

JULIE NAUD

**ESPÈCES HERBACÉES MÉDICINALES DE SOUS-  
BOIS, CULTIVÉES EN ÉRABLIÈRE SOUS  
DIFFÉRENTES CONDITIONS DE LUMIÈRE ET DE  
SOL, DANS LE SUD DU QUÉBEC (CANADA)**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie  
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

FÉVRIER 2009

© Julie Naud, 2009

## Résumé

La majorité des plantes d'ombre d'intérêt médicinal sont récoltées en milieu naturel, menaçant ainsi les populations naturelles. Cette étude visait à évaluer l'impact des trouées et des caractéristiques chimiques du sol sur l'émergence, la croissance et la production de composés actifs de quatre plantes médicinales : *Actaea racemosa*, *Sanguinaria canadensis*, *Caulophyllum thalictroides* et *Asarum canadense*. Les boutures de rhizome ont été récoltées deux années après leur plantation en érablière. Les régressions multiples ont indiqué que la croissance de trois des espèces augmente avec l'irradiance et que toutes ont davantage répondu aux éléments liés à l'acidité plutôt qu'à la richesse du sol. Les concentrations en composés actifs des rhizomes et des racines varient peu ce qui fait que leur contenu total augmente avec la biomasse. La création de trouées et le chaulage semble donc des interventions souhaitées pour augmenter le rendement en biomasse et en composés actifs chez ces espèces.

## **Avant-propos**

Le premier chapitre de ce mémoire est une introduction générale rédigée en français. Le deuxième chapitre a été rédigé en anglais afin d'être publié dans une revue scientifique. Une conclusion générale écrite en français termine ce mémoire. J'ai rédigé en entier ce mémoire sous la supervision de Line Lapointe. Les coauteurs de l'article qui sera éventuellement soumis seront Line Lapointe, Alain Olivier et André Bélanger. Alain Olivier a participé activement au développement du projet et au choix du dispositif expérimental. André Bélanger a effectué l'analyse des teneurs en huiles essentielles chez l'asaret.

## Remerciements

Je veux remercier ma directrice, Line Lapointe, pour son écoute, sa grande disponibilité, ses réflexions, son esprit critique ainsi que pour son soutien tout au long de ce projet. Je tiens également à remercier Paul Angers de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir mis à ma disposition les appareils nécessaires pour bien compléter ce projet. Merci à André Bélanger pour son accueil toujours chaleureux, d'avoir partagé ses observations sur la culture de l'asaret et ses connaissances et expériences sur les composés actifs des plantes. Merci à Alain Olivier pour ses corrections toujours pertinentes et son implication, ainsi qu'à Stéphane Boudreau pour avoir accepté de prendre le relais de Karen Harper comme membre de mon comité d'évaluation. Je remercie également les propriétaires qui ont mis à notre disponibilité leurs terres forestières, M. et Mme Goyer, ainsi que la famille Brunelle. Merci également à Isabelle Nadeau pour son aide en tant que professionnelle de recherche, aux Fraises de l'Île Inc. pour l'approvisionnement en rhizomes, ainsi qu'au CORPAQ et au FQRNT pour leur participation financière.

Un merci tout spécial à Amélie Collard et Olivier Larouche pour leur aide précieuse sur le terrain. Amélie, tes compétences, ta générosité et ton authenticité ont su transformer notre travail d'équipe en amitié et en complicité qui, j'espère, se perpétueront! Merci également à Sylvain Gutjahr et Anthony Gandin. Une mention particulière à Mireille Bellemare et Alexandre Lenière pour leur amitié et les encouragements tout au long de ce périple, même après leur graduation. Merci également à Julie Bussièrès et Philippe Jobin pour avoir parfois pris le relais lors de demandes d'aide et de conseils. Merci à Souad Bouchiba de m'avoir aidé à démarrer les analyses des composés actifs. Je souhaite également exprimer ma gratitude à Marie Coyea, Alison Munsen, Claude Camiré, Karen Harper et Jean Caron, soit pour leurs conseils précieux et/ou leur soutien technique via le prêt d'instruments et d'appareils pour la prise de mes données. Enfin, les mots ne sauront jamais refléter l'expression de toute la gratitude que j'ai envers mes parents, Alice Fay et Eddy Naud, ainsi que mon copain de vie, Yan Lavallée, qui ont été de fiers et patients supporters tout au long de ce périple. Sans leurs encouragements et leur soutien moral et affectif, je n'y serais jamais arrivée!

# Table des matières

<b>Remerciements .....</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des Abréviations.....</b>	<b>viii</b>
<b>Chapitre 1 – Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
1.1. Mise en contexte .....	1
1.2. Espèces à l'étude .....	4
1.3. Compromis entre la croissance et la production de composés actifs.....	8
1.4. Impact de la lumière et des conditions de sol sur la croissance.....	10
1.5. Objectifs de l'étude.....	13
1.6. Hypothèses biologiques.....	14
<b>Chapitre 2 - Medicinal Understorey Herbaceous Species Cultivated under Different Light and Soil Conditions in Maple Forests in the South of Québec, Canada.....</b>	<b>17</b>
2.1. Résumé .....	17
2.2. Abstract.....	19
2.3. Introduction .....	20
2.4. Methodology.....	23
2.4.1. Plant Source.....	23
2.4.2. Study Sites.....	23
2.4.3. Plantation.....	24
2.4.4. Field Measurements .....	25
2.4.5. Soil and Light Analyses .....	28
2.4.6. Plant Harvest .....	29
2.4.7. Plant Active Component Analyses.....	29
2.4.8. Statistical Analyses .....	32
2.5. Results .....	33
2.5.1. Black cohosh .....	35
2.5.2. Bloodroot.....	35
2.5.3. Blue cohosh.....	36
2.5.4. Wild ginger.....	37
3.1. Discussion.....	50
3.1.2. Light effects.....	50
3.1.3. Soil effects.....	51
3.1.3.1. Soil acidity .....	51
3.1.3.2. Soil richness .....	53
3.1.4. Active component yield.....	55
3.1.5. Conclusion.....	56
3.1.6. Acknowledgments.....	57
Conclusion générale.....	58
Références citées .....	61
Annexes .....	75

## Liste des tableaux

<b>Table 1.</b>	Coefficients of correlation ( $r^2$ ) between the different soil variables for soil samples collected in spring 2004. ....	34
<b>Table 2.</b>	Individual $P$ values for the independent variables included in the model, and stepwise regression coefficient ( $R^2$ ) and $P$ value of the stepwise regression model for each dependent variable of black cohosh. ....	39
<b>Table 4.</b>	Individual $P$ values for the independent variables included in the model, and stepwise regression coefficient ( $R^2$ ) and $P$ value of the stepwise regression model for each dependent variable of blue cohosh. ....	44
<b>Table 5.</b>	Individual $P$ values for the independent variables included in the model, and stepwise regression coefficient ( $R^2$ ) and $P$ value of the stepwise regression model for each dependent variable of wild ginger. ....	46
<b>Table 5.</b>	(Continued) .....	47

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b>	Letters used to identify the leaflets in the leaf area equation for black cohosh..	26
<b>Figure 2.</b>	Relation between leaf length and width and total leaf area of black cohosh, blue cohosh, bloodroot and wild ginger .....	27
<b>Figure 4.</b>	Soil and light characteristics that were included in the stepwise linear model for each dependant variable of bloodroot in 2004, 2005 and 2006. ....	42
<b>Figure 4.</b>	(Continued) .....	43
<b>Figure 5.</b>	Soil and light characteristics that were included in the stepwise linear model for each dependant variable of blue cohosh in 2005 and 2006 .....	45
<b>Figure 6.</b>	Soil and light characteristics that were included in the stepwise linear model for each dependant variable of wild ginger in 2004, 2005 and 2006 .....	48
<b>Figure 6.</b>	(Continued) .....	49

## Liste des Abréviations

Al	Aluminium
BS	Saturation en bases – Base saturation
C/N	Rapport Carbone/Azote – Carbon/Nitrogen ratio
Ca	Calcium
CEC	Capacité d'échange cationique – Cation exchange capacity
OC	Carbone organique – Organic carbon
EC	Conductivité électrique – Electrical conductivity
Cu	Cuivre – Copper
Fe	Fer – Iron
H+Al	Hydrogène + Aluminium – Hydrogen+Aluminium
K	Potassium
Mg	Magnésium – Magnesium
N	Azote – Nitrogen
Na	Sodium
P	Phosphore – Phosphorus
pH <sub>w</sub>	pH eau – Water pH
pH <sub>B</sub>	pH tampon – Buffer pH



# Chapitre 1 – Introduction générale

## 1.1. Mise en contexte

Le secteur des plantes médicinales est en plein essor partout dans le monde. En Amérique du Nord, cette popularité croissante s'observe avec la hausse de leur présence dans la composition de médicaments thérapeutiques en vente libre ainsi que dans l'augmentation des récoltes dans leur milieu naturel. Les ventes de suppléments alimentaires, dont la majorité contiennent des matières végétales, a augmenté de 4,5% à 21,3 milliards de dollars en 2005 (Craker, 2007). Par ailleurs, on estime que 25% des composés actifs contenus dans les produits pharmaceutiques vendus sous prescriptions aux États-Unis sont extraits de plantes (Farnsworth, 1988). L'estimation du marché mondial pour les médicaments dérivés de plantes a été 18 milliards de dollars en 2005, et devrait augmenter à \$ 26 milliards en 2011, avec les États-Unis et le Canada représentant plus de 50% de la demande du marché (Craker, 2007). La hausse globale de l'intérêt porté aux plantes médicinales a également créé une demande soutenue et un « marché noir » d'échanges de matériel végétal entraînant des récoltes désordonnées d'espèces indigènes et une perte de biodiversité locale. Parmi ces plantes, on trouve des espèces sciaphytes, c'est-à-dire croissant en milieu ombragé, et poussant dans les forêts canadiennes. L'augmentation de la demande pour ces espèces fait que leurs populations naturelles déclinent rapidement.

Les caractéristiques des plantes herbacées sciaphytes, qui les rendent vulnérables à la cueillette intensive, sont leur croissance et leur mode de reproduction lents, ainsi qu'une faible production de graines, menaçant ces espèces d'extinction à moyen ou long terme. Les graines montrent une dormance morphophysiological profonde due à un embryon immature et des facteurs internes inhibant la germination (Baskin et Baskin 1998). Elles requièrent d'abord une stratification au chaud, pour permettre à l'embryon d'atteindre sa

maturité morphologique, puis une stratification au froid pour lever la dormance physiologique. Ainsi, les graines germent le printemps suivant leur dispersion dans la nature. Pour d'autres espèces, une deuxième année, et parfois une troisième, sont nécessaires pour briser l'ensemble des dormances (Baskin et Baskin 1998). De plus, durant leur première saison de croissance, souvent seuls les cotylédons se déploient, le développement de leurs premières vraies feuilles se produisant l'année suivante. Ainsi, la croissance lente des jeunes plants d'herbacées sciaphytes en fait une culture peu rentable et leur cueillette en milieu naturel reste, par conséquent, le moyen le moins coûteux de combler la demande des marchés.

L'exemple le plus commun d'espèce herbacée sciaphyte indigène à croissance lente à avoir subi une pression de cueillette trop intense est le ginseng d'Amérique (*Panax quinquefolius* L.). Celui-ci se reproduit uniquement par semence et seules les plantes âgées de plus de trois ans produisent des graines (Small et Catling 2000). Sa forte valeur commerciale de par ses propriétés médicinales lui a fait subir une pression de cueillette intensive du 18<sup>e</sup> au 21<sup>e</sup> siècle, épuisant ainsi les populations naturelles au Canada (Small et Catling 2000). Jusqu'à la fin des années 1980, l'Ontario exportait chaque année près de 40 000 racines de ginseng d'Amérique sauvage. En conséquence de cette cueillette intensive, elle a été officiellement classée « espèce menacée au Canada » par le Comité sur la situation des espèces en péril au Canada en 1988 (Small et Catling 2000). Des recherches et études sur la mise en production de cette espèce ont permis l'émergence de sa culture au Canada (Nadeau et al. 1999). L'exportation des racines de ginseng d'Amérique a contribué pour environ 92 millions de dollars à l'économie canadienne en 2007 (Statistiques Canada, 2008). Cependant, le ginseng et l'hydraste du Canada (*Hydrastis canadensis* L.) sont les seules plantes herbacées forestières canadiennes pour lesquelles une régie de culture a été développée.

Présentement, la culture intensive des plantes sciaphytes entraîne des coûts de production élevés. Une structure à ombrière artificielle, comprenant des poutres, des lattes ou un tissu de polypropylène tissé en guise d'ombrière, peut coûter jusqu'à 2500\$ l'hectare (Persons et Davis, 2005). La production en monoculture intensive fait souvent augmenter la

vulnérabilité des plantes face aux pathogènes et ainsi provoquer la propagation rapide de celles-ci (Gurr et al., 2003; Wolfe, 2001). Dû à une surface de sol homogène, parfois exempt de paillis, à un sol plus riche qui est fertilisé et à des conditions d'humidité optimales, le contrôle des mauvaises herbes doit être fait plus fréquemment sous ombrière artificielle qu'en milieu forestier. Cela pousse généralement les producteurs à appliquer des herbicides avant la plantation, mais aussi au cours de la croissance des plants, tels des herbicides sélectifs aux graminées, en plus de l'application régulière de fongicides. Selon les cueilleurs de ginseng sauvage, on trouve rarement en forêt des plants malades, et les gens qui le cultivent en forêt observent tout aussi rarement des plants souffrant de maladies fongiques, telle la pourriture ou la rouille. De plus, en milieu forestier, davantage de champignons symbiotiques peuvent coloniser les racines favorisant ainsi l'absorption des nutriments et créant une barrière potentielle à certains champignons pathogènes (Dehne 1982; Cardoso et Kuyper, 2006). En culture sous ombrière, de l'irrigation artificielle doit aussi parfois être installée puisque l'humus et la matière organique qui est naturellement présente en forêt et qui permet de retenir l'humidité, est parfois manquante en milieu agricole ouvert. Cela est souvent complété par l'ajout de paillis du fait que le sol s'assèche rapidement et que les plants sont sujets à une augmentation de leur évapotranspiration car les champs sont davantage exposés aux vents qu'en milieu forestier. De plus, l'ajout de paillis réduit la germination des graines de mauvaises herbes qui sont beaucoup plus nombreuses en milieu ouvert. Bref, non seulement de nombreux coûts sont associés à une culture intensive, mais aussi une gestion qui est de moins en moins bien perçue par les consommateurs qui tendent davantage à choisir des plants qui ont été exempts de traitements avec des produits chimiques.

Le défi de la culture de plantes présentant un intérêt médicinal est d'identifier les conditions de culture permettant de maximiser le rendement en composés actifs au moment de la récolte. Il ne s'agit pas nécessairement de maximiser la biomasse produite, ni la teneur en composés actifs, mais bien le contenu total en composés actifs par plante ou par hectare. La majorité des matières premières fournies à l'industrie est commercialisée en tant que marchandises en vrac, avec peu de contrôle sur les conditions de culture (Laird et Pierce, 2002). Peu d'entreprises sont conscientes des conditions dans lesquelles le matériel végétal

a été cultivé et récolté, souvent dû à l'achat via une longue chaîne d'intermédiaires. Entre autres, l'industrie reconnaît que dans le futur, les bonnes pratiques agricoles seront la norme. De plus, l'industrie s'attend à ce qu'il y ait davantage de matières biologiques certifiées, que des systèmes de certification soient mis en place comme moyen de contrôle de la qualité et qu'une part plus grande du marché soit comblée par la culture plutôt que par la cueillette des plantes en milieu naturel (Laird et Pierce, 2002).

La mise en culture des plantes forestières à croissance lente a comme but d'améliorer la qualité du produit tout en freinant le prélèvement des espèces indigènes dans leur milieu naturel, permettant ainsi la conservation de la biodiversité végétale de nos forêts. L'asaret et la sanguinaire ont récemment été ajoutés à la liste de plantes considérées vulnérables au Québec (Gazette officielle du Québec, 2004). La culture de ces espèces dans un système agroforestier sous érablière permettrait, selon nous, de réduire les coûts de production et ainsi rendre leur culture rentable. De plus, elle permettrait une diversification de l'utilisation du territoire forestier ainsi qu'une diversification des revenus pour les propriétaires, tout en protégeant les populations naturelles restantes. Notre étude permettra d'améliorer et éventuellement d'optimiser les conditions de culture pour plusieurs de ces espèces. Le cas de la mise en culture du ginseng est un exemple potentiellement reproductible (Nadeau et al., 1999).

## 1.2. Espèces à l'étude

L'actée à grappes noires (*Actaea racemosa* L.), autrefois appelée *Cimicifuga racemosa*, se trouve à l'état indigène dans 25 états des États-Unis et une province canadienne, soit l'Ontario (Ford, 2000; Small et Catling, 2000). La plante peut croître en zones de rusticité 3 à 8 (telles que définies par Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2008), de façon optimale en zone 5 à 7, sous ombre partielle dans un sol relativement humide et riche en matière organique, où le pH se situe entre 5,0 et 6,0 (Persons et Davis, 2005). L'utilisation des propriétés médicinales de l'actée à grappes noires vient des Premières Nations d'Amérique du Nord. Les Cherokee et les Iroquois l'ont utilisée, entre autres, pour les

troubles de santé des femmes (Moerman, 1998). Aujourd'hui, elle est utilisée dans la fabrication des produits de santé naturels pour ces mêmes propriétés et est la plante dont la vitesse de commercialisation a été l'une des plus rapides ces dernières années, avec une augmentation de 511% en 1997 (Ford, 2000). La plus forte demande provient de l'Europe et de l'Australie, mais sa popularité est croissante au Canada, puisque l'on comptait déjà en 2000 29 produits thérapeutiques en vente contenant des extraits de cette espèce (Small et Catling, 2000). La nouvelle législation canadienne sur les produits de santé naturels, entrée en vigueur en janvier 2004, a permis l'élaboration de monographies de plantes acceptées par Santé Canada dont les propriétés médicinales sont reconnues. L'actée à grappes noires s'y trouve monographiée et est reconnue tant pour son utilisation traditionnelle que pour son efficacité clinique démontrée pour le soulagement des symptômes associés à la ménopause (Health Canada, 2007). Par conséquent, cette espèce semble bien implantée dans le marché des plantes médicinales et la demande devrait se maintenir au cours des prochaines années compte tenu du vieillissement de la population. Elle est aussi bien présente sur le marché de l'horticulture ornementale en Amérique du Nord. Ses composés soupçonnés être à l'origine de la diminution des symptômes de la ménopause sont des glycosides triterpéniques, comprenant l'actéine et le cimicifugoside (Borelli et al., 2003; Bolle et al., 2007). Cependant, leur mécanisme d'action n'a pas encore été élucidé et d'autres molécules sont aussi soupçonnées de participer aux effets thérapeutiques de la plante (Kruse et al., 1999; Zierau et al., 2002; Viereck et al., 2005). Jusqu'à présent, l'approvisionnement des compagnies de transformation des plantes médicinales se fait presque entièrement à partir de récolte en milieu naturel, les producteurs de cette espèce étant encore marginaux. La meilleure période de récolte, en prenant en considération le contenu en glucosides triterpéniques et en acides phénoliques, serait en automne (Popp et al., 2003).

L'aire de répartition de la sanguinaire (*Sanguinaria canadensis* L.) est le centre et l'est des États-Unis et du Canada (Small et Catling, 2000). Elle préfère les forêts de feuillus clairsemés, humides, avec un sol à pH variant de 5 à 7, et peut croître dans les zones de rusticité de 3 à 8 (Lamoureux, 2002). Le rhizome de la sanguinaire a été utilisé comme remède par les Premières Nations d'Amérique pour des traitements divers. Les Algonquins

et les Delawares l'utilisaient comme tonique et pour remédier aux problèmes reliés au cœur. Mais elle a surtout été utilisée pour la guérison des blessures et les infections reliées au système respiratoire, tels la grippe, le rhume et la tuberculose, par les Cherokees, les Iroquois, les Malécites, les Micmacs et les Potawatomis (Moerman, 1998). La sanguinarine et la chélérythrine sont les principaux composés actifs de la sanguinaire. La sanguinarine aurait une activité anti-angiogénique (Jong-Pil et Gou, 2004), des effets inhibitifs sur des bactéries, telles *Helicobacter pylori*, qui cause des gastro-entérites chroniques, des ulcères peptiques et le cancer de l'estomac, et *Escherichia coli*, dont elle empêche l'adhésion aux parois épithéliales de l'appareil urinaire (Mahady et al., 2003). Elle aurait des effets sur les cellules de l'épiderme et de la prostate cancéreuses en induisant leur apoptose (Ahmad et al., 2000; Vaqar et al., 2004). Quant à la chélérythrine, une étude a montré qu'elle a une puissante activité antimycobactérienne face à deux mycobactéries, soit *Mycobacterium aureum* et *M. smegmatis* (Newton et al., 2002). Dû à son potentiel antimicrobien, la sanguinaire a déjà été utilisée dans les dentifrices et rince-bouches pour combattre le tartre et la gingivite (Southard, 1985; Hannah et al., 1989; Small et Catling, 2000), mais ceux-ci ont dû être retirés du marché dû à un doute sur son innocuité.

