette expérience fait suite aux travaux de Bois *et al.* (2005c) (Chapitre 4).

6.4 Matériel et méthodes

6.4.1 Production des inocula et semis inoculés

Expérience A - Les semis utilisés sont issus du même lot de semis produits pour l'expérience de Bois *et al.* (2005b) (Chapitre 5). Ainsi, la production des inocula (*L. bicolor* UAMH 8232, *H. crustuliniforme* UAMH 5247 et un isolat de *S. tomentosus* provenant d'un terrain sodique de Syncrude Canada Ltd.), leur inoculation sur les semis d'épinette blanche et de pin gris et la production de ces semis ont été réalisées suivant la méthode décrite dans Bois *et al.* (2005b). Les espèces végétales hôtes utilisées sont issues de sources de graines (fournies par l'« *Alberta Tree Improvement and Seed Center, Smoky Lake* », AB, Canada) sélectionnées pour leur résistance à la salinité (Khasa *et al.* 2002). Après 21 semaines de croissance en serre, les semis ont été transférés dans une chambre de croissance pour simuler des conditions automnales et hivernales et permettre leur entrée en dormance.

Expérience B - Les semis utilisés sont issus du même lot produit pour l'expérience de Bois *et al.* (2005c) (Chapitre 4). Ainsi, la production de l'inoculum de *L. bicolor* UAMH 8232, son inoculation sur des semis d'épinette blanche et de pin gris et la production de ces semis ont été réalisées suivant la méthode décrite par Bois *et al.* (2005c). Les espèces végétales hôtes utilisées sont issues de sources de graines (fournies par l'« *Alberta Tree Improvement and Seed Center, Smoky Lake* », AB, Canada) sélectionnées pour leur résistance à la salinité (Khasa *et al.* 2002). L'inoculation et l'ensemencement du substrat de croissance ont été effectués en janvier 2002. En juin 2002, la hauteur de 60 semis de chacune des espèces, inoculés et non inoculés, a été mesurée et dix semis (de chaque traitement d'inoculation) ont été récoltés pour évaluer la matière sèche (après trois jours à 65°C) des parties aériennes et racinaires. Après huit mois de croissance en pépinière, en septembre 2002, les semis inoculés et témoins ont été plantés sur un terrain salin et relativement sodique de la compagnie Syncrude Canada Ltd.

6.4.2 Dispositif expérimental

Expérience A - Après 6 semaines en dormance à 4°C, les semis ont été transplantés dans des tubes PVC (10 × 20 mm, D × H) contenant le même substrat déjà utilisé pour la croissance des semis : un mélange de Sable:Turface®:Tourbe:Perlite (S:T:To:P) (v:v:v:v, 16:16:1,2:1,75). La face

inférieure des tubes PVC était fermée par de la toile de moustiquaire. Lors de la transplantation, une attention particulière a été portée pour garder intact la masse de substrat dans lequel les racines et le réseau mycélien s'étaient développés. Une fois transplantés, les semis ont été placés en serre dans des conditions de photopériode longue pour briser la dormance (30-40 % HR, 6/18 h nuit/jour, 18-23°C nuit/jour) et ont été fertirrigués chaque semaine par immersion (15 min) dans une solution de 20-8-20r (Plant Prod Québec, Laval, QC, Canada) à 0,5 g l⁻¹. Après deux semaines, les tubes PVC ont été insérés dans 1 l de RC dans un contenant de 2,5 l (Figure 6.1). Les RC entourant la base du tube ont été couverts d'un paillis plastique noir (limitant l'évaporation) pour favoriser les remontées capillaires à travers la colonne de sol où se développaient les semis. Chaque semaine, 300 ml d'eau de RC (pH_{H₂O} : 8, EC : 3,25 dS m⁻¹, 51,5 mM Na⁺, 30,3 mM Cl⁻, 0,05 mM K⁺, 7,4 mM Ca²⁺) ont été apportés au niveau des RC ; suite à l'évapotranspiration, les sels peuvent ainsi s'accumuler dans la zone de croissance racinaire. Les semis sont distribués selon un dispositif en blocs complets entièrement aléatoires. Dans chaque bloc (quatre au total), on retrouve huit unités expérimentales (chacune étant représentée par un semis) correspondant aux combinaisons des deux espèces hôtes et des quatre niveaux d'inoculation (Figure 6.1). Pour effectuer les mesures du potentiel hydrique de semis adaptés à l'obscurité, un répliquât de l'expérience a été réalisé simultanément.

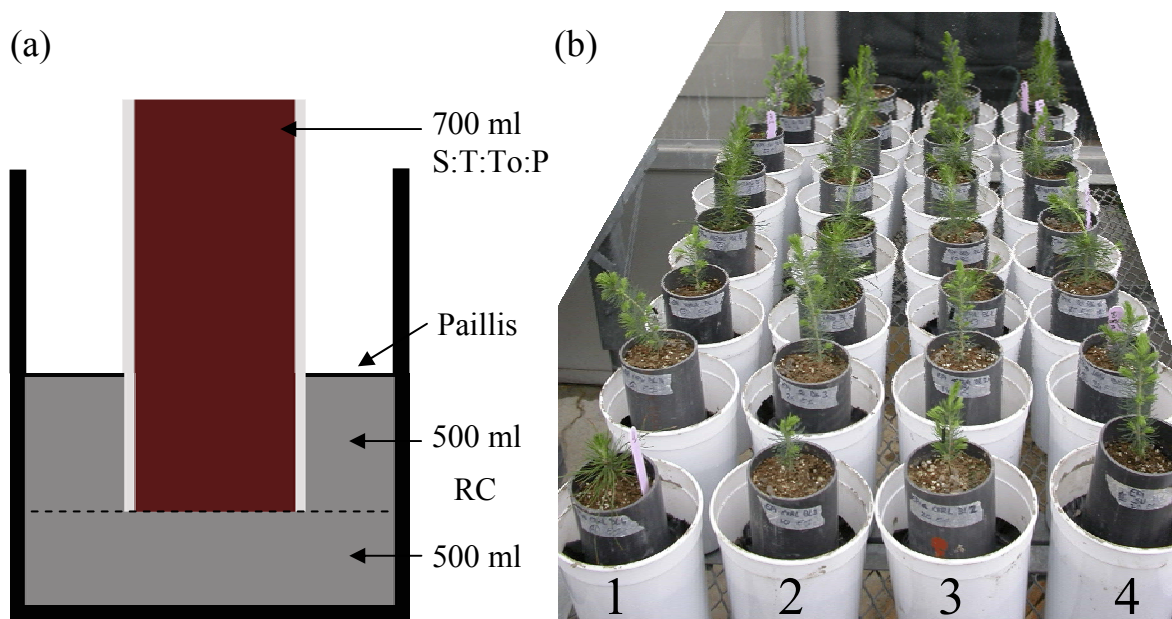


Figure 6.1 Coupe transversale d'une unité expérimentale de l'expérience A (a) et photographie montrant la disposition des quatre blocs (b).

Expérience B – Deux parcelles expérimentales, 1 et 2, ont été établies sur un vaste champ de sable de rejets (pente : 2,4 %). Le terrain amendé un an auparavant a été labouré pour dégager les herbes colonisatrices préalablement à la transplantation des semis. Ces derniers ont été distribués aléatoirement selon un dispositif en tiroir : le facteur inoculation (deux niveaux) en sous-parcelle et le facteur espèce hôte (deux niveaux) en parcelle principale, le tout répété sur 12 blocs orientés perpendiculairement à la pente pour chaque parcelle. Le blocage permettait notamment d’isoler le gradient d’amendement dû à l’érosion hydrique suivant lequel la couche de matière organique augmente en progressant vers le bas de pente. Au total, 480 semis d’épinette blanche et de pin gris, inoculés ou non, ont été plantés sur chacune des parcelles expérimentales et 92 ont été disposés sur les pourtours comme zone tampon (Figure 6.2). Chaque unité expérimentale était constituée de dix semis.

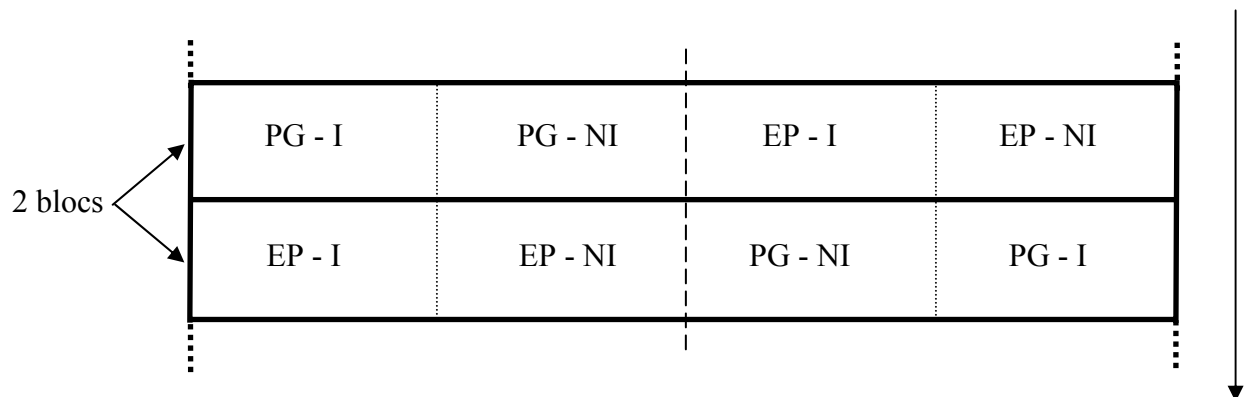


Figure 6.2 Exemple de distribution des unités expérimentales dans deux blocs du dispositif expérimental B.

La flèche indique l’orientation de la pente ; EP : épinette blanche ; PG : pin gris ; I : inoculé ; NI : non inoculé.

6.4.3 Récolte et mesures

Expérience A - La hauteur de tige des semis a été mesurée avant l’expérience et au moment de la récolte, après 28 jours d’exposition aux eaux de RC. Le taux de croissance absolue (TCA) (ou élongation journalière de la tige) a été déterminé suivant la formule :

$$(h_{Tf} - h_{Td})/dt$$

où h_{TF} correspond à la hauteur au moment de la récolte, h_{Td} à la hauteur au début de l'expérience, et dt au nombre de jours écoulés entre les deux mesures. Des mesures de fluorescence de la chlorophylle *a* (*i.e.*, F_v/F_m et Φ_{PSII}) ont également été effectuées sur les plantes entières à l'aide d'un fluoromètre (modèle PAM-2000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Allemagne). Le détail de ces mesures est conforme à la méthode présentée par Bois *et al.* (2005b). Pour la mesure du potentiel hydrique, les semis de l'expérience dupliquée ont été placés à l'obscurité dans une pièce ventilée le soir précédant la récolte. La mesure a ensuite été effectuée avec une chambre à pression Scholander (PMS Instrument Co., Corvallis, OR, USA) sur les semis excisés juste au-dessus du collet.

Par la suite, les semis ont été récoltés et la masse fraîche (MF) des parties aériennes et racinaires évaluées. Des sous-échantillons frais ont été collectés pour évaluer la colonisation racinaire par les champignons inoculés et pour mesurer la composition en osmolytes organiques, *i.e.*, proline, saccharose, glucose, fructose, raffinose, stachyose, pinitol, mannitol et glycerol, des tissus des parties aériennes et racinaires. Les parties aériennes et racinaires ont ensuite été séchées au four à 65°C pour les mesures de masse sèche (MS). Le pourcentage d'eau contenue dans les tissus frais a été déterminé à l'aide de la formule suivante : $(MF-MS)/MF$. Les échantillons ont ensuite été broyés pour évaluer la composition en Na, K et Ca. Les mesures de biomasse, de colonisation racinaire et de composition des tissus en osmolytes organiques et inorganiques ont été effectuées d'après les méthodes décrites par Bois *et al.* (2005b, c). La salinité (conductivité électrique ($CE_{1:5}$)) et la sodicité (ratio d'absorption du sodium ($SAR_{1:5}$)) du substrat de croissance ont été évaluées sur des échantillons récoltés en même temps que les racines.

Expérience B – En juin, juillet et août 2003, la croissance de la cime et la survie ont été évaluées sur l'ensemble des semis de chacune des parcelles. Au mois de juillet 2003, huit échantillons de sol ont été récoltés en surface (20 cm) sur l'ensemble du terrain pour déterminer la salinité ($CE_{1:5}$) et la sodicité ($SAR_{1:5}$) du sol reconstruit (Kalra & Maynard 1992).

6.4.4 Statistiques

Expérience A - Une analyse de variance (ANOVA) à deux voies a été utilisée pour évaluer les différences physiologiques entre les espèces hôtes en réponse aux traitements d'inoculation. Les effets principaux et les effets d'interaction ont été évalués avec la procédure GLM du logiciel

SAS (SAS system v 9.1, The SAS Institute, Cary, NC, USA) suivant le modèle (Steel *et al.*, 1997) :

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \delta_k + \varepsilon_{ijk}$$

où y_{ijk} est la variable réponse, μ est la moyenne, τ_i est l'effet du i ème niveau du traitement "espèce hôte", β_j est l'effet du j ème niveau du traitement "inoculation", $(\tau\beta)_{ij}$ représente l'interaction entre les deux variables indépendantes, δ_k est l'effet du k ème bloc, et ε_{ijk} est le terme d'erreur $((\tau\delta)_{ik} + (\beta\delta)_{jk} + (\tau\beta\delta)_{ijk})$. Cette analyse fut complétée par une analyse de contrastes entre les traitements d'inoculation. Les contrastes utilisés sont similaires à ceux de l'expérience de Bois *et al.* (2005b) : plantes témoins vs plantes inoculées (C1) ; *H. crustuliniforme* vs *L. bicolor* et *S. tomentosus* (C2) ; *L. bicolor* vs *S. tomentosus* (C3).

Expérience B – Pour les résultats de croissance en pépinière, un test de t a été effectué avec la procédure TTEST du logiciel SAS (SAS system v 9.1, The SAS Institute, Cary, NC, USA) sur les variables de croissance enregistrées pour chaque espèce végétale. Étant donné le taux de mortalité survenue après la plantation des semis sur le terrain (voir 6.5 Résultats), les analyses statistiques n'ont pu être effectuées tel que prévu initialement pour évaluer l'effet de l'inoculation sur la croissance et la survie de ces semis.

6.5 Résultats

Le stress produit dans l'expérience A fut de trop courte durée alors que les stress subi par les semis de l'expérience B furent trop intenses. De ce fait, les points 6.5.1 , 6.5.2 , 6.5.3 et 6.5.4 décrivent les résultats des analyses obtenues de l'expérience A et le point 6.5.5 rassemble l'ensemble des résultats (très limités) de l'expérience B.

6.5.1 Salinité du substrat

Un sol sableux est salin lorsque la $CE_{1:5}$ dépasse $0,2 \text{ dS m}^{-1}$ (ce qui équivaut approximativement à une $EC_e > 4 \text{ dS m}^{-1}$ (Slavich & Petterson 1993)) et un sol sodique montre un $SAR_{1:5} > 10$ (équivalent à un pourcentage de sodium échangeable supérieur à 15 % (Sumner *et al.* 1998)). Dans l'expérience A, les RC dans lesquels furent placés les tubes PVC n'étaient pas salins, sodiques ou alcalins. Inversement l'irrigation avec des eaux de RC a été un succès puisque le substrat de croissance (S:T:To:P) contenu dans les tubes PVC a développé une salinité et une sodicité élevées au cours de la période expérimentale (Tableau 6.1).

Tableau 6.1 Caractéristiques des RC purs avant l'expérience et des substrats de croissance Sable:Surface:Tourbe:Perlite (S:T:To:P) après l'expérience.

Substrat	pH	$CE_{1:5}$ (dS m^{-1})	$SAR_{1:5}$
RC	7,2	0,2	0,03
S:T:To:P	7,0	0,8	16,00

6.5.2 Croissance des semis

Les semis d'épinette blanche ont montré une croissance en hauteur ($TCA = 0,9 \text{ mm j}^{-1}$) trois fois supérieure au pin gris ($TCA = 0,3 \text{ mm j}^{-1}$) ($P < 0,001$) (données non présentées). Les semis d'épinette blanche inoculés avec du *L. bicolor* ont montré la croissance apicale la plus élevée alors que les pins gris inoculés avec *S. tomentosus* présentaient la croissance la plus basse ($P < 0,05$). Inversement, les semis de pin gris ont montré une biomasse significativement plus élevée que les semis d'épinette blanche ($P < 0,001$). L'inoculation a

provoqué une augmentation significative de la production de biomasse aérienne et souterraine chez les deux espèces ($P < 0,001$) (Figure 6.3, Tableau 6.2). Les semis d'épinette blanche peuvent être classés par ordre croissant de production de biomasse : témoin non inoculé $< H. crustuliniforme < L. bicolor < S. tomentosus$ ($P < 0,05$). Les semis d'épinette blanche inoculés avec *H. crustuliniforme* ont présenté une biomasse aérienne plus élevée que la biomasse racinaire. Ces semis étaient significativement plus petits que les autres semis d'épinette blanche inoculés et, par contraste, les semis de pin gris inoculés ont présenté peu de différence entre eux ($P < 0,05$). Ces derniers ont tous démontré une biomasse racinaire plus élevée que la biomasse aérienne contrairement aux semis témoins ($P < 0,001$).

