

NATHALIE NIVOT

**ESSAIS DE GERMINATION ET DE BOUTURAGE DE  
SIX ESPÈCES INDIGÈNES SCIAPHYTES DU  
CANADA**

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

DÉPARTEMENT DE PHYTOLOGIE  
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

AVRIL 2005

## Résumé

Parmi les plantes pérennes de sous-bois indigènes au Canada, les six espèces suivantes possèdent un fort potentiel commercial : *Actaea racemosa*, *Asarum canadense*, *Caulophyllum thalictroides*, *Oplopanax horridus*, *Sanguinaria canadensis* et *Trillium grandiflorum*. L'objectif de cette étude est de pouvoir multiplier ces six espèces en un an grâce aux techniques de propagation classiques. Les essais de germination ont montré que l'*A. canadense* et le *T. grandiflorum* ont de bons taux de germination. Les traitements de scarification et de trempage des graines dans la gibbérelline ont permis d'accélérer la germination mais pas d'augmenter les pourcentages de germination. Les résultats des essais de bouturage indiquent une propagation végétative satisfaisante chez le *C. thalictroides* et l'*O. horridus*, sans traitement, ainsi que chez la *S. canadensis* et l'*A. canadense*, avec application d'auxine. Les résultats obtenus laissent penser qu'une culture des espèces étudiées, excepté pour l'*A. racemosa*, est tout à fait envisageable.

## Abstract

Among understory perennial plants indigenous from Canada, the following species have a commercial value: *Actaea racemosa*, *Asarum canadense*, *Caulophyllum thalictroides*, *Oplopanax horridus*, *Sanguinaria canadensis* and *Trillium grandiflorum*. For these six species, which are of particular interest for horticultural and natural medicinal products industries, we investigated efficient methods of propagation by seeds and cuttings. Germination tests showed good percentage of germination for *A. canadense* and *T. grandiflorum*. Scarified or gibberellins-treated seeds of these two species succeeded in germinating earlier but not in obtaining to a higher percentage as compared to control seeds. Results from cutting experiment concluded in a satisfactory vegetative propagation for *C. thalictroides* and *O. horridus* without treatment, as well as for *S. canadensis* and *A. canadense* following an auxin application. These results show that it is possible to cultivate all the studied species, except *A. racemosa*, through either seeds or cutting propagation.

## Avant-propos

Je tiens à remercier, avant tout, ma directrice, Line Lapointe, qui s'est beaucoup impliquée dans ce travail de maîtrise, et dont l'implication n'a pas failli même une fois en Suède, à 5000 km de distance. Je la remercie aussi de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet, soutenue financièrement et épaulée scientifiquement durant ces deux ans de maîtrise.

Mes remerciements vont également à Alain Olivier, mon co-directeur, pour m'avoir permis d'exposer une partie de mes résultats au 8<sup>ème</sup> congrès de l'AFTA, pour ses corrections rapides et efficaces ainsi que son soutien financier.

De nombreuses autres personnes ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ces travaux. Je voudrais ici leur témoigner ma reconnaissance. Merci à J. Turcotte de m'avoir aidée à entamer cette maîtrise, merci à J. A. Rioux et C. Fortin de m'avoir si généreusement et habilement conseillée et guidée en matière d'horticulture, merci à M-È. Leclerc de m'avoir assistée et encouragée tout au long de ce travail et de m'avoir fait partager son optimisme. Merci également à R. Gauci qui avait bien souvent la réponse à mes questions, ainsi qu'aux autres membres du laboratoire de Line Lapointe pour leur gentillesse. Merci aux gens de Sherbrooke, et spécialement à Isabelle Nadeau, ainsi qu'à Isabelle Dupras, d'Horticulture Indigo, pour leur collaboration dans ce projet.

Je souhaite remercier chaleureusement Andrew P. Coughlan qui a travaillé fort sur les manuscrits des chapitres 2 et 3 pour les enrichir de sa « british touch », faisant toute la différence.

Enfin, mon quotidien, pendant ces deux années, aurait été beaucoup moins joyeux et vivant si je n'avais pas bénéficié du soutien de ma famille, ma mère, ma grand-mère et mon frère, accompagné du réconfort et de l'agréable compagnie de Céline Lepage ainsi que de la douce présence de Jean-Luc Jany. C'est aussi grâce à vous que j'en suis là.

Je dédie ce mémoire à Marcel Debest, mon grand-père,  
qui investit une belle énergie dans la transformation d'une parcelle en friche en un  
immense jardin, monde mystérieux fait d'odeurs, de couleurs et de stratégies incroyables  
pour exister, monde qui m'émerveillait enfant et continue de me fasciner.

# Table des matières

RÉSUMÉ .....	I
ABSTRACT .....	II
AVANT-PROPOS .....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES .....	XII
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1

## CHAPITRE 1

### REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- DESCRIPTION DES ESPÈCES SÉLECTIONNÉES .....	4
<u>1. <i>Sanguinaria canadensis</i> L.</u> .....	5
1.1- Description morphologique.....	5
1.2- Écologie et aire de répartition .....	6
1.3- Intérêt horticole.....	6
1.4- Propriétés médicinales.....	6
1.5- Quantités produites/échangées.....	7
1.6- Évaluation du risque lié au prélèvement .....	7
<u>2. <i>Asarum canadense</i> L.</u> .....	7
2.1- Description morphologique.....	7
2.2- Écologie et aire de répartition .....	8
2.4- Propriétés médicinales.....	8
2.5- Quantités produites/échangées. ....	9
2.6- Évaluation du risque lié au prélèvement .....	9
<u>3. <i>Trillium grandiflorum</i> (Michx.) Salisb.</u> .....	9
3.1- Description morphologique.....	9
3.2- Écologie et aire de répartition .....	9
3.3- Intérêt horticole.....	10
3.4- Propriétés médicinales.....	10
3.5- Quantités produites/échangées.....	10
3.6- Évaluation du risque lié au prélèvement .....	11
<u>4. <i>Caulophyllum thalictroides</i> (L.) Michx.</u> .....	11
4.1- Description morphologique.....	11
4.2- Écologie et aire de répartition .....	11
4.3- Intérêt horticole.....	12
4.4- Propriétés médicinales.....	12

4.5- Quantités produites/échangées.....	12
4.6- Évaluation du risque lié au prélèvement .....	13
<b>5. <i>Actaea racemosa</i> L., anciennement appelée <i>Cimicifuga racemosa</i> (L.) Nutt .....</b>	<b>13</b>
5.1- Description morphologique.....	13
5.2- Écologie et aire de répartition .....	13
5.3- Intérêt horticole.....	13
5.4- Propriétés médicinales.....	14
5.5- Quantités produites/échangées.....	14
5.6- Évaluation du risque lié au prélèvement .....	14
<b>6. <i>Oplopanax horridus</i> (Sm.) Miq. ....</b>	<b>15</b>
6.1- Description morphologique.....	15
6.2- Écologie et aire de répartition .....	15
6.3- Intérêt horticole.....	16
6.4- Propriétés médicinales.....	16
6.5- Quantités produites/échangées.....	16
6.6- Évaluation du risque de prélèvement.....	17
<b>7. Intérêt d'une propagation commerciale pour les six espèces sélectionnées .....</b>	<b>17</b>
<b>II- LA PROPAGATION PAR LES GRAINES.....</b>	<b>18</b>
1. <i>La germination et la morphologie des graines à l'étude</i> .....	19
1.1- La germination .....	19
1.2- La morphologie des graines à l'étude .....	19
2. <i>Les types de dormance</i> .....	21
2.1- La dormance morphologique .....	22
2.2- La dormance physiologique .....	23
2.3- Les dormances morphophysiologiques .....	24
3. <i>La levée de la dormance</i> .....	27
3.1- Le rôle des gibbérellines (GA).....	28
3.2- Le rôle des cytokinines (CK) .....	31
3.3- La scarification.....	32
4. <i>Objectifs et hypothèses de recherche</i> .....	34
<b>III- LA PROPAGATION PAR BOUTURAGE .....</b>	<b>35</b>
1. <i>Les organes de propagation des espèces à l'étude</i> .....	36
2. <i>Le bouturage</i> .....	38
2.1- L'enracinement des boutures .....	39
2.2- L'induction de nouveaux bourgeons .....	40
2.3- L'élimination de la dominance apicale.....	41
3. <i>Objectifs et hypothèses de recherche</i> .....	41

## CHAPITRE 2

### GERMINATION STUDIES ON SIX NORTH AMERICAN PLANT SPECIES WITH UNDERDEVELOPED EMBRYOS

I-	AVANT-PROPOS .....	44
II-	RÉSUMÉ .....	44
III-	ABSTRACT .....	45
IV-	INTRODUCTION .....	46
V-	MATERIALS AND METHODS .....	48
	1. <i>Plant material</i> .....	48
	2. <i>Pre-treatments</i> .....	48
	3. <i>Stratification conditions</i> .....	49
	4. <i>Data analysis</i> .....	49
VI-	RESULTS.....	50
	1. <i>Oplopanax horridus and Actaea racemosa</i> .....	50
	2. <i>Trillium grandiflorum</i> .....	50
	3. <i>Sanguinaria canadensis</i> .....	53
	4. <i>Asarum canadense</i> .....	56
	5. <i>Caulophyllum thalictroides</i> .....	59
VII-	DISCUSSION .....	62

## CHAPITRE 3

### INFLUENCE OF AUXIN AND CYTOKININ ON THE GROWTH AND SURVIVAL OF CUTTINGS OF FIVE CANADIAN UNDERSTORY PLANT SPECIES

I-	AVANT-PROPOS .....	69
II-	RÉSUMÉ .....	69
III-	ABSTRACT .....	70
IV-	INTRODUCTION .....	71
V-	MATERIALS AND METHODS .....	73
	1. <i>Experimental manipulation of cuttings</i> .....	73
	2. <i>Biometric measurements</i> .....	74
	3. <i>Data analysis</i> .....	75
VI-	RESULTS.....	77
	1. <i>Asarum canadense</i> .....	77
	2. <i>Oplopanax horridus</i> .....	81
	3. <i>Sanguinaria canadensis</i> .....	84
	4. <i>Caulophyllum thalictroides</i> .....	87

5. <i>Trillium grandiflorum</i> .....	91
VII- DISCUSSION .....	93
1. <i>Percent survival of cuttings</i> .....	93
2. <i>Treatment effects</i> .....	95
3. <i>Rhizome growth</i> .....	97
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>100</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>107</b>

# Liste des tableaux

Table 1 :

Cumulative percentage of radicle and cotyledon emergence for seeds of *T. grandiflorum*. The results show data collected after 67 days (equivalent to late autumn) and at the end of the experiment. The ratio of cotyledon to radicle emergence is also presented as the results of a one-way ANOVA for treatment comparisons of the different combinations of pre-treatments and stratification periods. Within a column, data followed by a different letter are significantly different.....51

Table 2 :

Cumulative percentage of radicle and cotyledon emergence for seeds of *S. canadensis*. The results show data collected after 67 days (equivalent to late autumn) and at the end of the experiment. The ratio of cotyledon to radicle emergence is also presented as the results of a one-way ANOVA for treatment comparisons of the different combinations of pre-treatments and stratification periods. Within a column, data followed by a different letter are significantly different.....55

Table 3 :

Cumulative percentage of radicle and cotyledon emergence for seeds of *A. canadense*. The results show data collected after 67 days (equivalent to late autumn) and at the end of the experiment. The ratio of cotyledon to radicle emergence is also presented as the results of a one-way ANOVA for treatment comparisons of the different combinations of pre-treatments and stratification periods. Within a column, data followed by a different letter are significantly different.....58

Table 4 :

Cumulative percentage of radicle and cotyledon emergence for seeds of *C. thalictroides*. The results show data collected after 67 days (equivalent to late autumn) and at the end of the experiment. The ratio of cotyledon to radicle emergence is also presented as the results of a one-way ANOVA for treatment comparisons of the different combinations of pre-treatments and stratification periods. Within a column, data followed by a different letter are significantly different.....61

Table 5 :

Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on percent survival, number of new roots, new root biomass, total leaf area, shoot biomass, bud number and percent rhizome growth of *Asarum canadense* cuttings. P values for  $\chi^2$  (percent survival) and ANCOVA analyses are presented together with the P values of the covariables initial rhizome biomass and initial root biomass. Data within a given row and followed by a different letter are significantly different.....79

Table 6 :

Effect of the presence of roots at the time of planting on the subsequent growth of the rhizome and on the production of new roots, shoots and buds on *Asarum canadense* cuttings (mean  $\pm$  SE). P values for the t tests are also shown.....80

Table 7 :

Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on percent survival, number of new roots, new root biomass, shoot biomass, bud number and percent stem growth of *Oplopanax horridus* cuttings. P values for  $\chi^2$  (percent survival) and ANCOVA analyses are presented together with the P values of the covariables initial stem biomass and shoot biomass. Data within a given row and followed by a different letter are significantly different .....83

Table 8 :

Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on percent survival and emergence, number of new roots, new root biomass, bud number and percent rhizome growth of *Sanguinaria canadensis* cuttings. P values for  $\chi^2$  (percent survival and emergence) and ANCOVA analyses are presented together with the P values of the covariables initial rhizome biomass and initial root biomass. Data within a given row and followed by a different letter are significantly different.....86

Table 9 :

Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on percent survival, number of new roots, new root biomass, total leaf area, shoot biomass, bud number and percent rhizome growth of *Caulophyllum thalictroides* cuttings. P values for  $\chi^2$  (percent survival) and ANCOVA analyses are presented together with the P values of the covariables initial rhizome biomass and initial root biomass. Data within a given row and followed by a different letter are significantly different.....90

Table 10 :

Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on percent survival, number of new roots, new root biomass, shoot biomass, bud number and percent rhizome growth of *Trillium grandiflorum* cuttings. P values for  $\chi^2$  (percent survival) and ANCOVA analyses are presented together with the P values of the covariables for initial rhizome biomass and initial root biomass. Data within a given row and followed by a different letter are significantly different. ....92

## Liste des figures

- Figure 1.  
Coupes longitudinales des graines de Sanguinaire (*S. canadensis*), de gingembre sauvage (*A. canadense*), de trille blanc (*T. grandiflorum*) et de Caulophylle (*C. thalictroides*) laissant apparaître l'embryon immature de ces espèces. ....20
- Figure 2.  
Dormance MP simple et profonde de l'épicotyle. Chronologie du développement de la plantule en fonction des saisons de l'année, de la dispersion des graines jusqu'à l'apparition de la plantule à la surface du sol. 24
- Figure 3.  
Dormance MP simple et profonde double. Chronologie du développement de la plantule en fonction des saisons de l'année, de la dispersion des graines jusqu'à l'apparition de la plantule à la surface du sol.....25
- Figure 4.  
Reproduction végétative par marcottage chez le bois piquant (*Oplopanax horridus*). Dessin de Catherine Jacobsen. Tiré de Lantz et Antos, 2002. ....38
- Figure 5.  
Evolution of *T. grandiflorum* cumulative radicle (A) and cotyledon (B) emergence in response to different pre-treatments and stratification periods. Continuous lines represent the warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures from day 151; dotted lines represent the cold/warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures (from day 181) (See text for further details). Symbols represent pre-treatments applied to seeds: scarified seeds (•), gibberellins treated seeds (▲), gibberellins and cytokinins treated seeds (◆) and control (■). Seeds were treated on day 0 and placed in the Petri dishes.....52
- Figure 6.  
Evolution of *S. canadensis* cumulative radicle (A) and cotyledon (B) emergence in response to different pre-treatments and stratification periods. Continuous lines represent the warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures from day 151; dotted lines represent the cold/warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures (from day 181) (See text for further details). Symbols represent pre-treatments applied to seeds: scarified seeds (•), gibberellins treated seeds (▲), gibberellins and cytokinins treated seeds (◆) and control (■). Seeds were treated on day 0 and placed in the Petri dishes.....54
- Figure 7.  
Evolution of *A. canadense* cumulative radicle (A) and cotyledon (B) emergence in response to different pre-treatments and stratification periods. Continuous lines represent the warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures from day 151; dotted lines represent the cold/warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures (from day 181) (See text for further details). Symbols represent pre-treatments applied to seeds: scarified seeds (•), gibberellins treated seeds (▲), gibberellins and cytokinins treated seeds (◆) and control (■). Seeds were treated on day 0 and placed in the Petri dishes.....57

Figure 8.	
Evolution of <i>C. thalictroides</i> cumulative radicle and epicotyl emergence in response to different pre-treatments and stratification periods. Continuous lines represent the warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures from day 151; dotted lines represent the cold/warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures (from day 181) (See text for further details). Symbols represent pre-treatments applied to seeds: scarified seeds (•), gibberellins treated seeds (▲), gibberellins and cytokinins treated seeds (◆) and control (■). Seeds were treated on day 0 and placed in the Petri dishes.....	60
Figure 9.	
Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on the dry biomass (g) of new root, shoot and the rhizome tissues of <i>Asarum canadense</i> cuttings after a four-month growth period. Rhizome growth is expressed as (final – initial) rhizome biomass. The results for control (C) and control cuttings with an apical bud (C+AB) are shown. ....	78
Figure 10.	
Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on the dry biomass (g) of new root, shoot and the stem tissues of <i>Oplopanax horridus</i> cuttings after a four-month growth period. Stem growth is expressed as (final – initial) stem biomass. The results for control (C) cuttings are shown. ....	82
Figure 11.	
Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on the dry biomass (g) of new root and the rhizome tissues of <i>Sanguinaria canadensis</i> cuttings after a four-month growth period. Rhizome growth is expressed as (final – initial) rhizome biomass. The results for control (C) and control cuttings with an apical bud (C+AB) are shown. ....	85
Figure 12.	
Effect of the initial dry biomass (g) of the rhizome on the production of buds by cuttings of <i>Sanguinaria canadensis</i> . Bars with a different letter are significantly different. ....	87
Figure 13.	
Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on the dry biomass (g) of new root, shoot and the rhizome tissues of <i>Caulophyllum thalictroides</i> cuttings after a four-month growth period. Rhizome growth is expressed as (final – initial) rhizome biomass. The results for control (C) cuttings are shown. ....	89

## Introduction générale

Les forêts du Canada renferment des trésors de végétaux de plus en plus connus du grand public. Dans les érablières du nord-est du Canada et des États-Unis, nombreuses sont les plantes à posséder des qualités ornementales ou médicinales faisant d'elles des espèces indigènes intéressantes à commercialiser sur leurs marchés respectifs. Le marché des plantes médicinales, avec un taux de croissance compris entre 15 et 20 % par an, représente le secteur connaissant la plus forte croissance dans l'industrie nord-américaine des pharmaceutiques (Small et Catling, 2000). Par ailleurs, les plantes indigènes du Québec jouissent d'une popularité croissante qui se manifeste à la fois par l'abondance de la documentation et par l'importance de la demande, notamment en aménagement paysager (Lamoureux et Nantel, 1999). L'engouement pour ces plantes est donc bien réel. Cependant, ce nouveau marché pour les plantes indigènes n'est appuyé par aucune structure qui lui soit propre et, à quelques exceptions près (ail des bois, ginseng), ne fait encore l'objet d'aucune réglementation.

Parmi la variété d'espèces indigènes vendues sur le marché horticole, beaucoup ne se cultivent pas encore d'une façon qui soit commercialement rentable (Lamoureux et Nantel, 1999). Ceci laisse penser que l'approvisionnement d'un bon nombre d'espèces indigènes vendues se fait au sein même des populations naturelles. Le premier problème que cela engendre est l'appauvrissement et la diminution de la taille des populations, suivi, à plus long terme, par leur disparition éventuelle. Le deuxième problème est que la variabilité des plantes récoltées en milieu naturel se répercute sur la qualité du produit vendu au consommateur, ce qui peut être nuisible pour l'image de marque d'une espèce.

La mise au point d'un système de culture des espèces indigènes commercialisées aurait un double avantage. D'abord, la culture devrait permettre d'approvisionner adéquatement les marchés de plantes horticoles ou médicinales pour ces espèces en ayant moins, voire plus

du tout, recours à la récolte de plants sauvages. La culture de ces plantes aurait également l'avantage de fournir des produits standardisés en matière de qualité, ce qui est très important pour l'industrie pharmaceutique et celle des produits de santé naturels, mais également pour les horticulteurs (Schilcher, 1989; Mathe et Franz, 1999).

Nous nous sommes particulièrement intéressés à cinq de ces plantes qui poussent à l'état sauvage dans les érablières de l'est du Canada et du nord-est des États-Unis: le trille blanc (*Trillium grandiflorum* (Michx.) Salisb.), la sanguinaire (*Sanguinaria canadensis* L.), le gingembre sauvage (*Asarum canadense* L.), le caulophylle faux-pigamon (*Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx.), et, pour finir, l'actée à grappes (*Actaea racemosa* L., anciennement *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. ). Notre intérêt s'est également porté sur une sixième espèce provenant des forêts de l'Ouest canadien: le bois piquant (*Oplopanax horridus* (Sm.) Miq.). Le choix de ces six espèces s'est effectué sur la base de leur potentiel commercial en tant que plantes ornementales ou médicinales, d'une part, et sur leur capacité d'adaptation aux conditions nordiques du Québec, d'autre part.

Toutes ces plantes ont pour caractéristiques d'être pérennes et de pousser à l'état naturel à l'ombre des érablières riches de l'est du Canada (Small et Catling, 2000; Lamoureux, 2002), sauf pour le bois piquant que l'on trouve généralement dans les coins humides et ombragés des forêts de conifères de l'Ouest canadien (Small et Catling, 2000). L'idée serait donc d'associer la culture de ces plantes médicinales et horticoles à l'acériculture largement pratiquée au Québec. Ce serait en quelque sorte une culture secondaire qui ferait bénéficier l'exploitant de l'érablière d'une diversification de sa production ainsi que d'un revenu supplémentaire, parfois non négligeable. Ainsi, l'acériculteur pourrait stabiliser son revenu en échange de quelques travaux d'installation de ces plantes au sein de l'érablière, ces travaux devant rester minimes étant donné la présence d'arbres sur le terrain et le fait que ces cultures ne soient que « secondaires ». Dans la partie est et centrale de l'Amérique du Nord, ce genre d'association agroforestière est pratiquée depuis plusieurs années déjà, surtout concernant la culture du ginseng (*Panax quinquefolium*) sous couvert forestier qui se révèle être une culture agroforestière très profitable (Gordon et Newman, 1997). Les plantes auxquelles nous nous intéressons n'ont pas une valeur ajoutée aussi forte que celle

du ginseng mais elles possèdent tout de même une valeur commerciale qui pourrait être mise à profit, avec peu d'investissements, dans le cadre d'une culture sous érablière.

Afin de mettre au point des méthodes de culture adéquates pour ces plantes en système agroforestier, nos travaux, rapportés dans ce mémoire, se sont centrés autour de la problématique d'être en mesure d'accélérer ou d'augmenter quantitativement la propagation de ces plantes d'une façon simple et qui soit à la portée de tout acériculteur.

Dans la revue bibliographique qui suit, au chapitre 1, nous nous attacherons d'abord à décrire chacune des espèces sélectionnées, aussi bien d'un point de vue morphologique, écologique que par leurs utilisations actuelles. Nous passerons ensuite en revue les bases de la germination et ce qui est connu en ce domaine concernant les espèces à l'étude. Puis, nous aborderons la multiplication végétative de ces espèces et, plus précisément, le bouturage, qui est la technique de propagation végétative que nous avons choisi d'adopter pour ces espèces. Les deuxième et troisième chapitres exposeront, sous forme d'articles, les résultats obtenus, respectivement, dans les essais de germination et dans ceux de propagation végétative pour les six espèces à l'étude. Enfin, une conclusion sera consacrée à résumer les résultats obtenus et à discuter des techniques de propagation utilisables pour le trille blanc, la sanguinaire, le gingembre sauvage, le caulophylle faux-pigamon, l'actée à grappes, ainsi que le bois piquant.

## Chapitre 1

### Revue bibliographique

#### I- Description des espèces sélectionnées

---

Parmi la multitude de plantes indigènes du Canada, nous en avons sélectionné six, pour notre étude, que nous présentons ci-dessous. Afin de permettre au lecteur de mieux les identifier, nous présentons d'abord leurs noms usuels, suivis d'une description morphologique. Puisqu'il est important que la culture de ces plantes soit compatible avec un système agroforestier dans les érablières du Québec, nous avons ensuite rapporté les éléments les plus pertinents concernant l'écologie et l'aire de répartition de ces plantes. S'ensuivent "l'intérêt horticole", "les propriétés médicinales", ainsi que "les quantités échangées" sur les marchés, trois paragraphes qui éclaireront le lecteur sur le potentiel commercial des plantes sélectionnées. Enfin, un dernier paragraphe fera mention de l'ampleur du risque écologique encouru lors du prélèvement de ces plantes sauvages en populations naturelles.

Concernant l'intérêt horticole des espèces à l'étude, nous ferons souvent référence aux résultats d'un questionnaire édité par FloraQuebeca. Nous donnons ci-après le détail du dispositif de ce questionnaire tel qu'énoncé dans Lamoureux et Nantel, 1999.

FloraQuebeca, une association sans but lucratif, vouée à la connaissance, à la promotion et surtout à la protection de la flore et des paysages végétaux du Québec, s'est inquiétée de l'impact du commerce de plantes indigènes ornementales. Les membres de son *Comité commerce horticole des plantes indigènes*, qui comptait des producteurs de plantes indigènes, préparèrent et diffusèrent deux questionnaires destinés : 1) aux producteurs ou vendeurs de plantes ornementales (questionnaire A); 2) aux utilisateurs ou promoteurs de

ces plantes - principalement des architectes paysagistes (87 %), mais aussi des chroniqueurs horticoles (questionnaire B). [...]