Une étude a montré qu'il y a augmentation de la concentration en alcaloïdes chez la sanguinaire avec la diminution de l'irradiance (Salmore et Hunter, 2001). La concentration en sanguinarine augmente également avec l'âge du rhizome (Bennett et al., 1990). La concentration maximale en alcaloïdes serait observée pendant la floraison ou immédiatement après (Bennett et al., 1990; Small et Catling, 2000). Les rhizomes de la sanguinaire qui sont vendus dans le commerce proviennent surtout de la récolte de populations naturelles de l'est des États-Unis où, annuellement, il y en aurait entre 9 000 et 13 600 kg de récoltés (McGuffin et Young, 2001). De plus, elle a fait son apparition, ces dernières années, sur le marché des plantes à caractère ornemental, un marché qui présente également une forte croissance.

Le caulophylle faux-pigamon (*Caulophyllum thalictroides* L.) croît dans les forêts matures, humides à mésiques, ombreuses, situées au nord des Appalaches et à l'est de la région des Grands Lacs (Small et Catling, 2000; Schmidt, 2002). Elle peut croître en zone de rusticité

3 à 7 (Schmidt, 2002). Les Cherokees, les Menominis, les Meskwakis, les Ojibwas et les Potawatomis ont utilisé le rhizome du caulophylle faux-pigamon principalement comme remède gynécologique, soit pour faciliter les accouchements, soit pour traiter les ménorragies et les douleurs associées aux règles (Moerman, 1998). Le caulophylle faux-pigamon contient de la caulosaponine et de la caulophyllosaponine, qui seraient des stimulants de l'utérus, d'où son emploi pour faciliter l'accouchement et régulariser les menstruations, mais aussi comme abortif (Small et Catling, 2000). Cependant, ces composés, qui ont été très peu étudiés, seraient cardiotoxiques, probablement dû à leur activité vasoconstrictrice (Ferguson et Edwards, 1954). Le caulophylle faux-pigamon contient aussi, entre autres alcaloïdes, la magnoflorine, qui provoquerait une baisse de pression artérielle (El-Tahir, 1991). Ces molécules sont généralement dosées sur l'ensemble du rhizome et des racines confondues, les racines étant charnues et constituant une masse non-négligeable à considérer dans leur teneur totale (Tibebe et al., 1997; Jhoo et al., 2001; Ganzera et al., 2003). À notre connaissance, il ne semble pas y avoir à ce jour eu d'étude comparant la teneur de ces composés dans le rhizome et dans les racines. Ces molécules se trouveraient en plus forte concentration dans les tissus souterrains à l'automne (Small et Catling, 2000).

L'asaret (*Asarum canadense* L.) croît à l'état indigène dans les forêts décidues riches du sud du Québec et de l'est des États-Unis (Marie-Victorin, 1995; Lamoureux, 2002). Son aire de distribution naturelle inclue les zones de rusticité 4 à 7. Les Algonquins et les Iroquois l'ont utilisé principalement comme anticonvulsif chez les enfants, mais de nombreux autres groupes autochtones, tels les Chippewas, Malécites, Micmacs et Ojibwas, l'ont utilisé pour traiter les troubles reliés au système digestif (Moerman, 1998). Les deux molécules appartenant à la famille des huiles essentielles se trouvant en plus forte concentration dans l'asaret sont le méthyleugenol (36 à 44% du total des huiles essentielles) et l'acétate linalyl (28 à 41% du total des huiles essentielles) (Motto et Secord, 1985; Locock, 1995). Le méthyleugenol aurait des propriétés sédatives et narcotiques (MacGregor et Layton, 1974). D'autres ont rapporté que cette molécule a, entre autres, des propriétés anesthésique, anticonvulsive, antiseptique, bactéricide, préventive du cancer, antifongique, insecticide et myorelaxante (Duke, 2004). L'acétate linalyl, aussi présent en

forte concentration dans l'huile de lavande et dans l'huile de bois de rose, entre dans la composition de parfums incorporés dans des savons, détergents, crèmes et lotions (Locock, 1995). Les autres molécules, en faible concentration, sont le géraniol, le linalool, le limonène, l'alpha terpinol, l'acétate bornyl, l'aristolone, l'élémicine et l'acide aristolochique. Ce dernier, présent dans la plante sous forme d'acide aristolochique I et II, serait néphrotoxique (U.S. Food and Drug Administration, 2000 & 2001; Arlt et al., 2002). La plus forte concentration en composés secondaires se trouve dans le rhizome (Duke, 2004). Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a été faite sur le temps de l'année le plus favorable à la récolte afin d'optimiser la teneur en ces composés.

### 1.3. Compromis entre la croissance et la production de composés actifs

En agriculture, la gestion d'une plantation est généralement orientée vers la maximisation de la croissance des plantes pour obtenir le meilleur rendement possible. Cependant, dans le cas des plantes médicinales, il faut également tenir compte d'autres facteurs que l'on veut favoriser, tels que la teneur en composés actifs à propriétés médicinales. La croissance peut se définir comme étant l'augmentation de la masse sèche, du volume, de la longueur ou de la surface, impliquant la division, l'expansion et la différenciation des cellules (Lambers et al., 1998). Les principaux facteurs abiotiques influençant la croissance des plantes sont la disponibilité de la lumière, de l'eau et des nutriments, en plus de la température (Lambers et al., 1998). Cependant, chaque espèce s'est adaptée en fonction des conditions environnementales des écosystèmes dans lesquels elle a évolué. De plus, chez plusieurs espèces, il y a de la variabilité génétique et de la plasticité phénotypique, qui permettent à la plante de croître sous une gamme de conditions (Weiner, 2004). Ceci ne veut pas pour autant dire que les conditions du milieu sont optimales pour les espèces qui s'y trouvent. Ainsi, les plantes sciaphytes ne croissent pas nécessairement sous des conditions optimales de lumière, mais se seraient plutôt adaptées à croître en sous-bois, donc adaptées à un milieu pauvre en lumière (Marino et al., 1997), du fait qu'elles sont peu compétitives dans un milieu qui leur serait optimal. Ainsi, l'optimisation des conditions de croissance doit



tenir compte des conditions environnementales de l'écosystème ou des écosystèmes où croît la plante mais aussi de sa plasticité phénotypique potentielle.

Les composés actifs pouvant agir comme médicament et/ou utilisés en parfumerie, tels les alcaloïdes et les huiles essentielles, sont des métabolites secondaires produits par la plante principalement dans le but de se défendre contre des herbivores et des agents pathogènes ou encore d'attirer des agents de pollinisation (Downum, 1992; Salisbury et Ross, 1992). La production de ces métabolites serait modulée par des facteurs abiotiques, tels l'irradiance, la disponibilité en eau et la richesse du sol (Bryant et al. 1983; Bazzaz et al. 1987; Downum 1992; Herms et Mattson 1992; Almeida-Cortez et al. 1999; Almeida-Cortez et Shipley, 2002). Par ailleurs, la production de métabolites secondaires entraînerait des «coûts» pour la plante et serait donc négativement corrélée avec le taux de croissance de celle-ci (Coley et al., 1985; Herms et Mattson, 1992). La croissance aurait priorité sur la production de métabolites secondaires avec l'augmentation de la disponibilité des nutriments, de la lumière ou de l'eau (Bazzaz et al. 1987; Herms et Mattson 1992). Cependant, les plantes sciaphytes ont une croissance lente ce qui fait qu'une grande proportion de leurs ressources n'est pas investie dans la croissance immédiate, mais réservée dans des structures, tels les rhizomes, ce qui leur permet de survivre jusqu'à la prochaine période de croissance, et répondre à des stress environnementaux ou à l'herbivorie (Herms et Mattson 1992). Les facteurs qui limitent la croissance davantage qu'ils ne limitent la photosynthèse, tels une sécheresse modérée, une limitation modérée de nutriments et une température basse devraient faire augmenter les réserves de carbone disponibles pour la production de métabolites secondaires sans aller puiser dans ce qui est disponible pour la croissance (Bryant et al. 1983; Bazzaz et al. 1987; Herms et Mattson 1992). Donc, des conditions optimales de croissance réduiraient la production de composés actifs au profit du taux de croissance, un stress moyen optimiserait la production de composés actifs sans trop affecter la croissance surtout chez des espèces à croissance lente, alors qu'un stress majeur réduirait à la fois la croissance et la production de composés actifs. Cependant, les résultats dans la littérature sont contradictoires (Bazzaz et al. 1987; Almeida-Cortez et al. 1999; Stamp 2003) et ne permettent pas pour l'instant de prédire les conditions optimisant la production de métabolites secondaires chez les espèces sciaphytes. Il semble néanmoins qu'un

compromis entre la croissance et la production de métabolites secondaires dû à des stress physiologiques pourrait potentiellement permettre un rendement optimal en métabolites secondaires.

#### 1.4. Impact de la lumière et des conditions de sol sur la croissance

La lumière est vitale pour les plantes, leur permettant de transformer le dioxyde de carbone en glucose utilisable pour leur métabolisme. La moyenne de la densité du flux de photons photosynthétiques atteignant les sols forestiers se situe généralement entre 0,5 et 5% des valeurs en plein soleil (Pfitsch et Percy, 1989a; Chazdon et Percy, 1991; Beudet et al. 2007). Les espèces herbacées ayant évolué en milieu forestier se sont adaptées à une faible luminosité. Leur point de compensation est plus faible que celui des espèces adaptées à croître au soleil, et elles sont plus efficaces à utiliser la lumière intermittente. Par contre, leur activité photosynthétique sature à de plus faibles densités de flux de photons photosynthétiques (Salisbury et Ross, 1992). Ainsi, elles sont davantage sensibles à une exposition trop forte et prolongée de lumière directe, les rendant vulnérables aux dommages causés par la photoinhibition (Osmond et al., 1997). La quantité de lumière requise pour une croissance optimale en forêt de l'asaret, du caulophylle faux-pigamon, de l'actée à grappes noires et de la sanguinaire n'a pas encore été déterminée, et est, pour l'instant, approximative (Persons et Davis, 2005; Dostie, 2006).

Le sol et ses éléments minéraux constitutifs sont le garde-manger de la majorité des espèces végétales. Les 3 éléments majeurs sont l'azote, le phosphore et le potassium. Les informations sur les besoins nutritionnels de l'asaret et du caulophylle faux-pigamon sont assez rares. Cependant, comme elles sont des espèces compagnes du ginseng d'Amérique, elles pourraient avoir des besoins similaires à cette espèce (Van der Voort, 1998). L'azote ne semble pas jouer un rôle crucial chez les plantes herbacées forestières. Chez le ginseng d'Amérique, il a été observé que ce nutriment ne se trouve pas en très grande quantité dans

les sols où il croît naturellement, et il a même été démontré qu'un trop grand apport d'azote le rendait davantage vulnérable aux maladies, diminuait le taux de germination de ses semences ainsi que le taux d'émergence, et pourrait faire diminuer son contenu en composés actifs (Nadeau et Olivier, 2003). Le phosphore serait lui aussi en concentration assez faible, soit en moyenne  $37 \text{ kg ha}^{-1}$  (environ 16 ppm) dans les sols forestiers du Québec où croît le ginseng d'Amérique (Nadeau et Olivier, 2003). Il a été montré que la croissance racinaire du ginseng d'Amérique était corrélée positivement au contenu en phosphore de la solution fertilisante (Stoltz, 1982). Toutefois, en Ontario, on considère qu'il n'est pas nécessaire de fertiliser les champs de ginseng dont la teneur en phosphore du sol est supérieure à  $37 \text{ kg ha}^{-1}$  (environ 16 ppm). Les effets du potassium sur le ginseng d'Amérique sont variables. Il pourrait faire augmenter la biomasse racinaire, mais cet impact ne serait pas toujours significatif (Konsler et Shelton, 1990; Nadeau et al., 1999). Il a été toutefois démontré qu'il pouvait faire augmenter la résistance à certaines maladies (Liu 1988, cité par Li 1995). En Ontario, on considère qu'il n'est pas nécessaire de fertiliser les champs de ginseng dont la teneur en potassium excède  $400 \text{ kg ha}^{-1}$  (environ 180 ppm).

L'actée à grappes noires et la sanguinaire semblent présenter de faibles besoins en azote, puisqu'un léger apport de fertilisant, procurant 10 à 30 kilos d'azote par hectare, n'est recommandé que dans les sols très pauvres. (Persons et Davis, 2005). Cependant, McCoy et collaborateurs (2007) ont montré que les sols forestiers donnaient un moins bon rendement en masse fraîche de rhizomes d'actée à grappes noires qu'un sol de culture préparé sous ombrière, probablement dû à une différence de fertilité. La quantité optimale de phosphore et de potassium du sol n'a pas encore été déterminée, mais les meilleurs rendements chez l'actée à grappes noires ont été observés à des teneurs de  $28 \text{ kg ha}^{-1}$  (environ 13 ppm) et  $231 \text{ kg ha}^{-1}$  (environ 100 ppm) pour le phosphore et le potassium, respectivement (McCoy et al., 2007). La fertilité du sol n'aurait pas d'incidence sur la teneur en composés actifs de l'actée à grappes noires (McCoy et al., 2007). La sanguinaire, par contre, montrerait une diminution de sa teneur en composés actifs avec une fertilisation élevée en azote, en phosphore et en potassium (20-10-20 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O), 400 ppm) (Salmore et Hunter, 2001).

Les éléments secondaires que sont le calcium, le magnésium et le soufre peuvent aussi jouer un rôle important dans la culture des espèces à l'étude. L'asaret et le caulophylle faux-pigamon pourraient être sensibles aux niveaux de calcium dans les sols, puisqu'il est considéré comme un élément critique pour le ginseng d'Amérique. La concentration moyenne en calcium du sol où croît naturellement le ginseng d'Amérique est de  $4500 \text{ kg ha}^{-1}$  (environ 2000 ppm), mais on peut l'observer sur des sites présentant aussi peu que  $600 \text{ kg ha}^{-1}$  (environ 270 ppm) ou autant que  $21\,420 \text{ kg ha}^{-1}$  (environ 9750 ppm) (Beyfuss, 2000; Nadeau et Olivier, 2003). Le magnésium serait le deuxième élément nutritionnel d'importance chez le ginseng d'Amérique, donc probablement chez l'asaret et le caulophylle faux-pigamon, et la quantité minimale requise serait de  $45 \text{ kg ha}^{-1}$  (environ 20 ppm) (Nadeau et Olivier, 2003). La quantité optimale de calcium et de magnésium atteinte dans l'étude sur l'actée à grappes noires de McCoy et al. (2007) a été de  $3818 \text{ kg ha}^{-1}$  (environ 1700 ppm) et  $229 \text{ kg ha}^{-1}$  (environ 100 ppm), respectivement, mais on ne sait pas si un niveau supérieur à ces valeurs augmenterait davantage le rendement. Aucun résultat sur l'effet de ces deux nutriments chez la sanguinaire n'a, à notre connaissance, été publié jusqu'à maintenant. Par ailleurs, chez les quatre espèces, aucune donnée n'est disponible quant à l'influence du soufre sur leur rendement. Cependant, même si aucune carence en soufre n'a été notée chez le ginseng d'Amérique, un apport de celui-ci pourrait améliorer le rendement de cette espèce (Nadeau et Olivier, 2003), donc probablement aussi celui de ses espèces compagnes, dont l'asaret et le caulophylle faux-pigamon.

Les éléments considérés mineurs chez les végétaux sont souvent associés à des problèmes reliés à des valeurs de pH extrêmes. Chez le ginseng d'Amérique, l'augmentation de la teneur en manganèse et en bore dans le sol aurait des effets négatifs sur la biomasse racinaire. Celle-ci serait aussi corrélée négativement avec l'augmentation du contenu en zinc des tissus de la plante (Nadeau et Olivier, 2003). D'ailleurs, la teneur en zinc serait néfaste, pour la majorité des espèces végétales, à un niveau de 500 ppm ou plus dans les sols. Généralement, l'augmentation de l'acidité du sol fait augmenter la solubilité du fer, du manganèse, de l'aluminium et du zinc, qui peuvent atteindre des niveaux toxiques si l'acidité est élevée. Les phosphates, notamment, précipitent au contact du fer et de

l'aluminium dans les sols fortement acides et deviennent ainsi moins disponibles aux plantes. Par ailleurs, le cuivre deviendrait toxique à des valeurs supérieures à 30 ppm (Doucet, 1994).

Le rapport carbone/azote (C/N), la capacité d'échange cationique (C.E.C.) et la saturation en bases (S.B.) sont toutes des méthodes d'évaluation de la fertilité d'un sol. L'étude du déclin des érablières du sud du Québec dans les années 1980 a permis de faire ressortir une baisse de fertilité dans les sols forestiers affectés. Il a ainsi été montré que le rapport C/N avait augmenté et que la diminution de la C.E.C. et de la S.B. avait eu un impact négatif sur la croissance des érables (Côté et Ouimet, 1996; Ouimet et al., 1996). Une étude plus récente sur la comparaison de la culture de l'actée à grappes noires en forêt versus sous ombrière a conclu que l'augmentation de la C.E.C. et de la S.B. favorisait la croissance de cette espèce (McCoy et al., 2007). Ces indices de fertilité, communément utilisés en agriculture traditionnelle, sont encore très peu utilisés pour l'évaluation de la fertilité des sols forestiers dans le but d'y implanter une culture agroforestière.

## 1.5. Objectifs de l'étude

La production de l'actée à grappes noires, de la sanguinaire, du caulophylle faux-pigamon et de l'asaret en système agroforestier est l'avant-dernière étape d'un programme de recherche comprenant en tout 6 autres projets. Au départ, 9 espèces avaient été retenues, mais chacun des projets comprenait un nombre plus réduit d'espèces. La première étude portait sur l'écologie des populations naturelles, soit la distribution des classes de taille au sein de populations et la relation entre la masse, le stade phénologique et la capacité reproductrice des plantes (Goyer, 2004). Une étude phytosociologique des sept espèces présentes au Québec a également été réalisée (Pradieu, 2004). Deux autres études se sont intéressées aux questions de germination et de bouturage pour six espèces herbacées (Nivot et al., 2008) et deux espèces de fougères (Leclerc et al., 2007). La cinquième étude a tenté de préciser les conditions de pH et de lumière incidente nécessaires pour optimiser la

croissance chez sept espèces à partir d'une étude en serres (Dostie, 2006). La dernière phase du programme de recherche, menée par Souad Bouchiba (données non publiées), visait à déterminer l'influence de la génétique et de certains facteurs de l'environnement sur la teneur en composés actifs des 6 espèces présentant des propriétés médicinales en vue de sélectionner des populations à haute teneur en composés actifs, tout en contribuant à identifier les conditions de culture qui optimisent leur rendement en composés actifs.

L'actée à grappes noires est l'espèce dont la culture agroforestière est la plus documentée des quatre espèces à l'étude pour le moment. Pour ces espèces, nous connaissons seulement de façon approximative les pH et les niveaux d'irradiance sous lesquels elles semblent bien croître en milieu forestier. Leurs besoins nutritionnels en différents minéraux sont souvent extrapolés à partir des besoins d'autres espèces forestières qui ont été davantage étudiées, tel le ginseng d'Amérique, l'hydraste du Canada ou l'ail des bois (*Allium tricoccum* Ait.). Ce projet de recherche a pour but de préciser les conditions de sol et d'irradiance nécessaires pour une croissance optimale, ainsi qu'un contenu maximal en composés actifs, chez quatre espèces d'herbacées forestières à croissance lente et d'intérêt médicinal. Les quatre espèces ont été implantées dans deux érablières, dont la composition chimique des sols variait, sous diverses conditions de lumière. La réponse de ces espèces en termes de croissance et de contenu en composés actifs a été étudiée en fonction de gradients de lumière et de nutriments dans le sol dans le but d'identifier les conditions maximisant le rendement en composés actifs.

## 1.6. Hypothèses biologiques

Les quatre espèces étudiées croissent généralement en forêts matures, dont les sols sont typiquement reconnus comme étant relativement riches en éléments nutritifs et en matière organique, et au pH légèrement acide. Le pourcentage moyen de lumière atteignant le sol sous la canopée est aussi faible que 1,3% (Canham et al., 1990).

## **Hypothèse 1**

Le pH est la variable associée au sol la plus fréquemment corrélée avec l'émergence et la croissance, et celles-ci sont supérieures dans les sites où le pH du sol s'approche de la neutralité.

## **Hypothèse 2**

La teneur élevée de certains éléments minéraux, tels que le calcium, le phosphore et le potassium, influencent positivement l'émergence et la croissance des plantes.