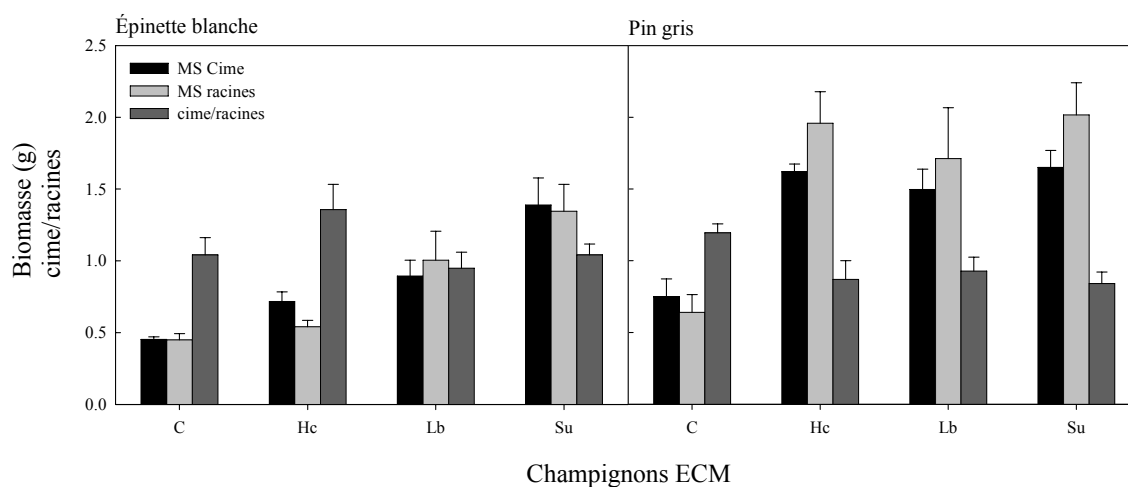


Figure 6.3 Masse sèche des parties aériennes et racinaires, ainsi que leur ratio chez des semis d'épinette blanche et de pin gris non inoculés (C) ou inoculés avec *H. crustuliniforme* (Hc), *L. bicolor* (Lb), ou *S. tomentosus* (Su) après 28 jours d'exposition à des eaux de RC.

6.5.3 Relations hydriques

Les semis de pin gris et d'épinette blanche ont montré le même pourcentage d'eau dans leurs tissus racinaires (81 %). Ce dernier était significativement plus élevé par comparaison au pourcentage d'eau dans la partie aérienne ($P < 0,001$) (données non présentées). Les semis d'épinette blanche ont présenté une hydratation de leur partie aérienne (68 %) légèrement inférieure à celle de semis de pin gris (71 %) ($P < 0,05$). Aucune différence significative n'a été détectée entre les traitements d'inoculation. Les semis d'épinette blanche avaient un potentiel

hydrique (-0.63 MPa) inférieur à celui des semis de pin gris (-0.50 MPa) ($P < 0.001$) mais aucune différence entre les traitements d'inoculation n'a été détectée (données non présentées).

6.5.4 Indicateurs de stress

Photochimie – Aucun stress n'a été détecté avec la mesure du ratio $F_v:F_m$ (proche de 0,8) chez les deux espèces hôtes, inoculées ou non (données non présentées) ainsi qu'aucune différence entre leur valeur de Φ_{PSII} .

Sodium, Potassium et Calcium – Aucune différence n'a été détectée entre les différents traitements d'inoculation au niveau du contenu en Na (3,5 % dans la partie aérienne et 7,6 % dans les parties racinaires) et des ratios Na/K et Na/Ca dans les tissus (données non présentées). Néanmoins, les semis de pin gris ont montré des valeurs de ratio cime/racine en termes de contenu en Na dans les tissus supérieures à celles des semis d'épinette blanche ($P < 0,05$). Le ratio Na/K était significativement supérieur dans les racines par comparaison aux parties aériennes et supérieur dans les tissus de pin gris par rapport à ceux de l'épinette blanche ($P < 0,001$). Le ratio Na/Ca était significativement supérieur dans les racines par comparaison aux parties aériennes des semis d'épinette blanche, mais aucune différence n'a été observée entre les semis de pin gris ($P < 0,001$) (données non présentées).

Proline – Aucune différence significative n'a été détectée quant à la concentration en proline des tissus (entre 300 et 600 $\mu\text{g mg}^{-1}$ DM, données non présentées).

Sucres – Les deux espèces hôtes ont présenté des valeurs similaires de concentration des sucres totaux dans leurs tissus. Ces valeurs étaient supérieures dans les parties aériennes (5,1 % DM) par comparaison aux parties racinaires (2,3 % DM) (Figure 6.4, Tableau 6.2). Les champignons *L. bicolor* et *H. crustuliniforme* ont induit les plus faibles niveaux de concentration en sucres dans les racines des pins gris inoculés. Inversement, les semis d'épinette blanche inoculés avec *L. bicolor* et *S. tomentosus* ont présenté les valeurs de concentration en sucres les plus élevées dans les parties aériennes et racinaires, respectivement ($P < 0,05$).

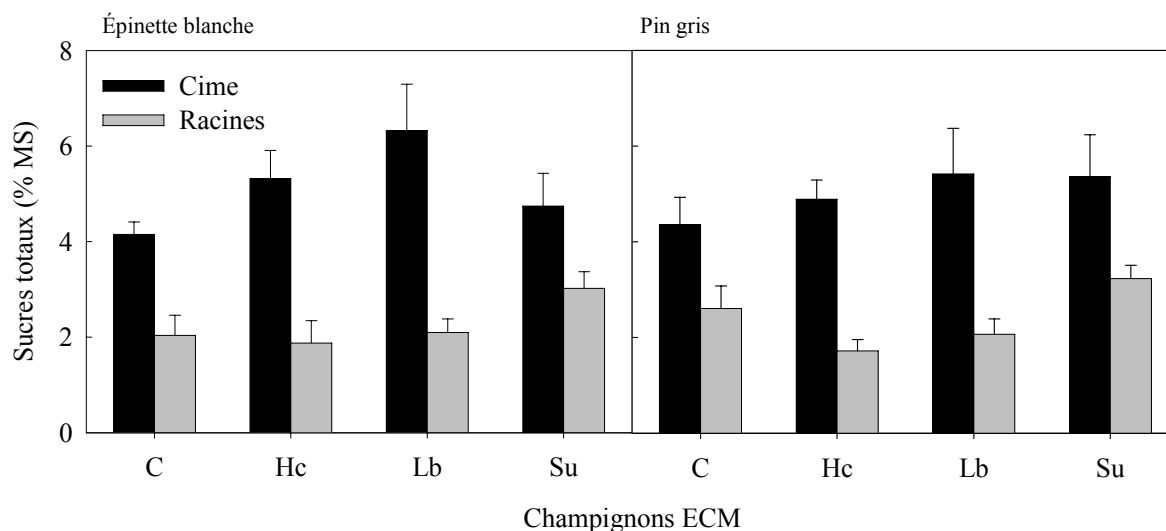


Figure 6.4 Sucres totaux accumulés dans les parties aériennes (cime) et racinaires en pourcentage de la masse sèche respective de ces parties chez des semis d'épinette blanche et de pin gris non inoculés (C) ou inoculés avec *H. crustuliniforme* (Hc), *L. bicolor* (Lb), ou *S. tomentosus* (Su) après 28 jours d'exposition aux eaux de RC.

Tous les sucres sauf le glycérol ont montré une différence significative de concentration entre les parties racinaires et aériennes : le glucose, le fructose, le pinitol et le mannitol ont été préférentiellement concentrés dans les parties aériennes alors que le saccharose, le raffinose et le stachyose ont été préférentiellement concentrés dans les parties racinaires ($P < 0,001$) (données non présentées). Le fructose, le glucose et le pinitol étaient les sucres dominants avec un contenu supérieur à 2 % DM. Le saccharose et le glycérol n'ont pas dépassé une concentration supérieure à 1 % DM, et les autres sucres étaient proches de 0,1 % DM. Le fructose et le glucose étaient les sucres dominants dans les tissus d'épinette blanche alors que les tissus de pin gris étaient caractérisés par une dominance du pinitol. Les traitements d'inoculation n'ont pas provoqué de différence au niveau de l'accumulation du fructose, du pinitol et du raffinose. Les semis d'épinette blanche inoculés avec *L. bicolor* ont montré la plus forte concentration de glucose dans leur partie aérienne alors que les semis d'épinette blanche inoculés avec *S. tomentosus* ont présenté la plus forte concentration de glucose dans les tissus racinaires ($P < 0,05$) (Figure 6.5, Tableau 6.2).

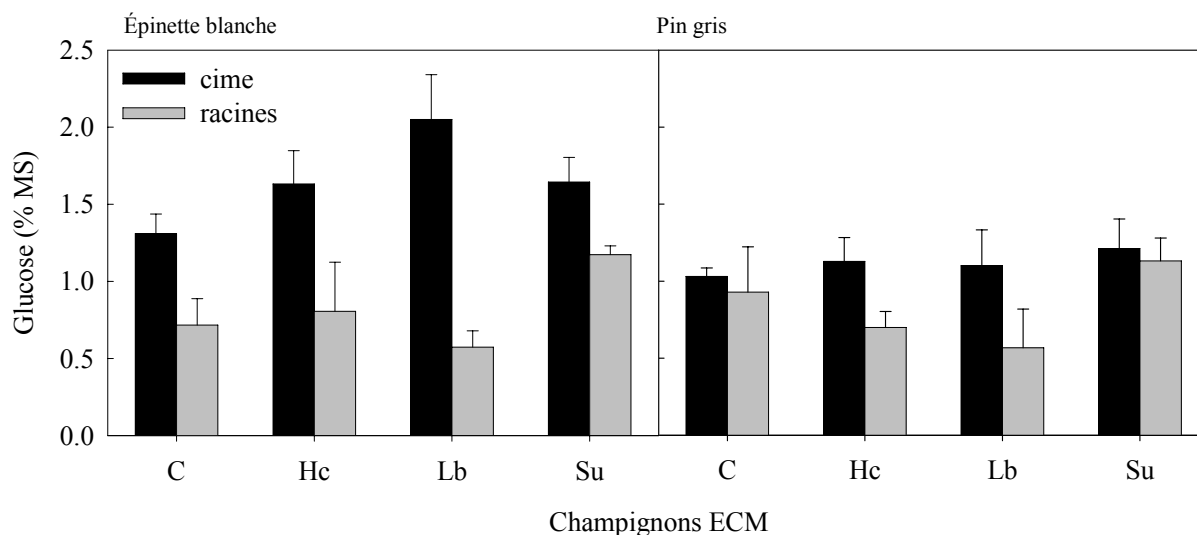


Figure 6.5 Glucose accumulé dans les parties aériennes (cime) et racinaires en pourcentage de la masse sèche respective de ces parties chez des semis d'épinette blanche et de pin gris non inoculés (C) ou inoculés avec *H. crustuliniforme* (Hc), *L. bicolor* (Lb), ou *S. tomentosus* (Su) après 28 jours d'exposition aux eaux de RC.

L'isolat de *S. tomentosus* a également induit la concentration de saccharose la plus élevée dans les parties racinaires chez les deux espèces hôtes ($P < 0,05$) (Figure 6.6, Tableau 6.2). Le champignon *L. bicolor* a induit la plus forte accumulation de glycérol dans les parties aériennes des semis d'épinette blanche et *S. tomentosus* a provoqué une augmentation significative du contenu en glycérol dans les parties aériennes et racinaires des semis de pin gris ($P < 0.05$) (Figure 6.7, Tableau 6.2).

Les semis des deux espèces hôtes inoculés avec *H. crustuliniforme* et les semis de pin gris inoculés avec *L. bicolor* ont accumulé davantage de mannitol dans leur partie aérienne ($P < 0,05$) (données non présentées). Les semis témoins d'épinette blanche possédaient significativement moins de stachyose dans leur partie racinaire que les plantes inoculées et inversement pour les semis témoins de pin gris ($P < 0,05$) (données non présentées). Aucune influence sur la concentration en raffinose n'a été détectée entre les traitements d'inoculation.

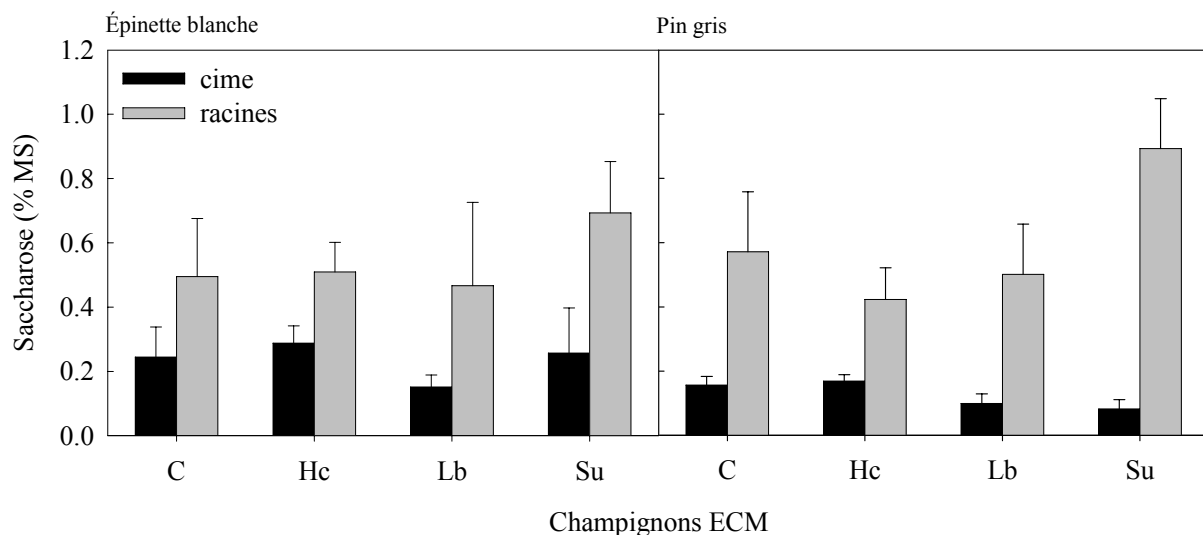


Figure 6.6 Saccharose accumulé dans les parties aériennes (cime) et racinaires en pourcentage de la masse sèche respective de ces parties chez des semis d'épinette blanche et de pin gris non inoculés (C) ou inoculés avec *H. crustuliniforme* (Hc), *L. bicolor* (Lb) ou *S. tomentosus* (Su) après 28 jours d'exposition aux eaux de RC.

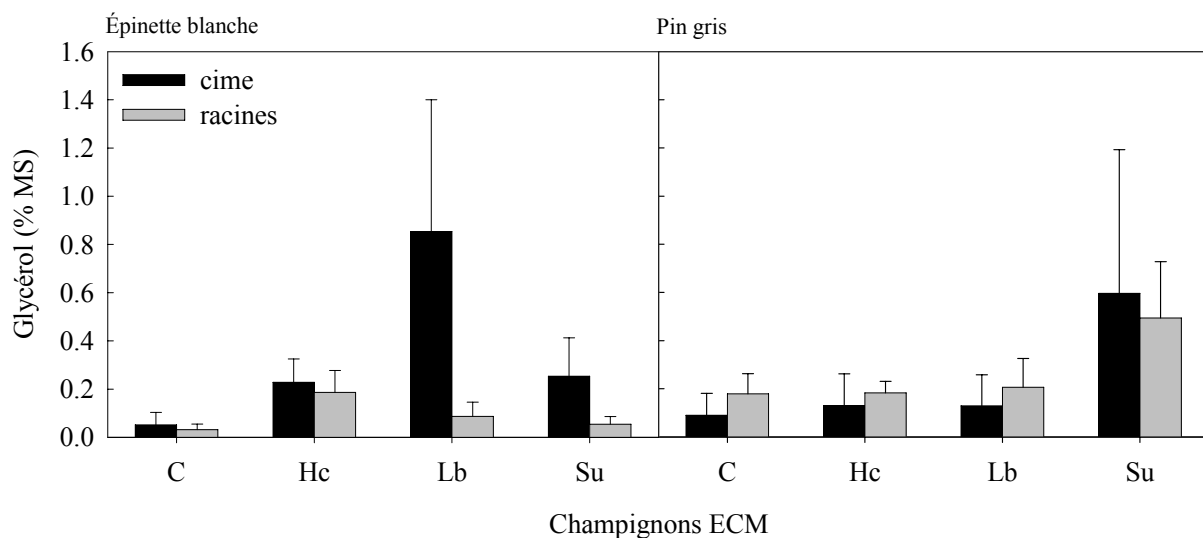


Figure 6.7 Glycérol accumulé dans les parties aériennes (cime) et racinaires en pourcentage de la masse sèche respective de ces parties chez des semis d'épinette blanche et de pin gris non inoculés (C) ou inoculés avec *H. crustuliniforme* (Hc), *L. bicolor* (Lb) ou *S. tomentosus* (Su) après 28 jours d'exposition aux eaux de RC.