Ce sondage/sensibilisation, une première au Québec, visait deux objectifs: recueillir de l'information permettant d'évaluer la demande en plantes indigènes, et sensibiliser le milieu de l'horticulture ornementale aux problèmes engendrés par un commerce incontrôlé de plantes prélevées en nature. La *Fédération interdisciplinaire de l'horticulture ornementale du Québec* (FIHOQ) distribua 800 questionnaires de type A à des entreprises produisant ou vendant des végétaux. Le questionnaire B, quant à lui, fut expédié aux 300 membres de l'*Association des architectes paysagistes* et FloraQuebeca le soumit à quelques chroniqueurs horticoles. Le sondage/sensibilisation se déroula entre la mi-novembre et la mi-décembre 1996. Au total, seulement 65 personnes ou entreprises retournèrent le questionnaire (11 pour le questionnaire A et 54 pour le questionnaire B) (Lamoureux et Nantel, 1999).

Par ailleurs, lorsque cela fut possible, nous avons repris les données de Lamoureux et Nantel (1999) concernant le nombre de catalogues dans lesquels la plante était répertoriée sur 14 catalogues de ventes au total de producteurs ou vendeurs de plantes indigènes au Québec. Cela permettra au lecteur d'avoir une idée de l'intérêt horticole de l'espèce étudiée au Québec. Un autre chiffre, toujours tiré de cette même étude, a été rapporté dans la section « quantités produites/ échangées ». Ce chiffre représente, pour chaque espèce, la quantité offerte par 6 entreprises parmi les 18 principaux producteurs ou vendeurs de plantes indigènes au Québec. Pour davantage d'information concernant le commerce des plantes indigènes au Québec, le lecteur pourra consulter le détail des résultats des questionnaires A et B en annexe de l'ouvrage de Lamoureux et Nantel (1999).

## **1. Sanguinaria canadensis L.** (Papaveraceae), Bloodroot, Sanguinaire du Canada.

### 1.1- Description morphologique

La sanguinaire du Canada est une herbacée vivace à rhizome charnu de couleur rougeâtre. Petite (20 cm), elle forme des tapis denses dépourvus d'autres plantes (Lamoureux, 2002). La feuille est solitaire, d'une largeur de 10 à 15 cm, épaisse, d'un vert grisâtre, surtout au revers, et découpée en grands lobes au pourtour sinueux. La fleur de couleur blanche est solitaire au bout d'un long pédoncule. La floraison est très printanière s'étendant de la mi-

avril à la mi-mai. Le fruit est une capsule en forme de fuseau mesurant 5 à 8 cm de long qui se fend longitudinalement de chaque côté pour libérer une vingtaine de graines (Lobstein et Rockwood, 1993). Ces dernières sont sphériques, de 2 à 3 mm de diamètre, brunes à maturité et garnies d'un éliosome. Cet éliosome, appendice charnu de nature lipidique, attire les fourmis qui transportent et dispersent ainsi les graines.

### 1.2- Écologie et aire de répartition

La sanguinaire vit dans les peuplements de feuillus ombrageux, frais, humides, ainsi que les pentes boisées bien drainées, à sol légèrement basique à très basique (Small et Catling, 2000). On trouve cette plante dans les érablières riches (à caryers, à tilleul), surtout si ces dernières comptent des micro habitats humides ou le long des plaines d'inondation. Elle est endémique à l'est de l'Amérique du Nord. Elle est présente dans tout l'est et le centre-est des États-Unis à l'exception de la Floride. Au Canada, elle est présente dans le sud du Manitoba, de l'Ontario, du Québec et des provinces maritimes, à l'exception de Terre-Neuve.

### 1.3- Intérêt horticole

La sanguinaire est une des premières espèces à annoncer le printemps de sa fleur blanche cristalline, dès la fonte des neiges. Sa fleur on ne peut plus délicate émergeant d'une feuille tout en rondeur, échancrée et sinueuse, fait toute la beauté éphémère de cette espèce. Elle est présente sur 8 des 14 catalogues de vente des entreprises horticoles offrant des plantes indigènes au Québec (Lamoureux et Nantel, 1999). Cette plante est commandée par un quart des architectes paysagistes qui ont accepté de répondre au questionnaire « B » de FloraQuebeca.

### 1.4- Propriétés médicinales

La sanguinaire entre dans la composition de plus d'une douzaine de préparations pharmaceutiques vendues au Canada, principalement des expectorants, des sirops contre la toux et des teintures (Small et Catling, 2000). La sanguinarine est l'un des alcaloïdes benzophenanthridines les plus actifs de la plante. Ce composé a montré des propriétés bactéricides et bactériostatiques surtout contre les microorganismes à l'origine de la

formation de la plaque dentaire et de la gingivite (Southard *et al.*, 1987). La sanguinarine est également pourvue de propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (Chaturvedi *et al.*, 1997). Récemment, une étude a mis à jour son pouvoir antiprolifératif et apoptique, suggérant ainsi que la sanguinarine pourrait entrer dans la fabrication de médicaments contre le cancer (Ahmad *et al.*, 2000). Un autre de ses alcaloïdes benzophenanthridines, la chélérythrine, a montré une puissante activité antimycobactérienne face à deux mycobactéries, le *Mycobacterium aurum* et le *M. smegmatis* (Newton *et al.*, 2002).

### 1.5- Quantités produites/échangées

Selon Lamoureux et Nantel (1999), la sanguinaire du Canada fait partie des 23 espèces indigènes du Québec produites en très grande quantité. Ils ont, en effet, recensé que la production totale de sanguinaire de 6 producteurs ou vendeurs du Québec était supérieure à 10 000 plants par année au Québec. D'autre part, selon l'American Herbal Products Association, entre 9 000 et 13 600 kg de racines séchées de sanguinaire seraient récoltées annuellement en milieu naturel aux États-Unis (McGuffin et Young, 2001).

### 1.6- Évaluation du risque lié au prélèvement

Le risque lié au prélèvement de cette plante est considéré comme très élevé en raison d'une propagation très lente. Sa culture semble toutefois rentable avec des risques de pertes (Lamoureux et Nantel, 1999).

**2. Asarum canadense L.** (Aristolochiaceae), Wild ginger, Canada snakeroot, Gingembre sauvage, Asaret du Canada.

### 2.1- Description morphologique

Le gingembre sauvage est une herbacée vivace à rhizome fin et allongé, peu profondément enfoui et dépourvue de tige aérienne (Lamoureux, 2002). Petit (15 cm), il forme des tapis très denses, souvent dépourvus d'autres plantes. Ses deux grandes feuilles, qui mesurent 10 à 15 cm de diamètre à maturité, sont en forme de rein, velues, satinées et d'un vert sombre. La fleur, d'un rouge sombre, est cachée au niveau du sol. Elle est formée d'un calice à 3 lobes et sans corolle. La floraison est très printanière s'étendant d'avril à mai. Le fruit est

une capsule globuleuse charnue contenant une quinzaine de graines de 4 à 5 mm de long (Lobstein et Rockwood, 1993). Les graines sont de formes triangulaire et de couleur brun foncé avec des reflets verdâtres. Elles possèdent un éliosome, ce qui leur permet d'être disséminées par les fourmis.

## 2.2- Écologie et aire de répartition

Cette plante pousse à l'ombre, sur des sols mésiques avec un pH qui varie de 4,5 à 6 (Lamoureux, 2002). Au Québec, on la trouve dans les érablières les plus riches (à caryers, à tilleul), souvent sur des sols calcaires ou en bordure des cours d'eau. Son aire de répartition est assez étendue et couvre presque tout l'est et le centre-est des États-Unis à l'exception de l'état de la Floride. Au Canada, cependant, le gingembre sauvage n'est présent que dans la portion sud du Manitoba, de l'Ontario, du Québec et du Nouveau-Brunswick.

## 2.3- Intérêt horticole

Le gingembre sauvage est très apprécié pour son feuillage dense et au raz du sol, ce qui en fait un très bon couvre-sol dans les endroits ombragés. Il est présent dans 6 des 14 catalogues de vente cités précédemment et il est commandé par les architectes paysagistes dans 5 cas sur 54, c'est-à-dire dans 9% des cas (Lamoureux et Nantel, 1999).

## 2.4- Propriétés médicinales

Le gingembre sauvage, à ne pas confondre avec le gingembre cultivé (*Zingiber officinale*), a traditionnellement été utilisé comme plante médicinale (Locock, 1995). De 1820 à 1873, il faisait partie de la United States Pharmacopoeia et, de 1916 à 1947, du National Formulary. Une huile essentielle est extraite à partir du rhizome du gingembre sauvage (Motto et Secord, 1985). Le principal constituant de son huile essentielle, le méthylleugenol, aurait des propriétés sédatives et narcotiques chez des souris et empêcherait la mort de souris traitées à des doses létales de strychnine (Locock, 1995). Le gingembre sauvage comprend également de l'acide aristolochique, un composé présentant des propriétés anti-inflammatoires, immunostimulantes et antibactériennes (Cavallito et Bailey, 1946). Cependant, on met en garde les gens contre l'ingestion de plantes contenant de l'acide aristolochique (Schaneberg *et al.*, 2002). Ce dernier composé aurait une toxicité

rénale et augmenterait ainsi les risques de développer un cancer des voies urinaires (Nortier *et al.*, 2003).

2.5- Quantités produites/échangées Information non trouvée.

2.6- Évaluation du risque lié au prélèvement

Que ce soit à partir de ses graines qui ont un pourcentage de germination allant de 60 à 80 % ou à partir de son rhizome qui se ramifie pour s'étaler de 14 cm<sup>2</sup> par année (Lamoureux, 2002), cette espèce ne présente pas de problème particulier quant à sa reproduction en milieu naturel, si ce n'est la lenteur de sa croissance.

**3. Trillium grandiflorum (Michx.) Salisb.** (Liliaceae ou Trilliaceae, selon les botanistes), Large-flowered trillium, White trillium, Trille blanc.

3.1- Description morphologique

Le trille blanc est une herbacée vivace à rhizome charnu (Case et Case, 1997). De taille moyenne, pouvant atteindre 30 cm de haut, il pousse en très grandes colonies formées de tiges solitaires. Les trois feuilles cordées que produit la plante sont presque aussi larges que longues, longuement effilées et sans pétiole. La fleur est grande (8 cm de diamètre), pédonculée, avec trois pétales, plus larges que chez les autres trilles, d'un blanc éclatant devenant rose en fin de floraison. La floraison est printanière. Le fruit est une capsule globuleuse vert pâle de 15 à 25 mm de diamètre qui contient entre 30 et 80 graines. À maturité, les graines deviennent brunes. Elles mesurent alors de 2 à 4 mm de long et sont pourvues d'un éliosome sur leur côté (Solt, 2002). Elles aussi sont dispersées par les fourmis.

3.2- Écologie et aire de répartition

Le trille blanc est une plante d'ombre qui croît sur des sols riches, bien drainés, au pH neutre ou légèrement acide (Case et Case, 1997). Plante des forêts mixtes ou décidues, le trille blanc pousse préférentiellement dans les érablières à caryers ou à tilleul. Sa répartition est limitée au nord-est de l'Amérique du Nord, de la Caroline du Nord, jusqu'au sud du

Québec et de l'Ontario. On la trouve localement tout le long de la chaîne appalachienne et communément dans le Smoky Mountain National Park situé en Caroline du Nord. Vers l'ouest, le trille blanc atteint l'état du Minnesota.

### 3.3- Intérêt horticole

Le trille blanc est une espèce horticole très réputée (Case et Case, 1997). Il est l'emblème provincial de l'Ontario depuis 1937. Dans les jardins européens, c'est une des fleurs qui coûte le plus cher dans la catégorie des plantes d'ombre ou de sous-bois. Au Japon, quantités d'études scientifiques portent sur les trilles qui font l'objet d'une véritable dévotion. Les auteurs tels que Samejima et Samejima, Fukuda, ou encore Kurabayashi compte parmi ces scientifiques japonais fascinés par les trilles. Au Québec, le trille blanc est présent dans 4 des 14 catalogues de vente de plantes indigènes au Québec (Lamoureux, 2002). De plus, toutes les espèces de trilles confondues sont commandées par 18 des 54 architectes paysagistes qui ont accepté de répondre au questionnaire B de FloraQuebeca. La réputation du trille blanc pour sa qualité ornementale n'est ainsi plus à faire. C'est une réputation largement méritée qui est reconnue de par le monde (Case et Case, 1997).

### 3.4- Propriétés médicinales

La diosgénine est un précurseur de stéroïdes utilisés dans la préparation de contraceptifs et de la cortisone. Cette substance a déjà été identifiée chez différentes espèces de trilles (Paul et Handa, 1963; Fukuda *et al.*, 1981). Lamoureux (2002) a rapporté que le rhizome du trille blanc, par hydrolyse, produisait également de la diosgénine.