## **Hypothèse 3**

L'augmentation du flux de photons au sol est corrélée avec la croissance des plantes, mais la relation initialement linéaire pourrait tendre vers un plateau de pente nulle aux flux de photons les plus élevés. Cela serait causé par le fait que leur appareil photosynthétique sature à de plus faibles intensités de lumière que le plein soleil.

## **Hypothèse 4**

La teneur en composés actifs des plantes diminue avec l'augmentation du flux de photons. Cette augmentation de l'irradiance favoriserait en effet la croissance et ne constituerait pas un stress physiologique induisant la production de composés actifs. Ceci présuppose que même en trouée, la lumière ne sera pas suffisamment intense pour provoquer un stress physiologique.

## **Hypothèse 5**

La teneur en composés actifs des plantes diminue avec l'augmentation de la richesse des sols. En sols pauvres, la teneur en composés actifs des plantes serait favorisée par des stress physiologiques dû à des carences ou à des effets de toxicité alors qu'en sols plus riches, les stress seraient diminués et la croissance prédominerait sur la production de composés actifs.



## **Chapitre 2 - Medicinal Understorey Herbaceous Species Cultivated under Different Light and Soil Conditions in Maple Forests in the South of Québec, Canada**

### 2.1. Résumé

Plusieurs espèces de sous-bois ont des propriétés médicinales. La majorité des plantes qui se trouvent sur le marché sont récoltées dans leur milieu naturel et ce, dû aux coûts de production élevés de ces espèces en pratique culturale conventionnelle, mettant ainsi leur population naturelle en péril. Leur culture en système agroforestier en milieu boisé semble être une alternative prometteuse. Cette étude visait à évaluer l'impact de l'ouverture du couvert forestier et de la composition chimique du sol sur la croissance et la production de composés actifs de quatre plantes médicinales : l'actée à grappes noires (*Actaea racemosa* (L.) Nutt.), la sanguinaire (*Sanguinaria canadensis* L.), le caulophylle faux-pigamon (*Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx.) et l'asaret (*Asarum canadense* L.). Les boutures de rhizome ont été plantées à l'automne 2003 dans deux érablières. Le taux d'émergence et la surface foliaire totale ont été évalués lors des 3 années suivantes, et une récolte partielle s'est effectuée à la fin de la deuxième année pour mesurer les biomasses et faire l'analyse des composés actifs. Les régressions multiples ont indiqué que toutes les espèces ont davantage répondu soit à la lumière ou aux éléments reliés à l'acidité (pH, Al, Al+H, Fe, Zn) plutôt qu'à la richesse du sol (Ca, K, Mg, P, C/N, saturation en base et capacité d'échange cationique). Toutes les espèces ont répondu au pH du sol et toutes, à l'exception du caulophylle faux-pigamon, ont été affectées par la présence d'éléments tels que l'aluminium, le sodium et le zinc. Ceci suggère que la fertilisation n'aurait pas un fort impact sur la croissance de ces espèces, mais que l'ajustement du pH par le chaulage serait approprié. À l'exception du caulophylle faux-pigamon, la croissance a augmenté avec l'irradiance, indiquant que la formation de trouées pourrait faire partie d'un plan de gestion

approprié pour leur culture. Bien que les concentrations en composés actifs des rhizomes et des racines aient augmenté dans des conditions qui ont affecté la croissance, telles qu'une quantité élevée en Zn, en Na, une faible saturation en base, une faible capacité d'échange cationique du sol ou une faible irradiance, leur contenu a répondu de façon similaire à celle des variables de croissance. Ainsi, il semble que les sols et les conditions de lumière qui favorisent la croissance de ces plantes médicinales favorisent également leur rendement total en composés actifs.

## 2.2. Abstract

Many understorey plants have medicinal properties. Because of the high cost of production of such species under conventional cultivation practices, most of the plants that make it to the market are harvested in their natural habitat, putting the natural populations at risk. Their cultivation in a forest farming system seems a promising alternative. This study was aimed at assessing the impact of canopy opening and soil chemical composition on growth and active component production of four medicinal plants: black cohosh (*Actaea racemosa* (L.) Nutt.), wild ginger (*Asarum canadense* L.), blue cohosh (*Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx.) and bloodroot (*Sanguinaria canadensis* L.). Rhizome sections were planted in the fall of 2003 in two sugar maple forests. Emergence and total leaf area were monitored during the following three years, while subsamples were harvested at the end of the second year for biomass and active component analyses. Multiple regressions indicated that all species responded more to either light or acidity related elements (pH, Al, Al+H, Fe, Zn) than to soil richness (Ca, K, Mg, P, C/N, base saturation and cation exchange capacity). All species responded to soil pH and all, except blue cohosh, were affected by the presence of elements such as aluminium, sodium and zinc. This suggests that fertilisation might not have a strong impact on the growth of these species, but that adjusting the pH by liming could be appropriate. Except for blue cohosh, growth increased with irradiance, indicating that forest openings could also be part of an appropriate forest management plan for their cultivation. While active component concentrations of rhizomes and roots increased in conditions that negatively affected growth, such as high Zn, high Na, low base saturation, low cation exchange capacity of the soil or low light levels, their total content exhibited responses that were similar to those of the growth variables. Thus, it seems that soil and light conditions that favour the growth of these medicinal plants also favour their total yield in active components.

### 2.3. Introduction

Many perennial understorey herbs of rich hardwood forests that have medicinal properties (Small and Catling, 2000; Cech 2002; Persons and Davis, 2005) are over harvested in their natural habitat, putting their populations at risk (Ticktin, 2004; Van Manen et al., 2005). Although some of them can be cultivated, their production costs are high. Moreover their slow growth makes their production not commercially profitable. Their culture in an agroforestry system seems a promising alternative due to much lower production costs and to the possibility of obtaining a second income for the owner of forested lands. Moreover, such practice would reduce the pressure on the natural populations. However, little is known about the conditions that would maximize growth and active component production.

Wild understorey plants are adapted to very low light levels. Their photosynthetic apparatus becomes light saturated at a lower level than sun loving plants (Boardman, 1977; Givnish, 1988) and, beyond a certain limit, they become photoinhibited (Quigley and Mulhall, 2002; Fournier et al., 2004). However, they are more effective in using sunflecks than sun loving plants (Chazdon and Pearcy, 1986). Under northern hardwood forest canopies, the mean percentage of light that reaches the soil is generally less than 4% of full sunlight (Pfitsch and Pearcy, 1989a; Canham et al., 1990; Routhier and Lapointe, 2002). This is much lower than the light saturating point for shade plants (Pfitsch and Pearcy, 1989a; Pfitsch and Pearcy, 1989b). However, natural disturbances, such as broken branches and dead trees, significantly increase the amount of light reaching the understorey vegetation. In 50 to 150 m<sup>2</sup> gaps in sugar maple forests, at 1 m above-ground, light ranges between 5 and 25% of full sun (Beaudet et al., 2004). Thus, optimal light levels for shade plants might be reached in small gaps, although these levels would vary with species. However, gaps may be invaded by sun-loving species that would then compete with shade species.

Temperate deciduous forest soils are often poor in nutrients because of the slow and long degradation of the organic matter (Liski et al., 2003). Soil class and texture are factors that

affect nutrient content and availability (Soil Classification Working Group, 1998). In sugar maple forests, calcium, magnesium, phosphorus and potassium appear to be the main elements that limit plant growth, combined with aluminium toxicity and a low pH (Bernier and Brazeau, 1988b; Ouimet and Fortin, 1992; Côté et al., 1995). In the last decades, these forests suffered from soil acidification causing nutrient leaching, imbalances, antagonistic effects, and the increased solubility of some toxic elements (Tomlinson 1993; Côté and Ouimet, 1996; Ouimet et al., 1996).

While we are gaining knowledge about how nutrient and light stresses affect plant growth, we are still speculating about their effect on the production of secondary metabolites, the components usually responsible for plant medicinal properties (Herms and Matson, 1992; Hamilton et al., 2001; Stamp, 2003). One model hypothesizes that a moderately stressful environment such as direct light exposure, for shade loving species, or soil moderate drought, for moist soil loving species, may increase their secondary metabolite production while having a negative impact on their growth (Berenbum, 1995; Hamilton, 2001). On the other hand, high growth rates under non stressful conditions can lead to diluted concentrations of active components in plant tissues. Since medicinal plants' producers are more interested in the total yield of active components than solely in their concentration, the goal is to find the conditions that favour plant growth without inducing a drastic reduction in active component production.

In this research, four species were studied: black cohosh (*Actaea racemosa* (L.) Nutt.), bloodroot (*Sanguinaria canadensis* L.), blue cohosh (*Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx.) and wild ginger (*Asarum canadense* L.). Black cohosh is an important medicinal plant which can constitute an alternative to hormone therapy for the relief of menopausal symptoms (Borelli et al., 2008). Of the conservative estimate of 83,5 tons of dried black cohosh roots and rhizomes collected in the United States in 2001, only 4% were from cultivated plants (Predny et al., 2006). Bloodroot is found in several pharmaceutical preparations, generally in expectorants, cough mixtures and tinctures (Small and Catling, 2000). It is also found in some cosmetics and in livestock feed additives (Persons and Davis, 2005). Between 9 and 13,6 tons of dried bloodroot rhizomes are collected annually

in their natural habitat in the United States (McGuffin and Young, 2001). Blue cohosh is mainly used to facilitate childbirth. Although seldom used in manufactured drugs, it is part of several preparations based on medicinal herbs (Small and Catling, 2000). This species is wild harvested in North America where a risk of overexploitation has already been noted in several areas. Between 4,5 and 9 tons of dried roots and rhizomes are collected annually in its natural environment in the United States (McGuffin and Young, 2001). Wild ginger has a taste similar to ginger and can thus be used for similar purposes (Lamoureux, 2002). This essential oil contains principally methyl eugenol, linalool and linalyl acetate. Methyl eugenol is known to have sedative, narcotic (MacGregor and Layton, 1974), anaesthetic, anticonvulsant, antiseptic, antibacterial, antifungal, insectifuge and myorelaxant properties and to prevent cancer (Duke 2004). Linalool and linalyl acetate are used in perfumery, and enter in the composition of soap, detergent, cream and lotion. Wild ginger also contains an anti-inflammatory, immune stimulant and antibiotic, but nephrotoxic compound: aristolochic acid (Cavallito and Bailey, 1946; Nortier and Vanherweghem, 2007). There is no available estimate of the total amount of wild ginger harvested in United-States and/or Canada. However, there is evidence that harvesting in wild populations is occurring for the plant trade in Tennessee, North Carolina, South Dakota, and Manitoba (NatureServe Explorer, 2008).

Black cohosh, blue cohosh and bloodroot are considered vulnerable in the United States as it is suspected that they have been over harvested. It has been proposed to add them to the CITES appendix II list (CITES, 2001, 2008). Wild ginger and bloodroot are now included in the list of vulnerable species for the province of Québec, prohibiting commercial harvesting from the wild (Gazette officielle du Québec, 2004). Cultivating these species in a forest farming system could thus be an interesting alternative to wild harvesting. In this study, we tested the impact of soil chemistry and light levels on the growth and active component production of these four species under cultivation in sugar maple forests in order to identify the conditions that maximises active component yield in these species.

## 2.4. Methodology

### 2.4.1. Plant Source

Rhizomes were collected in October 2003 from wild populations in the Eastern Townships region in the province of Québec, Canada, except for black cohosh and a fraction of bloodroot rhizomes, which were bought from Les Fraises de l'Île Inc, Québec, Canada (Annexe 1). All rhizomes were stored at 4°C prior to their plantation, about one month later.

### 2.4.2. Study Sites

The study was conducted at two sites located in the southern part of Québec, Canada. The first site was located in Saint-Étienne-de-Bolton (45°18'00"N - 72°19'00"O) in the Eastern Townships region. The forest at this site presents different stages, from a young maple forest with sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) and red maple (*Acer rubrum* L.) as dominant species, to a mature forest where sugar maple and red maple still dominate, but grey birch (*Betula populifolia* Marsh), balsam fir (*Abies balsamea* L.) and eastern hemlock (*Tsuga canadensis* L.) are also present. The mean canopy height is about 17 m and the soil is an orthic dystic brunisol (Soil Classification Working Group, 1998). The second site is located in Bromont (45°19'00"N - 72°39'00"O), in the Montérégie region in the province of Québec, Canada. The forest is rich and mature and is dominated by sugar maple and managed for maple syrup production. The mean canopy height is about 24 m and the soil is an orthic ferro-humic podzol (Soil Classification Working Group, 1998).

At both sites, two light levels — closed canopy and canopy gaps — were selected. Natural canopy gaps were selected when possible, but in some cases, they were artificially created by cutting some trees. The surface area of the plots varied from 80 to 160 m<sup>2</sup>, with no tree nor shrub inside the plots. Gap surface areas were approximately equivalent or lesser to their respective plot surface area. A total of 8 plots per site were established, and included 4 closed canopy plots and 4 canopy gaps plots. Soil texture analysis (one composite sample per plot made out of three sub-samples, 20 cm deep by 5 cm diameter) was done based on the hydrometer method of Bouyoucos (Gee and Bauder, 1986).

#### 2.4.3. Plantation

Rhizomes of bloodroot were treated with Benomyl<sup>®</sup> fungicide at 1.2 g L<sup>-1</sup> for 20 min (Nivot et al., 2008). Rhizomes of the other species were treated with Bordeaux mixture (Bordo Wilson<sup>®</sup> copper spray negro: 53% tribasic copper sulphate) at 3 g L<sup>-1</sup> for 15 minutes. This last fungicide is allowed in organic culture (Conseil des appellations réservées et des termes valorisants, 2008). Rhizomes were cut with sterilized knives and small incisions were scarved at the basal end to facilitate the penetration of auxin that was applied to promote rapid rooting (Nivot et al., 2008). Rhizome basal end of each section was dipped in an aqueous solution containing 1 000 ppm of auxin (Stim-Root No.1: 3-indol butyric acid (3-IBA) from Plant Products CO. Ltd) for 15 seconds. The minimum length of the rhizome sections was chosen according to the results of a previous greenhouse study (Nivot et al., 2008): 5 cm for wild ginger, blue cohosh and bloodroot, and 5-10 cm for black cohosh. To maximise survival, all selected rhizomes had an apical bud, except for blue cohosh. Rhizome sections from this species carry many buds that can develop into shoots, suggesting that even dormant buds could do so (Nivot et al., 2008). The plantation depth was 5 cm for wild ginger, blue cohosh and bloodroot, and 5-10 cm for black cohosh. Spacing between individuals was 30 cm for wild ginger and bloodroot, and 50 cm for blue cohosh and black cohosh due to their larger size at maturity. Within each plot, a subplot



was defined for each species, and 50 rhizomes per species were planted. The subplot occupied by each species was randomly selected within each plot. Rhizomes were planted between October 16 and November 13, 2003.

In July 2005, symptoms of defoliation appeared at both sites on black cohosh. Sodium acid carbonate was sprayed until the leaves drip at a rate of 15 mL L<sup>-1</sup> to prevent further damage. Subsequently, a caterpillar from the Plusiinae sub-family group (Lepidoptera: Noctuidae) was identified as the cause of defoliation. The same symptoms appeared in June 2006 and subplots were treated with BTK<sup>®</sup> (*Bacillus thuringiensis* Kurstaki, by Safer's<sup>®</sup>) at a rate of 3.33 mL L<sup>-1</sup>.

#### 2.4.4. Field Measurements

The presence of aboveground tissue was noted for each rhizome section in spring 2004, 2005 and 2006. Emergence was then expressed as the percentage of rhizome sections planted in fall 2003 that produced aboveground tissues in 2004, 2005 and 2006.

In order to estimate leaf area in the experimental sites based on non destructive measurements, regression equations were estimated for each species. To do so, a minimum of 25 leaves of different sizes per species were collected from natural populations. Their length and width were measured with a ruler, then their leaf area was measured with a leaf area meter (LI-COR, Inc. Li-3100 area meter). Regression equations were estimated for each species in order to be able to estimate leaf area in the experimental sites based on non destructive measurements. For black cohosh and blue cohosh, the total leaf area of the three leaves of one shoot was best correlated with length (l) x width (w) of the leaflet B of the symmetric leaf (Fig. 1). The equation was  $y = 8.47 \times (l \times w)^{0.972}$  ( $r^2 = 0.881$ ) and  $y = 5.7768 \times (l \times w)^{1.1771}$  ( $r^2 = 0.917$ ) for black cohosh and blue cohosh, respectively

(Fig. 2). For bloodroot and wild ginger, the equation was  $y = 1.249 (l \times w)^{0.958}$  ( $r^2 = 0.995$ ) and  $y = 1.04 (l \times w)^{0.988}$  ( $r^2 = 0.996$ ), respectively, where “l” is the length and “w” is the width of each leaf (Fig. 2). The dimensions of each leaf were measured for each individual in June and July of 2004, 2005 and 2006, except for wild ginger, whose leaves were measured in late August of 2005 and 2006 because it was noted in 2005 that they expand throughout summer. To determine the increase in leaf area over 2 years, 2004 leaf area was subtracted from the one of 2006, and the difference was divided by the leaf area of 2004 and then expressed in percent. Increase in leaf area of blue cohosh was based on the change in leaf area over one year, since the rhizomes did not produce any shoot in 2004.

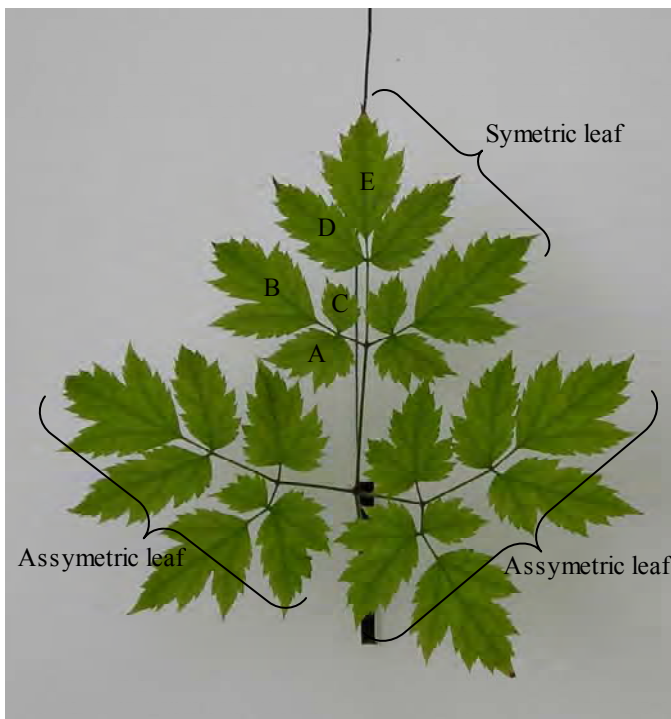


Figure 1. Letters used to identify the leaflets in the leaf area equation for black cohosh.