Tableau 6.2 Valeurs F significatives déterminées par l'analyse de variance des variables dépendantes.

	dl	Biomasse	Sucres totaux	Glucose	Saccharose	Glycérol
<i>Variables inter-groupes</i>						
ECM (E)	3	17.93***	ns	ns	ns	ns
C1	1	45.34***	ns	ns	ns	ns
C2	1	ns	ns	ns	ns	ns
C3	1	5.08*	ns	ns	7.45*	ns
Hôte (H)	1	38.52***	ns	6.49*	ns	ns
E×H	3	3.71*	ns	ns	ns	ns
C1×H	1	4.83*	ns	ns	ns	ns
C2×H	1	5.86*	ns	ns	ns	ns
C3×H	1	ns	ns	ns	ns	5.64*
<i>Variables intra-groupes</i>						
Parties (P)	1	ns	135.86***	36.48***	41.87***	ns
E×P	3	ns	4.12*	3.32*	ns	ns
C1×P	1	ns	ns	ns	ns	ns
C2×P	1	ns	ns	ns	ns	ns
C3×P	1	ns	7.83*	7.71*	ns	ns
H×P	1	ns	ns	7.81*	ns	ns
E×H×P	3	ns	ns	ns	ns	ns
C1×H×P	1	ns	ns	ns	ns	ns
C2×H×P	1	ns	ns	ns	ns	ns
C3×H×P	1	ns	ns	ns	ns	ns

6.5.5 Expérience B

Après six mois de croissance en pépinière, les semis d'épinette blanche inoculés ont montré une accumulation de biomasse sèche significativement ($P < 0,05$) supérieure aux semis non inoculés (données non présentées). Les semis de pin gris inoculés ont montré des valeurs de biomasse racinaire significativement ($P < 0,05$) inférieures aux semis non inoculés. À ce stade de croissance, aucune différence significative n'a été détectée entre les traitements concernant la hauteur de cime, et ce, chez les deux espèces hôtes.

Sur le terrain, le sol reconstruit présentait une sodicité moyenne avec un $SAR_{1,5}$ de 8 et une salinité élevée avec une $CE_{1,5}$ de $1,1 \text{ dS m}^{-1}$. Par ailleurs, il est intéressant de noter que K^+ était en faible proportion par rapport aux autres cations, constituant à peine 0,8 % de la somme des cations (Na, K, Ca, Mg, données non présentées). Une grande proportion des semis est morte sur chacune des deux parcelles expérimentales, les pertes étant plus élevées (100 %) dans les blocs du haut de pente. Un plus grand nombre de semis d'épinette blanche ont survécu sur les deux

parcelles comparativement aux semis de pin gris (Tableau 6.3). La survie des semis d'épinette blanche a été augmentée par l'inoculation sur les deux parcelles alors que cette amélioration n'a été observée que sur la parcelle 1 pour les semis de pin gris (Tableau 6.3).

Tableau 6.3 Survie de semis d'épinette blanche et de pin gris, inoculés ou non avec *L. bicolor* sur un sol reconstitué sodique.

		Survie (%)	
		Parcelle 1	Parcelle 2
Épinette blanche	Total	46	49
	Inoculées	52	54
	Non inoculées	41	44
Pin gris	Total	23	15
	Inoculés	27	10
	Non inoculés	19	20

6.6 Discussion

6.6.1 Expérience A

La $CE_{1:5}$ du substrat de croissance, le potentiel hydrique au collet et le niveau d'accumulation de Na^+ dans les cimes et racines obtenus dans cette expérience étaient comparables à ces mêmes paramètres observés dans deux expériences réalisées par Bois *et al.* (2005b,c) pour des semis exposés à une solution de NaCl de l'ordre de 50 mM. Néanmoins, dans la présente expérience, le $SAR_{1:5}$ du substrat était de 16, alors que dans les expériences de Bois *et al.* (2005b,c) le $SAR_{1:5}$ situait entre 12 et 13. Cette forte augmentation de la sodicité a pu être observée en conséquence de la composition saline dominée par le Na^+ des eaux de RC utilisées dans cette expérience. Toutefois, l'accumulation des sels dans le substrat de croissance s'est fait progressivement, ce qui expliquerait le moindre stress des semis. En effet, aucune perturbation photochimique (F_v/F_m et Φ_{PSII}), ni aucune augmentation significative de proline, n'a été détectée sur les semis exposés aux RC, qu'ils soient inoculés ou non. Premièrement, le choc d'exposition était moins intense dans cette expérience que dans les expériences de Bois *et al.* (2005b,c). Deuxièmement, les semis ont été ainsi exposés moins de temps à un niveau de sodicité élevé, soit un $SAR_{1:5}$ supérieur à 10. L'intensité du stress d'exposition aux RC fut donc insuffisante (ou l'exposition trop brève pour cette intensité) pour provoquer une réponse physiologique significative.

En se basant seulement sur les résultats de l'expérience A, il est difficile de conclure sur l'efficacité des traitements d'inoculation pour réduire le stress des semis exposés à des eaux de RC. Néanmoins, on retrouve des similarités avec les résultats obtenus dans les expériences de Bois *et al.* (2005b,c). En effet, les semis des deux espèces hôtes inoculés avec *L. bicolor* et *S. tomentosus* ont montré la plus forte croissance et, comme dans l'expérience de Bois *et al.* (2005b), le champignon *H. crustuliniforme* a favorisé la croissance aérienne par rapport aux racines. De plus, aucune différence marquante quant à la réponse biochimique des semis n'a été observée entre le traitement de 50 mM NaCl (Bois *et al.* 2005b) et le traitement avec des eaux de RC appliqué dans l'expérience A. Si les tendances de la réponse sont effectivement similaires, alors les semis inoculés ont un potentiel de résistance au stress sodique plus élevé que les semis non-inoculés.

Les résultats de l'expérience A suggère que les réponses physiologiques enregistrées sur des semis d'épinette blanche et de pin gris inoculés ou non et exposés à différentes concentrations de NaCl (Bois *et al.* 2005b,c) peuvent être étendues à des conditions sodiques générées à partir d'eaux de RC.

6.6.2 Expérience B

Dans l'expérience B, les terrains en pente ont montré une tendance marquée à l'érosion. La matière organique épandue en haut de pente a ainsi été transportée vers le bas de pente. Cette tendance était visible au moment de la plantation et s'est accentuée au printemps qui a suivi. Ce processus peut expliquer en partie le gradient croissant de survie observé du haut vers le bas de la pente. En complément de la salinité et de la sodicité du terrain, plusieurs autres stress peuvent être à l'origine de la forte mortalité des semis. Le manque d'eau visible (sol craquelé) en juin et en juillet était possiblement le stress dominant et il était visiblement plus important en haut de pente qu'en bas de pente. Les semis ont pu être exposés alors à de forts excès de Na^+ provoqués par l'assèchement du sol. À l'inverse, les mouillères qui se sont formées sporadiquement étaient un autre facteur de mortalité évident. La tourbe étant facilement érodée, la couche de mort-terrain (argile lourde) sous-jacente est facilement mise à nue et crée des zones imperméables retenant les eaux de pluies.

Dans ces conditions, l'épinette blanche s'est montrée l'espèce la plus résistante aux multiples stress rencontrés sur le terrain. L'inoculation a influencé favorablement cette espèce en termes de survie et de croissance (en pépinière). Par contre, l'inoculation de semis de pin gris a montré des résultats contrastés entre les deux parcelles : sur la parcelle 1, le taux de survie a gagné 10 % relativement aux semis non inoculés et inversement sur la parcelle 2. Ceci indique une différence de conditions de croissance entre les deux parcelles. Comme il a été démontré dans l'expérience de Bois *et al.* (2005c), *L. bicolor* peut influencer positivement ou négativement le développement du pin gris selon le niveau de stress (*i.e.*, sodicité).

6.7 Conclusion

Malgré ces résultats ambigus, l'inoculation s'est avérée bénéfique (*i.e.*, augmentation de la croissance et de la production d'osmolytes) sur les semis d'épinette blanche et de pin gris exposés

à des eaux de RC ou à des conditions salines et sodiques *in situ*. L'expérience A suggère que les réponses physiologiques enregistrées sur des semis d'épinette blanche et de pin gris inoculés ou non et exposés à différentes concentrations de NaCl (Bois *et al.* 2005b,c) peuvent être étendues à des conditions sodiques générées à partir d'eaux de RC. L'expérience B indique que l'inoculation de semis d'épinette blanche avec la souche *L. bicolor* UAMH 8232 a augmenté la survie tout comme pour les semis de pin gris sur la parcelle 1. Ces résultats suggèrent que les réponses obtenues en serre peuvent être reproduites sur le terrain mais la confirmation des bienfaits de l'inoculation avec des champignons ECM de semis de pépinière ne pourra être obtenu que par un suivi au long terme *in situ* ainsi qu'avec de meilleures conditions de reprise à la plantation.

6.8 Remerciements

Cette recherche a été financée par Syncrude Canada Ltd. et le CRSNG (CRDPJ 250448-01 pour D.P.Khasa). Nous tenons à remercier Alexis Guérin-Laguette pour son appui pour l'inoculation des champignons ECM, Yves Dubuc pour son aide dans les mesures physiologiques, Lucette Chouinard et Pierre Lechasseur pour les analyses biochimiques, Alain Brousseau pour les analyses minérales, et Michèle Bernier-Cardou pour les conseils statistiques. Nous souhaitons remercier également Jean-Luc Jany pour son aide dans la résolution de problèmes scientifiques ainsi que dans la préparation du manuscrit, Erin Bergrand et Claude Fortin pour leur aide technique et leurs conseils.

Chapitre 7 Conclusions générales et perspectives de recherche

7.1 Récapitulatif des acquis

La symbiose ectomycorhizienne (ECM) a permis de réduire le stress salin et sodique de semis d'épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss) et de pin gris (*Pinus banksiana* Lamb.). Les travaux présentés dans cette thèse ont ainsi répondu à l'objectif général visant l'amélioration, par l'inoculation de champignons ECM sélectionnés, des conditions de croissance et de survie de semis de conifères suite à leur transplantation dans un milieu salin et sodique. Les champignons ECM utilisés, en particulier *Suillus tomentosus* (Kauff.) Sing., Snell and Dick et *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Quel., ont amélioré la croissance et/ou la résistance des semis en conditions salines et sodiques en modifiant l'absorption, la distribution et l'utilisation de l'eau, du C et des minéraux. Bien qu'il soit prématuré d'affirmer que l'inoculation de semis en pépinière va améliorer leur croissance et leur survie en milieu salin et sodique *in situ* sur le long terme, il est néanmoins évident que le mycobiote influence la physiologie de son hôte en réponse à ce stress. L'inoculation en pépinière donne l'occasion de choisir et de contrôler le paramètre fongique. Pour que cela soit rentable, un champignon inoculé doit réduire le choc lié au stress visé et persister après plantation. La persistance réduira les pertes de ressources encourues par le semis pour la formation de nouvelles associations avec la (ou les) souche(s) éventuellement rencontrée(s) dans l'amendement du site à restaurer. Dans le contexte de cette thèse, la mesure du potentiel inoculant, effectuée dans l'expérience 1, a montré que les rejets sableux communs (RS) et les rejets consolidés (RC) ne contenaient pas de propagules actives de champignons ECM (chapitre 2). Ces résultats ont confirmé également que les matériaux utilisés pour l'amendement de ces terrains ne montrent qu'un faible apport potentiel de propagules viables pour la colonisation des racines des conifères sur les sols reconstitués. Ces sols reconstruits offrent donc un faible choix aux semis non inoculés parmi les champignons symbiotiques indigènes ; mais à l'opposé, un faible potentiel inoculant est synonyme de faible compétition pour les champignons introduits par inoculation de semis en pépinière. L'expérience 1 (Chapitre 2) confirme ainsi l'intérêt des travaux menés dans la présente thèse. La suite de ce chapitre décrit les conclusions principales tirées des thématiques abordées au cours de cette thèse : la sélection *in vitro*, l'inoculation et la croissance de semis en conditions non limitantes, la réponse physiologique au

stress sodique de semis d'épinette blanche et de pin gris ainsi que l'influence de champignons ECM sélectionnés sur la réponse au stress de l'hôte.

7.2 Sélection *in vitro*

La sélection de souches *in vitro* est une étape utile pour réduire l'éventail de souches intéressantes pour les expériences en symbiose avec une plante hôte. Toutefois, cette pratique suppose implicitement que la résistance au stress des souches ECM sélectionnées peut être transmise aux semis inoculés. Or, la validité de cette hypothèse est compromise car le comportement des mycobiotés en culture pure est sensiblement différent du comportement en symbiose. D'une part, la source de C n'est pas la même *in vitro* et *in vivo* (en symbiose) et, d'autre part, en termes d'association mutualiste, la logique veut que la somme des parties soit inférieure au tout. De plus, la sélection peut être sensiblement différente en fonction du paramètre physiologique regardé. Antérieurement aux travaux présentés dans cette thèse, les souches ECM *H. crustuliniforme* UAMH 5247 et *Laccaria bicolor* (Maire) Orton UAMH 8232 ont été sélectionnées sur la base de leur croissance *in vitro* face à différents types de stress salins et alcalins au cours d'une étude menée par Kernaghan *et al.* (2002). Dans l'expérience 2 (Chapitre 3), l'utilisation d'une batterie de paramètres physiologiques, et notamment biochimiques, a montré que la croissance seule n'était pas un indicateur fiable de résistance au stress sodique (*i.e.*, *H. crustuliniforme*). Pour effectuer une sélection plus juste, il faut considérer la stratégie d'adaptation de l'organisme plutôt que la seule résultante de croissance. À cette fin, un ensemble de paramètres physiologiques doit être évalué. En plus de la croissance, nous recommandons d'évaluer au moins l'hydratation ainsi que de mesurer l'accumulation du Na^+ , du Cl^- et de solutés compatibles comme variables explicatives pour prédire la stratégie de résistance du mycobioté en réponse à un excès de NaCl. Cette stratégie ne peut être bien sûr validée que par l'étude du comportement en symbiose. De plus, au vu des présents résultats, l'évaluation de la stratégie de résistance des organismes doit se baser sur un gradient d'intensité de stress (plutôt que deux niveaux seulement), voire si possible suivre le concept de stress suggéré par Lichtenthaler (1996) : quand le seuil de résistance est dépassé, un stress intense de courte durée peut induire les mêmes dommages qu'un stress peu intense appliqué sur le long terme. Gardons à l'esprit que ces suggestions sur la sélection *in vitro* s'appliquent également à la sélection d'une combinaison symbiotique.

L'expérience 2 (Chapitre 3), en plus d'avoir permis d'évaluer des paramètres importants pour la sélection *in vitro*, a permis de comparer des champignons de différentes origines. *Hebeloma crustuliniforme* UAMH 5247 et *L. bicolor* UAMH 8232 ont été sélectionnés parmi à des champignons communs à la forêt boréale mais probablement peu adaptés aux stress salin et sodique. Pour valider cette sélection, la réponse de ces champignons a été comparée aux rares espèces fongiques piégées sur le terrain (*i.e.*, *Phialocephala* sp. *Hymenoscyphus* sp. et *Suillus tomentosus*) puisqu'elles sont possiblement résistantes aux stress rencontrés sur les sols reconstruits à partir de rejets sableux salins. Ces espèces, isolées d'un terrain salin et relativement sodique reconstruit par la compagnie Syncrude Canada Ltd en Alberta, ont toutes montré des indices d'une forte résistance à l'excès de NaCl. Ces trois genres regroupent des espèces pionnières et, de ce fait, ces dernières disposent de mécanismes d'adaptation certainement très efficaces. Pour ne citer que cela, la mélanine, visiblement accumulée dans les tissus de l'espèce du genre *Phialocephala*, est un composé conférant une grande résistance aux stress biotiques et abiotiques (Gadd 1993) (Annexe II). Mentionnons également que l'espèce de *Sebacina* identifiée dans l'expérience 1 (Chapitre 2) est une autre espèce remarquable pour la tolérance au sel. Ce champignon s'est développée dans des matériaux de mort-terrains salins pour coloniser des racines fines de pin gris.