### 3.5- Quantités produites/échangées

Lamoureux et Nantel (1999) classe le trille blanc parmi les 53 espèces indigènes au Québec produites en grande quantité, c'est-à-dire entre 2 000 et 10 000 plants par année, basé sur les chiffres fournis par 6 des 18 plus importants producteurs ou vendeurs québécois de plantes indigènes. Aux États-Unis, les quantités de rhizomes de trilles exportés chaque année ont passé de 3 000 en 1981-1982, à 13 000 en 1986-1987; les trilles blancs et rouges, prélevés en milieu naturel, figurent parmi les plus vendus (Sawkins et McGough, 1993). En

1989, le nombre de trilles prélevés et exportés hors des États-Unis a atteint, pour le seul état du Tennessee, 600 000.

### 3.6- Évaluation du risque lié au prélèvement

Le principal inconvénient de la biologie des trilles, et du trille blanc en particulier, réside en la lenteur de croissance de la plante qui fait de sa culture commerciale, une production non rentable (Case et Case, 1997). En effet, en condition naturelle, le cycle de la plante (c'est-à-dire de la graine à la première fleur) demande théoriquement un minimum de 7 à 10 ans! Même si la culture peut accélérer le processus à 5 ou 6 ans « seulement », on comprend pourquoi la culture des trilles à partir des graines n'est pas rentable. De plus, le trille blanc ne se propage pas végétativement (Hanzawa et Kalisz, 1993). Le trille blanc ayant une croissance très lente, le risque lié à son prélèvement en milieu naturel est classé comme « extrême » selon Lamoureux et Nantel (1999). Néanmoins, Case et Case (1997) assurent que cette espèce est abondante dans son aire de distribution.

## **4. Caulophyllum thalictroides (L.) Michx.** (Berberidaceae), Yellow-flowered blue cohosh, Cohosh bleu, Caulophylle faux-pigamon.

### 4.1- Description morphologique

Le caulophylle faux-pigamon est une herbacée vivace formant un rhizome épais et tordu (Lamoureux, 2002). De taille moyenne (75 cm), il forme de petites colonies. D'une teinte violacée remarquable au début de la saison, il devient vert avec le déploiement de ses feuilles composées-ternées. C'est une plante glabre et à pruine abondante. La fleur est petite, moins de 2 cm de diamètre. Elle est constituée de six sépales charnues pourpres et d'autant de minuscules pétales nectarifères avec au centre six étamines jaunes. Quant au fruit, il est sphérique, d'un bleu mat et d'un cm de diamètre environ. Chaque fruit contient une seule graine. Notons également que ce fruit est toxique.

### 4.2- Écologie et aire de répartition

Le caulophylle faux-pigamon est une plante d'ombre qui s'épanouit sur les sols rocheux et organiques, humides à mésiques et riches en humus (Small et Catling, 2000). Il s'adapte à

un large éventail de pH allant de 4,5 à 7,0. Le caulophylle s'observe fréquemment dans les érablières riches (à caryers ou à tilleul) et calcaires mais aussi, exceptionnellement, dans des érablières à bouleau jaune. Son aire de répartition, assez étendue, se situe principalement dans l'est et le centre-est de l'Amérique du Nord. Il est essentiellement absent des états du Sud-Est américain ainsi que des provinces maritimes.

#### 4.3- Intérêt horticole

Une grande partie de l'intérêt horticole du caulophylle repose sur la couleur de son feuillage. D'un violet extraordinaire dans ses jeunes stades, la plante devient vert bleuté, une fois épanouie. Elle plaît également aux jardiniers pour son feuillage aéré. Le caulophylle est répertorié dans 3 des 14 catalogues de vente mentionnés plus haut (Lamoureux et Nantel, 1999).

#### 4.4- Propriétés médicinales

Dans l'extrait de rhizomes et racines du caulophylle, on trouve des alcaloïdes dont la méthylcystisine, composé dont l'action ressemble à celle de la nicotine, mais avec une toxicité 40 fois inférieure (Scott et Chen, 1943). La méthylcystisine, ou caulophylline, est reconnue pour augmenter la pression sanguine et stimuler à la fois la respiration et le flux intestinal (allant même jusqu'à causer parfois des spasmes intestinaux). Des saponosides sont également présents dans ses rhizomes et racines, en particulier la caulosaponine (Power et Salway, 1913). Ce composé serait à l'origine de l'action ocytotique de la plante (Tyler, 1999), d'où son emploi pour faciliter l'accouchement et régulariser les menstruations, mais aussi comme abortif (Small et Catling, 2000). Cette même molécule provoque une vasoconstriction des vaisseaux sanguins coronariens, et peut donc avoir un effet toxique pour le cœur, ce qui implique une grande précaution dans l'utilisation phytothérapeutique de cette espèce.

#### 4.5- Quantités produites/échangées

Tout comme le trille blanc, le caulophylle fait parti des plantes indigènes produites en grande quantité, avec entre 2 000 et 10 000 plants arrivant chaque année sur le marché québécois (Lamoureux et Nantel, 1999). Aux États-Unis, entre 4 500 et 9 000 kg de racines

séchées de caulophylle seraient récoltées annuellement en milieu naturel, d'après l'American Herbal Products Association (McGuffin et Young, 2001).

#### 4.6- Évaluation du risque lié au prélèvement

De la graine à la première floraison, il faut compter entre 5 et 7 ans (Lamoureux et Nantel, 1999). Cette plante, ayant une croissance très lente combinée à une faible production de graines, est classée parmi les espèces dont la culture commerciale est non rentable et le risque lié au prélèvement "extrême".

**5. Actaea racemosa L., anciennement appelée Cimicifuga racemosa (L.) Nutt**  
(Renunculaceae), Black Cohosh, Actée à grappes.

#### 5.1- Description morphologique

L'actée à grappes est une herbacée vivace de 1 à 2,6 m de haut formant de gros rhizomes compacts (Small et Catling, 2000). Les feuilles sont composées et profondément dentées. L'inflorescence est un long racème blanc de 10 à 60 cm composé de petites fleurs blanches qui fleurissent successivement de la base au sommet du racème. La floraison a lieu au milieu, voire à la fin de l'été. Le fruit est un follicule de couleur marron foncé.

#### 5.2- Écologie et aire de répartition

L'actée à grappes est une plante des milieux partiellement ombragés, aux sols riches et humides, ayant un pH de 5 à 6 (Small et Catling, 2000). On la trouve surtout sur les versants riches et arborés, mais elle s'adapte aussi assez bien aux boisés ouverts, partiellement ombragés, ainsi qu'aux taillis rocheux. L'aire de répartition de la plante se situe dans l'est de l'Amérique du Nord. Elle est plutôt rare au Canada, où elle n'existe à l'état naturel que dans la zone carolinienne de l'Ontario. Elle est également peu présente dans les états du Sud-Est américain.

#### 5.3- Intérêt horticole

L'actée à grappes est aussi connue sous le nom de "fairy candles" en anglais, ce qui reflète bien la particularité ornementale de cette plante (Cullina, 2000). Les inflorescences

ressemblent effectivement à des chandelles incandescentes féeriques, dansant au gré des vents et se consumant de bas en haut au fur et à mesure de l'épanouissement des fleurs du racème. Nous n'avons malheureusement pas trouvé d'informations concernant la vente de cette espèce, bien qu'elle soit présente sur le marché horticole.

#### 5.4- Propriétés médicinales

L'espèce a gagné sa réputation de plante médicinale en Occident grâce à son effet sur le système endocrinien, lui permettant de soulager certains symptômes de la ménopause tels la dépression et l'anxiété (Lieberman, 1998; Liske, 1998; McKenna *et al.*, 2001) et ce mieux que le Valium® ou le Premarin® (Warnecke, 1985). D'autre part, la matière résineuse contenue dans les rhizomes, l'actéine, exerce un effet hypotenseur chez divers animaux et provoque une vasodilatation périphérique et une augmentation du débit sanguin chez l'homme (Anonyme, 2003). De plus, le rhizome de l'actée à grappes a démontré des effets anti-inflammatoires analgésiques et antipyrétiques. Enfin, de récentes recherches menées *in vitro* ont montré que l'extrait de l'actée à grappes inhibait la croissance des cellules cancéreuses du sein (Bodinet et Freudenstein, 2002). Ces mêmes recherches ont mis en évidence le fait que la plante augmente les effets antiprolifératifs du tamoxifène.

L'utilisation médicale de l'actée à grappes est largement répandue en Europe et en Australie, où plusieurs millions de cachets de Remifemin, extrait standardisé d'actée à grappes, ont été utilisés depuis quelques années (Small et Catling, 2000). Au Canada, l'actée à grappes entre dans la composition de 29 produits pharmaceutiques fabriqués uniquement à partir de plantes cueillies en milieu sauvage.

#### 5.5- Quantités produites/échangées

En 1999, aux États-Unis, 67 tonnes de racines séchées ont été enregistrées, dont seulement 2 % provenaient de la culture (McGuffin et Young, 2001).

#### 5.6- Évaluation du risque lié au prélèvement

Le cycle de la plante, de la graine à la graine, est de 3 ou 4 ans (Small et Catling, 2000). En milieu naturel, l'actée à grappes compte plusieurs centaines de populations aux États-Unis.

Ces dernières sont dispersées en Indiana, au Maryland, dans l'état de New York, en Caroline du Sud et au Tennessee, avec une forte densité, mille populations environ, en Caroline du Nord (Lyke, 2001). Les récoltes en milieu naturel sont déjà à l'origine du déclin, voire de la disparition, de plusieurs populations de l'actée à grappes. Pour cette raison, l'espèce a été proposée pour apparaître dans l'appendice II de la Convention internationale du commerce des espèces en danger de la faune et de la flore sauvages (CITES-Appendix II).

**6. Oplopanax horridus (Sm.) Miq.** (Araliaceae) Devil's club, Bois piquant, Aralie épineuse.

**6.1- Description morphologique**

Le bois piquant est un arbuste très épineux (comme son nom vernaculaire l'indique), peu ramifié, à feuille caduque, qui peut mesurer entre 1 et 3 m de haut (Ringius et Sims, 1997; Small et Catling, 2000). Cette espèce peut former des colonies aussi bien ouvertes que pratiquement impénétrables, entre autres grâce à sa capacité de marcottage naturelle. Les tiges âgées présentent des épines robustes et une écorce papyracée brun gris. Les feuilles alternes sont très larges (20 - 40 cm), à nervures saillantes et épineuses et présentent une forme typique de feuille d'érable. La floraison a lieu en juillet et les graines arrivent à maturité en août dans son aire de répartition. L'inflorescence de 10 à 20 cm de long est composée de petites fleurs blanc verdâtre. Le fruit est une drupe de 4 à 6 mm de diamètre, de couleur rouge vif, qui contient, en moyenne, une vingtaine de graines (Traveset et Willson, 1997). Les fruits sont fréquemment mangés par les ours.

**6.2- Écologie et aire de répartition**

Le bois piquant est un arbuste nitrophile d'ombre, qui pousse préférentiellement sur les sols riches très humides à mouillés avec un pH acide (3,8 à 6) (Small et Catling, 2000). L'arbuste se retrouve souvent en sous-étage des forêts humides, partiellement ouvertes à fermées, des basses terres, mais aussi dans les clairières. On trouve cette espèce aussi bien sous les climats maritimes que continentaux. Elle domine le sous-étage de diverses forêts conifériennes du nord-ouest des Etats-Unis et de la Colombie-Britannique. L'aire de

répartition de cette espèce s'étend tout le long de la côte ouest de l'Amérique du Nord, de la partie sud de l'Alaska jusque dans les états de Washington et d'Oregon. À l'est, on trouve la plante jusque dans les Rocheuses. Une enclave de plusieurs populations distinctes de bois piquant se situe sur plusieurs îles au nord du lac Supérieur.

### 6.3- Intérêt horticole

Impressionnante par sa taille et ses énormes feuilles palmées, cette espèce ne manque pas de se faire remarquer. Ses épines irritantes, présentes aussi bien sur les tiges que sur les feuilles, la prédisposent à servir de clôture végétale, très efficace contre les rôdeurs ou les animaux. Il est à noter que cette plante, accumulatrice de cuivre, s'avère utile dans les études géobotaniques et pour la reconversion des sites pollués par le cuivre (Ringius et Sims, 1997).

### 6.4- Propriétés médicinales

Des extraits de bois piquant ont révélé des activités antibactériennes, une activité anti-*Candida*, ainsi que des activités antimycobactériennes (Kobaisy *et al.*, 1997). Un extrait à partir de son bois inhiberait, en effet, complètement la croissance du *Mycobacterium tuberculosis* et du *M. avium* qui sont les deux principaux agents pathogènes à l'origine de la tuberculose (McCutcheon *et al.*, 1997). Enfin, cette plante, la plus importante pour les populations autochtones de l'ouest de l'Amérique du Nord, jouit d'une réputation d'hypoglycémiant depuis très longtemps et c'est peut être là sa propriété médicinale la plus prometteuse (Small et Catling, 2000). Cependant, c'est une propriété controversée et qui n'a pas pu être démontrée scientifiquement (Thommasen *et al.*, 1990). Il semblerait toutefois qu'il y ait un consensus s'accordant à attribuer au bois piquant une action hypoglycémiant en raison d'une utilisation très ancienne de la plante à cet effet (Marles et Farnsworth, 1995).