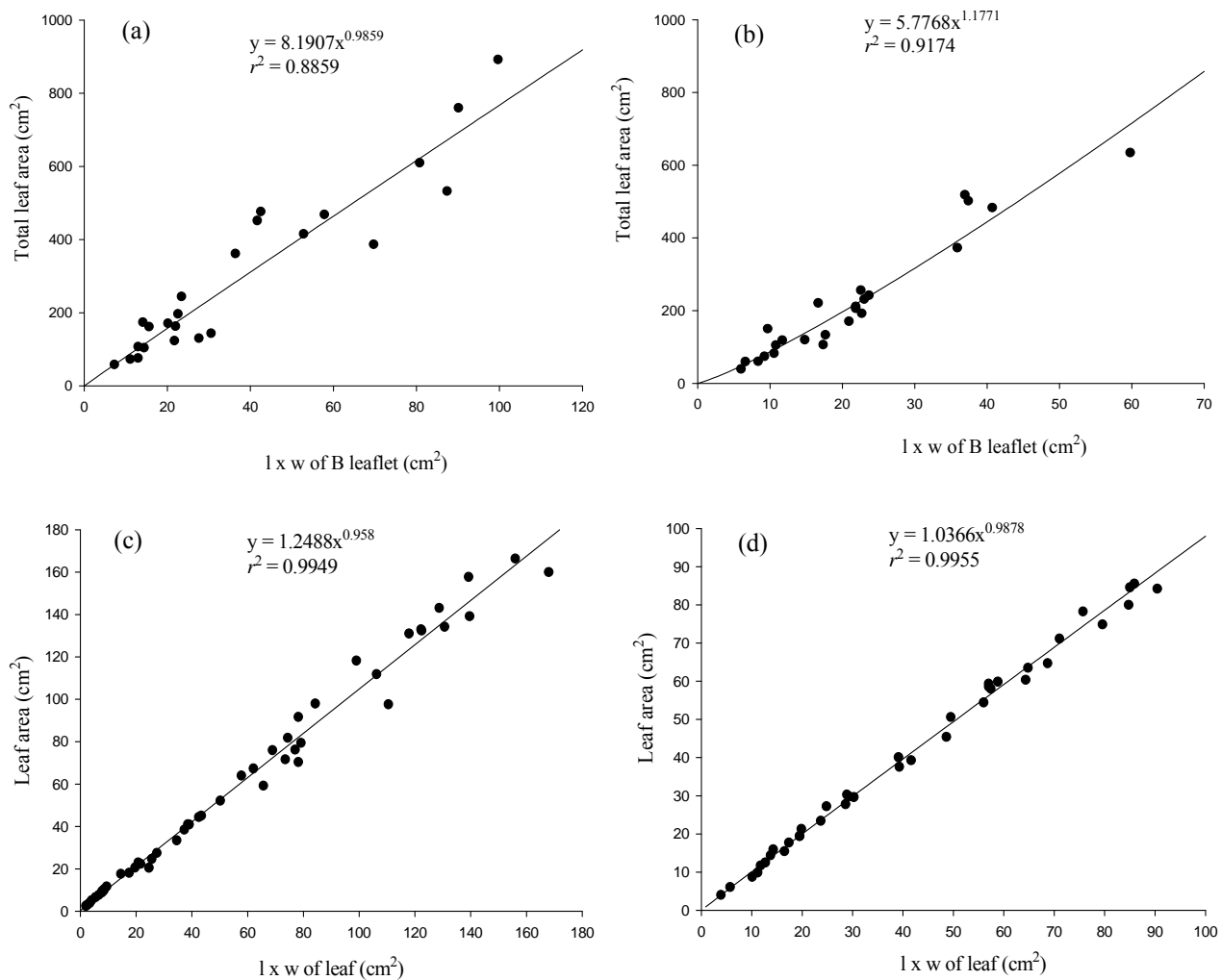


Figure 2. Relation between leaf length and width and total leaf area of (a) black cohosh, (b) blue cohosh, (c) bloodroot and (d) wild ginger. The equations used to estimate leaf area from leaf dimensions measured in the field are indicated on each graph along with the  $r^2$ . For the two first species, the dimensions of leaflet B were used to estimate the total leaf area of the plant (see Fig. 1 for the position of leaflet B) whereas for bloodroot and wild ginger the equation was used to estimate individual leaf area.

#### 2.4.5. Soil and Light Analyses

In spring 2004, symptoms typical of low soil pH appeared on most species at the St-Étienne-de-Bolton site. Soil chemical samples (one composite sample per plot made out of ten sub-samples 20 cm deep by 5 cm in diameter) taken on June 9 and 10, 2004, revealed that the water pH was below 4.7. Thus, lime was added at a rate of 4 t ha<sup>-1</sup> in this site on May 21, 2004, and at a rate of 10 t ha<sup>-1</sup> on May 5, 2005. In the Bromont site, 5 t ha<sup>-1</sup> were added on May 6, 2005. Another soil chemical analysis was performed on samples collected on November 1-2, 2005, at both sites.

Each plot soil sample for each year was composed of 10 soil sub-samples of 15 cm deep. All soil samples were air dried. Water pH (pH<sub>w</sub>) and electrical conductivity (EC) were determined with a pH meter and an electrical conductivity meter, respectively, in a water-soil suspension (1:1). The rest of the soil samples were then sieved through a 2 mm sieve, and ground. Aluminium, copper, iron, phosphorus and zinc were analysed following the Mehlich III extraction method (Mehlich, 1984). Total nitrogen was determined using the Kjeldahl method (Diamond, 1992). Organic carbon (OC) was analysed as recommended by Yeomans and Bremner (1988). Cationic exchange capacity (CEC) and major exchangeable cations (Ca, Mg, K, Na) were determined at soil pH according to the method described by Amacher et al. (1990).

Light was measured in each subplot as the mean of ten data points recorded every 10 seconds at 20 cm above the ground with a Sunfleck PAR Ceptometer. A second series of measures was taken simultaneously in a nearby open field with a second Sunfleck PAR Ceptometer. All measurements were recorded between 11h00 and 13h00 on overcast days (Battaglia, 2000), on July 25-27, 2005. Taking light measurements on overcast days was proposed by Messier and Puttonen (1995) as light transmittance during overcast days is stable throughout the day, and therefore an instantaneous measurement taken at almost any time would be representative of the mean daily %PPFD (photosynthetic photon flux

density). Parent and Messier (1996) confirmed this proposal reporting a strong linear relationship ( $r^2=0.969$ ) between three instantaneous measurements of %PPFD on an overcast day and mean daily %PPFD measured continuously on an overcast day. In addition, they also reported a strong linear relationship ( $r^2=0.862$ ) between mean daily %PPFD measured on an overcast day and on a clear day (Parent and Messier 1996). The percentage of light was calculated as the ratio of PAR (Photosynthetic Active Radiation ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )) in each subplot to the corresponding PAR measured in the open field.

#### 2.4.6. Plant Harvest

In 2005, twelve rhizomes per subplot were randomly selected amongst plants that emerged. They were harvested after leaf senescence in October 2005. The rhizome and root systems were small enough that it was still easy to harvest all of it. Plants were put in sealed bags in a cooler, then transferred to a freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). The old rhizome part (rhizome section that was planted originally), the two-year rhizome growth and the roots were weighed (fresh mass), then frozen dried and weighed again to determine their dry mass. The number of buds was also recorded.

#### 2.4.7. Plant Active Component Analyses

Amongst the plants that were harvested, six plants per species per plot were randomly chosen for active component analyses. Due to the photosensitivity of sanguinarine, extraction procedures for bloodroot were conducted under low-light conditions when possible. Tubes were wrapped with aluminium foil, and vials were made of amber glass. Each part (new rhizome section (two-year growth), old rhizome section (planted in 2003) and, for blue cohosh, roots) was ground with a mortar and pestle or a coffee grinder. After

mixing the powder for homogeneity, 0.5 g of sample was weighed, except for small samples where all ground material was weighed and used for subsequent extraction. Each ground sample of wild ginger, blue cohosh and black cohosh was treated three times with 3 mL methanol, while bloodroot was treated three times with a mixture of methanol and water (80:20). During each extraction, samples were put in an ultrasonic bath (Ultrasonic cleaner Model 75T Aquasonic, VWR Scientific, Mississauga, Ontario; Volts 117/120, 50/60 HZ, Amps 1) for 30 minutes, then centrifuged (10 min at 1,800 g). Supernatants were combined and completed at 10 mL with the same solvent. The extracted solution was centrifuged again (10 min at 1,800 g) then stored at -20°C.

Before being quantified, bloodroot extracts were diluted a hundred times (100x) with a mixture of 70% methanol (Omnisolve HPLC grade from VWR™) and 30% acidified water (water HPLC grade from a Milli-Q® system and 2.5% hydrochloric acid). Except for black cohosh, 1.5 mL of each extract solution was filtered with a 0.2 µm nylon membrane filter (Whatman) and transferred in an amber vial (Amber wide crimp top vial write-on, Agilent Technologies, Santa Clara, California). Standard for wild ginger was a mixture of aristolochic acids I and II ( $R_t = 27.6$  and  $25.1$ ; ChromaDex Inc., Santa Ana, CA). Sanguinarine chloride hydrate and chelerythrine chloride ( $R_t = 8.7$  and  $9.2$ ; Sigma-Aldrich Co., St-Louis, MO) were used as standard for bloodroot samples whereas magnoflorine ( $R_t = 5.7$ ; ChromaDex Inc., Santa Ana, CA) was used for blue cohosh samples. Measures of active component concentrations of wild ginger (Jong et al., 2003), blue cohosh (Ganzera et al., 2003) and bloodroot (Mahady, 2003; Salmore and Hunter, 2001) were carried on using high performance liquid chromatography (HPLC HP Series 1050) with a column prefilter (Direct-Connect™ Universal Column Prefilter, 0.5 micron porosity and 4 mm diam.; Alltech Associates Inc., Deerfield, IL), a Zorbax Eclipse (C18) column (3 mm x 15 cm; Agilent Technologies, Santa Clara, California) and a Photodiode Array Detector (HP Series 1050). Omnisolve acetonitrile, formic acid, methanol, trifluoroacetic acid, ammonium acetate and propionic acid were of HPLC grade (VWR™), and HPLC grade water was obtained from a Milli-Q® system. Each solvent or solvent mixture for the mobile phase was filtered with a 0.2 µm nylon membrane filter (Whatman®) prior to its addition to the HPLC column. Injected volume was 20 µl for wild ginger, and 10 µl for blue cohosh and

bloodroot samples. Flow was  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$  at  $40^\circ\text{C}$  for wild ginger and  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$  at  $35^\circ\text{C}$  for blue cohosh and bloodroot. See Annexe 2 for the composition of the different mobile phase gradients used to analyse the different active components of these three species. The detector wavelength was set at 254 nm, 310 nm and 283 nm for wild ginger, blue cohosh and bloodroot, respectively. Each sample was analyzed in duplicate and samples for which duplicates varied by more than a 12 % were reanalysed. This threshold was determined based on the repeatability of standard solutions of the different components (S. Bouchiba, unpubl. results).

Standard for black cohosh was actein (Chromadex Inc., Santa Ana, CA) and the concentrations used to establish the regression curve varied between  $0.5$  and  $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The reactive solution contained 50% glacial acetic acid (EMD™ 99.7% min.) and 50% sulphuric acid (95-98% Fisher Scientific, Ottawa, Ontario). Once prepared, it was let to cool down at ambient temperature for 2 h. Five mL of the reactive solution were added to a mixture containing 0.5 mL of black cohosh extract sample and 4.5 mL of glacial acetic acid and put for 20 min at  $60^\circ\text{C}$  in a water bath (Panossian et al., 2004, modified by S. Bouchiba, pers. comm.). Duplicates were prepared for each sample. They were transferred on ice and analyzed with a spectrophotometer at 390 nm. Blank samples containing glacial acetic acid and the reactive solution (1:1) were run with each batch of samples. This method was not specific to actein as all triterpenoids reacted. We thus reported the data as total triterpenoids since it is known that black cohosh contains significant amounts of other triterpenoids, including seven different types of cimracemosides (Bradley, 1992; Panoissian et al., 2004).

Wild ginger linalool, linalyl acetate and methyleugenol analyses were done using 250  $\mu\text{L}$  of rhizome extract, diluted with 2.75 mL of distilled water and transferred onto a Chem-Elute cartridge (Varian, 3 mL capacity). The cartridge was eluted with 8.5 mL of hexane. Samples of 1  $\mu\text{L}$  were then injected into a gas chromatography (GC) system (Varian 8200). The columns were Supelco SPB1 and Supelcowax 10 (both  $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ ,  $0.25 \mu\text{m}$  film thickness). The temperature of the injection port was maintained at  $250^\circ\text{C}$  whereas the GC oven temperature was programmed from  $40^\circ\text{C}$  to  $210^\circ\text{C}$  with a  $2^\circ\text{C min}^{-1}$  increase, then

held constant for 33 min. The flame ionisation detector was maintained at 240°C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.2 mL min<sup>-1</sup> and split flow was adjusted at 50 mL min<sup>-1</sup>. Identification of the components was done by comparison of their retention indices. Quantitative data were obtained electronically from GC/FID area percentages.

#### 2.4.8. Statistical Analyses

Stepwise multiple linear regressions were run for each dependant variable using their mean recorded at the subplot level, for all the independent variables drawn from the soil chemical analyses at the plot level (2004 or 2005), and for the percentage of irradiance measured at the subplot level (in 2005). Dependant variables recorded repeatedly over the years were analysed separately for each year. For the 2004 and 2005 data, soil chemical analyses were used in the stepwise regressions of the dependent variables recorded the same year, while in 2006, the soil data of 2005 were used since no soil chemical analyses were performed in 2006. Since light was measured only once in 2005, the same light measurements were used for the dependant variables of all three years.

Stepwise multiple regression was done adding one by one the independent variables presenting a *P* value of 0.15 or less (Afifi et al., 2004; Hosmer and Lemeshow, 2004). This was repeated until no other variable strengthened the model *P* value, that had to be lower than 0.05 for the regression to be considered significant. Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov residues normality tests were run and the homogeneity of variances of the residues was verified. A transformation was performed (log) when needed to improve either the normality or the homogeneity of variances of the residues. Independent variables that were retained in the final stepwise multiple regression model, as presented in the different tables, were plotted individually to see the relationship between each dependant and independent variable. Values of the dependant variables presented in those figures are the original data (no transformation). Although these figures are useful to see the shape of the relation and to



some extent the strength of the relation between the dependant and independent variables of the model, it is important to mention that the stepwise multiple regression model did not analyse the independent factors individually, but as a single equation containing all independent factors that contributed to explain the dependant variable.

## 2.5. Results

Light varied between 2.3% and 9.6% of what was measured in the open field, under the closed canopy (mean 4.5% and median 4%), and between 5.4% and 20.6% in the gaps (mean 14.8% and median 15.6%). Soil texture analysis revealed no significant differences between plots, that all consisted in loams, sandy loams or clay sandy loams. Soil characteristics exhibited many correlations with each another (Table 1). We thus decided to focus on those that had a coefficient ( $r^2$ ) higher than 0.40 due to the very high number of significant correlations. Water pH ( $\text{pH}_w$ ) and buffer pH ( $\text{pH}_B$ ) were strongly correlated with cation availability, as shown by the concomitant increase of cationic exchange capacity (CEC), electrical conductivity (EC) and base saturation (BS), as well as the increase in calcium (Ca), magnesium (Mg) and sodium (Na) concentrations, and a decrease in aluminium (Al) and exchangeable acidity with the increase of both pHs. In general,  $\text{H} + \text{Al}$  and Al were correlated with the same variables as  $\text{pH}_w$  and  $\text{pH}_B$ , but in the opposite way, while BS, Na and Ca exhibited similar correlations as  $\text{pH}_B$ . Organic carbon (OC), nitrogen (N), CEC and EC were correlated with each other. Copper (Cu) was only correlated with N, potassium (K) was only correlated with BS and Mg, whereas zinc (Zn) and phosphorus (P) were only correlated with each other. Carbon/nitrogen ratio (C/N) was correlated with Al, and iron (Fe) was not correlated, within limits used, with the other variables.

Table 1. Coefficients of correlation ( $r^2$ ) between the different soil variables for soil samples collected in spring 2004.

	Al	BS	C/N	Ca	CEC	OC	EC	Cu	Fe	H+Al	K	Mg	N	Na	P	pH <sub>w</sub>	pH <sub>B</sub>	Zn
Al	-	-	-	-														
BS	-0.64 <sup>+++</sup>	-	-	-														
C/N	0.57 <sup>+++</sup>	-0.07	-	-														
Ca	-0.84 <sup>+++</sup>	0.46 <sup>+</sup>	-0.11	-														
CEC	-0.78 <sup>+++</sup>	0.34 <sup>+</sup>	-0.08	0.98 <sup>+++</sup>														
OC	-0.23	0.13	0.0004	0.38 <sup>+</sup>	0.43 <sup>+</sup>													
EC	-0.60 <sup>+++</sup>	0.37 <sup>+</sup>	-0.10	0.76 <sup>+++</sup>	0.77 <sup>+++</sup>	0.58 <sup>+++</sup>												
Cu	-0.26 <sup>+</sup>	0.23	-0.08	0.19	0.16	0.36 <sup>+</sup>	0.23											
Fe	-0.003	-0.003	0.07	-0.01	-0.002	0.02	-0.007	0.06										
H+Al	0.55 <sup>+</sup>	-0.83 <sup>+++</sup>	0.13	-0.75 <sup>+++</sup>	-0.06	-0.08	-0.29 <sup>+</sup>	-0.26 <sup>+</sup>	0.16									
K	-0.36 <sup>+</sup>	0.52 <sup>+</sup>	-0.0001	0.21	0.17	0.11	0.26 <sup>+</sup>	0.04	0.06	-0.33 <sup>+</sup>								
Mg	-0.59 <sup>+++</sup>	0.77 <sup>+++</sup>	-0.04	0.33 <sup>+</sup>	0.27 <sup>+</sup>	0.09	0.38 <sup>+</sup>	0.20	0.02	-0.56 <sup>+++</sup>	0.72 <sup>+++</sup>							
N	-0.33 <sup>+</sup>	0.21	-0.23	0.52 <sup>+</sup>	0.54 <sup>+</sup>	0.74 <sup>+++</sup>	0.67 <sup>+++</sup>	0.45 <sup>+</sup>	-0.06	-0.18	0.08	0.12						
Na	-0.79 <sup>+++</sup>	0.68 <sup>+++</sup>	-0.24	0.74 <sup>+++</sup>	0.67 <sup>+++</sup>	0.21	0.50 <sup>+</sup>	0.37 <sup>+</sup>	-0.0006	-0.61 <sup>+++</sup>	0.26 <sup>+</sup>	0.50 <sup>+</sup>	0.39 <sup>+</sup>					
P	0.007	0.07	0.19	-0.02	-0.05	0.02	-0.009	0.04	0.09	-0.08	0.04	0.02	-0.01	-0.02				
pH <sub>w</sub>	-0.80 <sup>+++</sup>	0.68 <sup>+++</sup>	-0.08	0.86 <sup>+++</sup>	0.78 <sup>+++</sup>	0.31 <sup>+</sup>	0.64 <sup>+++</sup>	0.22	-0.03	-0.65 <sup>+++</sup>	0.30 <sup>+</sup>	0.47 <sup>+</sup>	0.40 <sup>+</sup>	0.81 <sup>+++</sup>	0.0003			
pH <sub>B</sub>	-0.77 <sup>+++</sup>	0.71 <sup>+++</sup>	-0.19	0.78 <sup>+++</sup>	0.66 <sup>+++</sup>	0.15	0.46 <sup>+</sup>	0.19	-0.06	-0.78 <sup>+++</sup>	0.26 <sup>+</sup>	0.44 <sup>+</sup>	0.32 <sup>+</sup>	0.85 <sup>+++</sup>	0.002	0.90 <sup>+++</sup>		
Zn	-0.18	0.15	0.19	0.05	0.04	0.25 <sup>+</sup>	0.09	0.12	0.0	-0.07	0.23	0.14	0.05	0.01	0.62 <sup>+++</sup>	0.05	0.01	

Correlations marked with <sup>+</sup> or <sup>+++</sup> are statistically significant at  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively.

### 2.5.1. Black cohosh

Black cohosh emergence rate was 81%, 84% and 65% in 2004, 2005 and 2006 respectively. It was positively affected by Mg and negatively affected by Al, Ca, C/N and Na concentrations in the soil (Table 2, Fig. 3). None of the plant had flowered after 3 years of growth, but leaf area increased by  $232 \pm 78\%$  on average in two years. Growth in this species was less variable than in the three other species. It was mostly influenced by soil  $\text{pH}_w$  and light. Leaf area in 2005 and 2006, along with the mass of the new rhizome section and its triterpenoid content, increased with soil  $\text{pH}_w$ . BS enhanced leaf area and new rhizome mass in 2005. Al, which was negatively correlated with soil  $\text{pH}_w$  ( $r^2 = 0.80$ ,  $P < 0.0001$ ; Table 1), had a negative effect on rhizome and root growth in 2005, as well as on leaf area in 2006. Zn negatively affected the old rhizome mass and EC positively influenced bud production. The triterpenoid concentration of either the old or the new rhizome sections was not correlated with any of the independent variables measured. Light positively influenced leaf area, new rhizome and root growth, the production of buds and the triterpenoid content in the new rhizome section.

### 2.5.2. Bloodroot

Bloodroot presented the best emergence rate of all four species with 96% in 2004, 94% in 2005 and 82% in 2006. Na had a slightly negative effect on emergence in 2005, while in 2006, Mg, Ca and CEC enhanced emergence and Zn decreased it (Table 3, Fig. 4). The mean percentage of flowering in 2006 was  $49 \pm 33\%$ . Bloodroot presented a growth similar to that of wild ginger and black cohosh with a mean increase of leaf area of  $215 \pm 148\%$  after two years, growth variability being intermediate between that of these two species. New rhizome mass, and bud number in 2005, as well as leaf area in 2006, were positively

correlated with soil pH<sub>w</sub>. Zn negatively affected leaf area in 2005. Na had a negative influence on the old rhizome dry mass and on the chelerythrine content of old and new rhizome sections, but it raised the sanguinarine concentration in the new rhizome section. Higher BS improved leaf area in 2004, and CEC had a positive effect on the sanguinarine content in the new rhizome section, but a negative effect on its concentration in the old rhizome. Chelerythrine old rhizome content was positively affected by Mg. Light had a great effect on bloodroot plants since it improved growth of aerial parts and all underground parts, but had a negative effect on the old and new rhizome sanguinarine concentration. Despite of this negative effect, global light effects were positive for both sanguinarine and chelerythrine total content due to the positive effect of light on the mass of both the old and the new section of the rhizome. The chelerythrine concentration of either the old or the new rhizome sections was not correlated with any of the independent variables measured.