Dans l'expérience 2 (Chapitre 3), les isolats d'*Hymenoscyphus* sp. et de *Phialocephala* sp. ont montré la plus forte résistance à l'excès de NaCl relativement aux trois autres champignons basidiomycètes : *L. bicolor*, *H. crustuliniforme* et *S. tomentosus*. Toutefois, les genres *Hymenoscyphus* et *Phialocephala* ont une relation symbiotique encore incertaine avec les conifères et le mutualisme de ces associations reste encore à être confirmé (Jumpponen & Trappe 1998, Jumpponen 1999, Vrålstad *et al.* 2000, Vrålstad *et al.* 2002) avant de les intégrer dans des programmes de production de semis en pépinière.

7.3 Inoculation et croissance de semis en conditions contrôlées

La méthode d'inoculation, le substrat de croissance et l'alimentation hydrique et minérale (Miller *et al.* 1989, Nylund & Wallander 1989, Colpaert & Verstuyft 1999) sont autant de paramètres à considérer pour accroître la réussite d'une inoculation (mise en place et persistance du champignon sélectionné) ainsi que la croissance des semis mycorhizés en conditions facilitant

l'entretien de la symbiose. Dans l'expérience 3 (Chapitre 4), la souche de *L. bicolor* a été inoculée en conditions de pépinière sur des semis de pin gris. Le champignon a favorisé la photosynthèse de son hôte probablement par un effet puits. L'augmentation de la photosynthèse pouvait être également combinée à la modification par le mycobiote des signaux (*e.g.*, ABA) des racines vers la partie aérienne. Néanmoins, plutôt que d'augmenter la croissance des semis, le gain de C (et plus) a possiblement été investi dans la croissance fongique. À l'inverse, dans les expériences 4 (Chapitre 5) et 5 (expérience A, Chapitre 6), les conditions de croissance et d'alimentation minérale et hydrique ont augmenté la croissance des semis d'épinette blanche et de pin gris inoculés avec la souche de *L. bicolor*.

Dans les conditions de l'expérience 3 (Chapitre 4), la souche *L. bicolor* UAMH 8232 a montré une grande facilité d'inoculation. L'inoculum liquide a été mélangé au substrat et le mycélium, pour demeurer viable pendant le temps de germination des plantules (≈ 12 jours), a vraisemblablement exploité le substrat tourbeux de façon saprophytique. Ayant subsisté et ensuite développé une colonisation racinaire élevée, cette souche a ainsi montré une forte capacité de compétition face aux espèces fongiques colonisant les semis non inoculés. Ces espèces colonisatrices sont ecto- ou ectendomycorhiziennes, *e.g.*, *Thelephora americana* Lloyd, *Amphinema byssoides* (Persoon:Fries) J. Eriksson. et *Wilcoxina* spp., et se retrouvent en abondance dans les pépinières en Alberta (Kernaghan *et al.* 2003). Inversement, dans les expériences 4 (Chapitre 5) et 5 (expérience A, Chapitre 6), les semis témoins n'ont montré que peu de contamination par des champignons de pépinière et donc la pression de compétition était certainement moins élevée dans les serres du Centre de foresterie des Laurentides (CFL, Québec, Canada). De plus, les graines des semis des expériences 4 (Chapitre 5) et 5 (expérience A, Chapitre 6) ont pré-germés avec une alimentation minérale minimale avant l'inoculation. Les plantules de six semaines disposaient de racines fines développées encore vierges de toute colonisation ECM lorsqu'elles ont été mises en contact avec l'inoculum. Ainsi, dans ces conditions l'hôte était probablement un puits plus fort par rapport au mycobiote. Ce dernier n'a pas subi de contraintes nutritionnelles préalables comme le mycelium de l'expérience 3, et a donc permis un gain de croissance chez son hôte. Cette hypothèse reste à vérifier, mais il est possible que le symbiote le moins limité devienne source et l'autre puits, et donc que le protocole d'inoculation influence l'effet de l'inoculation sur la croissance de l'hôte. Cette hypothèse se base sur des résultats obtenus par Miller *et al.* 1989 et Colpaert *et al.* 1992.

Les isolats de *S. tomentosus* et de *H. crustuliniforme* n'ont été testés que dans les conditions de production des expériences 4 (Chapitre 5) et 5 (expérience A, Chapitre 6). Le premier a amélioré la croissance des semis d'épinette blanche et de pin gris de façon comparable à *L. bicolor*. Par contre, *H. crustuliniforme* sans augmenter ni réduire la croissance de son hôte a pu développer un mycélium abondant. Ce développement a donc possiblement créé un puits important pour les ressources sans pour autant que cette combinaison symbiotique n'ait montré une capacité d'exploitation de son environnement réduite par rapport aux plantes témoins. Finalement, même si la croissance de l'hôte n'était pas augmentée, les résultats obtenus en conditions non limitantes indiquent une augmentation de l'exploitation des ressources disponibles par l'association plante-champignon prise dans son ensemble par comparaison aux plantes non inoculées.

7.4 Stress sodique et réponse physiologique des semis

Les semis de l'expérience 3 âgés de 1 an ont été transplantés dans un substrat minéral dont la salinité et la sodicité ont été progressivement augmentées (Chapitre 4). Ce traitement a permis de rendre compte de la réponse physiologique des semis exposés à un gradient de stress sodique. À cette fin, l'utilisation d'un substrat minéral avec un pouvoir tampon limité - par rapport à de la tourbe pure par exemple - était essentiel pour obtenir une solution sodique dans le substrat représentative des traitements. Par souci d'amélioration, dans les expériences 4 (Chapitre 5) et 5 (expérience A, Chapitre 6), le substrat minéral était amendé d'approximativement 3 % de tourbe pour favoriser le développement du réseau mycélien extra-racinaire. Cette addition de matière organique n'était pas suffisante pour modifier la réponse du substrat à l'ajout de NaCl. Ainsi, les résultats des expériences 3 (Chapitre 4) et 4 (Chapitre 5) montrent que tous les traitements de NaCl ont permis, tel que recherché, une augmentation significative de la $EC_{1.5}$ et du $SAR_{1.5}$ du substrat de croissance. L'utilisation de substrats avec un pouvoir tampon limité devrait être recommandé dans les expériences en milieu contrôlé portant sur les stress physiologiques liés à l'excès de sels.

La réponse physiologique des espèces étudiées peut être expliquée en comparant nos résultats à ceux de la littérature (Figure 7.1). En accord avec les résultats obtenus par Renault *et al.* (1999), Franklin *et al.* (2002a,b), Mushin & Zwiazek (2002), Apostol *et al.* (2004) et Franklin & Zwiazek (2004), les semis d'épinette blanche et de pin gris ont subi une réduction de la croissance et une

augmentation significative du Na^+ et du Cl^- (deux fois plus de Cl^-) dans leurs tissus avec la hausse des concentrations en NaCl dans le substrat. La tension osmotique due aux sels se trouvant à l'extérieur des tissus provoque en premier lieu une perte de turgescence qui réduit l'ouverture stomatique (Munns 1993, 2005). Au-delà de la turgescence, le contrôle des stomates est ensuite assuré par des hormones telles que l'acide abscissique (ABA) en réponse au niveau de stress (Hetherington & Quatrano 1991, Hartung & Jeschke 1999, Itai 1999, Xiong *et al.* 2002). Cette réaction réduit la capacité photosynthétique sans perturbation photochimique tel qu'observé avec un stress sodique de faible intensité, *i.e.*, 50 mM NaCl (Chapitre 4 et Chapitre 5). À ce niveau de stress, les ions ne sont pas accumulés à des niveaux toxiques dans les tissus de la partie aérienne et leur influence est essentiellement physico-chimique par la modification de l'équilibre osmotique (Munns 1993, 2002, 2005). De façon à ajuster le potentiel osmotique, les ions en excès sont éventuellement absorbés et employés comme osmolytes dans les tissus. Pour éviter des concentrations toxiques dans le cytoplasme, les semis d'épinette blanche et de pin gris ont probablement séquestré dans les vacuoles le Na^+ et le Cl^- absorbés. Bien que très probable, la compartimentation dans les vacuoles reste à être confirmée car il est aussi possible que le Na^+ et le Cl^- soient contenus dans l'apoplaste et les parois cellulaires. Pour contenir les ions dans les vacuoles ou dans l'apoplaste, des solutés compatibles sont accumulés dans le cytoplasme. Ce qui peut contribuer à la réduction de croissance car l'augmentation des sucres dans les parties aériennes peut réduire la force des puits et ainsi contribuer indirectement à la réduction de la fixation de C (Munns 1993).

En plus de la compartimentation, le contrôle de la distribution des ions en excès dans la plante est déterminant pour la survie au long terme. Celui-ci est déterminé notamment par la modification de la composition des membranes (*e.g.*, membranes plasmiques et tonoplaste) ainsi que par des barrières physiques tels que la bande de Caspari. Cette dernière donne un contrôle supplémentaire pour limiter le passage des ions en excès dans le xylème. Il est possible également que les ions en excès absorbés par les racines soient redirigés vers le milieu extérieur par un transport actif (activation de pompe Na^+). Avec une certaine combinaison de ces mécanismes les plantes peuvent contenir les ions en excès au niveau des racines et ainsi réduire l'accumulation de Na^+ et de Cl^- dans les parties aériennes en croissance. Ce résultat fut observé dans l'expérience 4 (Chapitre 5) sur l'épinette blanche. Cette espèce a montré un ratio cime/racine de la concentration en Na^+ inférieur à 1 pour tous les traitements de NaCl utilisés. À ce sujet, il s'agit de se rappeler

que les racines montrent une résilience plus élevée en terme de croissance que les parties aériennes face au stress hydrique ou salin (Hsiao & Xu 2000, Munns 2002). Or souvent la partie aérienne accumule plus de solutés compatibles que les racines et Munns (2002) suggère que des solutés inconnus sont probablement responsables de la résistance élevée des racines au stress salin. Les ions pénétrants le flux de transpiration peuvent également être compartimentés dans les parties aériennes les plus anciennes. Ce résultat est confirmé par l'expérience 3 (Chapitre 4) où le pin gris a accumulé plus de Na^+ et de Cl^- dans les parties aériennes les plus anciennes. Si les ions s'accumulent dans les parties aériennes en croissance, il est possible également qu'ils soient redirigés vers d'autres tissus par le phloème. Mais ce mécanisme semble très limité puisque les sels accumulés dans les parties aériennes restent longtemps après que le stress salin est disparu (Munns 2002). D'après les résultats de l'expérience 4 (Chapitre 5), les semis d'épinette blanche ont accumulé moins de Na^+ dans leurs tissus et leurs parties aériennes ont accumulé moins de Na^+ relativement aux parties racinaires avec la hausse de la concentration en NaCl dans le substrat. Ainsi, l'épinette blanche a montré un contrôle des ions Na^+ absorbés plus efficace que le pin gris.

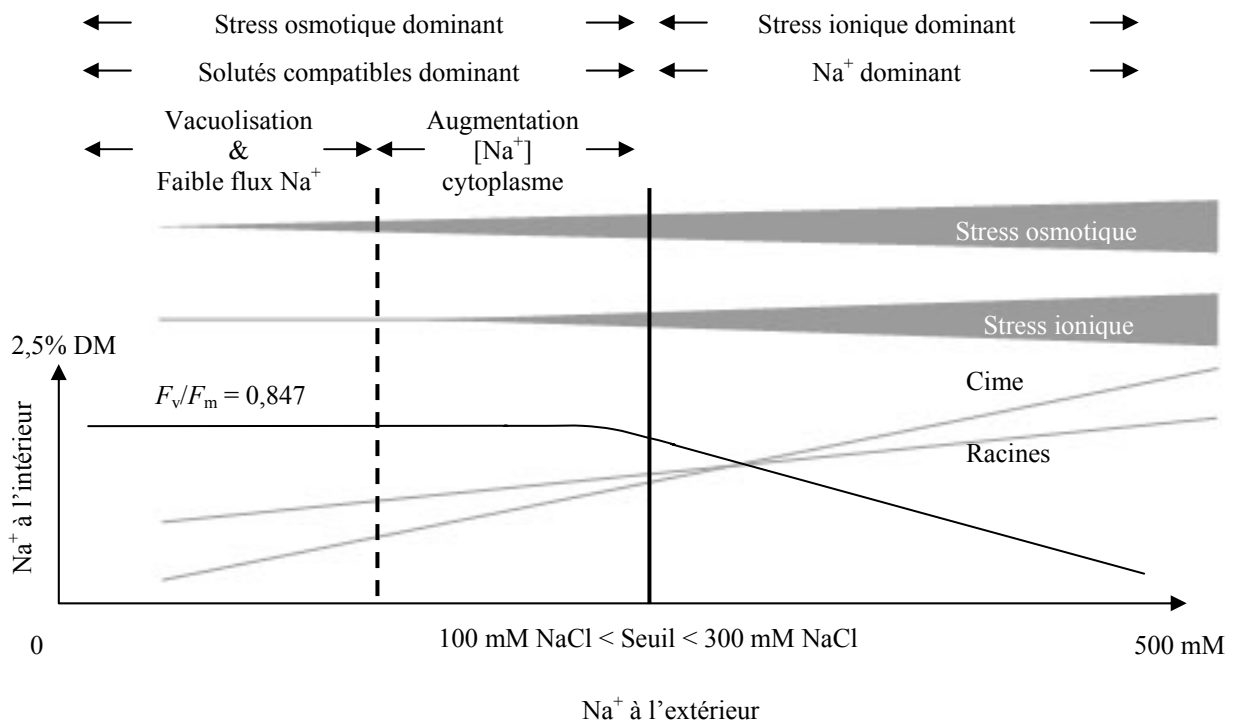


Figure 7.1 Schéma de synthèse décrivant l'augmentation hypothétique du stress chez des semis de pin gris exposés à des concentrations croissantes de NaCl dans le substrat (à l'extérieur des tissus).

Relativement à l'extrême de sodicité évalué (> 100 mM de NaCl), les semis de pin gris ont montré une moindre résistance au NaCl relativement aux semis d'épinette blanche. L'exposition des semis de pins gris jusqu'à une concentration extrême de 500 à 600 mM de Na^+ , équivalente à celle de l'eau de mer, a permis de détecter un seuil de « toxicité » pour cette espèce : au-delà de ce seuil, les capacités d'adaptation sont dépassées (*e.g.*, vacuolisation, détoxification, protection des structures et des fonctions métaboliques) et les effets des stress hyperosmotique et hyperionique agissent de façon synergique (Figure 7.1). Lorsque le Na^+ devient l'osmolyte dominant, l'accumulation dans les parties aériennes dépasse celle des racines pour compenser la tension osmotique. Dans le même ordre d'idées, plus le stress osmotique augmente (salinité), plus les parties en croissance accumulent du Na^+ et du Cl^- (relativement aux parties plus anciennes) et s'exposent aux effets spécifiques de ces ions (sodicité) (Figure 7.1). Ce seuil n'a pas été détecté chez les semis d'épinette blanche qui ont montré une résistance supérieure à 200 mM de NaCl puisqu'ils n'ont montré aucune perturbation photochimique.

7.5 Sodicité, sucres et symbiose ectomycorhizienne

Le résultat essentiel de cette étude est que la réponse physiologique au stress sodique des semis d'épinette blanche et de pin gris a été modifiée par l'influence des champignons ECM inoculés. La croissance des semis n'a pas été un facteur de résistance puisque les semis de pin gris inoculés par *L. bicolor* UAMH 8232 et l'isolat de *S. tomentosus* ont montré la plus faible résistance à 200 mM NaCl. L'influence principale du mycobiote inoculé est vraisemblablement d'ordre chimique, directe, en modifiant l'équilibre phyto-hormonale (Nylund & Wallander 1989) ou indirecte par la modification des ressources disponibles à la croissance de l'hôte. La modification des osmolytes de façon quantitative et qualitative dans les tissus du mycobiote (chapitre 3) et de l'hôte (chapitre 5) ainsi que leur coordination entre les deux partenaires sont probablement les principaux facteurs d'amélioration de la résistance des semis.