### 6.5- Quantités produites/échangées

Les récentes études dévoilant le potentiel pharmaceutique de la plante ont fait augmenter sa récolte commerciale. En 1997, celle-ci a été estimée à plus de 2 000 kg d'écorce en Colombie-Britannique (Wills et Lipsey, 1999).

### 6.6- Évaluation du risque de prélèvement

Le bois piquant a été désigné espèce rare au Yukon et en Ontario (Ringius et Sims, 1997). Aux États-Unis, l'espèce est considérée menacée au Michigan. Des pressions importantes s'exercent déjà sur les populations naturelles de bois piquant.

## **7. Intérêt d'une propagation commerciale pour les six espèces sélectionnées**

Comme on a pu le constater, les six plantes indigènes du Canada dont il est question ici ont un intérêt commercial avéré, qu'il concerne leurs qualités ornementales ou bien leurs propriétés médicinales. Les données de quantités produites et échangées nous informent que la sanguinaire, le trille blanc, le caulophylle faux-pigamon et l'actée à grappes que l'on trouve sur les marchés des États-Unis ne sont quasiment jamais cultivés. Bien que nous ne possédions pas de telles informations pour les marchés canadiens, il est fort probable que la situation soit la même. Avec une propagation lente à très lente pour la sanguinaire et le caulophylle faux-pigamon, quand elle n'est pas très lente à impossible comme c'est le cas du trille blanc, il apparaît clairement que la culture commerciale n'est pas rentable et, qu'en conséquence, les producteurs s'approvisionnent majoritairement de plantes prélevées en milieu naturel. Par ailleurs, ces derniers ne le font pas toujours sciemment étant donné qu'il y a souvent plusieurs paires de mains « aveugles et sourdes » qui séparent le fournisseur du producteur soucieux de répondre à la demande.

La culture des espèces à l'étude pourrait donc participer à la lutte contre l'épuisement de la ressource naturelle, bien que ce ne soit pas là son seul avantage, comme nous l'avons déjà souligné. De plus, la mise en culture de trois des espèces que nous venons de présenter deviendra d'autant plus importante qu'un projet de règlement, au Québec, se dessine. Le Ministère de l'Environnement du Québec compte en effet désigner neuf espèces, parmi lesquelles le gingembre sauvage, la sanguinaire du Canada et le trille blanc, comme « espèces vulnérables au Québec » en vertu de la Loi sur les espèces menacées ou vulnérables (Lamoureux, 2002; Couillard, 2004). Cette désignation aura pour effet d'interdire le prélèvement intégral de ces espèces, y compris les parties souterraines, à des

fins commerciales, de même que le commerce des individus prélevés en milieu naturel. La récolte de plants cultivés et non plus sauvages risque donc bientôt d'être la seule source légale d'approvisionnement pour ces trois espèces.

Le premier pas concernant les méthodes de culture consiste à trouver un moyen qui soit rentable de propager ces espèces, autrement dit, une propagation qui serait à la fois rapide et multiplierait suffisamment le matériel de départ. C'est sur cet objectif général de propagation que repose tout ce travail de maîtrise. La suite de ce mémoire traitera donc des différents modes de propagation envisagés pour multiplier ces six espèces, que ce soit la propagation par les graines, issue de la reproduction sexuée, ou la propagation par bouturage, issue de la multiplication végétative des espèces.

## II- La propagation par les graines

---

Toutes les espèces sélectionnées ont la possibilité de se reproduire grâce à la dissémination, puis la germination des graines produites. Même si peu de plantules sont visibles sur le terrain, ce mode de propagation reste très intéressant pour un producteur car il est facile à mettre en œuvre. En effet, il suffit, en théorie, de récolter les graines parvenues à maturité, puis de les semer à la volée au sol pour qu'apparaissent de nouvelles plantes quelques jours plus tard. "En théorie" seulement, car il semble que le processus soit plus compliqué pour les espèces de notre étude.

Dans les pages qui suivent, nous présenterons d'abord ce qu'est la germination, ainsi qu'une description des graines qui permettra de nous familiariser avec les termes utilisés. Nous verrons ensuite les types de dormance associés aux graines, ainsi que les traitements généralement utilisés pour les surmonter. Toutes ces informations nous permettront

d'entrevoir des pistes de solutions éventuelles pour faciliter et accélérer la germination des graines des six espèces à l'étude.

## **1. La germination et la morphologie des graines à l'étude**

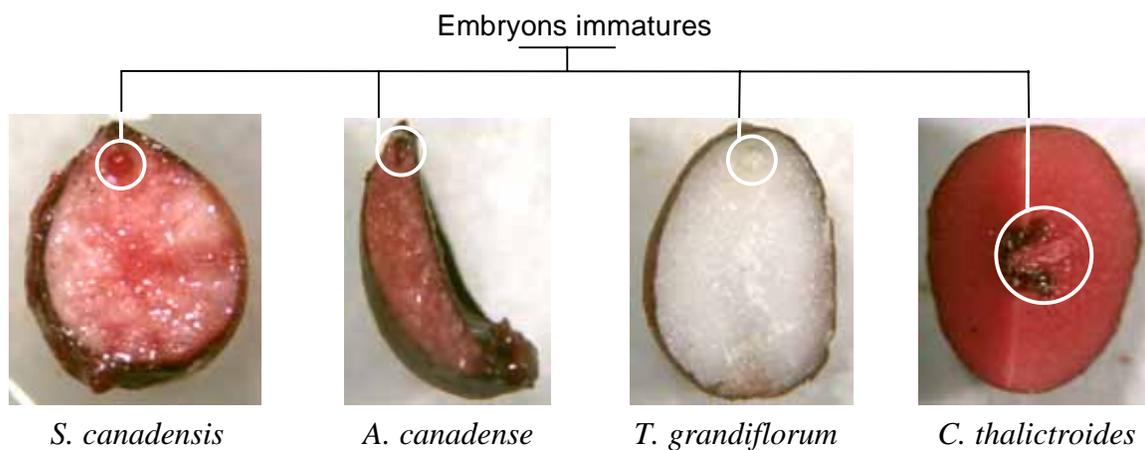
### 1.1- La germination

La germination d'une graine est définie comme étant la somme des événements qui commencent avec l'imbibition et se termine par l'émergence d'une partie de l'embryon, généralement la radicule, à travers les tissus qui l'entourent (Bewley, 1997). L'eau est d'abord absorbée par les ouvertures naturelles de la graine, puis diffusée à travers ses tissus (Young et Young, 1986). Les cellules de la graine deviennent ensuite turgescentes. La graine grossit alors en volume et devient davantage perméable à l'oxygène et au dioxyde de carbone. À la suite de l'hydratation, sous l'effet de la dilatation de la graine, les téguments s'ouvrent, et l'embryon subit des changements métaboliques qui réamorcent sa croissance. Des enzymes commencent à dégrader les réserves contenues dans l'albumen ou dans les cotylédons, et les nutriments parviennent aux régions en croissance de l'embryon. La synthèse de nouvelles molécules donne lieu à une augmentation en taille de l'embryon jusqu'à ce que ce dernier émerge de la graine. Le premier organe à émerger de la graine est généralement la radicule qui constitue la racine embryonnaire. S'ensuit l'émergence de l'épicotyle et des cotylédons, qui constituent la partie aérienne de la plantule.

### 1.2- La morphologie des graines à l'étude

Une graine est formée de trois éléments différents (Young et Young, 1986). L'élément le plus externe est une couche protectrice appelée « téguments » de la graine. Plus à l'intérieur, on trouve, dans le cas des graines albuminées, un tissu de réserve appelé « albumen » ou « endosperme » chez les angiospermes. Enfin, au cœur de la graine, se trouve l'embryon. Ce dernier est formé d'une radicule (future racine), d'un ou de plusieurs cotylédon(s) (un, dans le cas des monocotylédones, deux, pour les dicotylédones, ou plusieurs, chez les gymnospermes), d'un épicotyle (future tige), d'une plumule (bourgeon

apical), et enfin d'un hypocotyle qui fait le lien entre les parties aériennes et les parties souterraines de la future plante. Dans notre étude, seul le trille blanc appartient aux monocotylédones, toutes les autres espèces, c'est-à-dire la sanguinaire, le gingembre sauvage, le caulophylle faux-pigamon, l'actée à grappes ainsi que le bois piquant, sont des dicotylédones. L'embryon n'occupe pas la même place dans toutes les graines. Il peut tout aussi bien être bien développé, avec ses différentes structures, et remplir presque la totalité de la graine, comme il peut aussi être rudimentaire et ne former qu'une toute petite masse de cellules au sein de la graine. Selon nos propres observations, les embryons des graines à l'étude sont tous rudimentaires ou sous-développés. Cette information est confirmée pour les familles des Papavéracées (celle de la sanguinaire) et des Araliacées (celle du bois piquant) (Baskin et Baskin, 1998), ainsi que pour l'actée à grappes (Baskin et Baskin, 1985). La figure 1 présentée ci-dessous fait bien ressortir un embryon très petit par rapport à l'albumen pour quatre des espèces étudiées.



**Figure 1.** Coupes longitudinales des graines de sanguinaire (*S. canadensis*), de gingembre sauvage (*A. canadense*), de trille blanc (*T. grandiflorum*) et de caulophylle faux-pigamon (*C. thalictroides*) présentant un embryon immature.

Cette description fait ressortir, pour les graines des six espèces à l'étude, un état immature de l'embryon. Nous allons voir que cette caractéristique morphologique et physiologique est importante pour la germination, ou plutôt, la non germination de ces graines.

En règle générale, les graines mûrissent, deviennent quiescentes, puis germeront dès que de l'eau, de l'oxygène et des conditions de températures adéquates leur seront fournies (Srivastava, 2002). Par contre, il arrive chez beaucoup d'espèces, dont celles que nous étudions, qu'en plus d'être quiescentes, les graines deviennent "dormantes", c'est-à-dire qu'elles ne germeront pas, bien qu'étant dans des conditions environnementales optimales pour cela. Les graines dormantes ont alors besoin d'un autre signal, environnemental la plupart du temps, tel que la température ou la lumière, pour pouvoir germer. Il n'y a pas "une" mais "des" dormances. Savoir quel type de dormance exprime la graine étudiée permet souvent d'identifier la raison pour laquelle la graine ne germe pas, et donc d'identifier des traitements susceptibles de conduire à la germination de cette graine.

## **2. Les types de dormance**

Un des problèmes, lorsqu'on aborde la dormance des graines, est qu'il n'existe pas de terminologie qui soit reconnue pour décrire les différents types de dormance. Ainsi Geneve (2003) écrit :

Crocker (1916) a décrit sept types de dormance selon les traitements utilisés pour les surmonter. Nikolaeva (1977) a ensuite décrit des types de dormance essentiellement selon les contrôles physiologiques qui les gouvernaient. Plus récemment, Lang (1987) a proposé les termes eco-, para-, et endo-dormance pour simplifier la classification des types de dormance. Cette terminologie, souvent utilisée par les horticulteurs dans les journaux de la société américaine des sciences horticoles, n'est cependant pas suffisante pour décrire adéquatement tous les types de dormance rencontrés. Baskin et Baskin (1998) ont développé la panoplie de termes la plus complète pour désigner les différents types de dormance des graines. Ils ont, en fait, repris la classification de Nikolaeva pour l'étendre à de nouveaux types de dormance particuliers (Geneve, 2003).

C'est justement en fonction de dernière cette classification que les graines des espèces de notre étude ont le plus été étudiées, désignées et répertoriées. Dans ce mémoire, nous nous appuierons donc sur la classification élaborée par Baskin et Baskin (1998). Selon cette

classification, on distingue cinq grands types de dormance en fonction du ou des facteur(s) mis en cause dans la non germination des graines sous conditions propices à la germination.

Ainsi, selon Baskin et Baskin (1986), la dormance peut être physiologique, morphologique, physique, chimique ou encore mécanique. Certaines de ces dormances peuvent, par ailleurs, être combinées et former ainsi une nouvelle catégorie. C'est le cas des graines des cinq espèces de l'est du Canada sur lesquelles nous travaillons. Celles-ci sont classées parmi les graines ayant une dormance de type « morphophysiologique » (MP), autrement dit une combinaison de dormance morphologique et physiologique, et plus particulièrement une « dormance MP simple et profonde de l'épicotyle », ou bien une « dormance MP simple et profonde double ».

### 2.1- La dormance morphologique

La dormance « morphologique » est due à la présence d'un embryon « sous-développé » au moment de la dissémination des graines (Baskin et Baskin, 1998). La germination ne peut avoir lieu tant que l'embryon n'est pas arrivé au terme de sa croissance. Dans le cas des espèces de notre étude, l'embryon est déjà différencié - ce qui n'est pas toujours le cas pour d'autres espèces. L'adjectif « sous-développé » a alors trait au fait que la croissance des embryons n'a pas encore eu lieu et qu'ils sont, par conséquent, très petits (comme cela est bien visible sur les photos). Pour que l'embryon puisse croître, il lui faut rencontrer certaines conditions : un substrat humide pour assurer l'imbibition de l'embryon; des températures adéquates permettant la croissance de l'embryon; et, pour certaines espèces, un rapport approprié lumière/obscurité. Dans le cas présent, c'est-à-dire des graines avec une dormance MP simple et profonde, les températures doivent être « chaudes », c'est-à-dire comprises entre 15 et 30°C. Cependant, une différence de température entre le jour et la nuit paraît être plus propice à la germination qu'une température stable tout au long de la journée (Geneve, 2003).