### 2.5.3. Blue cohosh

There was no emergence of blue cohosh in 2004, but rhizomes were still alive and 68% produced at least one shoot in 2005, and 58% in 2006. Ca and Na had a negative effect on shoot emergence of this species (Table 4, Fig. 5). Blue cohosh had an annual leaf area increase of  $57 \pm 30\%$ . None of the plants had flowered 3 years after the plantation. Rhizome (old and new section) and root mass were positively affected by Mg. Surprisingly, Al had a positive effect on the old rhizome dry mass and Ca had a slightly negative effect on root dry mass. However, this last correlation appears weak based on visual assessment (Fig. 5). Fe had a strongly negative influence on growth of blue cohosh as it reduced leaf area along with the old and new rhizome dry mass and their magnoflorine content. Root magnoflorine concentration was positively affected by Na, whereas old rhizome magnoflorine concentration was negatively affected by Al. The new rhizome magnoflorine concentration was enhanced by Zn, but negatively affected by K. Zn and, to a small extent,

H+Al, positively affected the new and old rhizome magnoflorine content, respectively. Root magnoflorine content did not correlate with any of the measured variables. No regressions were calculated for the number of buds because all rhizomes in 2005 produced only one bud each.

#### 2.5.4. Wild ginger

Emergence of wild ginger was strongly affected by soil conditions: only 60% of the plants emerged in 2004, 50% in 2005 and 35% in 2006. BS had an important positive effect on emergence during the first year, whereas Na had a negative effect in the two subsequent years (Table 5, Fig. 6). The mean percentage of flowering in 2006 was  $9 \pm 12\%$ . Leaf area increased by  $230 \pm 366\%$  in two years. Variability in plant growth was very high in this species.

All growth variables were negatively affected by Al, except for the number of buds. Zn negatively affected root dry mass and, surprisingly, P affected negatively both root dry mass and leaf area. However, these relations appeared weak, based on visual assessment (Fig. 6). K positively influenced leaf area in 2004 and new rhizome growth in 2005. Aristolochic acid I and II concentration for the whole rhizome varied between 0 and  $0.196 \text{ mg g}^{-1}$  and 0 and  $0.011 \text{ mg g}^{-1}$ , respectively. None of the independent variables measured were correlated with the aristolochic acid I and II concentration, aristolochic acid II content of either the old or the new rhizome section, and aristolochic acid I content in the old rhizome section. However, rhizome essential oils responded to soil chemical composition. Old rhizome linalool concentration was positively affected by Al, whereas old rhizome linalool content increased with Mg, but decreased with the increase of OC and Cu. New rhizome linalool content decreased with Zn increase. New rhizome linalyl acetate concentration decreased with an increase in Na and its content decreased with an increase in Al and Fe. P had a negative impact on old rhizome methyleugenol concentration. BS had

a positive effect on the new rhizome methyleugenol content, whereas Na and Fe, in the new rhizome, and Al, in the old rhizome, decreased the content of methyleugenol. Light had a positive effect on plant growth (2005 and 2006 leaf area, root dry mass, new rhizome section dry mass, number of buds), and on aristolochic acid I content, linalool and linalyl acetate concentration and content, and methyleugenol content in the new rhizome section.

Table 2. Individual  $P$  values for the independent variables included in the model, and stepwise regression coefficient ( $R^2$ ) and  $P$  value of the stepwise regression model for each dependent variable of black cohosh.

Year	Dependent variable	Independent variables	Variable $P$ value	Model $R^2$	Model $P$ value
2004	Emergence	Mg	<0.0001	0.68	<0.0001
	Leaf area	Ca	0.0457	0.88	<0.0001
		Light	0.0106		
2005	Emergence	Na (-)	<0.0001	0.73	0.0002
		C/N (-)	0.0216		
	Leaf area	Light	0.0001	0.90	<0.0001
		pH <sub>w</sub>	0.0004		
		BS	0.0264		
		Na (-)	0.0045		
	Root dry mass	Al (-)	0.0001	0.78	<0.0001
		Light	0.0031		
	Old rhizome section dry mass	Zn (-)	0.0063	0.75	0.0001
		Al (-)	0.0388		
	New rhizome section dry mass	Al (-)	0.0262	0.86	0.0001
		Light	0.0007		
		pH <sub>w</sub>	0.0062		
		BS	0.0454		
	Number of buds	EC	0.0003	0.75	0.0001
		Light	0.0023		
	Old rhizome section triterpenoid concentration	-	-	-	-
		-	-	-	-
	New rhizome section triterpenoid concentration	-	-	-	-
		-	-	-	-
Old rhizome section triterpenoid content	Zn (-)	0.0219	0.32	0.0219	
	New rhizome section triterpenoid content	Light	<0.0001	0.90	<0.0001
Na (-)		0.0031			
pH <sub>w</sub>		0.0002			
H + Al (-)		0.0163			
2006	Emergence	Al (-)	0.0005	0.62	0.0018
		Ca (-)	0.0222		
	Leaf area	Al (-)	0.0027	0.89	<0.0001
		Light	0.0004		
		pH <sub>w</sub>	0.0024		
	H + Al (-)	0.0189			

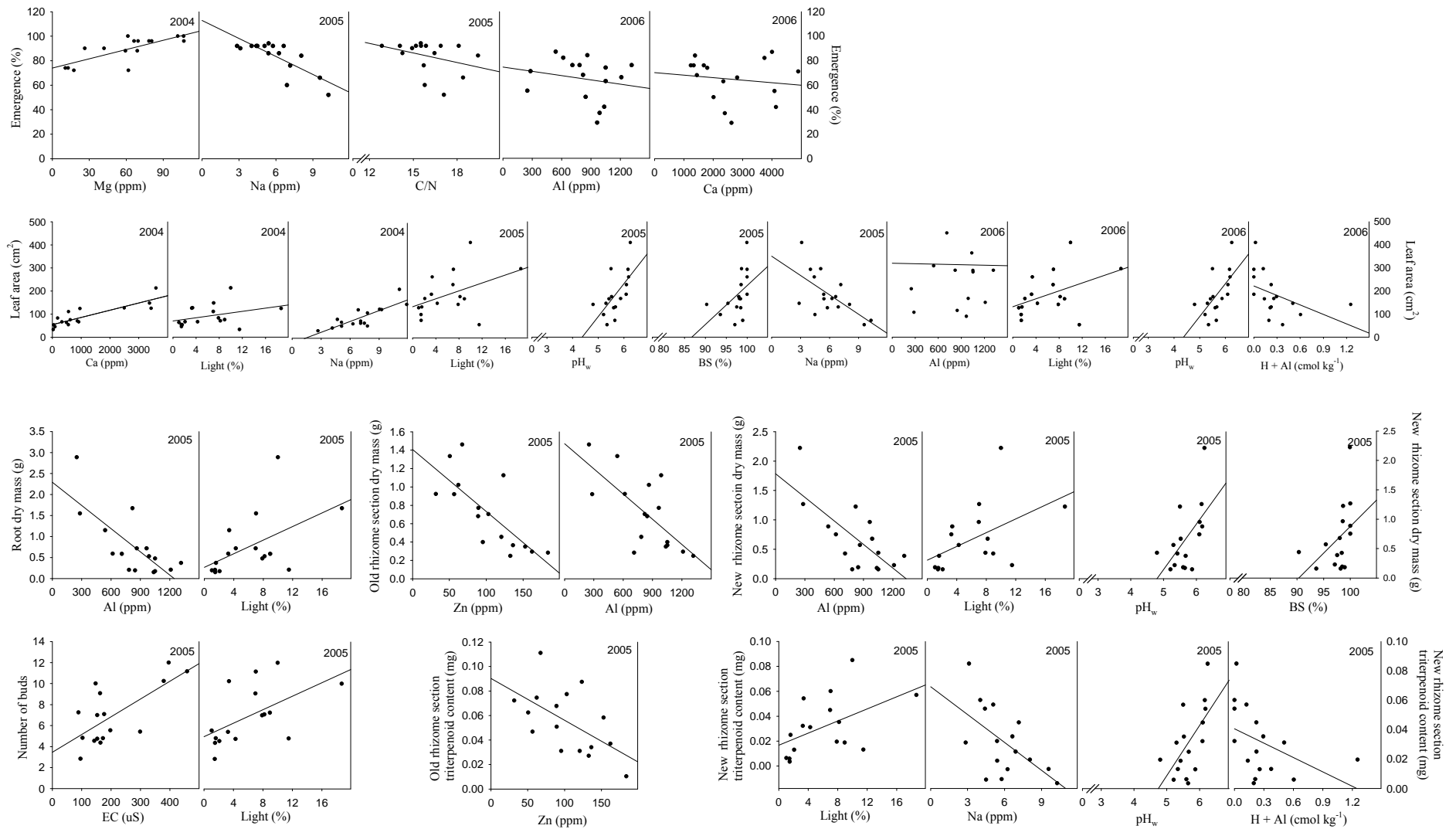


Figure 3. Soil and light characteristics that were included in the stepwise linear model (see Table 2) for each dependant variable of black cohosh in 2004, 2005 and 2006.



Table 3. Individual  $P$  values for the independent variables included in the model, and stepwise regression coefficient ( $R^2$ ) and  $P$  value of the stepwise regression model for each dependent variable of bloodroot.

Year	Dependent variable	Independent variables	Variable $P$ value	Model $R^2$	Model $P$ value
2004	Emergence	-	-	-	-
	Leaf area	BS	0.0019	0.81	<0.0001
2005	Emergence	Na (-)	0.0063	0.42	0.0063
	Leaf area	Light	0.0003	0.72	0.0002
		Zn (-)	0.0027		
	Root dry mass	Al (-)	0.0007	0.76	<0.0001
		Light	0.0009		
	Old rhizome section dry mass	Light	>0.0001	0.80	<0.0001
		Na (-)	0.0021		
	New rhizome section dry mass	Light	>0.0001	0.83	<0.0001
		pH <sub>w</sub>	0.0011		
	Number of buds	Light	<0.0001	0.79	<0.0001
		pH <sub>w</sub>	0.0012		
	Old rhizome section sanguinarine concentration	Light (-)	0.0014	0.65	0.0011
		CEC (-)	0.0158		
	New rhizome section sanguinarine concentration	Na	0.0270	0.58	0.0340
		Light (-)	0.0423		
	Old rhizome section sanguinarine content	Light	0.0372	0.27	0.0372
	New rhizome section sanguinarine content	Light	0.0014	0.65	0.0011
CEC		0.0158			
Old rhizome section chelerythrine concentration	-	-	-	-	
New rhizome section chelerythrine concentration	-	-	-	-	
Old rhizome section chelerythrine content	Light	0.0075	0.67	0.0029	
	Na (-)	0.0040			
	Mg	0.0492			
New rhizome section chelerythrine content	Light	0.0005	0.73	0.0002	
	Na (-)	0.0022			
2006	Emergence	Zn (-)	0.0006	0.88	<0.0001
		Ca	0.0010		
		Mg	0.0052		
		CEC	0.0138		
Leaf area	pH <sub>w</sub>	0.0073	0.51	0.0101	
	Light	0.0487			

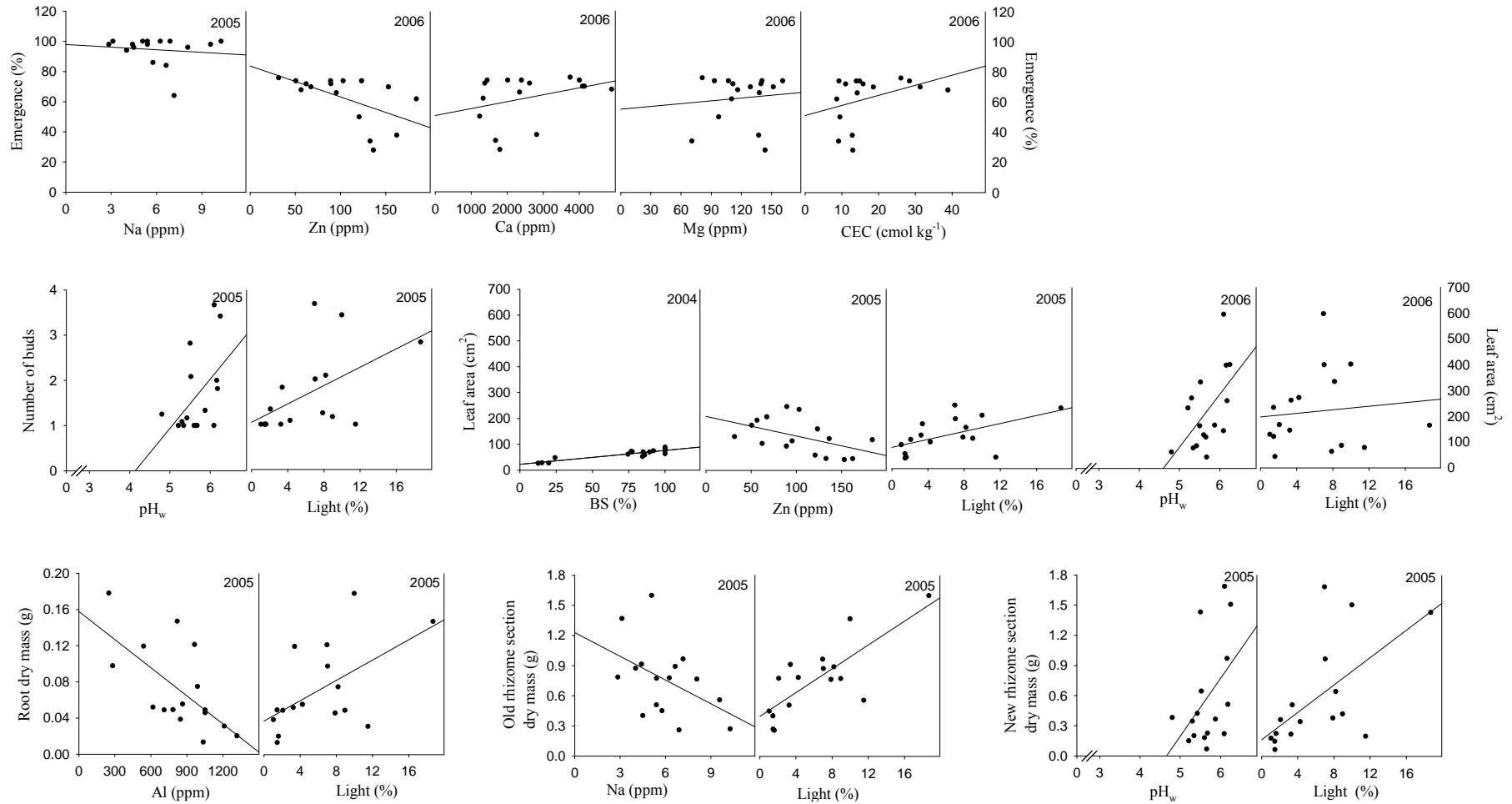


Figure 4. Soil and light characteristics that were included in the stepwise linear model (see Table 3) for each dependant variable of bloodroot in 2004, 2005 and 2006.

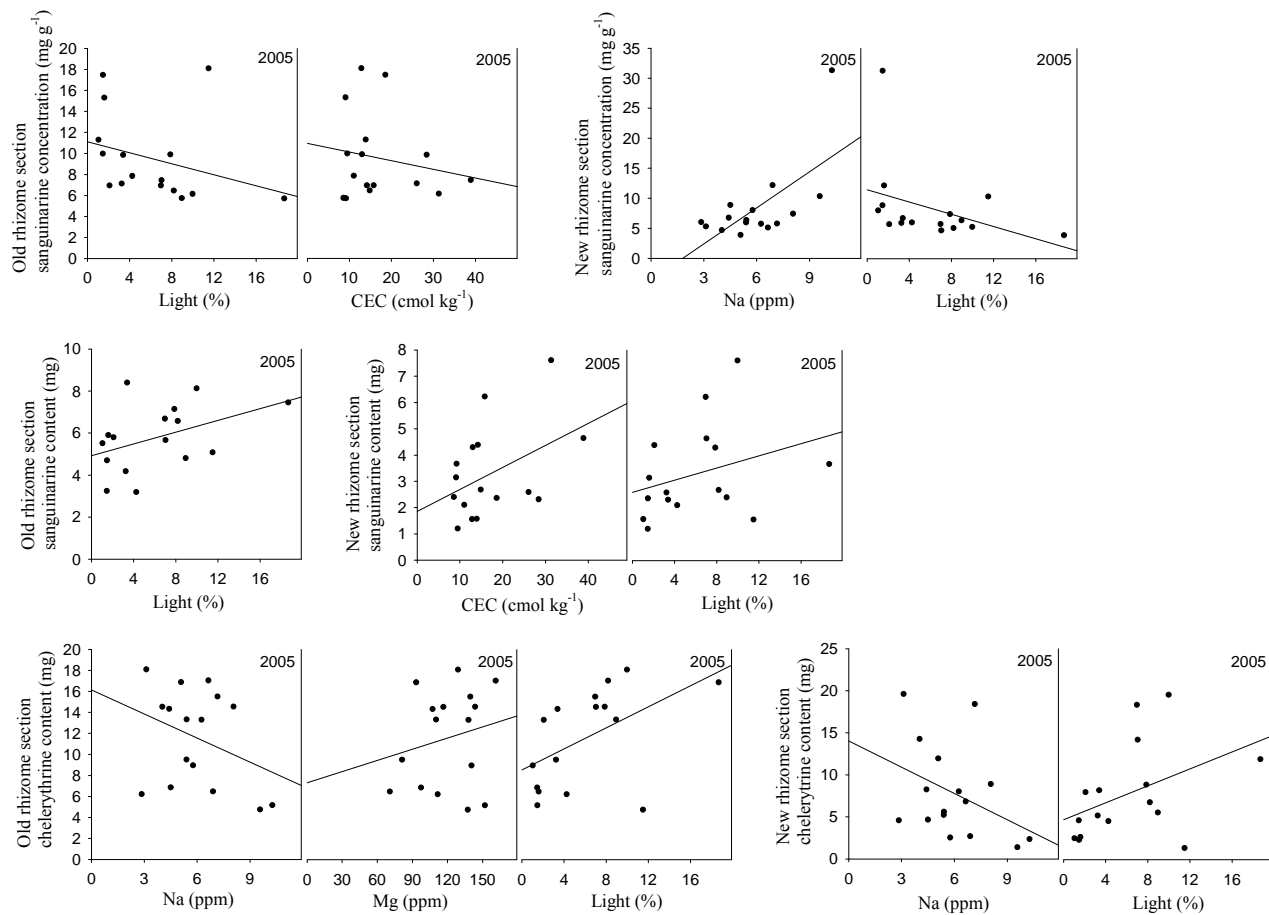


Figure 4. (Continued)

Table 4. Individual  $P$  values for the independent variables included in the model, and stepwise regression coefficient ( $R^2$ ) and  $P$  value of the stepwise regression model for each dependent variable of blue cohosh.