Les souches en culture pure tout comme les semis ont accumulé des osmolytes en réponse à l'augmentation des concentrations de NaCl. La proline, le glucose et le mannitol sont des osmolytes organiques communs aux deux organismes. La proline et le glucose sont accumulés à des niveaux similaires dans les tissus des deux organismes suite à l'exposition à une gamme de concentrations allant de 0 à 200 mM de NaCl. Par contre, l'accumulation de mannitol est

beaucoup plus spécifique. La concentration de ce composé est pratiquement doublée dans les tissus des champignons ECM exposés à des concentrations croissantes de NaCl, notamment *H. crustuliniforme*, par comparaison avec les tissus des plantes hôtes. À l'inverse, le mannitol n'est pas accumulé dans les tissus de la souche de *L. bicolor*, ce qui est une des causes probables de la sensibilité plus élevée de cette souche au stress hydrique (Coleman *et al.* 1989) et par conséquent au stress sodique. Les autres sucres mesurés étaient spécifiques aux plantes ou aux champignons. Le tréhalose a été spécifiquement accumulé chez les champignons. Inversement, le saccharose, le fructose, le pinitol, le glycérol et le stachyose ont été spécifiquement accumulés dans les tissus des plantes hôtes. Ces dernières ont montré une plus grande diversité de solutés compatibles accumulés par rapport à leur partenaire fongique en réponse à l'excès de NaCl. Le champignon, plus tolérant à l'absorption du NaCl, est donc moins sensible à ce stress alors que la plante hôte plus sensible accumule une plus grande diversité et quantité d'osmolytes dans ses tissus pour une plus grande résistance à l'absorption des ions en excès. En effet, les champignons continuent de croître même à des niveaux de Na supérieurs à 2,5 % DM dans leurs tissus (à 300 mM de NaCl) (Chapitre 3). Par contre, les plantes hôtes semblent disposer d'une moindre tolérance à l'absorption de Na^+ puisque, par exemple, à une concentration de 2,0-2,5 % DM dans les tissus des parties aériennes, les semis de pin gris se déshydratent (soit à des concentrations en NaCl supérieures à 200 mM) (Chapitre 5).

7.6 Quel champignon utiliser pour la plantation de semis de conifères sur des terrains salins et sodiques ?

D'après les résultats obtenus sur des cultures pures, *L. bicolor* UAMH 8232 était la souche la moins résistante à l'excès de NaCl dans le substrat de croissance. Cette espèce a déjà montré son intolérance à la sécheresse (Coleman *et al.* 1989). Pour maintenir l'hydratation de son mycelium, *L. bicolor* a accumulé du Na^+ tout en présentant une forte réduction de croissance (Chapitre 3). La réponse au stress de cette souche est ainsi probablement entrée en conflit d'intérêt (Egger & Hibbett 2004) avec les besoins des semis de pin gris colonisés et exposés à des concentrations de NaCl dépassant le seuil de « toxicité » détecté (Chapitre 4 et Chapitre 5). Néanmoins, aux mêmes concentrations de NaCl (200 mM), *L. bicolor* n'a pas réduit la résistance des semis d'épinette blanche (Chapitre 5). Compte tenu de ce résultat, cette souche pourrait être éventuellement

considérée pour l'inoculation en pépinière de semis d'épinette blanche destinés à la végétalisation de terrains salins et sodiques.

Les deux autres souches ECM étudiées montrent des avantages plus remarquables et sont les deux champignons les plus intéressants pour l'inoculation de semis utilisés pour la végétalisation de terrains salins et sodiques. La souche de *H. crustuliniforme* a montré la plus grande tolérance à l'absorption des ions Na^+ et Cl^- . Pour contrebalancer cette absorption, ce champignon a accumulé la plus grande diversité et quantité d'osmolytes organiques dans ses tissus, ceci tout en conservant une croissance peu élevée mais peu variable ainsi qu'une hydratation élevée même à 300 mM NaCl. Le maintien de l'hydratation de ses tissus pourrait être le « moteur » guidant l'adaptation de cette souche. C'est un avantage potentiel pour les semis inoculés avec ce champignon. Le pin gris inoculé avec *H. crustuliniforme* a montré la meilleure résistance au stress sodique à une concentration de 200 mM bien que ces semis n'aient pas bénéficié d'une croissance plus importante. *Hebeloma crustuliniforme* est possiblement un puits important pour les ressources absorbées par la symbiose mais cela peut éventuellement favoriser la rétention dans ses tissus des ions en excès. Ceci limiterait l'accumulation de Na^+ (et éventuellement de Cl^-) dans les tissus de l'hôte tout en favorisant son alimentation hydrique pour augmenter sa résistance aux ions en excès dans le substrat. De plus, après un traitement de NaCl, Mushin & Zwiazek (2002) ont rapporté que *H. crustuliniforme* UAMH 4257 a augmenté la conductivité hydraulique et réduit l'accumulation de Na^+ dans les tissus de semis d'épinette blanche inoculés.

L'isolat de *S. tomentosus* s'est révélé être également une espèce intéressante en présentant une résistance (*in vitro*) jusqu'à 300 mM NaCl tout en permettant une croissance mycéliale supérieure aux deux autres champignons, *H. crustuliniforme* UAMH 5247 et *L. bicolor* UAMH 8232. De plus, son inoculation a augmenté la croissance de semis d'épinette blanche et de pin gris. Nombre d'autres raisons mettent en évidence son intérêt pour l'inoculation de masse en pépinière dans les programmes de végétalisation de terrains affectés par un excès de sels : (i) ce champignon ECM peut être facilement cultivé *in vitro* et sa croissance rapide lui donne un avantage pour la production de grandes quantités d'inoculum (solide, de préférence), (ii) il colonise naturellement le pin gris dans les pépinières de l'Alberta (Danielson 1991) et semble donc compétitif face aux autres espèces ECM que l'on retrouve dans les pépinières, *e.g.*, *Thelephora americana* Lloyd, *Wilcoxina* spp. (Kernaghan *et al.* 2003), (iii) on le retrouve naturellement sur les terrains

perturbés dont les sols issus des rejets de l'industrie des sables bitumineux en Alberta (Danielson & Visser 1989), (iv) des espèces de ce genre ont déjà été inoculées pour améliorer la reforestation de terrains difficiles (Dahlberg & Finlay 1999) et (v) les espèces de ce genre ont déjà montré un certain potentiel de résistance à divers stress abiotiques (*e.g.*, Dixon *et al.* 1993, van Tichelen *et al.* 2001).

7.7 Perspectives de recherche

Pour finir, la présente étude physiologique est innovante par le spectre de conditions salines et sodiques explorées, par le nombre d'espèces hôtes et fongiques combinées, par le nombre d'indicateurs de stress (ou d'adaptation) utilisés et par l'évaluation de la distribution des osmolytes dans les diverses parties de la plante.

Les expériences présentées se sont appuyées essentiellement sur la réponse de l'hôte en symbiose exposé à un stress sodique. À l'échelle de la plante entière, il reste à définir le comportement physiologique du mycobiote en symbiose (*e.g.*, croissance, accumulation de Na^+ et autres osmolytes) relativement à son hôte. Par la suite, dans la mesure du possible, il serait intéressant de décrire des paramètres des relations hydriques dans le détail. Notamment, évaluer la conductivité hydraulique, l'intégrité et la perméabilité membranaire au niveau des racines et des hyphes et décrire le potentiel osmotique (et de turgescence) depuis les hyphes jusqu'à la cime de l'hôte, et ce, pour des semis exposés à un gradient de stress. Ceci permettrait de conclure sur la stratégie d'ajustement osmotique la plus efficace et caractériserait plus précisément l'équilibre ressource/énergie entretenu par chacune des symbioses exposées à un stress salin.

Avec une visée d'application immédiate, il est nécessaire de réaliser une expérience *in situ* avec les trois souches et les deux espèces hôtes sur des terrains aux combinaisons de stress différentes (*e.g.*, exposition radiation $\times$ sécheresse $\times$ salinité / sodicité $\times$ alcalinité). Ainsi, en serre, il serait bénéfique de caractériser la tolérance des combinaisons symbiotiques testées à la sécheresse, à l'alcalinité et à d'autres sels de Na. De cette façon, une combinaison donnée pourrait être recommandée en fonction des stress caractéristiques des sites à végétaliser. En poursuivant dans ce sens, il serait intéressant d'évaluer l'augmentation de la résistance de souches sélectionnées à des stress variés, en particulier la sécheresse et la toxicité de composés qui se trouvent dans les rejets sableux. Pour aller plus loin, un consortium de champignons adaptés à tout type de

conditions salines et sodiques pourrait être mis au point. L'étude *in situ* du comportement physiologique au long terme est seule capable de valider ces résultats.

L'objectif prioritaire des pépiniéristes pour la production de semis de qualité est leur survie post-plantation (Duryea 1984). Dans cet axe, la maximisation de la croissance des semis est nécessaire de manière à leur fournir un maximum de ressources pour favoriser leur implantation sur un site à reboiser (Duryea 1984, Ritchie 1984, Imo & Timmer 2001, 2002). L'amélioration des mécanismes de résistance est un autre objectif essentiel, notamment pour la reforestation des sites les plus difficiles. L'endurcissement au froid peut-être utilisé dans les pépinières septentrionales (Ritchie 1984, Roberts & Zwiazek 1999) et il est possible également d'améliorer les capacités d'ajustement osmotique par un endurcissement à la sécheresse (Zwiazek & Blake 1989, van den Driessche 1991) ou encore de « charger » l'organisme en nutriments (« *nutrient loading* ») pour réduire l'effet de la compétition *in situ* par exemple (Quoreschi & Timmer 1998, Imo & Timmer 2001, 2002, Salifu & Timmer 2003). L'endurcissement, en particulier à la sécheresse, serait un moyen complémentaire pour améliorer l'adaptation des semis destinés à la végétalisation de sols reconstitués à partir de rejets salins. Combiné aux effets bénéfiques d'un champignon ECM tel que l'isolat de *S. tomentosus*, il est probable que la résistance des semis soit augmentée tout comme leur croissance lors de la transplantation sur un terrain salin et/ou sodique.

Bien que l'amélioration des pratiques de restauration soit concentrée sur les aspects cultureux en pépinière et sur l'itinéraire technique pour la réhabilitation d'un substrat de croissance (en particulier l'amendement), il existe d'autres perspectives de recherche. Par exemple, au niveau du procédé d'extraction du pétrole des sables bitumineux à l'origine des stress dominants rencontrés sur les rejets sableux. Les eaux issues des sables bitumineux étant dominées par le Na^+ et le Cl^- , plutôt que de favoriser le Na^+ par l'ajout excessif de NaOH , il est possible d'ajouter du KOH dans une certaine mesure. Rajouté en compensation d'une certaine quantité de Na^+ , le K^+ permettrait une dispersion toujours satisfaisante pour l'extraction du pétrole sans augmenter la quantité total d'électrolytes apportée. Il est probable que le K^+ ait une influence positive sur la réponse au stress sodique de semis ectomycorhizés puisque cet élément intervient dans l'adaptation des organismes à l'excès de Na^+ . Parmi d'autres fonctions, le K^+ est un osmorégulateur efficace (Marcum & Murdoch 1992, Hasegawa *et al.* 2000). Au final, cette adaptation des procédés industriels favoriserait potentiellement la survie des semis sur des rejets

sableux. Ces derniers seraient toujours salins mais avec un équilibre cationique où le K^+ serait plus disponible aux plantes pour réduire l'absorption et les effets toxiques du Na^+ . Il est probable que ce type de modification des techniques d'extraction ait des coûts élevés et il est nécessaire comme pour toute amélioration des moyens de végétalisation d'évaluer le rapport investissement/qualité.

Pour finir, au-delà de l'amélioration de la tolérance végétale (*e.g.*, par l'inoculation de champignons symbiotiques), ou des techniques de reconstruction des sols (*e.g.*, amendement), les terrains perturbés montrant des stress intenses nécessitent également un processus de végétalisation plus raffiné. En ce sens, l'écologie des conifères, tels que l'épinette blanche et le pin gris, veut qu'ils soient des espèces dominantes à maturité de l'écosystème boréal. Ce sont des espèces à croissance lente dont la survie *in vivo* est favorisée par la présence d'espèces pionnières à croissance rapide tels que les espèces des genres *Populus* et *Betula*. Bien entendu, le retour vers l'écosystème prévalant sera ralenti et son coût de réhabilitation augmenté par un processus de végétalisation par étape. Néanmoins, l'inoculation seule ne peut permettre d'augmenter de façon significative la survie de semis de conifères sur des terrains exposés, salins et/ou sodiques, et soumis à des périodes de gel et de sécheresse intenses. C'est pourquoi, l'utilisation de plantes pionnières, hyperaccumulatrices (*e.g.*, pour les résidus d'hydrocarbures et pour les métaux lourds) et à croissance rapide associées à des conifères serait une solution envisageable pour favoriser la reprise de l'écosystème boréal sur les terrains perturbés les plus difficiles. Par exemple, du peuplier et des éricacées pourraient être agencés de façon comparable à un système agroforestier pour stabiliser les sols nouvellement reconstruits et modérer les extrêmes environnementaux limitant la survie et la croissance des conifères. De plus, ces espèces pionnières sont associées à des champignons également symbiotiques des conifères. De ce fait, leur implantation pourrait permettre d'augmenter le potentiel inoculant des terrains et subséquemment favoriser la colonisation des racines de semis de pépinière par des champignons indigènes suite à leur plantation. Pour améliorer les techniques de végétalisation, il est nécessaire de concevoir un développement intégré de toutes les étapes du processus de restauration des écosystèmes.

Bibliographie générale

- Abbott L.K. & Robson A.D. (1991).** Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agriculture Ecosystems & Environment* **35**: 121-150.
- Abuzinadah R.A. & Read D.J. (1989).** The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. IV. The utilization of peptides by birch (*Betula pendula* L.) infected with different mycorrhizal Fungi. *New Phytologist* **112**: 55-60.
- Agerer R. (1999).** Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt toward a natural classification. In: Varma A. & Hock B. (Eds). *Mycorrhiza : structure, function, molecular biology and biotechnology*. 2nd edn. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp 633-682.
- Alberta environment (2001).** Salt contamination assessment and remediation guidelines. ENV-190-OP, www.gov.ab.ca/env/ (consulté: décembre 2004).
- Al-Karaki G.N. (2000).** Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza* **10**: 51-54.
- Al-Karaki G.N., Hammad R. & Rusan M. (2001).** Response of two tomato cultivars differing in salt tolerance to inoculation with mycorrhizal fungi under salt stress. *Mycorrhiza* **11**: 43-47.
- Allen M.F. (1991).** The Ecology of Mycorrhizae. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Apostol K.G., Zwiazek J.J. & MacKinnon M.D. (2002).** NaCl and Na₂SO₄ alter responses of jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings to boron. *Plant and Soil* **240**: 321-329.
- Apostol K.G., Zwiazek J.J. & MacKinnon M.D. (2004).** Naphthenic acids affect plant water conductance but do not alter shoot Na⁺ and Cl⁻ concentrations in jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings. *Plant and Soil* **263**: 183-190.
- Arguelles J.C. (2000).** Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Archive of Microbiology* **174**: 217-224.
- Arnholdt-Schmitt B. (2004).** Stress-induced cell reprogramming. A role for global genome regulation ? *Plant Physiology* **136**: 2579-2586.
- Arnon D.I. (1949).** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* **24**: 1-15.
- Augé R.M. (2001).** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3-42.
- Baxter J.W. & Dighton J. (2001).** Ectomycorrhizal diversity alters growth and nutrient acquisition of grey birch (*Betula populifolia*) seedlings in host symbiont culture conditions. *New Phytologist* **152**: 139-149.
- Bell A.A. & Wheeler M.H. (1986).** Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* **24**: 411-451.
- Bellgard S.E. (1993).** Soil disturbance and infection of *Trifolium repens* roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **3**: 25-29.
- Bending G.D. & Read D.J. (1995a).** The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. V. Foraging behaviour and translocation of nutrients from exploited litter. *New Phytologist* **130**: 401-409.
- Bending G.D. & Read D.J. (1995b).** The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. VI. Activities of nutrient mobilizing enzymes in birch litter colonized by *Paxillus involutus* (Fr.) Fr. *New Phytologist* **130**: 411-417.