D'autre part, la dormance de l'embryon, que Baskin et Baskin (1998) appelle dormance morphologique, impliquerait selon d'autres auteurs essentiellement deux facteurs: les cotylédons, ainsi que des inhibiteurs de germination, dont surtout l'acide abscissique (ABA)

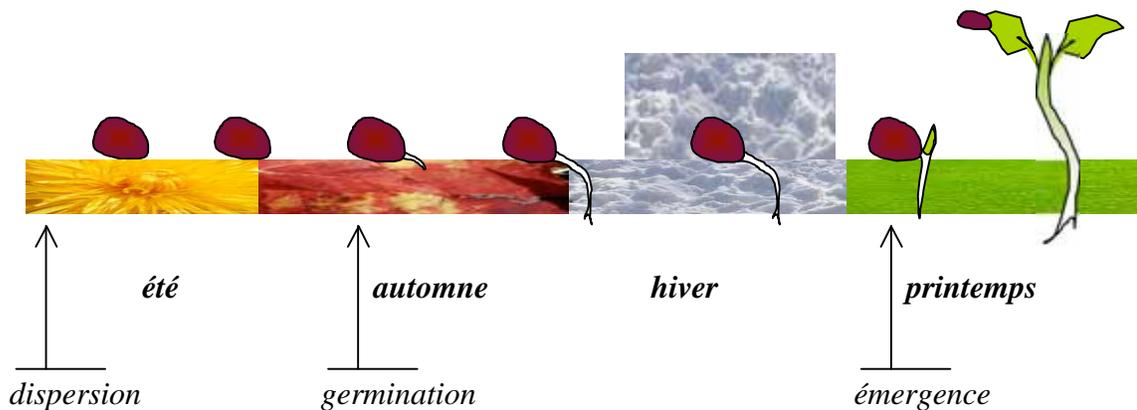
(Bewley et Black, 1994). Ainsi, l'excision des cotylédons permettrait de faire germer des graines dont l'embryon était dormant, y compris des graines ayant une dormance de l'épicotyle. Concernant les inhibiteurs de germination, il a été montré que les graines d'if à baie (*Taxus baccata*) et de pomme pouvaient germer en condition de lessivage. Après examen des substances lessivées, il a été trouvé que presque toutes les formes d'ABA, libres et complexées, avaient quitté l'embryon pour se retrouver dans le liquide de lessivage (Le Page-Degivry, 1973). Étant donné que l'ABA, quand il se trouve dans l'embryon, inhibe la germination, il a donc sûrement un rôle à jouer dans le maintien de la dormance morphologique. Une autre étude a montré que si l'on traitait des embryons dormants de l'hélianthe annuel (*Helianthus annuus*) avec de la fluridone, un inhibiteur de synthèse d'ABA, les embryons n'étaient plus dormants et la radicule commençait à croître (Le Page-Degivry et Garello, 1992). Même si la preuve directe de l'implication de l'ABA dans le maintien de la dormance morphologique n'a pas encore été apportée, ces études s'accordent à montrer que l'ABA est tout de même fortement impliqué dans cette dormance.

## 2.2- La dormance physiologique

À cette dormance morphologique, s'ajoute une dormance « physiologique » des graines. Celle-ci met en cause un ou plusieurs mécanisme(s) physiologique(s) qui provien(nen)t de l'embryon et qui inhibe(nt) l'émergence de la radicule (Baskin et Baskin, 1998). Toutefois, l'effet des structures qui entourent l'embryon, telles l'albumen ou les téguments, n'est pas à négliger comme cause potentielle de ce type de dormance. Alors que la dormance morphologique est rattachée à un embryon immature qualifié de rudimentaire ou linéaire, la dormance physiologique n'est liée à aucun critère morphologique et peut se présenter chez n'importe quel type de graines. La dormance physiologique « profonde », impliquée dans la dormance des graines de notre étude, se caractérise par le fait que seule une longue période de stratification à froid est capable de la lever. Dans ce cas, l'application de gibbérellines (GA) se révèle inefficace pour se substituer à la stratification au froid (Baskin et Baskin, 1998). Des températures d'environ 4 à 5°C semblent être optimales pour la stratification à froid.

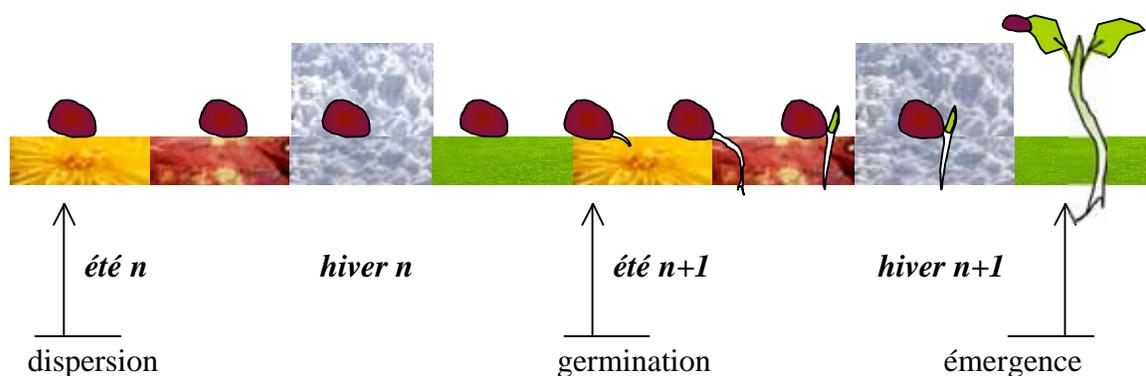
### 2.3- Les dormances morphophysiologiques

La dormance morphophysiologique se divise en huit sous-classes. Nous ne parlerons que de deux d'entre elles : la dormance MP simple et profonde de l'épicotyle et la dormance MP simple et profonde double. Nous avons déjà vu à quoi les termes « morphologique », « physiologique », et « profonde » se réfèrent. Pour ce qui est de la dormance « simple », cela signifie que, pour les graines qui doivent bénéficier d'une stratification à chaud, puis à froid, pour être en mesure de germer, la croissance de l'embryon se fait pendant la période au chaud, puis se continue pendant la période au froid (Baskin et Baskin, 1998). Les dormances MP simple et profonde de l'épicotyle et MP simple et profonde double donnent lieu à des émergences de la radicule et de l'épicotyle séparées dans le temps. Ainsi, les graines ayant une **dormance MP simple et profonde de l'épicotyle** sortiront leur radicule à l'automne, après une période de stratification à chaud (levée de la dormance morphologique), et l'émergence des cotylédons se fera au printemps suivant, après la période de stratification au froid vécue pendant l'hiver (levée de la dormance physiologique de l'épicotyle) (figure 2). C'est ce type de dormance qu'expriment les graines du gingembre sauvage (Baskin et Baskin, 1986), de l'actée à grappe (Baskin et Baskin, 1985), et 51 % des graines de la sanguinaire du Canada (Barton, 1944).



**Figure 2.** Dormance MP simple et profonde de l'épicotyle. Chronologie du développement de la plantule en fonction des saisons de l'année, de la dispersion des graines jusqu'à l'apparition de la plantule à la surface du sol.

Pour ce qui est des graines avec une **dormance MP simple et profonde double**, l'émergence de la racicule a lieu au printemps, après une première stratification à froid, puis un retour aux températures chaudes permettant la croissance de l'embryon. Les cotylédons, quant à eux, ne sortiront pas avant le second printemps, après que la graine ait subi une deuxième stratification à froid suivant l'émergence de la racicule (figure 3). Ce type de dormance est caractéristique des graines du caulophylle faux-pigamon et du trille blanc (Baskin et Baskin, 1998), ainsi que de 49 % des graines de la sanguinaire du Canada (Barton, 1944).



**Figure 3.** Dormance MP simple et profonde double. Chronologie du développement de la plantule en fonction des saisons de l'année, de la dispersion des graines jusqu'à l'apparition de la plantule à la surface du sol.

Il semble y avoir actuellement un débat concernant le type de dormance que présente le trille blanc, puisque Solt (1998b, 2002) indique que la racicule et le cotylédon sortiraient en même temps, et non séparément comme le suppose la dormance MP simple et profonde double. Cependant, Solt (1998a) ajoute que la deuxième dormance, car il y en aurait une deuxième, se situerait au niveau de l'élongation de l'hypocotyle, si bien que l'on ne verrait l'émergence de la graine hors du sol qu'au deuxième printemps, comme cela est effectivement observé. En résumé, la racicule et le cotylédon du trille blanc sortiraient tous les deux au premier printemps, mais resteraient sous la surface du sol. Au printemps suivant, l'hypocotyle ayant reçu la stratification au froid nécessaire à son élongation pourrait s'accroître et ainsi faire sortir de terre le cotylédon. Nous pouvons supposer qu'il s'agirait donc ici d'une dormance MP simple et profonde ou d'une dormance MP simple et

intermédiaire, selon que l'action des GA arrive ou non à remplacer la deuxième stratification à froid.

En ce qui concerne le mode de germination du bois piquant, Baskin et Baskin (1998) n'en parlent pas puisque c'est une espèce de l'ouest de l'Amérique du Nord. Par contre, Luna (2001) fait mention d'une technique de germination utilisée au "Glacier National Park" du Montana. Il s'agit d'une alternance de périodes de stratification à chaud (20°C), puis à froid (1°C), de 100 jours chacune, de sorte à avoir la séquence: chaud / froid / chaud / froid. Une autre source du même organisme indique qu'il faut utiliser une alternance de stratification: froid (100 jours) / chaud (150 jours) / froid (150 jours) pour faire germer les graines du bois piquant à un taux de seulement 25 % (Hartmann, 2003, communication personnelle). Dans les deux cas cités, les périodes de stratification sont humides et la germination ne commence pas avant le 13<sup>ème</sup> mois. Aucune des deux sources ne parle d'autres périodes de stratification après le début de la germination. Par ailleurs, selon Hartmann (2003), quatre mois après le début de la germination (i.e. après le début de l'émergence de la radicule), les plantules sont bien enracinées et ont déjà développé cinq vraies feuilles. Ceci indique qu'il n'y a probablement pas de dormance de l'épicotyle et que l'émergence des cotylédons se fait juste après celle de la radicule. En définitive, qu'il y ait d'abord une période de stratification à chaud ou pas, il semble que les graines de bois piquant nécessitent deux périodes de stratification à froid, entrecoupées d'une stratification au chaud, et que l'émergence des radicules et des cotylédons se fasse au même moment. Luna (2001) classe la dormance des graines de bois piquant dans la catégorie morphophysique sans préciser quel type. Une telle classification se justifie par le fait que l'embryon soit immature et par les différentes périodes de stratification requises. De plus, de nombreuses espèces de la famille des Araliacées expriment ce genre de dormance (Baskin et Baskin, 1998). De toutes les dormances MP, le bois piquant se rapproche le plus de la dormance MP simple et profonde. C'est celle qu'exprime aussi le ginseng. Dans ce cas, il faut une stratification à chaud (pour laquelle les GA sont inefficaces), puis une à froid, pour lever la dormance des radicules. L'émergence de l'épicotyle se fait juste après celle de la radicule. Ceci n'est cependant qu'une hypothèse qui demanderait à être vérifiée.

La dormance morphophysiological est largement répandue chez les herbacées de sous-bois des régions tempérées (Baskin et Baskin, 1998). Parmi les graines qui ont ce type de dormance, un fort pourcentage d'herbacées de forêts décidues ont une émergence des cotylédons différée par rapport à celle de la radicule. Les forces sélectives qui mènent à cette séparation sont encore inconnues, mais Baskin et Baskin (1986) émettent l'hypothèse que ce schéma de germination puisse être une adaptation de ces espèces afin de germer juste au moment où les conditions sont les plus propices à leur croissance. En effet, dans les zones où le climat est tempéré, une germination complétée en automne n'accorde que peu de temps à la photosynthèse avant que celle-ci ne soit limitée par les basses températures. De plus, pendant l'hiver, les cotylédons pourraient rester exposés de longs mois hors du sol, en proie au gel ou à la prédation. En ayant une émergence des cotylédons différée par rapport à celle de la radicule, et cela jusqu'au début du printemps suivant, la graine a le temps de mettre en place un système racinaire qui sera bien développé lors de l'arrivée des cotylédons. Ces derniers émergent hors du sol au début du printemps et bénéficient, à ce moment-là, de tout le système racinaire nécessaire à la mise en route immédiate et à un fonctionnement optimal de la photosynthèse. Or, celle-ci devra avoir lieu pendant la courte fenêtre de temps qui commence à partir du moment où la neige au sol a fondu et qui finit avec la fermeture de la canopée. Ainsi, en quelque sorte, les dormances MP simples et profondes, qu'elles soient de l'épicotyle ou double, permettent aux graines de retarder l'émergence des cotylédons jusqu'au moment où ils pourront fonctionner à plein régime pendant la courte période de temps où les conditions environnementales de croissance sont optimales pour des herbacées pérennes de sous-bois en zone tempérée.