Year	Dependent variable	Independent variables	Variable $P$ value	Model $R^2$	Model $P$ value
2005	Emergence	Na (-)	0.0279	0.32	0.0279
	Leaf area	Fe (-)	0.0277	0.32	0.0277
	Root dry mass	Mg	0.0037	0.80	0.0004
		Ca (-)	<0.0001		
		pH <sub>w</sub>	<0.0001		
	Old rhizome section dry mass	Al	0.0005	0.77	0.0008
		Fe (-)	0.0082		
	New rhizome section dry mass	Mg	0.0380	0.51	0.0129
		Fe (-)	0.0049		
	Root magnoflorine concentration	Mg	0.0312	0.40	0.0008
		Na	0.008		
	Old rhizome section magnoflorine concentration	Al (-)	0.0032	0.57	0.0063
		BS (-)	0.0151		
	New rhizome section magnoflorine concentration (log)	Zn	0.0024	0.62	0.0030
		K (-)	0.0223		
Root magnoflorine content	-	-	-	-	
Old rhizome section magnoflorine content	Fe (-)	0.0018	0.61	0.0062	
	H + Al	0.0202			
New rhizome section magnoflorine content	Fe (-)	0.0051	0.52	0.0117	
2006	Emergence	Zn	0.0456	0.27	0.0457
	Leaf area	Ca (-)	0.0457	-	-

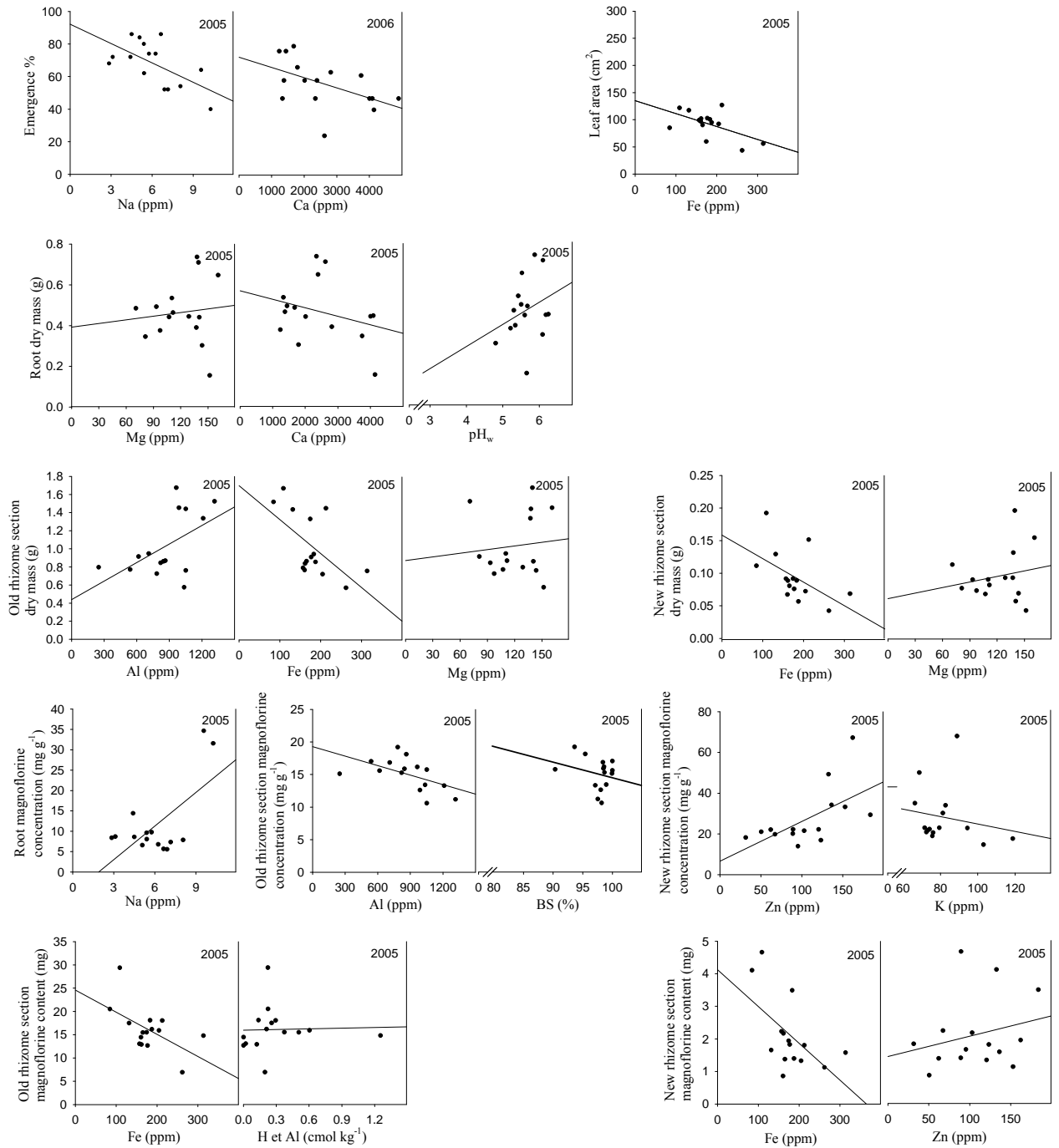


Figure 5. Soil and light characteristics that were included in the stepwise linear model (see Table 4) for each dependant variable of blue cohosh in 2005 and 2006.

Table 5. Individual  $P$  values for the independent variables included in the model, and stepwise regression coefficient ( $R^2$ ) and  $P$  value of the stepwise regression model for each dependent variable of wild ginger.

Year	Dependent variable	Independent variables	Variable $P$ value	Model $R^2$	Model $P$ value
2004	Emergence	BS	<0.0001	0.72	<0.0001
	Leaf area	Al (-) K	0.0005 0.0109	0.85	<0.0001
2005	Emergence	Na (-)	0.0006	0.58	0.0006
	Leaf area	Al (-)	<0.0001	0.93	<0.0001
		Light	<0.0001		
		P (-)	0.0044		
	Root dry mass	H + Al (-)	0.0297	0.94	<0.0001
		Light	<0.0001		
		Al (-)	0.0010		
		Zn (-)	0.0069		
	Old rhizome section dry mass	P (-)	0.0122	0.33	0.0323
		Al (-)	0.0323		
	New rhizome section dry mass	Light	<0.0001	0.87	<0.0001
		Al (-)	<0.0001		
	Number of buds	K	0.0342	0.91	<0.0001
		Light	<0.0001		
		Na (-)	<0.0001		
	Old rhizome section AA1 concentration	Mg	0.0274	-	-
	New rhizome section AA1 concentration	-	-	-	-
	Old rhizome section AA1 content	-	-	-	-
	New rhizome section AA1 content	Light	0.0041	0.58	0.0077
		EC	0.0430		
Old rhizome section AA2 concentration	-	-	-	-	
New rhizome section AA2 concentration	-	-	-	-	
Old rhizome section AA2 content	-	-	-	-	
New rhizome section AA2 content	-	-	-	-	
Old rhizome section linalool concentration (log)	Al	<0.0001	0.72	<0.0001	
New rhizome section linalool concentration	Light	<0.0001	0.73	<0.0001	

Table 5. (Continued)

Year	Dependent variable	Independent variables	Variable <i>P</i> value	Model <i>R</i> <sup>2</sup>	Model <i>P</i> value
2005	Old rhizome section linalool content (sqrt)	Mg	0.0001	0.79	0.0011
		OC (-)	0.0032		
		Cu (-)	0.0274		
	New rhizome section linalool content	Light	<0.0001	0.89	<0.0001
		Zn (-)	0.0034		
	Old rhizome section linalyl acetate concentration	-	-	-	-
	New rhizome section linalyl acetate concentration	Light	<0.0001	0.80	0.0001
		Na (-)	0.0015		
	Old rhizome section linalyl acetate content	-	-	-	-
	New rhizome section linalyl acetate content	Light	<0.0001	0.94	<0.0001
		Al (-)	<0.0001		
		Fe (-)	0.0083		
	Old rhizome section methyleugenol concentration	P (-)	0.0366	0.32	0.0366
	New rhizome section methyleugenol concentration	-	-	-	-
Old rhizome section methyleugenol content	Al (-)	0.0267	0.35	0.0267	
New rhizome section methyleugenol content	Light	<0.0001	0.98	<0.0001	
	Na (-)	<0.0001			
	BS	0.0003			
	Fe (-)	0.0409			
2006	Emergence	Na (-)	0.0066	0.42	0.0066
	Leaf area	Light	0.0011	0.88	0.0016
Al (-)		0.0037			

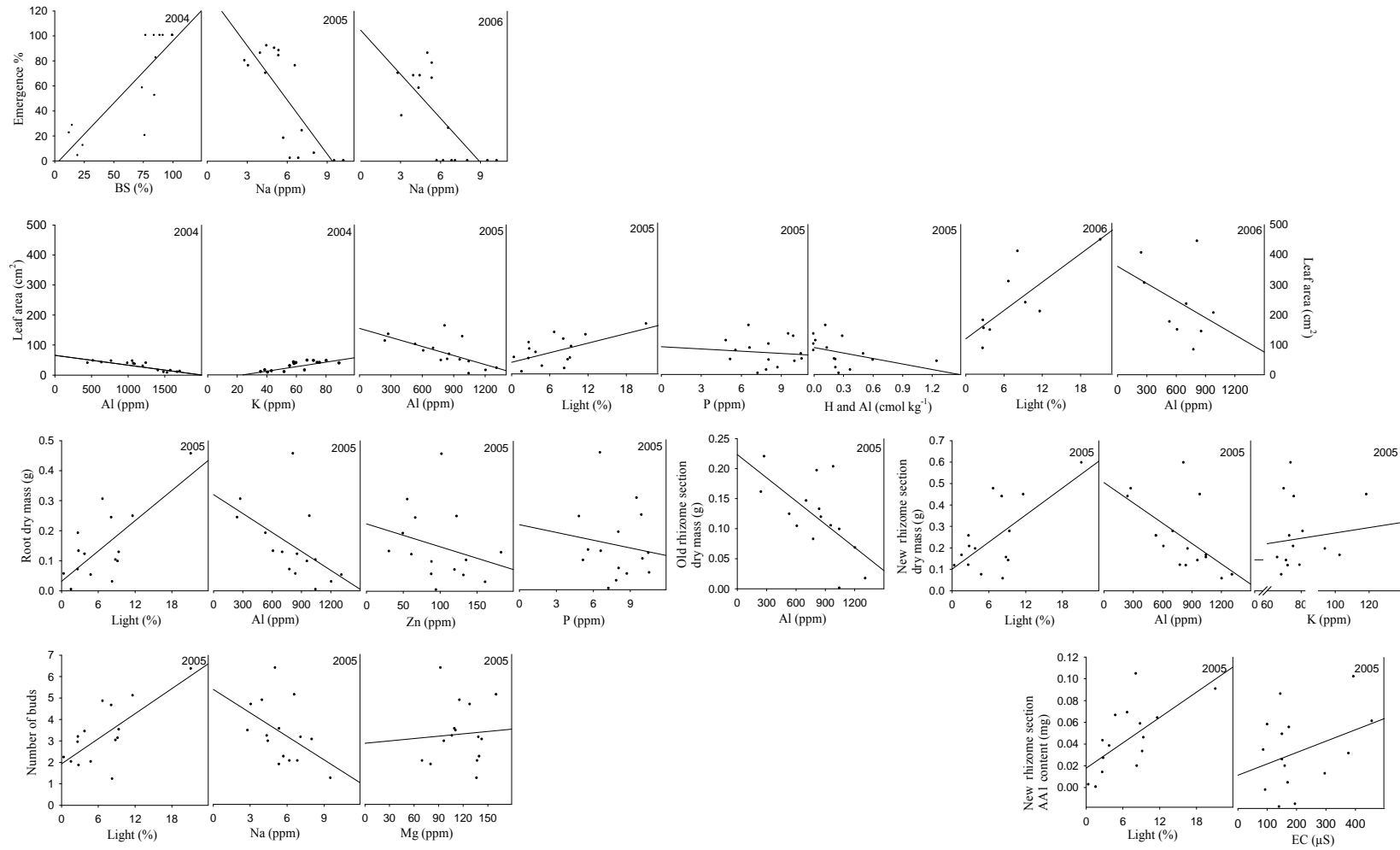


Figure 6. Soil and light characteristics that were included in the stepwise linear model (see Table 5) for each dependant variable of wild ginger in 2004, 2005 and 2006.



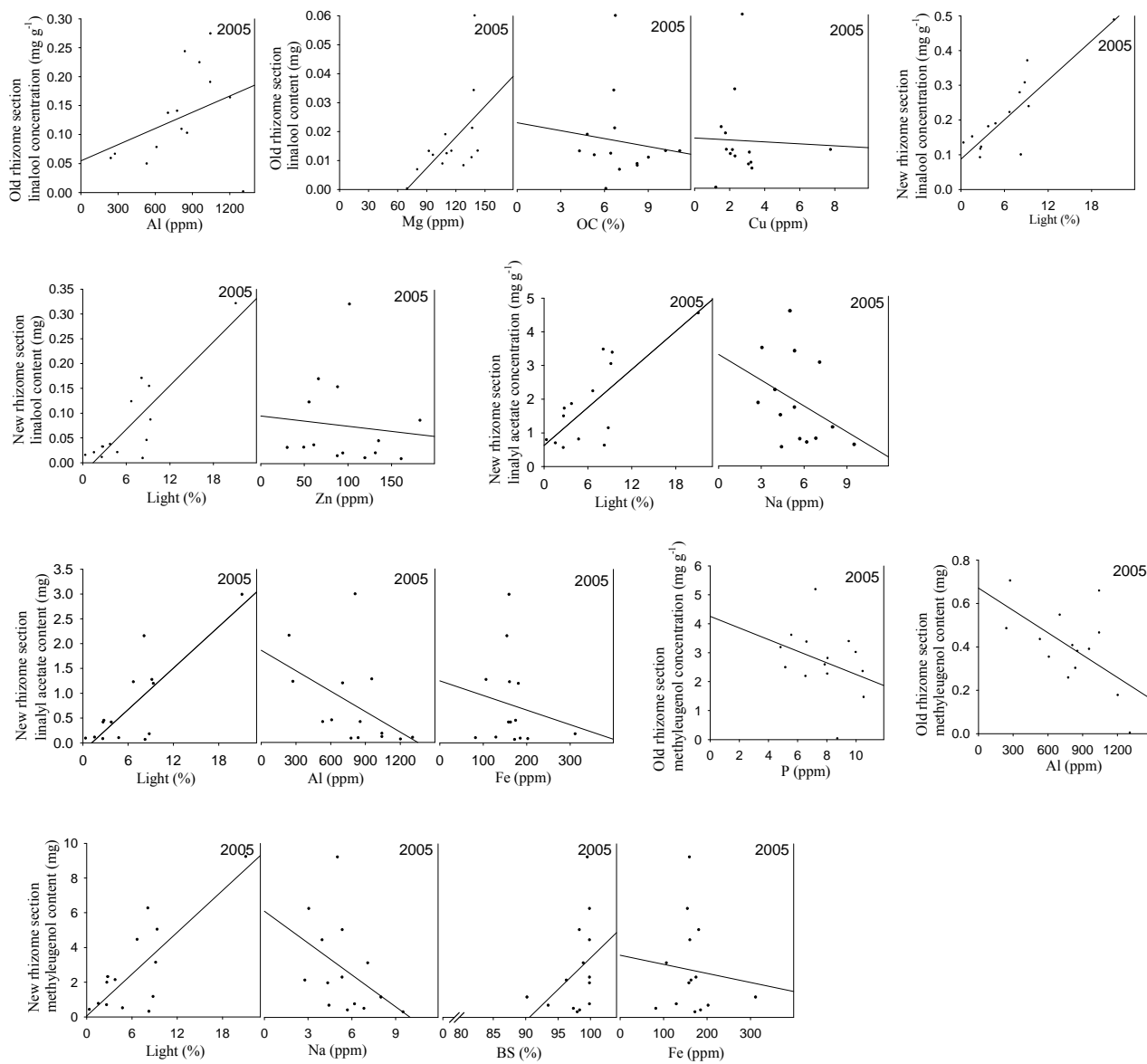


Figure 6. (Continued)

### 3.1. Discussion

#### 3.1.2. Light effects

In accordance with the results obtained by McCoy et al. (2007), increase in light availability favored the growth of both above and underground parts of black cohosh. This species seems to tolerate full sun although it naturally grows under partial shade (Small and Catling, 2000; Cech, 2002; Persons and Davis, 2005). Light also had a major and positive impact on the growth of all plant parts of bloodroot. This is in agreement with the results of Marino et al. (1997). In the present study, the highest growth was observed under light levels of 8 to 12% of the full daylight. Although much higher light levels have been reported as optimal by others (Marino et al., 1997; Persons and Davis, 2005), one should mention that some of these studies were done in greenhouses where plants are watered regularly, which might allow them to tolerate higher irradiances than in a forest farming system. Light also positively influenced wild ginger growth. This is in accordance with previous data showing that this species can grow well under light levels representing 20% of the full daylight (Persons and Davis, 2005). However, light availability had no significant effect on blue cohosh growth. In our study, blue cohosh tolerated light intensities as high as 16%, in accordance with Persons and Davis (2005) who mentioned that it may even grow under light levels as high as 25% of the full daylight, although it would prefer closed canopy (Cech, 2002).

### 3.1.3. Soil effects

#### 3.1.3.1. Soil acidity

The soils of our experimental sites, especially the orthic dystic brunisol at St-Étienne-de-Bolton, are acidic (Soil Classification Working Group, 1998). Maple forest decline caused by low soil  $\text{pH}_w$  and nutritional deficiencies have been reported in the region where the present study was conducted (Ouimet and Camiré, 1995). Al becomes soluble at low  $\text{pH}_w$  and can be responsible for many of the low  $\text{pH}_w$  effects observed in plants (Yamamoto et al., 2003; Ma, 2005). In fact, the impact of the low soil  $\text{pH}_w$  might be partly explained by the negative impact of Al.

In black cohosh, emergence and many growth variables were negatively correlated with Al. A better growth was observed at  $\text{pH}_w$  above 6 although, according to Person and Davis (2005), black cohosh would have an optimal growth at  $\text{pH}_w$  between 5 and 6. The fact that twelve of our sixteen plots of black cohosh had a soil  $\text{pH}_w$  under 5 during the first year of growth probably affected rhizome mass production despite the application of lime that increased the soil  $\text{pH}_w$  in 2005. After two years of growth, the fresh rhizome mean mass was only 6 g per individual (data not shown), which is very far from the fresh rhizome mean mass of 200 g obtained by Cech (2002) after three years of growth in an agroforestry system without fertilisation. Shorter growth season and cooler temperatures in Québec than in Oregon might also partly explain these differences.

Bloodroot plants were the first ones to exhibit symptoms related to low soil  $\text{pH}_w$  in spring 2004. Bud, rhizome and leaf production were higher at soil  $\text{pH}_w$  around 6 (Fig. 4). An optimal soil  $\text{pH}_w$  between 5 and 7 has been reported for this species (Cech, 2002; Pradiou 2004; Persons and Davis, 2005). Contrary to the other species of the present study, bloodroot appears to be little affected by Al, except for its root mass. This could be due to the fact that soil Al concentrations in our plots were inferior to those measured in sites where bloodroot grows naturally (Pradiou, 2004). It appears that bloodroot recovered better from symptoms of low  $\text{pH}_w$  than wild ginger and black cohosh after lime application, as

visual impact of low soil  $\text{pH}_w$  was mostly present during its first year of growth (J. Naud, pers. obs.). The fact that bloodroot has much larger rhizomes and thus more carbohydrate reserves than wild ginger could explain its better survival in plots with low pH at the beginning of the experiment.

Low soil  $\text{pH}_w$  also affected the root system of blue cohosh. Although this species appears to be more tolerant than the other three species to acidic soil  $\text{pH}_w$  and would grow naturally in soil  $\text{pH}_w$  of 4.5 to 5 (Pradieu, 2004; Persons and Davis, 2005), it has been reported to grow better in a soil  $\text{pH}_w$  near 6 (Cech, 2002; Persons and Davis, 2005). Wild ginger growth was also stressed indirectly by  $\text{pH}_w$  since it was strongly affected by the presence of Al (Yamamoto et al., 2003; Ma, 2005). Although emergence was not affected by either the pH or Al, plots with low pH had high mortality rates following the initial emergence in 2004 (data not shown). Lamoureux (2002) and Persons and Davis (2005) indicated that wild ginger can grow in soil  $\text{pH}_w$  as low as 4.5. However, Pradieu (2004) reported that natural populations in the Eastern Townships are found in soils whose  $\text{pH}_w$  is close to 6, while Dostie (2006) observed a better growth at  $\text{pH}_w$  7 than at lower  $\text{pH}_w$ . In natural sites, Al concentrations were reported to be lower than 1050 ppm and maximum content of H+Al was  $0.01 \text{ cmol kg}^{-1}$  (Pradieu, 2004). Half of our plots had Al concentrations between 1200 and 1715 ppm and twelve out of the sixteen had H+Al between 0.8 and  $3 \text{ cmol kg}^{-1}$  in 2004. The results of the present study indicate that wild ginger growth was very sensitive to low soil  $\text{pH}_w$  and high Al concentration that disturb both aboveground and belowground growth. Such sensitivity to low pH could explain the high variability in plant growth observed in this species.

Blue cohosh seems very sensitive to Fe since this element had a negative impact on many of its growth variables. Extractable Fe concentrations were high in the experimental sites (Soil Classification Working Group, 1998). It is well documented that the reduction in  $\text{pH}_w$  increases the solubilization of Fe, making it available to the roots (Hinsinger et al., 2003; Rattan et al., 2005). However, it is difficult to establish the level at which Fe becomes toxic since it varies with species (Snowden and Wheeler, 1993). Thus, despite its general tolerance to low soil  $\text{pH}_w$ , blue cohosh appears to be sensitive to Fe toxicity. Another

element solubilized at low  $\text{pH}_w$  and becoming toxic at  $\text{pH}_w$  lower than 5 is Zn (Robson, 1994; Rattan et al., 2005). It had negative effects on black cohosh, wild ginger and bloodroot. However, no publication has reported any problem of Zn phytotoxicity under natural concentration, even at low  $\text{pH}_w$ , and the concentrations reported here are not in the high range of Zn concentrations reported in top soils in the US (Robson, 1994). Further studies are needed to determine if natural high Zn levels could be toxic for these species.