- Berthomieu P., Con      G., Nublat A., Brackenbury W.J., Lambert C., Savio C., Uozumi N., Oiki S., Yamada K., Cellier F., Gosti F., Simonneau T., Essah P.A., Tester M., Very A-A, Sentenac H. & Casse F. (2003).** Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *Embo Journal* **22**: 2004-2014.
- Bidartondo M.I., Baar J. & Bruns T.D. (2001).** Low ectomycorrhizal inoculum potential and diversity from soils in and near ancient forests of bristlecone pine (*Pinus longeva*). *Canadian journal of Botany* **79**: 293-299.
- Bledsoe C.S. & Rygielwicz P.T. (1986).** Ectomycorrhizas affect ionic balance during ammonium uptake by Douglas fir roots. *New Phytologist* **102**: 271-283.
- Bois G., Bertrand A., Pich   Y., Fung M.Y.P. & Khasa D.P. (2005a).** Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations. *Mycorrhiza* (sous presse)
- Bois G., Bigras F., Bertrand A., Pich   Y., Fung M.Y.P. & Khasa D.P. (2005b).** Differential effect of three ectomycorrhizal fungi on the physiological response of *Picea glauca* and *Pinus banksiana* seedlings exposed to a NaCl gradient. (en soumission).
- Bois G., Bigras F., Pich   Y., Fung M.Y.P. & Khasa D.P. (2005c).** Physiological response to NaCl of nursery-grown *Pinus banksiana* inoculated with *Laccaria bicolor*. (en soumission).
- Bois G., Pich   Y., Fung M.Y.P. & Khasa D.P. (2005d).** Mycorrhizal inoculum potentials of pure reclamation materials and revegetated tailing sands from the Canadian oil sand industry. *Mycorrhiza* **15**: 149-158.
- Bohnert H.J., Nelson D.E. & Jensen R.G. (1995).** Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* **7**: 1099-1111.
- Bohnert H.J. & Shen B. (1999).** Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae* **78**: 237-260.
- Boucher D.H., James S. & Keeler K.H. (1982).** The ecology of mutualism. *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**: 315-347.
- Bradbury S.M., Danielson R.M. & Visser S. (1998).** Ectomycorrhizas of regenerating stands of lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Canadian Journal of Botany* **76**: 218-227.
- Brady N.C. & Weil R.R. (2002).** The nature and properties of soils. 13th edn. Prentice Hall, Upper saddle river, NJ, USA.
- Brandes B., Goldbold D.L., Kuhn A.J. & Jentschke G. (1998).** Nitrogen and phosphorus acquisition by the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and its effect on host nutrition. *New Phytologist* **140**: 735-743.
- Bronstein J.L. (2001).** The exploitation of mutualisms. *Ecology Letters* **4**: 277-287.
- Brown A.D. & Simpson J.R. (1972).** Water relations of sugar-tolerant yeasts: The role of intracellular polyols. *Journal of General Microbiology* **72**: 589-591.
- Brundrett M.C. (2002).** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* **154**: 275-304.
- Brundrett M.C. (2004).** Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* **79**: 473-495.
- Brundrett M.C. & Abbott L.K. (1994).** Mycorrhizal fungus propagules in the jarrah forest. I. Seasonal study of inoculum levels. *New Phytologist* **127**: 539-546.
- Brundrett M.C., Ashwath N. & Jasper D.A. (1996a).** Mycorrhizas in the Kakadu region of tropical Australia. I. Propagules of mycorrhizal fungi and soil properties in natural habitats. *Plant and Soil* **184**: 159-171.

- Brundrett M.C., Ashwath N. & Jasper D.A. (1996b).** Mycorrhizas in the Kakadu region of tropical Australia. II. Propagules of mycorrhizal fungi in disturbed habitats. *Plant and Soil* **184**: 173-184.
- Brundrett M., Bougher N., Dell B., Grove T. & Malajczuk N. (1996c).** Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph 32, Canberra, Australia.
- Butler M.J. & Day A.W. (1998).** Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology* **44**: 1115-1136.
- Cairney J.W.G. & Burke R.M. (1996).** Physiological heterogeneity within fungal mycelia: an important concept for a functional understanding of the ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **134**: 685-695.
- Cairney J.W.G., Taylor A.F.S., & Burke R.M. (2003).** No evidence for lignin peroxidase genes in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **160**: 461-462.
- Cheeseman J.M. (1988).** Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology* **87**: 547-550.
- Chen D.M., Ellul S., Herdman K. & Cairney J.W.G. (2001a).** Influence of salinity on biomass production by Australian *Pisolithus* spp. isolates. *Mycorrhiza* **11**: 231-236.
- Chen D.M., Taylor A.F.S., Burke R.M. & Cairney J.W.G. (2001b).** Identification of genes for lignin peroxidases and manganese peroxidases in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **152**: 151-158.
- Chrispeels C. & Maurel M.J. (2001).** Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant physiology* **125**: 135-138.
- Churchman G.J., Skjemstad J.O. & Oades J.M. (1993).** Influence of clay minerals and organic matter on effects of sodicity on soils. *Australian Journal of Soil Research* **31**: 779-800.
- Clipson N.J.W. & Jennings D.H. (1992).** *Dendryphiella salina* and *Debaryomyces hansenii*: models for ecophysical adaptation to salinity by fungi that grow in the sea. *Canadian Journal of Botany* **70**: 2097-2105.
- Colpaert J.V., van Assche J.A. & Luijckens K. (1992).** The growth of the extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi and the growth response of *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist* **120**: 127-135.
- Colpaert J.V., van Laere A. & van Assche J.A. (1996).** Carbon and nitrogen allocation in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* L. seedlings. *Tree Physiology* **16**: 787-793.
- Colpaert J.V., Vandenkoornhuyse P., Adriaensen K. & Vangronsveld J. (2000).** Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New Phytologist* **147**: 367-379.
- Colpaert J.V. & Verstuyft I. (1999).** The Ingestad concept in ectomycorrhizal research: possibilities and limitations. *Physiologia Plantarum* **105**: 233-238.
- Coleman M.D., Bledsoe C.S. & Lopushinsky W. (1989).** Pure culture response of ectomycorrhizal fungi to imposed water stress. *Canadian Journal of Botany* **67**: 29-39.
- Cramer G.R., Lauchli A. & Polito V.S. (1985).** Displacement of Ca^{2+} from the plasmalemma of root cells. *Plant Physiology* **79**: 207-211.
- Crowe J.H., Crowe L.M. & Chapman D. (1984).** Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* **223**: 701-703.
- Dahlberg A. (2001).** Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist* **150**: 555-562.

- Dahlberg A. & Finlay R.D. (1999).** *Suillus*. In: Cairney J.W.G. & Chambers S.M. (eds). *Ectomycorrhizal fungi – Key genera in profile*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 33-64.
- Danielson R.M. (1982).** Taxonomic affinities and criteria for identification of the common ectendomycorrhizal symbiont of pines. *Canadian Journal of Botany* **60**: 7-18.
- Danielson R.M. (1984).** Ectomycorrhizal associations in jack pine stands in Northeastern Alberta. *Canadian Journal of Botany* **62**: 932-939.
- Danielson R.M. (1991).** Temporal changes and effects of amendments on the occurrence of sheathing ectomycorrhizas of conifers growing in oil sands tailings and coal spoil. *Agriculture Ecosystems & Environment* **35**: 261-281.
- Danielson R.M. & Visser S. (1989).** Host response to inoculation and behavior of introduced and indigenous ectomycorrhizal fungi of jack pine grown on oil-sands tailings. *Canadian Journal of Forest Research* **19**: 1412-1421.
- Danielson R.M., Visser S. & Parkinson D. (1983a).** Plant growth in four overburden types used in the reclamation of extracted oil sands. *Canadian Journal of Soil Science* **63**: 353-361.
- Danielson R.M. Visser S. & Parkinson D. (1983b).** Microbial activity and mycorrhizal potential of four overburden types used in the reclamation of extracted oil sands. *Canadian Journal of Soil Science* **63**: 363-375.
- Danielson R.M., Zak J.C. & Parkinson D. (1984).** Mycorrhizal inoculum in a peat deposit formed under white spruce stand in Alberta. *Canadian Journal of Botany* **63**: 2557-2560.
- Davies F.T., Svenson S.E., Cole J.C., Phavaphutanon L., Duray S.A., Olalde-Portugal V., Meier C.E. and Bo S.H. (1996).** Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiology* **16**: 985-993.
- de Bary A. (1887).** Comparative morphology and biology of the fungi, mycetozoa and bacteria. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Dighton J. & Mason P.A. (1985).** Mycorrhizal dynamics during forest tree development. In: Moore D., Casselton L.A., Wood D.A. & Frankland J.C. (eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Dixon R.K., Rao M.V. & Garg V.K. (1993).** Salt stress affects *in vitro* growth and *in situ* symbioses of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **3**: 63-68.
- Dosskey M.G., Boersma L. & Linderman R.G. (1991).** Role of the photosynthate demand of ectomycorrhizas in the response of Douglas fir seedlings to drying soil. *New Phytologist* **117**: 327-334.
- Dosskey M.G., Linderman R.G. & Boersma L. (1990).** Carbon-sink stimulation of photosynthesis in Douglas fir seedlings by some ectomycorrhizas. *New Phytologist* **115**: 269-274.
- Dosskey M.G., Linderman R.G. & Boersma L. (1992).** Comparison of biomass allocation in ectomycorrhizal and nonmycorrhizal Douglas fir seedlings of similar nutrition and overall size. *Plant and Soil* **142**: 147-150.
- Duryea M.L. (1984).** Nursery cultural practices: impact on seedling quality. In: Duryea M.L. & Landis T.D. (eds). *Forest nursery manual: production of bareroot seedlings*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague/Boston/Landcaster, Oregon state university, Corvallis, www.rngr.net/Publications/fnm (consulté: mai 2005).
- Eastman P.A.K. & Camm E.L. (1995).** Regulation of photosynthesis in interior spruce during water stress: changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Tree Physiology* **15**: 229-235.

- Egger K.N. (1995).** Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Canadian Journal of Botany* **73**: S1415-S1422.
- Egger K.N. & Hibbett D.S. (2004).** The evolutionary implications of exploitation in mycorrhizas. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1110-1121.
- Egger K.N., Kernaghan G., O'Dell T.E. & Baldwin Q.F. (1996).** Describing DNA using molecular techniques. In: Goodman D.M.G., Dural D.M., Trofynow J.A.T. & Berch S.H. (eds). *Manual of Concise Description of North American Ectomycorrhizae*. Mycologue Publications, Sidney, BC, Canada, pp 3B.1-3B.2.
- Essington M.E. (2004).** Soil and water chemistry, an integrative approach. CRC Press, USA.
- Finlay R.D., Frostegard A. & Sonnerfeldt A.-M. (1992).** Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. Ex Loud. *New Phytologist* **120**: 105-115.
- Flowers T.J. (1972).** Salt tolerance in *Suaeda maritima* L. Dum. The effect of sodium chloride on growth, respiration and soluble enzymes in a comparative study with *Pisum sativum*. *Journal of experimental botany* **11**: 1881-1886.
- Flowers T.J., Troke P.F. & Yeo A.R. (1977).** The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **28**: 89-121.
- Formina M.A., Alexander I.J., Colpaert J.V. & Gadd G.M. (2005).** Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 851-866.
- Frankland J.C. (1998).** Fungal succession – unraveling the unpredictable. *Mycological Research* **102**: 1-15.
- Franklin J.A., Renault S., Croser C., Zwiazek J.J. & MacKinnon M. (2002a).** Jack pine growth and elemental composition are affected by saline tailings water. *Journal of Environmental Quality* **31**: 648-653.
- Franklin J.A. & Zwiazek J.J. (2004).** Ion uptake in *Pinus banksiana* treated with sodium chloride and sodium sulphate. *Physiologia Plantarum* **120**: 482-490.
- Franklin J.A., Zwiazek J.J., Renault S. & Croser C. (2002b).** Growth and elemental composition of Jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings treated with sodium chloride and sodium sulfate. *Trees* **16**: 325-330.
- Fung, M.Y.P. & Macyk T.M. (2000).** Reclamation of oil sand mining areas. In: Barnhisel R.I., Darmody R.G. & Daniels W.L. (eds). *Reclamation of drastically disturbed lands*, 2nd edn. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp 755-774.
- Gadd G.M. (1993).** Interaction of fungi with toxic metals. *New Phytologist* **124**: 25-60.
- Galinsky E.A. & Truper H.G. (1994).** Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microb Rev* **15**: 95-108.
- Gallaud I. (1905).** Études sur les mycorhizes endophytes. *Revue Générale de Botanique* **17**: 5-48, 66-85, 123-136, 223-239, 313-325, 423-433, 479-496.
- Garbaye J. & Guehl J.-M. (1997).** Le rôle des ectomycorhizes dans l'utilisation de l'eau par les arbres forestiers. *Revue forestière française* **XLIX**: 110-120.
- Gardes M, White T.J., Fortin J.A., Bruns T.D. & Taylor J.W. (1991).** Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* **69**: 180-190.
- Gardner W.K. (2004).** Changes in soils irrigated with saline groundwater containing excess bicarbonate. *Australian Journal of Soil Research* **42**: 825-831.
- Giovannetti M. & Mosse B. (1980).** An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytology* **84**: 489-500

- Glen M., Tommerup I.C., Bougher N.L. & O'Brien P. (2001).** Interspecific and intraspecific variation of ectomycorrhizal fungi associated with *Eucalyptus* ecosystems as revealed by ribosomal DNA PCR-RFLP. *Mycological Research* **105**: 843-858.
- Godde D. (1999).** Adaptation of the photosynthetic apparatus to stress conditions. In: Lerner H.R. (ed). *Plant response to environmental stresses, from phytohormones to genome reorganization*. Marcel Dekker Inc., Basel, NY, USA, pp 449-474.
- Goodman D.M., Durall D.M., Trofynow J.A. & Berch S.M. (1996).** Concise Description of North American Ectomycorrhizae. Mycologue publications, Sidney, BC, Canada.
- Gould A.B., Hendrix J.W. & Ferriss R.S. (1996).** Relationship of mycorrhizal activity to time following reclamation of surface mine land in Western Kentucky. I. Propagule and spore population densities. *Canadian Journal of Botany* **74**: 247-261.
- Greenway H. & Osmond C.B. (1972).** Salt response of enzymes from species differing in salt tolerance. *Plant Physiology* **49**: 256-259.
- Guehl J.-M., Garbaye J. & Wartinger A. (1992).** The effect of ectomycorrhizal status on plant water relations and sensitivity of leaf gas exchange to soil drought in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedlings. In: read D.J., Lewis D.H., Fitter A.H. & Alexander I.J. (eds). *Mycorrhizas in ecosystems*. CAB international, Oxon, UK.
- Guinberteau J. & Courtecuisse R. (1997).** Diversité des champignons (surtout mycorrhiziens) dans les écosystèmes forestiers actuels. *Revue forestière française* **XLIX**: 25-39.
- Hacskeylo E. (1965).** *Thelephora terrestris* and mycorrhizae of Virginia pine. *Forest Science* **11**: 401-404.
- Hartley J., Cairney J.W.G. & Meharg A.A. (1997).** Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptative tolerance to potentially toxic metals in the environment? *Plant and Soil* **189**: 303-319.
- Hartung W. & Jeschke W.D. (1999).** Absciscic acid: a long-distance stress signal in salt stressed plants. In: Lerner H.R. (ed). *Plant response to environmental stresses, from phytohormones to genome reorganization*. Marcel Dekker Inc., Basel, NY, USA, pp 333-348.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.-K. & Bohnert H.J. (2000).** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology and Molecular Biology* **51**: 463-499.
- Hashem A.R. (1995).** The role of mycorrhizal infection in the tolerance of *Vaccinium macrocarpon* to iron. *Mycorrhiza* **5**: 451-454.
- Henry J.D. (2002).** Canada's boreal forest. Smithsonian Natural History Series, Smithsonian institution press, Washington, USA.
- Herre E.A., Knowlton N., Mueller U.G. & Rehner S.A. (1999).** The evolution of mutualism : exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends in Ecology & Evolution* **14**: 49-53.
- Hetherington A.M. & Quatrano R.S. (1991).** Mechanisms of action of absciscic acid at the cellular level. *New Phytologist* **119**: 9-32.
- Hodge A. (2004).** The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* **162**: 9-24.
- Horie T & Schroeder JI. (2004).** Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiology* **136**: 2457-2462.
- Horton T.R. & Bruns T.D. (2001).** The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology* **10**: 1855-1871.