### **3. La levée de la dormance**

Les graines ne passent pas de l'état dormant à celui de "prêt à germer" de façon brutale. On pense plutôt que, progressivement, les graines d'une population deviennent davantage réceptives à la gamme de conditions environnementales auxquelles elles sont capables de germer et de moins en moins sensibles à la gamme de conditions qui entravent leur germination (Foley, 2001). Il existe plusieurs stimuli environnementaux importants qui

facilitent la levée de dormance des graines, tels le taux d'humidité ou la lumière, mais celui qui a le plus d'effet chez le plus grand nombre d'espèces est, sans doute, la température (Geneve, 2003). La température joue, en effet, un rôle de premier plan dans la levée de dormance des graines chez beaucoup d'espèces de milieux tempérés. Mais de quelle façon une température chaude ou froide au cours d'une certaine période de temps peut-elle participer à lever la dormance? Il semblerait que, dans certains cas, les fluctuations de température, de même que des températures extrêmes, puissent produire le craquellement des téguments (Geneve, 2003). Une scarification mécanique ou chimique pourrait alors remplacer la stratification et lever la dormance chez certaines espèces. Mais il est clair que ce n'est pas là le seul effet de la température. La température jouerait également un rôle dans l'accumulation des GA ainsi que dans la sensibilité de la graine à ces dernières (Chien *et al.*, 1998; Foley, 2001). Toutefois, l'action de la température sur les graines est mal connue et nous n'en sommes encore qu'aux suppositions. D'autre part, comme nous l'avons vu précédemment, l'ABA joue certainement un rôle très important dans la dormance des graines des espèces de notre étude, et réduire son action inhibitrice pourrait contribuer à lever leur dormance. Or, les GA, en plus d'être connues pour promouvoir la germination et remplacer certains stimuli environnementaux nécessaires à la germination des graines, seraient également efficaces pour contrecarrer l'effet inhibiteur de l'ABA, et ce, souvent sous l'action combinée des cytokinines (CK) (Bewley et Black, 1994; Srivastava, 2002). L'utilisation de ces deux substances de croissance, ainsi que la scarification des graines, combinées à des régimes de température adéquats semblent donc des avenues intéressantes pour favoriser la levée de dormance des graines des espèces à l'étude.

### 3.1- Le rôle des gibbérellines (GA)

Il existe un nombre phénoménal de GA. Un décompte récent fait état de 125 GA connues à ce jour et ce nombre ne cesse d'augmenter (Srivastava, 2002). Elles sont désignées par les abréviations GA<sub>1</sub>... GA<sub>125</sub>. Les GA sont définies bien plus par leur structure que par leur activité biologique. Ce sont toutes des diterpènes cycliques possédant un noyau *ent-gibberellane*. On distingue deux catégories de GA, celles comptant 20 atomes de carbone, les C<sub>20</sub>-GA et celles qui possèdent une lactone à la place d'un atome de carbone, les C<sub>19</sub>-GA. Chez les plantes vasculaires, ce sont les C<sub>19</sub>-GA qui sont responsables de l'activité

biologique. Bien qu'il existe un très grand nombre de GA, celles qui présentent une activité biologique sont assez peu nombreuses (Srivastava, 2002). Il s'agirait principalement de GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>, ainsi que de quelques autres. Parmi les GA biologiquement actives, il se peut, pour une espèce donnée, que toutes les GA ne réagissent pas de la même façon. Ainsi, alors qu'une application de GA<sub>4</sub> + GA<sub>7</sub> favorise la germination des graines de l'if *Taxus mairei*, une application de GA<sub>3</sub> se révèle presque inefficace (Chien *et al.*, 1998). La raison d'une telle spécificité n'a pas encore été mise à jour.

Plusieurs articles de synthèse ou ouvrages de référence s'accordent pour dire que la germination est régulée, au niveau hormonal, par deux substances de croissance au rôle opposé (Bewley 1997, Foley 2001, Srivastava, 2002) : d'un côté, l'ABA, qui empêche la germination et, de l'autre, les GA, qui ne sont pas directement impliquées dans la levée de dormance mais qui participeraient de façon importante à l'avènement et au maintien de la germination. En particulier, une augmentation des GA actives pourrait soit favoriser la germination en ramollissant les structures qui pouvaient faire barrière à la croissance de la radicule, soit réussir à contrecarrer la dormance de l'embryon liée à l'ABA en augmentant la capacité de la radicule à croître, soit encore les deux à la fois (Foley, 2001). Mais, comme nous l'avons déjà abordé, il semblerait qu'en plus de la quantité endogène de ces deux substances de croissance, la sensibilité des différents tissus de la graine face à ces substances de croissance contribuerait de façon importante à faire pencher la balance du côté de la germination ou de celui de la dormance, ce qui complexifie les choses.

Ainsi, l'action sur la germination des stimuli environnementaux, tels que la température, la lumière ou l'oxygène, ne se résume pas à influencer les quantités de telle ou telle substance de croissance. C'est peut-être pour cette raison que l'application de GA seule, en vue de remplacer le besoin des graines dormantes pour certaines conditions environnementales, n'a pas toujours donné les résultats escomptés. Dans certains cas, une application de GA<sub>3</sub> ou d'un mélange de GA<sub>4</sub> + GA<sub>7</sub> éliminait effectivement le besoin de stratification à froid; dans d'autres, elle l'éliminait partiellement; enfin, dans d'autres cas encore, elle ne l'éliminait que très peu, voire pas du tout (Srivastava, 2002). Baskin et Baskin (1998) ont eux aussi remarqué que l'application de GA était parfois inefficace pour se substituer à la

stratification à froid requise par les graines. Ils ont alors mis en cause le type de dormance des graines. Ainsi, les graines qui présenteraient une dormance physiologique profonde (comme c'est le cas pour nos espèces) ne seraient en aucun cas sensibles aux GA. Le seul traitement capable de lever ce type particulier de dormance serait une période relativement longue de stratification à froid. Contrairement à la dormance profonde, les dormances physiologiques non profonde et intermédiaire seraient, elles, réceptives aux GA. Leur application permettrait donc de stimuler la germination des graines ayant ces deux derniers types de dormance. Notons que si la graine présente une autre dormance en plus de la dormance physiologique profonde (comme dans le cas des graines des espèces de notre étude qui ont, en plus de la dormance physiologique, une dormance morphologique), il est possible que l'application de GA soit efficace pour lever la deuxième dormance; mais elle ne sera, en aucun cas, efficace pour lever la phase correspondant à la dormance physiologique profonde. Ainsi en est-il de la germination du fusain d'Europe (*Euonymus europaea*), qui se fait en deux phases (Nikolaeva *et al.*, 1973). Pendant la première phase, les graines ont besoin de températures chaudes (9, 10°C) pour permettre à l'embryon de grossir et aux téguments de se fendre. Les graines ont ensuite besoin d'une deuxième phase de températures froides (0, 3°C) pendant plusieurs semaines avant de pouvoir germer. Dans ce cas, l'application de GA peut remplacer la première phase (températures chaudes) mais pas la seconde (températures froides, qui visaient à lever la dormance physiologique profonde des graines).

D'autre part, Schmitz *et al.* (2000) ont montré que des graines intactes du cèdre jaune (*Chamaecyparis nootkatensis*) soumises à un mélange de GA<sub>4</sub> + GA<sub>7</sub> à température ambiante, ne montraient qu'une faible amélioration de la germination. Notons que la dormance des graines de cette espèce serait imposée par les structures externes à l'embryon, ce qui n'est pas le cas des graines ayant une dormance physiologique. Par contre, si le traitement aux GA était combiné à un trempage dans de l'eau chaude suivi d'une stratification à froid, la période de stratification, et donc de germination, était considérablement raccourcie. Ainsi, un traitement aux GA combiné avec une stratification à froid pourrait induire une diminution de la sensibilité des embryons envers l'ABA et ainsi améliorer la germination de graines stratifiées.

### 3.2- Le rôle des cytokinines (CK)

Les CK sont définies comme étant des substances de croissance qui induisent la division cellulaire chez les plantes (Srivastava, 2002). Toutes les CK naturelles (zéatine, par exemple) sont composées d'un noyau adénine et d'une chaîne isopentényl à 5 carbones fixée sur le N<sup>6</sup> de la molécule adénine. Les CK synthétiques (kinétine, benzylaminopurine (BAP), par exemple) ont, à la place de la chaîne isopentényl, une chaîne carbonée contenant un noyau aromatique fixé au noyau de base adénine. Ce noyau aromatique rend les composés synthétiques immuns face aux attaques des CK oxydases, enzymes chargées de dégrader les CK. Les CK de synthèse ont donc l'avantage d'être plus stables et mieux absorbées que les CK naturelles.

Les CK ont différents effets qui permettent de promouvoir la germination. D'abord, il semble qu'elles arrivent à compenser l'effet bloquant des inhibiteurs sur la germination, notamment celui de l'ABA, en augmentant la quantité d'ARN et en favorisant la synthèse de protéines (Bewley et Black, 1994). Les CK ont également un rôle permissif envers d'autres substances de croissances, telles que l'éthylène ou la GA, qui facilitent la germination. Ainsi, bien que n'étant pas actives au même moment, les CK permettraient aux GA de fonctionner (Khan, 1971). L'éthylène, quant à lui, est une autre substance de croissance naturelle, sous forme de gaz, qui est impliquée dans plusieurs processus de maturation et qui permet, entre autres, d'induire la germination chez certaines espèces (Hartmann *et al.*, 1997). Babiker *et al.* (1993) ont montré qu'une application de CK était capable d'induire la germination des graines de l'herbe de feu (*Striga asiatica*), et ce, en augmentant leur capacité à convertir le précurseur de l'éthylène en éthylène. Enfin, une application de CK a permis de lever la dormance chez certaines graines exprimant une thermodormance (dormance secondaire due à une température élevée, supérieure à 25°C) mais aussi chez des graines ayant besoin d'une stratification à froid ou de lumière pour germer (Powell 1987; Bewley et Black, 1994; Hartmann *et al.*, 1997).

En fait, les études portant sur l'efficacité des CK sont plutôt anciennes, les études récentes étant pratiquement inexistantes. Est-ce dû à un manque de preuves de l'effet des CK dans la stimulation de la germination? Ou plutôt à une efficacité plus variable ou moins fréquente

que celle des GA? En 1994, Bewley et Black écrivait que "les CK ont une efficacité plus réduite que les GA et que même lorsqu'elles agissent, elles induisent souvent une germination anormale". Les CK ont tout de même un rôle à jouer dans la germination, mais ce rôle apparaît secondaire par rapport à celui des deux autres substances de croissance que sont l'ABA ou les GA. L'efficacité des CK semble être maximisée lorsque ces dernières sont associées à une autre substance de croissance. Ainsi, comme nous l'avons vu, différentes CK conjuguées au précurseur de l'éthylène permettent la germination des graines de l'herbe de feu (*Striga asiatica*) (Babiker *et al.*, 1993). De même, une application de kinétine, en combinaison avec un faible éclairage, rend possible une germination normale de graines dormantes de laitue (Bewley et Black, 1994). Enfin, Baskin et Baskin, en 1986, écrivait que « la kinétine appliquée sur des graines afin de lever la dormance physiologique profonde (que les GA ne peuvent lever selon eux) est la plupart du temps inefficace, à moins qu'elle ne soit combinée à des GA ou à une stratification à froid ».

### 3.3- La scarification

On appelle "scarification" tout procédé qui consiste à casser, érafler, altérer mécaniquement ou amincir les téguments afin de faciliter les échanges entre l'embryon (siège de la germination) et l'environnement (Hartmann *et al.*, 1997). Les différents tissus entourant l'embryon peuvent, en effet, avoir un effet inhibiteur sur la germination des graines à différents niveaux: (1) en interférant avec l'absorption d'eau; (2) en exerçant une contrainte mécanique à la croissance physique de l'embryon; (3) en interférant avec les échanges gazeux; (4) en empêchant les inhibiteurs contenus dans l'embryon de sortir; et enfin (5) en produisant eux-mêmes des inhibiteurs (dont l'ABA) (Ren et Kermodé, 1999). Trois types de traitements sont généralement employés pour scarifier les graines: la scarification mécanique, incluant souvent l'utilisation de papiers sablés; le traitement chimique à l'aide d'acide sulfurique; et la scarification thermique à l'eau bouillante (Hartmann *et al.*, 1997).