### 3.1.3.2. Soil richness

Ca had a weak negative effect on emergence of black cohosh, but a positive effect on its leaf area as well as on emergence of bloodroot. This rather limited impact of Ca is somewhat surprising since it has been suggested that the main impact of liming on growth of many understory plants could be through the increase in Ca availability (Palta, 1996; Nadeau et al., 1999; Ritchey and Schumann, 2005). Wild ginger, similarly to American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) (Van der Voort, 1998; Nadeau and Olivier, 2003), has been reported to prefer soils with a high Ca content (Pradieu, 2004). Ca, whose deficiency in the soils of the south of Québec has been reported (Côté et al., 1995; Ouimet and Camiré, 1995; Ouimet et al., 1996), could have a greater impact on ginseng (*Panax quinquefolium*) growth than soil  $\text{pH}_w$  (Nadeau et al., 1999). Therefore, although pH appears to have a stronger influence than Ca on the survival and growth of the species of our study, the strong correlation observed between soil pH and Ca concentration, and results from other authors for similar species, suggests that a significant role of Ca cannot be ruled out at this point.

Among the macronutrients, Mg appears to be the most important for the species of the present study since they all responded positively to its concentration in the soil. In blue cohosh, it was the only cation that positively affected belowground biomass. Liming do increase the concentration of Mg in the soils (Pagé et al., 1990; Côté et al., 1995), and could thus have a beneficial role not only by increasing the  $\text{pH}_w$ , but also as a fertilizer. K

had a positive effect on wild ginger growth but not on any other species. Soil K concentrations of both sites were low (Doucet, 1994), suggesting that wild ginger might require an input of K at least in low K soils.

The fact that the plants of our study so strongly reacted to Na is surprising, since no paper evokes any particular sensibility of these species at the concentration levels found in the study sites. Saline stress would be noticeable on non saline species at concentrations between 1150 and 2895 ppm (Saquib et al., 2006; Shabala et al., 2006), which are much higher than those reported here or elsewhere in southern Quebec (Bernier and Brazeau, 1988b; Pradiou, 2004). Thus, it seems that the Na concentrations at the two sites were too low to induce saline stress. Correlations of growth variables with Na are probably non causal. It is known that multivariate models may produce some bias often associated with independent variable collinearity (Graham, 2003). The negative effect of P on foliar and root growth of wild ginger is also difficult to explain. P foliar deficiency has been found in some maple forests of Québec and Ontario (Adams and Hutchinson, 1992; Bernier and Brazeau, 1988a), but a negative effect of P has never been reported, at least under natural low ranges.

For all species, there were less growth variables that were correlated with soil richness (K, Mg, Ca, C/N, BS and CEC) than with either light or acidity related elements ( $\text{pH}_w$ , Al, Al+H, Zn, Fe). These plants thus appear to be more sensitive to the toxicity effects of low soil  $\text{pH}_w$  than to the reduced nutrient availability caused by low  $\text{pH}_w$ . Low  $\text{pH}_w$  decreases the solubility of many important cations (Ca, Mg, K) (Doucet, 1994; Fageria, 1998) and can even restrain the absorption of calcium by roots (Lawrence et al., 1995; Ma, 2005). Nevertheless, a few growth variables in black cohosh, wild ginger and bloodroot were affected by BS, CEC or EC, which are different measures of cation availability. According to Doucet (1994), a BS higher than 85%, as was the case for all the plots in 2005 but not in 2004, is considered as very high. The mean BS found in the soils where wild ginger and bloodroot grow naturally in Québec were 99.88% and 89.07%, respectively (Pradiou, 2004). Thus, the low BS in 2004 might have weakened the plants by inducing nutrient deficiencies, rendering them more vulnerable to low soil pH and high Al concentrations.

C/N ratio did not appear to be an important factor in the survival and growth of the four species studied.

#### 3.1.4. Active component yield

There was a very limited impact of growth conditions on the concentration of the different active components in the four species under study. For some of the active components such as black cohosh triterpenoid concentration and wild ginger aristolochic acid I and II concentrations, there was even no correlation with any factor. It is worth noting that the highest aristolochic acid I concentration measured in this experiment is close to the mean measured in *Aristolochia mashuriensis* Kom., which has been shown to have nephrotoxic effects (Zhou et al., 2006; Nortier and Vanherweghem, 2007). The total content of most active components was thus influenced by the same variables that influenced rhizome biomass.

Linalool concentration, and linalyl acetate and methyleugenol content, reached maximum values at intermediate Al concentrations, supporting the recent model of Stamp (2003) that suggests highest secondary metabolite production at intermediate levels of stress. However, an increase in light would be more appropriate to increase essential oil yield than an intermediate level of Al, since light increased essential oil concentrations without having any negative effects on wild ginger growth. In a previous study, Bélanger et al. (2007a, 2007b) found that wild ginger linalyl acetate concentration and essential oil content were positively affected by increased light availability. Positive effect of light on ginsenosid content in both American ginseng and Asian ginseng (*Panax ginseng* C. Meyer), two other understory plants, has also been reported (Fournier et al., 2003).

In bloodroot and blue cohosh, active component concentrations were positively correlated with factors that negatively affected growth. Factors such as Zn, Na, low BS, low CEC and

low light availability favoured active component concentrations. A compromise between plant growth and active component production has already been reported (Hamilton et al., 2001; Stamp, 2003; Campbell et al., 2007). Salmore and Hunter (2001) observed a decrease in sanguinarine concentration with an increase in light or with mineral fertilisation, both being known to increase plant growth in this species (Marino et al. 1997). Nevertheless, the content in sanguinarine, chelerythrine and magnoflorine were influenced by the same variables as rhizome mass, emphasising the positive role of good growing conditions on the overall production of active components in both bloodroot and blue cohosh. In fact, it appears that what maximises growth in the four species of the present study also maximises their active component yield. It seems that concentration of these active components might either be mainly under genetic control, present low plasticity, or that growth conditions were stressful enough to induce active component synthesis with limited impact on plant growth (Stamp, 2003).

### 3.1.5. Conclusion

Soil pH had a strong effect on the survival and growth of the four species. However, they appeared to be more affected by some toxicity effects related to low  $pH_w$  than by nutrient deficiencies, suggesting that fertilisation might not have a strong effect on their growth. However, lime addition in acidic soils for increasing the soil  $pH_w$  would be beneficial to these species. For three of the species, increase in light availability had a beneficial effect on their growth, while the other, blue cohosh, was not affected by light. However, the dynamic nature of gaps might make it difficult to maintain high light conditions on the long run over the cultivated plots. Moreover, the increase of light intensity reaching the forest floor resulted in intensive weeding due to sun-loving species invasion (e.g. raspberry). Finally, in the environmental conditions in which our species were studied, we observed few effects of soil and light conditions on the concentration of active components and, consequently, their contents were generally affected by the same variables that affected



rhizome biomass. It can thus be concluded that soil  $\text{pH}_w$  needs to be taken into account when choosing sites for the establishment of these four species and that more open forests or young plantations would increase both biomass and active component yield for all of the species except blue cohosh.

### 3.1.6. Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the owners of the forests where the study was carried out, the Goyer and Brunelle families. Thanks to Dr. Paul Anger for allowing us to use his laboratory equipment to carry out the analyses of active components. Thanks to Isabelle Nadeau and Souad Bouchiba for their technical support, and Amélie Collard and Olivier Larouche for their field and laboratory assistance. We would like to thank the Laboratoire de diagnostique en phytoprotection for identifying the insect larvae species on the black cohosh leaves. This study was funded by the Conseil de Recherches en Pêche et en Agroalimentaire du Québec (CORPAQ) and the Fonds québécois de recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) through the Actions concertées program.

## Conclusion générale

L'utilisation de plantes forestières d'intérêt médicinal dans l'industrie des produits de santé naturels est en constante croissance (Lamoureux et Nantel, 1999; Small et Catling, 2000). Ces espèces ne sont encore que trop peu cultivées (Lamoureux et Nantel, 1999), ce qui a comme conséquence de menacer les populations naturelles, puisque leur cueillette reste encore le moyen le plus rentable d'approvisionner l'industrie. C'est d'ailleurs pour cette raison que les espèces de notre étude se trouvent soit dans la CITES, soit dans la liste des plantes menacées ou vulnérables du Québec (Gazette officielle du Québec, 2004). La culture de ces plantes en système agroforestier est une solution possible à ce problème, mais le développement de techniques culturales appropriées est nécessaire pour qu'elle devienne rentable.

Ce projet de recherche s'insère dans un programme de recherche plus vaste d'abord financé par le Conseil des recherches en pêche et en agroalimentaire du Québec (CORPAQ), puis par le Fonds québécois de recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) via son programme d'Actions concertées. Les premiers projets visaient à mieux comprendre la biologie des espèces sélectionnées, à développer des techniques de propagation et de culture adaptées à ces espèces et à tester en serre l'impact de certaines conditions du milieu sur leur croissance et la production de composés actifs. Ces projets précédemment terminés ont permis d'en arriver à la présente étude qui visait l'implantation en culture agroforestière de plusieurs espèces forestières à croissance lente. Plus précisément, l'étude visait à étudier l'effet de la chimie du sol et de la lumière incidente sur leur survie, leur croissance et leur rendement en composés actifs.

La culture forestière à partir de sections de rhizomes a permis de montrer que toutes les espèces étaient capables de s'enraciner et survivre dans ces conditions, mais que le pH et l'aluminium du sol devaient être pris en considération pour un rendement optimal. Tel que montré par Dostie (2006), les résultats de cette étude confirment que les espèces étudiées

peuvent difficilement être cultivées dans des forêts dont le sol est acide (pH de 4 ou moins), sans un chaulage adéquat pour en augmenter le pH. Des pH plus élevés (pH 5 à pH 7) semblent plus appropriés à la culture de ces espèces. En ce qui a trait à la lumière, toutes les espèces étudiées ici semblent pouvoir croître sous des niveaux d'irradiance typiques des petites trouées, ce qui concorde avec les résultats de Dostie (2006). Cependant, mis à part le caulophylle faux-pigamon, ces espèces pourraient croître sous des intensités de lumière encore plus fortes que celles atteintes dans cette expérience puisque nous n'avons pas observé de phénomène de saturation de la croissance en fonction de la disponibilité de la lumière. L'influence des conditions environnementales étudiées sur la teneur en composés actifs a été beaucoup plus modeste que prévue puisque seules la teneur en sanguinarine et de certaines composantes des huiles essentielles de l'asaret se sont révélées corrélées de façon évidente avec la lumière. Mais puisque la croissance n'a pas plafonné aux niveaux maximums de lumière présents dans les trouées, il se pourrait que ces niveaux de lumière n'aient pas été assez élevés pour causer un stress et avoir un effet significatif sur la teneur en composés actifs. Les pH acides et la toxicité de certains éléments minéraux qu'ils entraînent n'ont pas eu non plus beaucoup d'effets sur la teneur en composés actifs. De ce fait, les variables qui influençaient positivement la croissance ont aussi favorisé l'augmentation du contenu en composés actifs.

La variabilité génotypique d'une population naturelle à une autre pourrait aussi influencer la production de composés actifs, et une étude toujours en cours devrait permettre de mieux sélectionner la source des boutures pour optimiser la teneur en composés actifs. Ce sujet constitue en fait la dernière étude du programme de recherche. Par ailleurs, il serait intéressant de tester l'effet de l'ajout de plusieurs types de paillis ainsi que d'un plus grand gradient d'intensité de lumière incidente. En premier lieu, l'ajout de paillis pourrait permettre de réduire la fréquence de désherbage, d'améliorer la rétention de l'humidité du sol, mais aussi d'évaluer son impact sur l'apparition probable de maladies fongiques. En second lieu, un plus grand gradient de lumière permettrait de déterminer le pourcentage de lumière où la croissance de chaque espèce est maximale, ainsi que de confirmer ou infirmer son effet sur la teneur des composés actifs. Dans la présente étude, les effets du pH et du calcium semblent être confondus l'un à l'autre. Tester séparément leur impact sur la

croissance des plantes à l'étude permettrait de savoir s'il serait possible de les cultiver en sol plus acide avec seulement un apport en calcium tel que déjà montré chez le ginseng (Nadeau et al., 1999). De plus, tester plus à fond l'effet du pH permettrait de vérifier si certains minéraux, tels que le fer, le sodium et le zinc, ont réellement un impact sur la croissance de ces espèces. Finalement, une étude économique des coûts et bénéfices reliés à l'implantation de boutures de ces espèces, comparés à ceux de leur ensemencement, puis leur comparaison avec ceux de la plantation sous ombrière, permettrait de déterminer la méthode de culture la plus rentable.

Afin de faire un premier pas vers la culture des espèces médicinales et ornementales que sont la sanguinaire, l'asaret, le caulophylle faux-pigamon et l'actée à grappes noires, nous avons souhaité tester la capacité de croissance en culture agroforestière de ces espèces canadiennes à partir de boutures. Ainsi, nous sommes déjà en mesure de proposer aux acériculteurs et propriétaires de forêts intéressés une régie de culture générale. Cependant, il reste encore plusieurs facteurs à étudier pour optimiser la culture de ces espèces.

## Références citées

- Adams, C.M., Hutchinson, T.C., 1992. Fine-root growth and chemical composition in declining central Ontario sugar maple stands. *Can. J. Forest Res.* 22, 1489–503.
- Afifi, A., Clark, V.A., May, S., 2004. *Computer-aided multivariate analysis* (4th Edition). Chapman & Hall/CRC, New York, 489 pp.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2008. “Zones de rusticité des plantes au Canada” Agriculture et Agroalimentaire Canada. Ottawa, Ontario, Canada. <http://sis.agr.gc.ca/siscan/nsdb/climate/hardiness/intro.html> (Page consultée le 29 janvier 2009).
- Ahmad N., Gupta S., Husain M.M., Heiskanen K.M., Mukhtar H., 2000. Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clin.*
- Almeida-Cortez, J.S., Shipley, B. et Arnason, J.T., 1999. Do plant species with high relative growth rates have poorer chemical defences? *Funct. Ecol.* 13, 819–827.
- Almeida-Cortez, J.S., Shipley, W., 2002. No significant relationship exists between seedling relative growth rate under nutrient limitation and potential tissue toxicity. *Funct. Ecol.* 16, 122–127.
- Amacher, M.C., Henderson, R.E., Breithaupt, M.P., Seale, C.L., LaBauve, J.M., 1990. Unbuffered and buffered salt methods for exchangeable cations and effective cation-exchange capacity. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54, 1036–1042.
- Arlt, V.M., Stiborova, M., Schmeiser, H.H., 2002. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis* 17, 265–277.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 1998. *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, New York, 668 pp.
- Battaglia, M.A., 2000. The influence of overstory structure on understory light availability in a longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) forest. M.Sc. Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia, 26 pp.

- Bazzaz, F.A., Chiariello, N.R., Coley, P.D., Pitelka, L.F., 1987. Allocating resources to reproduction and defense. *BioScience* 37, 58–67.
- Beaudet, M., Messier, C., Leduc, A., 2004. Understorey light profiles in temperate deciduous forests: recovery process following selection cutting. *J. Ecol.* 92, 328–338.
- Beaudet, M., Brisson, J., Gravel, D., Messier, C., 2007. Effect of a major canopy disturbance on the coexistence of *Acer saccharum* and *Fagus grandifolia* in the understorey of an old-growth forest. *J. Ecol.* 95, 458–467.
- Bélanger, A., Boudreau, F., Mainguy, L., 2007a. Variation de la composition de l'huile essentielle d'*Asarum canadense* cultivé sous canopée forestière. Proceedings of the 10th North American Agroforestry Conference, Québec, Québec, Canada, June 10–13, p.349–355.
- Bélanger, A., Boudreau, F., Mainguy, L., Langlais, G., Tardif, M., 2007b. Culture de l'asaret du Canada en vue de la production d'huile essentielle. Proceedings of the 10th North American Agroforestry Conference, Québec, Québec, Canada, June 10–13, p.343–348.
- Bennett, B.C., Bell, C.R., Boulware, R.T., 1990. Geographic variation in alkaloid content of *Sanguinaria canadensis* (Papaveraceae). *Rhodora* 92, 57–69.
- Berenbaum, M.R., 1995. The chemistry of defense: theory and practice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2–8.
- Bernier, B., Brazeau, M., 1988a. Nutrient deficiency symptoms associated with sugar maple dieback and decline in the Quebec Appalachians. *Can. J. Forest Res.* 18, 762–767.
- Bernier, B., Brazeau, M., 1988b. Magnesium deficiency symptoms associated with sugar maple dieback in a Lower Laurentians site in southeastern Quebec. *Can. J. Forest Res.* 18, 1265–1269.
- Beyfuss, R.L., 2000. Soil nutrient characteristics of wild ginseng populations in New York, New Jersey, Maine & Tennessee. Proceedings of american ginseng production in the 21st century. Cornell Cooperative Extension of Greene County, Cairo, NY.

- Boardman, N.K., 1977. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28, 355-377.
- Bolle, P., Mastrangelo, S., Perrone, F., Evandri, M.G., 2007. Estrogen-like effect of a *Cimicifuga racemosa* extract sub-fraction as assessed by *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* assays. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 107, 262–269.
- Borelli, F., Izzo, A.A., Ernst, E., 2003. Pharmacological effects of *Cimicifuga racemosa*. *Life Sci.* 73, 1215–1229.
- Borelli, F., Izzo, A.A., Ernst, E., 2008. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) for menopausal symptoms: A systematic review of its efficacy. *Pharmacol. Res.* 58, 8–14.
- Bradley, P.R., 1992. *British Herbal Compendium, Volume 1*. B.H.M. Association, London, 239 pp.
- Bryant, J.P., Chapin F.S. III, Klein, D.R., 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* 40, 357–368.
- Campbell, S., Affolter, J., Randle, W., 2007. Spatial and temporal distribution of the alkaloid sanguinarine in *Sanguinaria canadensis* L. (Bloodroot). *Econ. Bot.* 61, 223–234.
- Canham, C.D., Denslow, J.S., Platt, W.J., Runkle, J.R., Spies, T.A., White, P.S., 1990. Light regimes beneath closed canopies and tree-fall gaps in temperate and tropical forests. *Can. J. Forest Res.* 20, 620–631.
- Cardoso, I.M., Kuyper, T.W., 2006. Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agric. Ecosyst. Environ.* 116, 72–84.
- Cavallito, C.J., Bailey, J.H., 1946. Antibacterial substances from *Asarum canadense*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc.* 68, 489–492.
- Cech, R.A., 2002. *Growing at-risk medicinal herbs: Cultivation, Conservation and Ecology*. Horizon Herbs, Williams, Oregon, 314 pp.

- Chazdon, R.L., Pearcy, R.W., 1986. Photosynthetic response to light variation in rain forest species. Carbon gain and photosynthetic efficiency during lightflecks. *Oecologia* 69, 524-531.
- Chazdon, R.L., Pearcy, R.W., 1991. The importance of sunflecks for forest understorey plants. *Bioscience* 41, 760–766.
- CITES, 2001. Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Extract federal register (Unites States of America) PC11 Inf. 5. Eleventh meeting of the Plants Committee, Langkawi (Malaysia), 3-7 September 2001, 7 pp.
- CITES, 2008. Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Appendices I, II and III. <http://www.cites.org/eng/app/E-Jul01.pdf> (Page consultée le 28 janvier 2009).
- Coley, P.D., Bryant, J.P., Chapin, F.S. III, 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* 230, 895–899.
- Conseil des appellations réservées et des termes valorisants. Québec Organic Reference Standards, 2008. Montréal, Qué. <http://www.cartvquebec.com/EN/organic-designation/organic-reference-standard.asp> (Page consultée le 18 novembre 2008)
- Côté, B., O'Halloran, I., Hendershot, W.H., Spankie, H., 1995. Possible interference of fertilization in the natural recovery of a declining sugar maple stand in southern Quebec. *Plant Soil* 168-169, 471–480.
- Côté, B., Ouimet, R., 1996. Decline of the maple-dominated forest in southern Quebec: impact of natural stresses and forest management. *Environ. Rev.* 4, 133–148.
- Craker, L.E., 2007. Medicinal and Aromatic Plants—Future Opportunities. Reprint from: Issues in new crops and new uses. 2007. J. Janick and A. Whipkey (eds.). ASHS Press, Alexandria, VA, pp. 248–257.
- Dehne, H.W., 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant-pathogens. *Phytopathology* 72, 1115–1119.