- Hsiao T.C. & Xu L.-K. (2000).** Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1595 - 1616.
- Imo M. & Timmer V.R. (2001).** Growth and nitrogen retranslocation of nutrient loaded *Picea mariana* seedlings planted on boreal mixedwood sites. *Canadian Journal of Forest Research* **31**: 1357-1366.
- Imo M. & Timmer V.R. (2002).** Growth and nutritional interactions of nutrient-loaded black spruce seedlings with neighboring natural vegetation under greenhouse conditions. *Forest Science* **48**: 77-84.
- Itai C. (1999).** Role of phytohormones in plant responses to stresses. In: Lerner H.R. (ed). *Plant response to environmental stresses, from phytohormones to genome reorganization*. Marcel Dekker Inc., Basel, NY, USA, pp 287-301.
- Jakobsen I. & Rosendahl L. (1990).** Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist* **115** : 77-83.
- Jennings D.H. (1983).** Some aspect of the physiology and biochemistry of marine fungi. *Biological Review* **58**: 423-459.
- Jennings D.H. (1984).** Polyol metabolism in fungi. *Advances in microbial physiology* **25**: 149-193.
- Jennings D.H. & Burke R.M. (1990).** Compatible solute – The mycological dimension and their role as physiological buffering agents. *New Phytologist* **116**: 277-283.
- Jentschke G. & Goldbold D.L. (2000).** Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiologia Plantarum* **109**: 107-116.
- Johnson N.C., Graham J.H. & Smith F.A. (1997).** Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* **135**: 575-585.
- Jonsson L.M., Nilsson M.-C., Wradle D.A. & Zackrisson O. (2001).** Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. *Oikos* **93**: 353-364.
- Jumpponen A. (1999).** Spatial distribution of discrete RAPD phenotypes of a root endophytic fungus, *Phialocephala fortinii*, at a primary successional site on a glacier forefront. *New Phytologist* **141**: 333-344.
- Jumpponen A., Mattson K.G. & Trappe J.M. (1998).** Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. *Mycorrhiza* **7**: 261-265.
- Jumpponen A. & Trappe J.M. (1998).** Dark septate endophytes: A review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* **140**: 295-310.
- Jumpponen A., Trappe J.M. & Cázares E. (2002).** Occurrence of ectomycorrhizal fungi on the forefront of retreating Lyman glacier (Washington, USA) in relation to time since degradation. *Mycorrhiza* **12**: 43-49.
- Kalra Y.P. (1998).** Handbook of reference methods for plant analysis. CRC Press LLC, Baco Raton, USA.
- Kalra Y.P. & Maynard D.G. (1992).** Methods manual for forest soil and plant analysis. Inf. Rep.NOR-X-319. Forestry Canada, Edmonton, AB, Canada.
- Kårén O., Jonsson L., Jonsson M. & Ihrmark K. (1999).** Cook-book for DNA extraction restriction Analysis (RFLP): Agarose Gel Electrophoresis, PCR, Sequencing. In : Kårén O. (Ph.D. Thesis). *Effects of air pollution and forest regeneration methods on the community structure of ectomycorrhizal fungi*. Swedish University of Agricultural Sciences, Dept. of Forest Mycology and Pathology, Uppsala, Sweden.

- Keren R. (2000).** Salinity. In: Sumner M.E. (Ed). *Handbook of Soil Science*. CRC Press, NY, USA, pp G3-G25.
- Kernaghan G., Hambling B., Fung M.Y.P. & Khasa D.P. (2002).** *In vitro* selection of boreal ectomycorrhizal fungi for use in reclamation of saline-alkaline habitats. *Restoration Ecology* **10**: 1-9.
- Kernaghan G., Sigler L. & Khasa D. (2003).** Mycorrhizal and root endophytic fungi of containerized *Picea glauca* seedlings assessed by rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology* **45**: 128-136.
- Khasa D.P., Hambling B., Kernaghan G., Fung M. & Ngimbi E. (2002).** Genetic variability in salt tolerance of selected boreal woody seedlings. *Forest Ecology and Management* **165**: 257-269.
- Kimmins J.P. (2004).** Forest ecology, a foundation for sustainable forest management and environmental ethics in forestry. 3rd edn. Prentice Hall, NJ, USA.
- Kleinschmidt R., Hentschke I. & Rothe G.M. (1998).** Effect of season and soil treatments on carbohydrate concentrations in Norway spruce (*Picea abies*) mycorrhizae. *Tree Physiology* **18**: 325-332.
- Koch K. (2004).** Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 235-246.
- Kohl K.I. (1997).** The effect of NaCl on growth, dry matter allocation and ion uptake in salt marsh and inland population of *Armeria maritima*. *New Phytologist* **135**: 213-225.
- Koske R.E. & Gemma J.N. (1989).** A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research* **92**: 486-488.
- Kottke I. (1992).** Ectomycorrhizas – Organs for uptake and filtering of cations. In: Read D.J., Lewis D.H., Fitter A.H. & Alexander I.J. (Eds). *Mycorrhizas in ecosystems*. CAB International, Wallingford, UK, pp 316-322.
- Kozlowski T.T. (1997).** Response of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology* **1**: 1-29.
- Kramer P.J. & Boyer J.S. (1995).** Water relations of plants and soils. Academic Press, London, UK.
- Kropp B.R. & Langlois C.-G. (1990).** Ectomycorrhizae in reforestation. *Canadian Journal of Forest Research* **20**: 438-451.
- Kropp B.R. & Mueller G.M. (1999).** *Laccaria*. In: Cairney J.W.G. & Chambers S.M. (eds). *Ectomycorrhizal fungi – Key genera in profile*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 65-88.
- Lamhamedi M.S., Bernier P.Y. & Fortin J.A. (1992).** Hydraulic conductance and soil water potential at the soil-root interface of *Pinus pinaster* seedlings inoculated with different dikaryons of *Pisolithus* sp. *Tree Physiology* **10**: 231-244.
- Larsen J.A. (1980).** The boreal ecosystem. Academic Press, USA.
- Last F.T., Dighton J. & Mason P.A. (1987).** Successions of sheathing mycorrhizal fungi. *Trends in Ecology and Evolution* **2**: 157-161.
- Leake J.R. (2001).** Is diversity of ectomycorrhizal fungi important for ecosystem function? *New Phytologist* **152**: 1-8.
- Lerner H.R. (1999).** Introduction to the response of plants to environmental stresses. In: Lerner H.R. (ed). *Plant response to environmental stresses, from phytohormones to genome reorganization*. Marcel Dekker Inc., Basel, NY, USA, pp 1-26.
- Levitt J. (1980).** Response of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt and other stresses. 2nd edn. Academic Press, London, UK.

- Levy G.J. (2000).** Sodicity. In: Sumner M.E. (Ed). *Handbook of Soil Science*. CRC Press, NY, USA, pp G27-G62.
- Lewis D.H. & Harley J.L. (1965).** Carbohydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. I. Identity of endogenous sugars and utilization of exogenous sugars. *New Phytologist* **64**: 224-237.
- Lewis D.H. & Smith D.C. (1967).** Sugar alcohols (Polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, physiology and metabolism. *New Phytologist* **66**: 143-184.
- Li X. & Fung M.Y.P. (1998).** Creating soil-like materials for plant growth using tailings sand and fine tails. *Journal of Canadian Petroleum Technology* **37**: 44-47.
- Lichtenthaler H.K. (1996).** Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology* **148**: 4-14.
- Luard E.J. (1985).** Interaction of substrate C:N ratio and osmotic potential on growth and osmoregulation of four filamentous fungi. *New Phytologist* **101**: 117-132.
- Malajczuk N., Reddell P. & Brundrett M. (1994).** Role of ectomycorrhizal fungi in mineland reclamation. In: Pfleger F.L. & Linderman R.G. (eds). *Mycorrhizae and plant health*. APS Press, St Paul, MN, USA, pp 83-100.
- Mansour M.M.F. & Salama K.H.A. (2004).** Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environmental and Experimental Botany* **52**: 113-122.
- Marcum K.B. & Murdoch C.L. (1992).** Salt tolerance of the coastal salt marsh grass, *Sporobolus virginicus* (L.) Kunth. *New Phytologist* **120**: 281-288.
- Marschner H. & Dell B. (1994).** Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* **159**: 89-102.
- Martin P.K. & Koebner R.M.K. (1995).** Sodium and chloride ions contribute synergistically to salt toxicity in wheat. *Biologia Plantarum* **37**: 265-271.
- Marx D.H. (1969).** The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of fine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* **59**: 153-163.
- Marx D.H. (1991).** The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. In: The Marcus Wallemberg Foundation Symposia Proceedings 7. *Ecophysiology of ectomycorrhizae of forest trees*. Falun, Sweden, pp 54-90.
- Maxwell K. & Johnson G.N. (2000).** Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659-668.
- Meyer F.H. (1973).** Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In: Marks G.C. & Kozlowski T.T. (eds). *Ectomycorrhizae*. Academic Press, NY, USA, pp 79-105.
- Miller S.L., Durall D.M. & Rygiewicz P.T. (1989).** Temporal allocation of ^{14}C to extrametrical hyphae of ectomycorrhizal ponderosa pine seedlings. *Tree Physiology* **5**: 239-249.
- Molina R., Massicotte H. & Trappe J.M. (1992).** Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen M.F. (ed). *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*. Chapman and Hall, NY, USA, pp 357-423.
- Moyersoen B., Becker P. & Alexander I.J. (2001).** Are ectomycorrhizas more abundant than arbuscular mycorrhizas in tropical health forests? *New Phytologist* **150**: 591-599.
- Mulholland B.J., Taylor I.B., Jackson A.C. & Thompson A.J. (2003).** Can ABA mediate responses of salinity stressed tomato. *Environmental and Experimental Botany* **50**: 17-28.
- Munns R. (1993).** Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment* **16**: 15-24.

- Munns R. (2005).** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* **167**: 645-663.
- Munns R. (2002).** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* **25**: 239-250.
- Munns R. & Termaat A. (1986).** Whole plant response to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**: 143-160.
- Mushin T.M. & Zwiazek J.J. (2002).** Colonization with *Hebeloma crustuliniforme* increases water conductance and limits shoot sodium uptake in white spruce (*Picea glauca*) seedlings. *Plant and Soil* **238**: 217-225.
- Naidu R. & Rengasamy P. (1993).** Ion interactions and constraints to plant nutrition in Australian sodic soils. *Australian Journal of Soil Research* **31**: 801-819.
- Neumann P. (1997).** Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant, Cell and Environment* **20**: 1193-1198.
- Niu X., Bressan R.A., Hasegawa P.M. & Pardo J.M. (1995).** Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology* **109**: 735-742.
- Niu D.K., Wang M.G. & Wang Y.F. (1997).** Plant cellular osmotica. *Acta Biotheoretica* **45**: 161-169.
- Northup R.R., Yu Z., Dahlgren R.A. & Vogt K.A. (1995).** Polyphenol control of nitrogen release from pine litter. *Nature* **377**: 227-229.
- Nylund J.E. & Wallander H. (1989).** Effect of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semi-hydroponic cultivation system. *New Phytologist* **112**: 389-398.
- Orcutt D.M. & Nilsen E.T. (2000).** Physiology of plants under stress. John Wiley & Sons Inc., New York, NY, USA.
- Ortega U., Dunabeitia M., Menendez S., Gonzalez-murua & Majada J. (2004).** Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on growth and water relations of *Pinus radiata* in different water regimes. *Tree physiology* **24**: 65-73.
- Papageorgiou G.C. & Murata N. (1995).** The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynthesis Research* **44**: 243-252.
- Paquin R. & Lechasseur P. (1979).** Observations sur une méthode de dosage de la proline libre dans les extraits des plantes. *Canadian Journal of Botany* **57**: 1851-1854.
- Perez-Moreno J. & Read D.J. (2000).** Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist* **145**: 301-309.
- Peterson R.L. & Massicotte H.B. (2004).** Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1074-1088.
- Pfleger F.L., Stewart E.L. & Noyd R.K. (1994).** Role of VAM fungi in mine land revegetation. In: Pfleger F.L. & Linderman R.G. (eds). *Mycorrhizae and plant health*. APS Press, St Paul, MN, USA, pp 47-81.
- Pfeffer P.E., Bago B. & Shachar-Hill Y. (2001).** Exploring mycorrhizal function with NMR spectroscopy. *New Phytologist* **150**: 543-553.
- Pfyffer G.E. & Rast D.M. (1988).** The polyol pattern of fungi as influenced by the carbohydrate nutrient source. *New Phytologist* **109**: 321-326.
- Posas F., Chambers J.R., Heyman J.A., Hoeffler J.P., Nadal E. & Arino J. (2000).** The transcriptional response of yeast to saline stress. *Journal of Biology and Chemistry* **275**: 17249-17255.

- Prescott L., Harley J.P. & Klein D.A. (1995).** Microbiologie. De Boeck-Vesmael S.A., Bruxelles, Belgique.
- Quoreschi A.M. & Timmer V.R. (1998).** Exponential fertilization increases nutrient uptake and ectomycorrhizal development of black spruce seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* **28**: 674-682.
- Read D.J. (1991).** Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* **47**: 376-391.
- Read D.J. (1996).** The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. *Annals of botany* **77**: 365-374.
- Read D.J. & Kerley S. (1995).** The status and function of ericoid mycorrhizal systems. In: Varma A. & Hock B. (eds). *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and technology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 499-520.
- Read D.J., Leake J.R. & Perez-Moreno J. (2004).** Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1243-1263.
- Redfield E.B. & Zwiazek J.J. (2002).** Drought tolerance characteristics of black spruce (*Picea mariana*) seedlings in relation to sodium sulfate and sodium chloride injury. *Canadian Journal of Botany* **80**: 773-778.
- Renault S., Croser C., Franklin J.A., Zwiazek J.J. & MacKinnon M. (2001).** Effects of consolidated tailings water on red-osier dogwood (*Cornus stolonifera* Michx.) seedlings. *Environmental Pollution* **113**: 27-33.
- Renault S., Paton E., Nilsson G., Zwiazek J.J. & MacKinnon M.D. (1999).** Responses of boreal plants to high salinity oil sands tailings water. *Journal of Environmental Quality* **28**: 1957-1962.
- Ritchie G.A. (1984).** Assessing seedling quality. In: Duryea M.L. & Landis T.D. (eds.). *Forest nursery manual: production of bareroot seedlings*. Martinus Nihoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague/Boston/Landcaster, Oregon state university, Corvallis, USA, www.rngr.net/Publications/fnm (consulté: mai 2005).
- Roberts J.J. & Zwiazek J.J. (1999).** Periodic chilling exposure during nursery culture. *New Forests* **18**: 301-314.
- Rohacek K. & Bartak M. (1999).** Techniques of the modulated fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* **37**: 339-363.
- Röhrig E. & Ulrich B. (1991).** Ecosystems of the world 7, temperate deciduous forests. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Ruess R.W., Hendrick R.L., Burton A.J., Pregitzer K.S., Sveinbjornsson B., Allen M.F. & Maurer G.E. (2003).** Coupling fine root dynamics with ecosystem carbon cycling in black spruce forests of interior Alaska. *Ecology Monograph* **73**: 643-662.
- Sakakibara S.M., Jones M.D., Gillespie M., Hagerman S.M., Forrest M.E., Simard S.W. & Durall D.M. (2002).** A comparison of ectomycorrhizal identification based on morphotyping and PCR-RFLP analysis. *Mycological Research* **106**: 868-878.
- Salifu K.F. & Timmer V.R. (2003).** Nitrogen retranslocation response of young *Picea mariana* to nitrogen-15 supply. *Soil Science Society of America Journal* **67**: 309-317.
- Santarius, K.A. (1992).** Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VIII. Differential cryoprotection by sucrose, proline and glycerol. *Physiology Plantarum* **84**: 87-93.
- Schützendübel A. & Polle A. (2002).** Plant responses to abiotic stresses: heavy-metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1351-1365.

- Segner H. & Braunbeck T. (1998).** Cellular response profile to chemical stress. *In*: Schüürmann G. & Market B. (eds). *Ecotoxicology. Ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects*. John Wiley and Sons, Inc., NY, USA, pp 520-569.
- Selley R.C. (1985).** Elements of petroleum geology. W.H. Freeman and company, NY, USA.
- Selosse M.-A., Bauer R. & Moyersoen B. (2002).** Basal hymenomycetes belonging to the *Sebacinaceae* are ectomycorrhizal in temperate deciduous trees. *New Phytologist* **155**: 183-195.
- Sénat du Canada. (1999).** Réalités concurrentes : la forêt boréale en danger. Neuvième rapport du Sous-comité de la forêt boréale du Comité sénatorial permanent de l'agriculture et des forêts, environnement Canada, 36^e Législature, 1^{re} Session, www.parl.gc.ca/ (consulté: janvier 2005).
- Shah S.H., Wainwright S.J. & Merrett M.J. (1990).** The interaction of sodium and calcium chlorides and light on growth, potassium nutrition, and proline accumulation in callus cultures of *Medicago sativa* L. *New Phytologist* **116**: 37-45.
- Sharples J.M., Chambers S.M., Meharg A.A. & Cairney J.W.G. (2000).** Genetic diversity of root-associated fungal endophytes from *Calluna vulgaris* at contrasting field sites. *New Phytologist* **148**: 153-162.
- Shen B., S. Hohmann Jensen R.G. & Bohnert H.J. (1999).** Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiology* **121**: 45-52.
- Shen B., Jensen R.G. & Bohnert H.J. (1997).** Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology* **115**: 527-532.
- Sigler L. & Flis A. (1998).** University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium catalogue of strains. 3rd edn. University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium, Edmonton, Alberta, Canada, www.devonian.ualberta.ca/uamh/ (consulté: février 2005).
- Slavich P.G. & Petterson G.H. (1993).** Estimating the electrical conductivity of saturated paste extracts from 1:5 soil:water suspensions and texture. *Australian Journal of Soil Research* **31**: 73-81.
- Smith S.E., Gianinazzi-Pearson V., Koide R. & Cairney J.W.G. (1994).** Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant and Soil* **159**: 103-113.
- Smith S.E. & Read D.J. (1997).** Mycorrhizal Symbiosis, 2nd edn. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Söderström B. (1992).** The ecological potential of the ectomycorrhizal mycelium *In*: Read D.J., Lewis D.H., Fitter A.H. & Alexander I.J. (Eds). *Mycorrhizas in ecosystems*. CAB International, Wallingford, UK, pp 77-83.
- Söderström B., Finlay R.D. & Read D.J. (1988).** The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. IV. Qualitative analysis of carbohydrates contents of mycelium interconnecting host plants. *New Phytologist* **109**: 163-166.
- Souto C., Pellissier F. & Chiapusio G. (2000).** Allelopathic effects of humus phenolics on growth and respiration of mycorrhizal fungi. *Journal of Chemical Ecology* **26**: 2015-2023.
- Steel R.G.D., Torrie J.H. & Dickey D.A. (1997).** Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. 3rd edn. McGraw-Hill series in probability and statistics, New York, NY, USA.
- Sumner M.E. (1993).** Sodic soils: New perspectives. *Australian Journal of Soil Research* **31**: 683-750.