- Diamond, D., 1992. Total Kjeldahl nitrogen in soil/plant. QuikChem Method 13-107-06-2-D. Lachat Instruments, Milwaukee, WI.
- Dostie, G., 2006. Étude de la survie et de la croissance souterraine de sept espèces d'herbacées forestières à intérêt commercial en réponse au pH du sol et à l'intensité lumineuse. Mémoire de maîtrise. Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 81 pp.
- Doucet, R., 1994. La science agricole - Climat, sols et productions végétales du Québec. Éditions Berger, Joliette, Québec, 699 pp.
- Downum, K.R., 1992. Tansley review No. 43. Light-activated plant defence. *New Phytol.* 122, 401–420.
- Duke, J.A., 2004. “Dr. Duke’s phytochemical and ethnobotanical Databases.” National Genetic Resources Program. Phytochemical and Ethnobotanical Databases. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, <http://www.ars-grin.gov/duke/>. (Page consultée le 18 novembre 2008)
- El-Tahir, K.E.H., 1991. Pharmacological actions of magnoflorine and aristolochic acid-1 isolated from seeds of *Aristolochia bracteata*. *Int. J. Pharm.* 29, 101–110.
- Fageria, N.K., 1998. Influence of pH on growth and nutrient uptake by crop species in an oxisol. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 29, 2675–2682.
- Farnsworth, N.R., 1988. Screening plants for new medicines. In: E.O. Wilson and F.M. Peter (eds.), *Biodiversity*. National Academies Press, Washington, DC, pp. 83–97.
- Ferguson, H.C. and Edwards, L.D., 1954. A pharmacological study of a crystalline glycoside of *Caulophyllum thalictroides*. *J. Am. Pharm. Assn.* 43, 16–23.
- Ford, P., 2000. Pilot inventory study of black cohosh (*Actaea racemosa* L.) in a southern appalachian mesophytic forest. First annual report of the plant conservation alliance medicinal plant working group. Appendix C. Plant Conservation Alliance. <http://www.nps.gov/plants/medicinal/pubs/mpwgreport2000.htm> (Page consultée le 18 novembre 2008)

- Fournier, A.R., Gosselin, A., Proctor, J.T.A., Gauthier, L., Khanizadeh, S., Dorais, M., 2004. Relationship between understory light and growth of forest-grown American ginseng (*Panax quinquefolius* L.). *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 129, 425–432.
- Fournier, A.R., Proctor, J.T.A., Gauthier, L., Khanizadeh, S., Bélanger, A., Gosselin, A., Dorais, M., 2003. Understory light and root ginsenosides in forest-grown *Panax quinquefolius*. *Phytochemistry* 63, 777–782.
- Ganzera, M., Dharmaratne, H.R.W., Nanayakkara, N.P.D., Khan, I.A., 2003. Determination of saponins and alkaloids in *Caulophyllum thalictroides* (blue cohosh) by high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *Phytochem. Anal.* 14, 1–7.
- Gazette officielle du Québec, 2004. Projet de règlement: Loi sur les espèces menacées ou vulnérables (L.R.Q., c. E-12.01) Espèces menacées ou vulnérables et leurs habitats. 136<sup>e</sup> année, 32, 3742–3750.
- Gee, G.W. Bauder, J.W., 1986. Particle size analysis. In: A. Klute (Ed), *Methods of Soil Analysis. Part I, Physical and Mineralogical Methods*, 2d ed. Agronomy Monograph 9, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 383–411,
- Givnish, T.J., 1988. Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. *Aust. J. Plant Physiol.* 15, 63–92.
- Goyer, A., 2004. Étude sur la distribution des classes de taille et sur la relation entre la masse, le stade phénologique et la capacité reproductrice de cinq herbacées forestières à intérêt commercial. Mémoire de maîtrise. Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 66 pp.
- Graham, M.H., 2003. Confronting multicollinearity in ecological multiple regression. *Ecology* 84, 2809–2815.
- Gurr, G.M., Wratten, S.D., Lune, J.M., 2003. Multi-function agricultural biodiversity: pest management and other benefits. *Basic Appl. Ecol.* 4, 104–116.
- Hamilton, J.G., Zangerl, A.R., DeLucia, E.H., Berenbaum, M.R., 2001. The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecol. Lett.* 4, 86–95.

- Hannah, J.J., Johnson, J.D. et Kuflinec, M.M., 1989. Long-term clinical evaluation of toothpaste and oral rinse containing sanguinaria extract in controlling plaque, gingival inflammation, and sulcular bleeding during orthodontic treatment. *Am. J. Orthod. Dentofac.* 3, 199–207.
- Health Canada, 2007. Monograph - Black cohosh. Natural Health Product Directorate, Ottawa, Ontario, 4 pp.
- Herms, D.A., Mattson, W.J., 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q. Rev. Biol.* 67, 283–335.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., Jaillard, B., 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil* 248, 43–59.
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 2004. *Applied Logistic Regression*, 2nd Edition. Wiley, New York, 280 pp.
- Jhoo, J.-W., Sang, S., He, K., Cheng, X., Zhu, N., Stark, R.E., Zheng, Q.Y., Rosen, R.T., Ho, C.-T., 2001. Characterization of the triterpene saponins of the roots and rhizomes of blue cohosh (*Caulophyllum thalictroides*). *J. Agric. Food Chem.* 49, 5969–5974.
- Jong, T.T., Lee, M.R., Hsiao, S.S., Hsai, J.L., Wu, T.S., Chiang, S.T., Cai, S.Q., 2003. Analysis of aristolochic acid in nine sources of Xixin, a traditional Chinese medicine, by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization/tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33, 831–837.
- Jong-Pil, E., Gou, Y.K., 2004. Suppression of angiogenesis by the plant alkaloid, sanguinarine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 618–624.
- Konsler, T.R., Shelton, J.E., 1990. Lime and phosphorus effects on American ginseng. 1. Growth, soil fertility, and root-tissue nutrient status response. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115, 570–574.
- Kruse, S.O., Löhning, A., Pauli, G.F., Winterhoff, H., Nahrstedt, A., 1999. Fukiic and piscidic acid esters from the rhizome of *Cimicifuga racemosa* and the in vitro estrogenic activity of fukinolic acid. *Planta Med.* 65, 763–764.

- Laird, S.A., Pierce, A.R., 2002. Promoting sustainable and ethical botanicals: Strategies to improve commercial raw material sourcing. Results from the sustainable botanicals pilot project industry surveys, case studies, and standards collection. Final report. Rainforest Alliance, New York, 96 pp.
- Lambers, H., Chapin F.S. III, Pons, T.L., 1998. Plant physiological ecology. Springer-Verlag, New York, 540 pp.
- Lamoureux, G., 2002. Flore printanière. Fleurbec, Saint-Henri-de-Lévis, Québec, 575 pp.
- Lamoureux, G., Nantel, P., 1999. Cultiver des plantes sauvages... sans leur nuire. Fleurbec, Saint-Henri-de-Lévis, Québec, 80 pp.
- Lawrence, G.B., David, M.B., Shortle, W.C., 1995. A new mechanism for calcium loss in forest-floor soils. *Nature* 378, 162–165.
- Leclerc, M.-È., Lapointe, L., Olivier, A., 2007. L'effet de phytohormones sur la multiplication végétative de la matteuccie fougère-à-l'autruche. *Le Naturaliste canadien* 131, 15–23.
- Li, T.S.C., 1995. Asian and American ginseng - a review. *HortTechnology* 5, 27–34.
- Liski, J., Nissinen, A., Erhard, M., Taskinens, O., 2003. Climatic effects on litter decomposition from arctic tundra to tropical rainforest. *Glob. Change Biol.* 9, 575–584.
- Locock, R.A., 1995. *Asarum*: Canada snakeroot. *Can. Pharm. J.* 128, 33–35.
- Ma, J.F., 2005. Plant response to three abundant soil minerals: silicon, aluminium and iron. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24, 267–281.
- MacGregor, J.T., Layton, L.L., 1974. California bay oil. II: Biological effects of constituents. *J. Agric. Food Chem.* 22, 777–780.
- Mahady, G.B., Pendland, S.L., Stoia, A., Chadwick, L.R., 2003. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to isoquinoline alkaloids from *Sanguinaria canadensis* and *Hydrastis canadensis*. *Phytother. Res.* 17, 217–221.

- Marie-Victorin, 1995. Flore Laurentienne. Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, 1083 pp.
- Marino, P.C., Eisenberg, R.M., Cornell, H.V., 1997. Influence of sunlight and soil nutrients on clonal growth and sexual reproduction of the understory perennial herb *Sanguinaria canadensis* L. J. Torrey Bot. Soc. 124, 219–227.
- McCoy, J.-A., Davis, J.M., Camper, N.D., Khan, I., Bharathi, A., 2007. Influence of rhizome propagule size on yields and triterpene glycoside concentrations of black cohosh (*Actaea racemosa* L. syn *Cimicifuga racemosa* (L.) Nuttall). HortScience 42, 61–64.
- McGuffin, M., Young, A.L., 2001. Comments of the American Herbal Products Association on the request for information and changes to the CITES appendices. American Herbal Products Association, Silver Spring, Maryland, 13 pp.
- Mehlich, A., 1984. Mehlich 3 soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 18, 1003–1015.
- Messier, C., Puttonen, P., 1995. Spatial and temporal variation in the light environment of developing Scots pine stands: the basis for quick and efficient method of characterizing light. Can. J. Forest Res. 25, 343–354.
- Moerman, D.E., 1998. Native American Ethnobotany. Timber Press Inc., Portland, Oregon, 927 pp.
- Motto, M.G., Secord, N.J., 1985. Composition of the essential oil from *Asarum canadense*. J. Agric. Food Chem. 33, 789–791.
- Nadeau, I., Olivier, A., 2003. The biology and forest cultivation of American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) in Canada. Can. J. Plant Sci. 83, 877–891.
- Nadeau, I., Olivier, A., Simard, R.R., Coulombe, J., Yelle, S., 1999. Growing American ginseng in maple forests as an alternative landuse system in Québec, Canada. Agroforest. Syst. 44, 345–353.
- NatureServe. 2008. NatureServe Explorer: An online encyclopedia of life. Version 7.0. NatureServe, Arlington, Virginia. <http://www.natureserve.org/explorer>. (Page consultée le 23 janvier 2008).

- Newton, S.M., Lau, C., Gurcha, S.S., Besra, G.S., Wright, C.W., 2002. The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoraela corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *J. Ethnopharmacol.* 79, 57–67.
- Nivot, N., Olivier, A., Lapointe, L., 2008. Vegetative propagation of five northern forest understory plant species from either rhizome or stem sections. *HortScience* 43, 1531–1537.
- Nortier, J.L., Vanherweghem, J.-L., 2007. For patients taking herbal therapy - lessons from aristolochic acid nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22, 1512-1517.
- Osmond, B., Badger, M., Maxwell, K., Björkman, O., Leegood, R., 1997. Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Sci.* 2, 119-121.
- Ouimet, R., Fortin, J.-M., 1992. Growth and foliar nutrient status of sugar maple: incidence of forest decline and reaction to fertilization. *Can. J. Fores Res.* 22, 699–706.
- Ouimet, R., Camiré, C., 1995. Foliar deficiencies of sugar maple stands associated with soil cation imbalances in the Quebec Appalachians. *Can. J. Soil Sci.* 75, 169–175.
- Ouimet, R., Camiré, C., Furlan, V., 1996. Effect of soil base saturation and endomycorrhization on growth and nutrient status of sugar maple seedlings. *Can. J. Soil Sci.* 76, 109–115.
- Pagé, F., Roy, G., Gagnon, G., Giroux, M., 1990. Le chaulage des sols d'érablières en dépérissement: méthode d'échantillonnage des sols et impacts de la chaux. In: C. Camiré, W. Hendershot, D. Lachance (Eds). *Le dépérissement des érablières, causes et solutions possibles*. C.R.B.F., Faculté de foresterie et de géomatique, Université Laval, Québec, Québec, pp. 209–219.
- Palta, J.P., 1996. Role of calcium in plant responses to stresses: linking basic research to the solution of practical problems. *HortScience* 31, 51–57.
- Panossian, A., Danielyan, A., Mamikonyan, G., Wikman, G., 2004. Methods of phytochemical standardisation of rhizoma *Cimicifugae racemosae*. *Phytochem. Anal.* 15, 100–108.

- Parent, S., Messier, C., 1996. A simple and efficient method to estimate microsite light availability under a forest canopy. *Can. J. Forest Res.* 26, 151–154.
- Persons, W.S., Davis, J.M., 2005. Growing and marketing ginseng, goldenseal and other woodland medicinals. Bright Mountain Books Inc, Fairview, North Carolina, 466 pp.
- Pfitsch, W.A., Pearcy, R.W., 1989a. Daily carbon gain by *Adenocaulon bicolor* (Asteraceae), a redwood forest understory herb, in relation to its light environment. *Oecologia* 80, 465–470.
- Pfitsch, W.A., Pearcy, R.W., 1989b. Steady-state and dynamic photosynthetic response of *Adenocaulon bicolor* in its redwood forest habitat. *Oecologia* 80, 471–476.
- Popp, M., Schenk, R., Abel, G., 2003. Cultivation of *Cimicifuga racemosa* (L.) Nuttall and quality of CR extract BNO 1055. *Maturitas* 44, S1–S7 Suppl. 1.
- Pradiou, J., 2004. Étude phytosociologique de la végétation de sept espèces herbacées à intérêt commercial dans les forêts de feuillus de la région de l'Estrie (Québec). Mémoire de maîtrise, Faculté de Foresterie et de Géomatique, Université Laval, Québec, Québec, 175 pp.
- Predny, M.L., De Angelis, P., Chamberlain, J.L., 2006. Black cohosh (*Actaea racemosa*): an annotated bibliography. Gen. Tech. Rep. SRS–97. Department of Agriculture Forest Service, Southern Research Station, Asheville, North Carolina, 99 pp.
- Quigley, M.F., Mulhall, S., 2002. Effects of variable shading in a greenhouse study on rhizome weight, root length and bud proliferation in goldenseal. *HortTechnology* 12, 717–720.
- Rattan, R.K., Datta, S.P., Chhonkar, P.K., Suribabu, K., Singh, A.K., 2005. Long-term impact of irrigation with sewage influents on heavy metal content in soils, crops and groundwater - A case study. *Agric., Ecosyst. Environ.* 109, 310–322.
- Ritchey, K.D., Schumann, C.M., 2005. Response of woodland-planted ramps to surface-applied calcium, planting density, and bulb preparation. *HortScience* 40, 1516–1520.

- Robson, A.D., 1994. Zinc in soils and plants. Proceedings of the International Symposium on Zinc in Soils and Plants", held at The University of Western Australia, Perth, Western Australia, 27--28 September 1993. Series: Developments in Plant and Soil Sciences, Vol. 55, Springer, New York, 224 pp.
- Routhier, M.-C., Lapointe, L., 2002. Impact of tree leaf phenology on growth rates and reproduction in the spring flowering species *Trillium erectum* (Liliaceae). *Am. J. Bot.* 89, 500–505.
- Salisbury, F.B. Ross, C.W., 1992. Plant physiology. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, 682 pp.
- Salmore, A.K., Hunter, M.D., 2001. Environmental and genotypic influences on isoquinoline alkaloid content in *Sanguinaria canadensis*. *J. Chem. Ecol.* 27, 1729–1747.
- Saqib, M., Zörb, C., Schubert, S., 2006. Salt-resistant and salt-sensitive wheat genotypes show similar biochemical reaction at protein level in the first phase of salt stress. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 169, 542–548.
- Schmidt, W.G., 2002. An encyclopedia of shade perennials. Timber Press, Inc., Portland, Oregon, 494 pp.
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, A.C., Smith, S.J., Miller, A.J., Davies, J.M., Newman, I.A., 2006. Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ameliorates  $\text{NaCl}$ -induced  $\text{K}^{+}$  loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane  $\text{K}^{+}$ -permeable channels. *Plant Physiol.* 141, 1653–1665.
- Small, E., Catling, P.M., 2000. Les cultures médicinales canadiennes. Les Presses Scientifiques du CNRC, Ottawa, Ontario, 240 pp.
- Snowden, R.E.D., Wheeler, B.D., 1993. Iron toxicity to fen plant. *J. Ecol.* 81, 35–46.
- Soil Classification Working Group, 1998. The Canadian system of soil classification. Agriculture and Agri-Food Canada, Publ. 1646 (Revised), Ottawa, Ontario, 187 pp.
- Southard, G.L., 1985. *Sanguinaria* sanguinarine in the control of plaque and gingivitis. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 36, 378–379.



- Stamp, N., 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Q. Rev. Biol.* 78, 23–55.
- Statistiques Canada, 2008. “Canada’s Agri-Food; Exports to all countries” Agriculture and Agri-Food Canada. [http://www.ats.agr.gc.ca/stats/AllCountries\\_product\\_x\\_e.pdf](http://www.ats.agr.gc.ca/stats/AllCountries_product_x_e.pdf). (Page consultée le 28 janvier 2009).
- Stoltz, L.P., 1982. Mineral nutrition studies of american ginseng. Proceedings of the fourth national ginseng conference, Lexington, KY, May 25 – 26.
- Tibebe, Z.W., Betz, J.M., Houghton, P.J., 1997. Analysis of aporphine and quinolizidine alkaloids from *Caulophyllum thalictroides* by densitometry and HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, 839–843.
- Ticktin, T., 2004. The ecological implications of harvesting non-timber forest products. *J. Appl. Ecol.* 41, 11–21.
- Tomlinson, G.H., 1993. Nutrient disturbances in forest trees and the nature of the forest decline in Quebec and Germany. *Water, Air, Soil Pollut.* 54, 61–74.
- U.S. Food and Drug Administration, 2000, 2001. “Dietary supplements: Aristolochic acid.” Dietary supplements. U.S. Food & Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/ds-bot.html> (Page consultée le 18 novembre 2008)
- Van der Voort, M., 1998. An inventory of wild-harvested plants in the Otter Creek wilderness area of the Monongahela National Forest, West Virginia. M.Sc. Thesis. The College of Agriculture and Forestry, West Virginia University, Morgantown. West Virginia, 77 pp.
- Van Manen, F.T., Young, J.A., Cass, W.B., Ulrey, C., 2005. Habitat models to assist plant protection efforts in Shenandoah National Park, Virginia, USA. *Nat. Areas J.* 25, 339–350.
- Vaqr, M.A., Moammir, H.A., Reagan-Shaw, S.R., Minakshi, N., Mukhtar, H., Nihal, A., 2004. Sanguinarine causes cell cycle blockade and apoptosis of human prostate carcinoma cells via modulation of cyclin kinase inhibitor-cyclin-cyclin-dependant kinase machinery. *Mol. Cancer Ther.* 3, 933–940.

- Viereck, V., Emons, G., Wuttke, W., 2005. Black cohosh: just another phytoestrogen? Trends Endocrinol. Metab. 16, 214 – 221.
- Weiner, J., 2004. Allocation, plasticity and allometry in plants. Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst. 6, 207–215.
- Wolfe, M.S., 2001. Crop strength through diversity. Nature 406, 681–682.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., Matsumoto, H., 2003. Oxidative stress triggered by aluminium in plant roots. Plant Soil 255, 239–243.
- Yeomans, J.C., Bremner, J.M., 1988. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. Commun. Soil Sci. Plant. Anal. 19, 1467–1476.
- Zhou, X., Zheng, C., Sun, J., You, T., 2006. Analysis of nephrotoxic and carcinogenic aristolochic acids in *Aristolochia* plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection at a carbon fiber microdisk electrode. J. Chromatogr. A 1109, 152-159.
- Zierau, O., Bodinet, C., Kolba, S., Wulf, M, Vollmer, G., 2002. Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 80, 125–130.

## Annexes

Annexe 1. Species studied and rhizomes cutting origin, treatments and plantation details.

Species	Cuttings origin	Number	Harvesting date	Plantation date	Cuttings length	Plantation depth	Spacing
<i>Actaea racemosa</i>	Bought from Les fraises de l'Île inc.	50	Ordered	16/10/2003 17/10/2003 22/10/2003	5-10 cm with bud	5-10 cm	50 cm
<i>Asarum canadense</i>	Harvested in Stanstead	50	22/10/2003 27/10/2003	28/10/2003 29/10/2003 30/10/2003	5-7 cm with terminal bud	5 cm	30 cm
<i>Caulophyllum thalictroides</i>	Harvested in Stanstead	50	22/10/2003 04/10/2003 05/10/2003	31/10/2003 13/11/2003 07/11/2003	2-3 cm without terminal bud	5 cm	50 cm
<i>Sanguinaria canadensis</i>	Bought from Les fraises de l'Île inc. and harvested at Lennoxville	50	Ordered 7/10/2003	8/10/2003 9/10/2003 10/10/2003	5-7 cm with terminal bud	5 cm	30 cm

Annexe 2. HPLC mobile phase gradient used to analyse active components of *Asarum canadense*, *Caulophyllum thalictroides* and *Sanguinaria canadensis*.

Species	Time (min.)	0.1% Trifluoroacetic acid in water	2.5% propionic acid in water	Acetonitrile	Ammonium acetate 10 mM	Methanol
<i>Asarum canadense</i>	0	60	-	0	-	40
	15	55	-	0	-	45
	30	40	-	55	-	5
	33	0	-	100	-	0
	40	0	-	100	-	0
	45	60	-	0	-	40
	50	60	-	0	-	40
<i>Caulophyllum thalictroides</i>	0	-	-	10	90	0
	10	-	-	25	75	0
	25	-	-	26	74	0
	35	-	-	60	40	0
	40	-	-	60	40	0
	45	-	-	0	0	100
	50	-	-	0	0	100
	55	-	-	10	90	0
<i>Sanguinaria canadensis</i>	0	-	84	16	-	-
	2	-	20	80	-	-
	30	-	10	90	-	-
	35	-	84	16	-	-