- Sumner M.E., Rengasamy P. & Naidu R. (1998).** Sodic soils: a reappraisal. *In*: Sumner M.E. & Naidu R. (eds). *Sodic soils: distribution, properties, management and environmental consequences*. Oxford University Press, NY, USA, pp 3-17.
- Sun Y.-P., Unestam T., Lucas S.D., Johanson K.J., Kenne L. & Finlay R. (1999).** Exudation-reabsorption in a mycorrhizal fungus, the dynamic interface for interaction with soil and soil microorganisms. *Mycorrhiza* **9**: 137-144.
- Sundblad L.-G., Andersson M., Geladi P., Salomonson A. & Sjöström M. (2001).** Fast, nondestructive measurement of frost hardiness in conifer seedlings by VIS+NIR spectroscopy. *Tree Physiology* **21**: 751-757.
- Takagi H., Iwamoto F., Nakamori S. (1997).** Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutant. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**: 405-411.
- Tamm C.O. (1991).** Nitrogen in terrestrial systems. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Taylor C.B. (1996).** Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. *Plant Cell* **8**: 1221-1224.
- Thomas J.C., de Armond R.L. & Bohnert H.J. (1992).** Influence of NaCl on growth, proline and phosphoenolpyruvate carboxylase levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. *Plant Physiology* **98**: 626-631.
- Tibbett M., Sanders F.E. & Cairney J.W.G. (2002).** Low-temperature-induced changes in trehalose, mannitol and arabitol associated with enhanced tolerance to freezing in ectomycorrhizal basidiomycetes (*Hebeloma* spp.). *Mycorrhiza* **12**: 249-255.
- Ting I.P. (1982).** Plant Physiology. Addison-Wesley Publishing Company Inc., Reading, MA, USA.
- Tinker P.B., Durall D.M. & Jones M.D. (1994).** Carbon use efficiency in mycorrhizas: theory and sample calculations. *New Phytologist* **128**: 115-122.
- Trappe J.M. (1977).** Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annual Review of Phytopathology* **15**: 203-222.
- Tresner H.D. & Hayes J.A. (1971).** Sodium chloride tolerance of terrestrial fungi. *Applied Microbiology* **22**: 210-213.
- Tyerman S.D. & Skerrett I.M. (1999).** Root ion channels and salinity. *Scientia Horticulturae* **78**: 175-235.
- Unestam T. & Sun Y.-P. (1995).** Extramatrical structures of hydrophobic and hydrophilic ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **5**: 301-311.
- van Breugesem F., Vránova E, Dat J.F. & Inzé D. (2001).** The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* **161**: 405-414.
- van der Driessche R. (1991).** Influence of container nursery regimes on drought resistance of seedlings following planting. I. Survival and growth. *Canadian Journal of Forest Research* **21**: 555-565.
- van der Heijden M.G.A., Kliromonos J.N., Ursic M., Moutoglis P., Streitwolf-Engel R., Boller T., Wiemken A. & Sanders I.R. (1998).** Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**: 69-72.
- van Tichelen K.K., Coalpert J.V. & Vangronsveld J. (2001).** Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytologist* **150**: 203-213.
- Vierheilig H., Coughlan A.P. & Piché Y. (1998).** Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 5004-5007.

- Visser S. (1995).** Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytologist* **129**:389-401.
- Vogt K.A., Publicover D.A. & Vogt D.J. (1991).** A critique of the role of ectomycorrhizas in forest ecology. *Agriculture Ecosystems & Environment* **35**: 171-190.
- Vorhees M.E. & Uresk D.W. (2004).** Salt content determination for bentonite mine spoil:saturation extracts versus 1:5 extracts. USDA Forest Service RMRS-RN-18.
- Vrålstad T., Fossheim T. & Schumacher T. (2000).** *Piceirhizia bicolorata* – the ectomycorrhizal expression of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate. *New Phytologist* **145**: 549-563.
- Vrålstad T., Schumacher T. & Taylor A.F.S. (2002).** Mycorrhizal synthesis between fungal strains of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and potential ectomycorrhizal and ericoid hosts. *New Phytologist* **153**: 143-152.
- Vranová E., Inzé D. & van Breusegem F. (2002).** Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1227-1236.
- Wedding R.T. & Harley J.L. (1976).** Fungal polyol metabolites in the control of carbohydrate metabolism of mycorrhizal roots of beech. *New Phytologist* **77**: 675-688.
- White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. & White T.J. (eds.). *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic press, San diego, California, USA.
- Wiemken A. (1990).** Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Journal of General Microbiology* **58**: 209-217.
- Wu B., Nara K. & Hogetsu T. (2002).** Spatiotemporal transfer of carbon-14-labelled photosynthate from ectomycorrhizal *Pinus densiflora* seedlings to extraradical mycelia. *Mycorrhiza* **12**: 83-88.
- Xiong L., Schumaker K.S. & Zhu J.-K. (2002).** Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell Supplement* **14**: S165-S183.
- Yeo A. (1998).** Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany* **49**: 915-929.
- Yeo A.R. (1983).** Salinity resistance: physiologies and prices. *Physiologia Plantarum* **58**: 214-222.
- Zak J.C., Danielson R.M. & Parkinson D. (1982).** Mycorrhizal fungal spore numbers and species occurrence in two amended mine spoils in Alberta, Canada. *Mycologia* **74**: 785-792.
- Zak J.C. & Parkinson D. (1982).** Initial vesicular-arbuscular mycorrhizal development of slender wheatgrass on two amended mine spoils. *Canadian Journal of Botany* **60**: 2241-2248.
- Zak J.C. & Parkinson D. (1983).** Effect of surface amendment on vesicular-arbuscular mycorrhizal development of slender wheatgrass: a 4-year study. *Canadian Journal of Botany* **61**: 798-803.
- Zhu J.-K. (2001).** Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* **6**: 66-71.
- Zhu J.-K. (2002).** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 247-273.
- Zwiazek J.J. & Blake T.J. (1989).** Effect of preconditioning on subsequent water relations, stomatal sensitivity, and photosynthesis in osmotically stressed black spruce. *Canadian Journal of Botany* **67**: 2240-2244.

ANNEXES

Annexe I - Illustrations sur l'expérience de piégeage



Figure annexe I - Photographies des sites échantillonnés dans l'expérience 1 (Chapitre 2) comprenant des sables de rejets consolidés (a), des rejets sableux communs (b), un épandage de tourbe Muskeg (c), des matériaux de mort-terrain (d), un site restauré en 1999 (e), un site restauré en 1988 (f) et un site restauré en 1982 (g). Les photos (h) et (i) illustrent l'expérience de piégeage en serre.

Annexe II – Mycélia cultivés *in vitro*, mycorhization contrôlée et semis d'épinette blanche et de pin gris

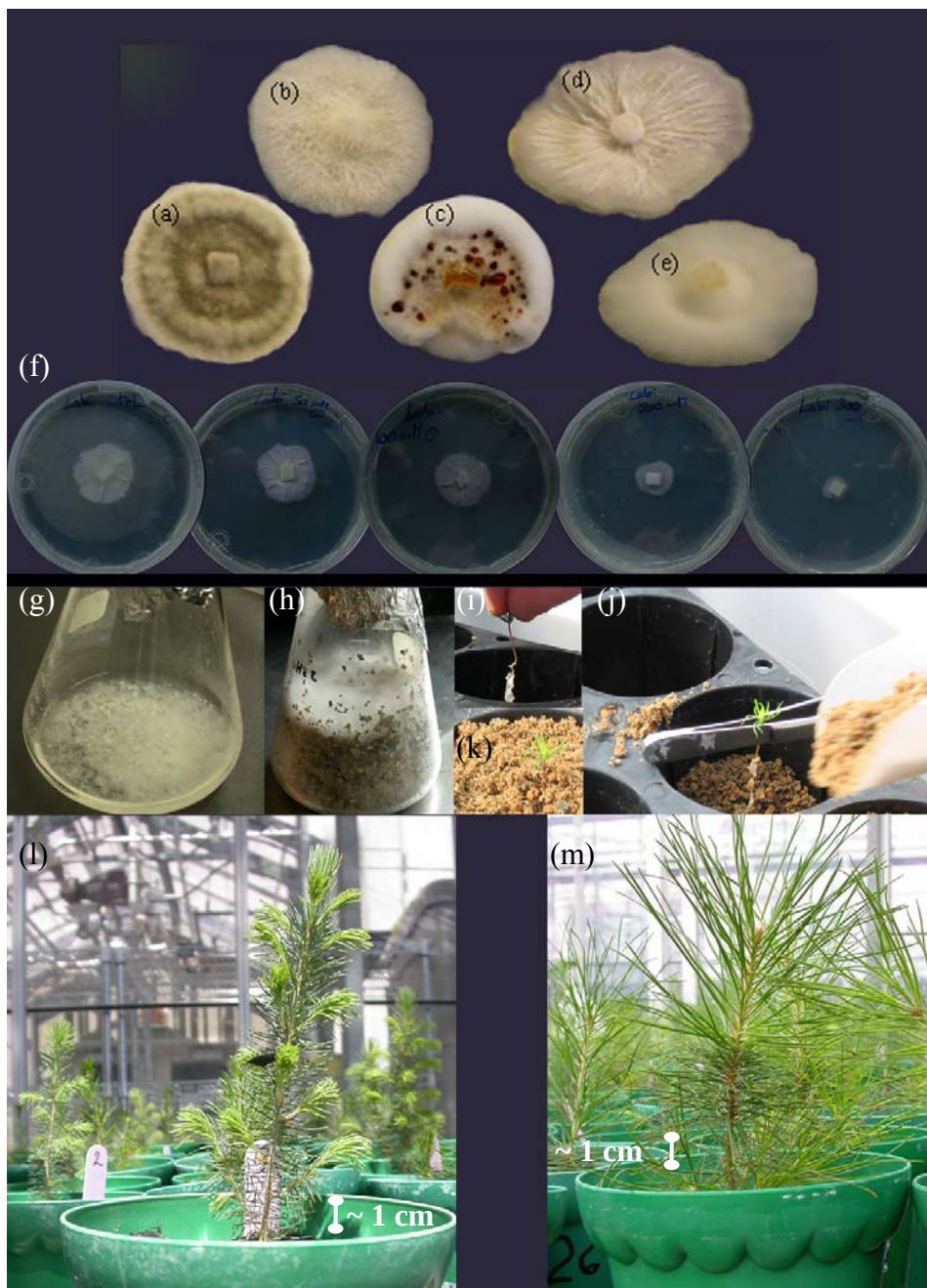


Figure annexe II - Photographies des mycéliums de (a) *Phialocephala* sp., (b) *Hymenoscyphus* sp., (c) *Suillus tomentosus* (d) *Laccaria bicolor* (e) *Hebeloma crustuliniforme* cultivés dans l'expérience 2 (Chapitre 3) ; (f) croissance *in vitro* de *L. bicolor* exposé à des concentrations croissantes de NaCl de la gauche vers la droite (0, 50, 100, 200 et 300 mM) ; (g, h) inoculum liquide (*L. bicolor*) et solide (*H. crustuliniforme*) ; (i, j, k) mycorhization contrôlée de *L. bicolor* sur de l'épinette blanche ; (l) semis d'épinette blanche et (m) de pin gris produits pour l'expérience 4 (Chapitre 5).

Annexe III - Croissance de semis inoculés

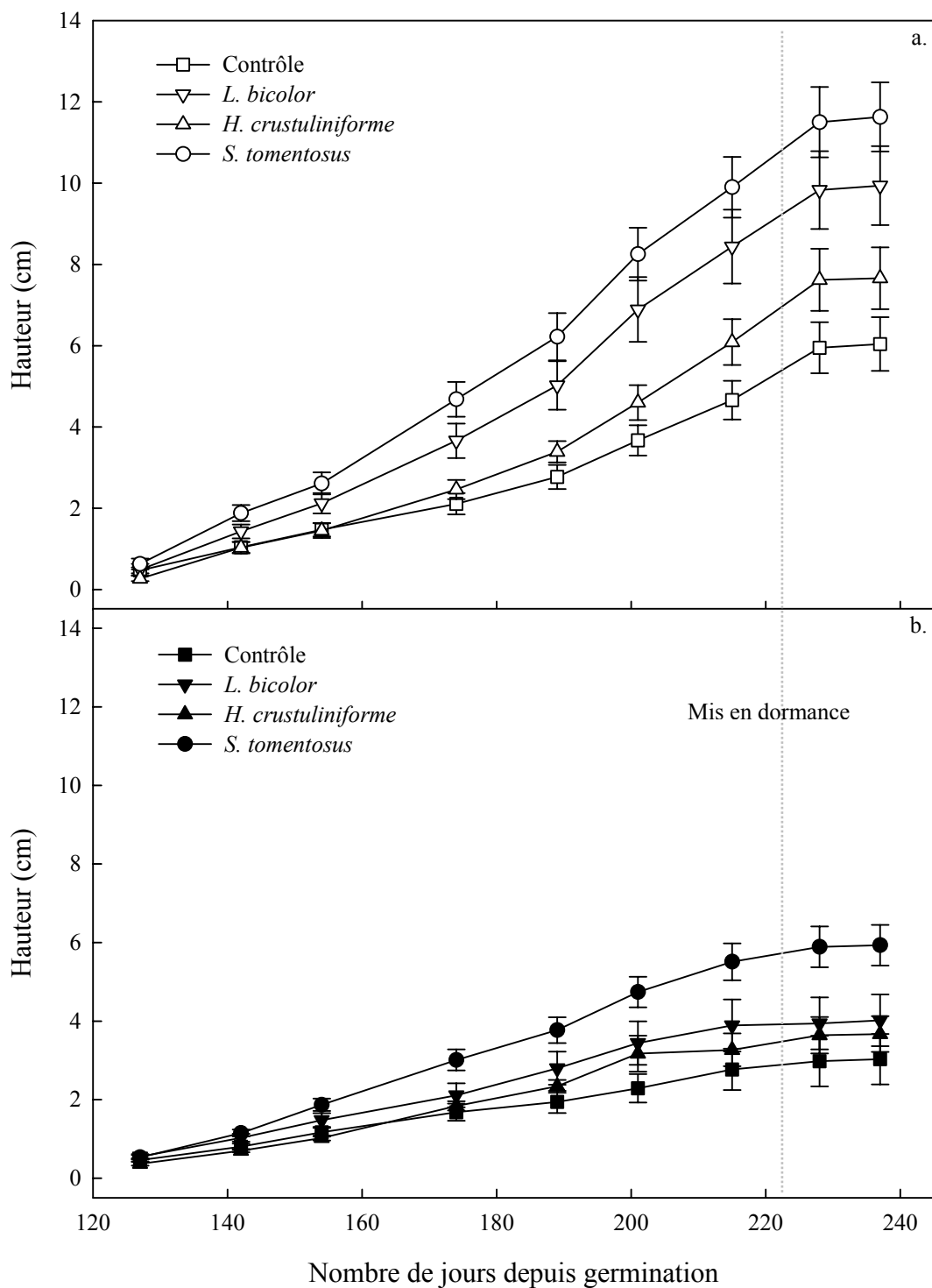


Figure annexe III - Croissance de semis d'épinette blanche (a) et de pin gris (b) inoculés ou non en conditions non-limitantes ; au total, 46,1 g N appliqué par cavités avec du 20-8-20r (Plant Prod Québec, QC, Canada).