Flemion et Waterbury (1945) ont rapporté que les embryons excisés des graines ayant une dormance physiologique profonde ne germent pas, bien que n'étant plus au contact des tissus externes à l'embryon, ou bien qu'ils se développent de façon anormale, la plantule présentant un phénotype de type nain. En d'autres termes, une scarification ne serait pas

efficace dans le cas de graines présentant une dormance physiologique. Cependant, une étude sur le développement des embryons de l'if *Taxus mairei* (Chang et Yang, 1996) a montré que l'embryon excisé se développait bien sur un milieu de culture dépourvu de substances de croissance alors que l'embryon de cette graine de gymnosperme, présentant une dormance MP simple et profonde, est dormant et qu'il requiert une période de stratification à chaud, puis à froid, avant de pouvoir germer. Ainsi, une scarification pourrait être efficace, au moins dans certains cas. Comme nous l'avons vu précédemment, il n'est pas exclu que les tissus entourant l'embryon puissent jouer un rôle dans les dormances MP. Il se pourrait donc, dans le cas des graines des espèces de notre étude qui possèdent une dormance MP simple et profonde - de l'épicyotyle ou double -, qu'une scarification puisse avoir un effet positif sur leur germination.

D'autre part, il semble qu'un des effets de la stratification à chaud ou à froid, dans certains cas, soit une modification des structures externes, autrement dit une sorte de scarification (Geneve, 2003). Ainsi, pour certaines graines, des températures élevées ou de fortes fluctuations de température (variations supérieures à 15°C) permettent l'imbibition des graines. Dans le cas des graines ayant une dormance physique, l'action thermique du gel-dégel ou du feu peut suffire à craqueler ou ouvrir les tissus entourant l'embryon. Bien que la dormance des graines des espèces à l'étude ne soit pas due majoritairement à une contrainte physique des téguments ou d'une autre structure externe à l'embryon, ces tissus peuvent tout de même avoir un effet inhibiteur sur la germination, dans quel cas une scarification aurait une action positive sur la germination des graines.

L'utilisation de substances de croissance et la scarification ne sont pas les seuls traitements à être utilisés pour induire la germination. On pourrait rajouter à ceux-ci des traitements au nitrate de potassium ou à l'éthylène (Bewley et Black, 1994; Hartmann *et al.*, 1997). Mais les traitements décrits précédemment ont démontré leur efficacité sur plusieurs types de dormances dont celles qui nous concernent et sont faciles à mettre en œuvre par des producteurs. La température est par ailleurs une condition environnementale ayant un impact majeur sur la germination. Dans le cadre de nos travaux, l'application de substances de croissance et la scarification, en vue d'améliorer ou d'accélérer la germination, seront

donc utilisées de façon combinée avec le facteur température, c'est-à-dire avec des stratifications à chaud et à froid.

#### **4. Objectifs et hypothèses de recherche**

L'objectif principal du présent projet est de parvenir à faire émerger l'épicotyle à la surface du sol au printemps suivant le semis, qui a généralement lieu au cours de l'automne. Comme nous l'indique la littérature, pour toutes les espèces choisies, sauf peut-être pour le bois piquant, l'émergence de l'épicotyle est séparée de l'émergence de la racicule par une période de stratification à froid de trois mois environ, c'est-à-dire d'un hiver. Pour que les épicotyles sortent au printemps, il faudrait donc que les racicules aient émergé à l'automne. De cette façon, le producteur pourrait observer, hors du sol, les premiers signes de survie de la plante dès le printemps suivant le semis.

Chez les espèces de notre étude, les graines sont prêtes à être dispersées au début de l'été (fin juin/juillet). C'est donc à ce moment qu'a lieu leur récolte. Les graines ayant une dormance MP simple et profonde de l'épicotyle devraient subir leur stratification à chaud pendant la période estivale et jusqu'en octobre. La racicule de ces graines devrait apparaître juste après, à l'automne (Barton, 1944; Baskin et Baskin, 1985, 1986). Concernant les graines ayant une dormance MP simple et profonde double, il leur faut normalement une stratification à froid suivie d'une stratification à chaud, de trois mois chacune, pour permettre l'élongation de la racicule et sa sortie. Dans ce cas-là, nous ne disposerons que de quelques mois, entre le moment où les graines sont mûres et le début de l'hiver, pour faire en sorte que la dormance de la racicule soit levée et que la racicule puisse émerger dès l'automne.

Pour toutes les espèces, nous souhaitons que la racicule sorte au plus tard un à deux mois après le semis, c'est-à-dire avant le début de l'hiver en conditions extérieures. Avec cet objectif en tête, nous allons appliquer des traitements aux graines dans le but d'obtenir: (1) une germination plus hâtive; et (2) un taux de germination plus élevé qu'avec des graines

non traitées. Parmi les **prétraitements** généralement utilisés, nous allons tester: **(a)** une application de GA (GA<sub>3</sub>); **(b)** une application combinée de GA (GA<sub>3</sub>) et de CK (6-BAP); et **(c)** une scarification des graines. De plus, comme certaines des graines des espèces à l'étude (celles ayant une dormance MP simple et profonde double) semblent nécessiter d'abord une période de stratification à froid, nous allons comparer l'effet de deux **régimes de stratification** différents sur les graines dans le but de hâter la sortie de la radicule : **(α)** deux mois à chaud; et **(β)** un mois à froid suivi de deux mois à chaud.

Nos hypothèses de recherche quant à la germination pourraient donc être exprimées ainsi:

- L'application de prétraitements combinée à un régime de stratification permettra l'émergence de la radicule au cours des deux à trois premiers mois de mise en culture chez les 6 espèces à l'étude;
- Une stratification à froid de trois mois des graines ayant déjà développé une radicule permettra l'émergence de l'épicotyle et des cotylédons une fois que les graines seront de nouveau exposées à des températures plus chaudes.

### III- La propagation par bouturage

---

La multiplication végétative est un corollaire de l'aptitude à la croissance indéfinie des végétaux. Les végétaux possèdent des méristèmes (tissus embryonnaires) composés de cellules indifférenciées capables de soutenir et de réamorcer indéfiniment la croissance (Campbell, 1995). La reproduction végétative ou clonale est le mode de production commerciale de beaucoup, pour ne pas dire de la plupart, des cultures horticoles (ornementale, fruits, légumes et noix). Le bouturage est défini comme étant la séparation d'une plante mère en parties qui reforment des plantes entières.

## 1. Les organes de propagation des espèces à l'étude

La sanguinaire, le gingembre sauvage, le caulophylle faux-pigamon, l'actée à grappes ainsi que le trille blanc sont des plantes herbacées qui produisent des rhizomes. Elles sont donc pérennes bien que leur apparition à la surface du sol soit brève, de 3 à 4 mois tout au plus. Un rhizome n'est autre qu'une tige souterraine (Hartmann *et al.*, 1997). Comme les tiges aériennes, les rhizomes produisent annuellement un nouveau bourgeon terminal, ainsi que des bourgeons latéraux qui s'expriment plus ou moins selon la dominance imposée par le bourgeon terminal. Chez ces cinq espèces, les bourgeons sont entièrement formés à l'automne. Ils seront dormants pendant toute la période hivernale et de nouveau actifs lorsque les conditions environnementales deviendront plus clémentes, au début du printemps. Lorsque l'activité reprend, des feuilles apparaissent à la surface du sol, accompagnées ou non, selon l'âge du rhizome, d'une structure florale. Comme nous l'avons déjà vu pour les graines, la croissance se fait surtout au début du printemps quand les plantes de sous-bois peuvent capter le maximum d'énergie lumineuse du fait que les érables n'ont pas encore, ou tout juste, débourré (Lapointe, 1998).

Dans les pages qui suivent, nous utilisons le terme de ramet. Ce dernier se définit comme étant un rejet feuillé du rhizome. Il constitue en quelque sorte l'unité de base qui se répète pour former le tapis végétal d'une espèce donnée (Lamoureux, 2002). Dans le cas du gingembre sauvage, c'est un nouveau ramet composé d'une ou de deux feuilles qui émerge des bourgeons présents sur le rhizome, au printemps de chaque année. Pendant la saison de croissance, les feuilles font de la photosynthèse et accumulent ainsi des réserves dans le nouveau rhizome produit. Ce dernier est rattaché à l'ancien rhizome au niveau de l'aisselle des feuilles. Quand la saison de croissance est terminée et que les parties aériennes ont sénescé, le nouveau ramet n'est alors plus constitué que de la nouvelle portion de rhizome produite contenant un ou plusieurs bourgeons qui passeront l'hiver. Un ramet peut produire jusqu'à 4 ramets filles (incluant le ramet terminal), mais, en moyenne, il n'en produit que 1,2 (Lamoureux, 2002). C'est ainsi qu'un clone de gingembre sauvage s'étend annuellement d'environ 14 cm<sup>2</sup>. Le rhizome qui connecte les ramets entre eux se décompose au bout d'une période de 1 à 10 ans, ce qui rend les ramets indépendants (Cain et Damman, 1997; Lamoureux, 2002). Ce schéma de propagation végétative n'est pas propre au gingembre

sauvage; il peut s'appliquer aussi à la sanguinaire, avec une ramification plus poussée du rhizome chez cette dernière. Dans le cas du caulophylle faux-pigamon et de l'actée à grappes, le rhizome produit également quelques ramets chaque année, mais sa croissance est beaucoup moins linéaire que chez la sanguinaire ou le gingembre sauvage. Ceci mène, après plusieurs années, à un plant constitué d'un réseau compact de rhizomes enchevêtrés produisant une touffe dense de ramets. Chez ces deux espèces, il ne semble pas y avoir de dominance apicale et il est d'ailleurs difficile de différencier les bourgeons apicaux des bourgeons latéraux (obs. pers.).

Chez le trille blanc, en conditions naturelles, il n'y a qu'un seul bourgeon apical, et quasiment jamais de bourgeons latéraux, ce qui fait qu'un seul ramet est produit d'année en année, visible sous la forme d'un anneau de quelques millimètres de long qui s'ajoute au rhizome déjà existant (Case et Case, 1997; Lamoureux, 2002). La partie la plus vieille du rhizome pourrit au bout de 20 à 30 ans, tandis que le rhizome s'allonge à l'autre extrémité. C'est de cette façon que cette herbacée pérenne perdure plusieurs dizaines d'années, sans toutefois se multiplier végétativement. Par conséquent, le trille blanc, comme la plupart des autres trilles pédonculés d'ailleurs, ne se propage naturellement que par les graines.

Le bois piquant est un peu à part dans le sens où cet arbuste, contrairement aux plantes précédentes, est une plante ligneuse, d'une part, et qui ne possède pas de rhizome, d'autre part. Il se reproduit végétativement par marcottage naturel (Lantz et Antos, 2002). Dans ce cas-là, c'est à partir des tiges aériennes, et non plus du rhizome, que se forment les nouveaux individus. Des tiges du bois piquant touchent le sol et produisent des racines adventives aux points de contact avec le sol (figure 4). Les branches dressées (appelées marcottes) situées sur cet axe horizontal deviennent avec le temps physiologiquement indépendantes du plant mère. Outre les marcottes déjà présentes avant l'enracinement, de nouvelles marcottes peuvent apparaître par l'expression de bourgeons présents le long de la tige couchée. Finalement, on distingue des entités clonales individualisées constituées d'un réseau ramifié de tiges couchées et enracinées portant un nombre varié de marcottes.



**Figure 4.** Reproduction végétative par marcottage chez le bois piquant (*Oplopanax horridus*). Dessin de Catherine Jacobsen. Tiré de Lantz et Antos, 2002.

## 2. Le bouturage

Le bouturage consiste à couper un fragment, appelé bouture, d'une pousse ou d'une tige afin de reproduire à l'identique le pied mère (Hartmann *et al.*, 1997). Un cal correspondant à une masse de cellules indifférenciées se forme alors sur la cicatrice de la bouture et émet des racines adventives. S'ensuit l'apparition des premières feuilles du plant fille. La technique utilisée pour propager végétativement des plantes à rhizome n'est autre que du bouturage à partir du rhizome. Cela consiste à sectionner un même rhizome en plusieurs morceaux, les sections de rhizomes devant être suffisamment longues pour que les réserves accumulées puissent subvenir aux besoins de croissance d'un ou de plusieurs bourgeons. Cullina (2000) laisse généralement de 3 à 6 nœuds pour chaque section. Tout le long du rhizome, au niveau des bourgeons, il existe des zones méristématiques qui se différencieront en racines, feuilles ou fleurs sous l'action de substances de croissance. C'est pourquoi le bouturage est la plupart du temps associé à des applications de substances de croissance dont la plus courante est l'auxine, appelée hormone d'enracinement. Dans le cas d'espèces se propageant par marcottage, tel le bois piquant, on utilise comme matériel de propagation des tiges couchées que l'on enfouit dans le sol afin de favoriser l'enracinement. La présence de bourgeons le long de cette tige permettra le développement de tiges aériennes.

## 2.1- L'enracinement des boutures

La formation de racines adventives est un pré-requis à la réussite du bouturage. C'est pourquoi l'utilisation des auxines, comme hormones d'enracinement, est si répandue pour ne pas dire systématique dans le commerce (Hartmann *et al.*, 1997). Depuis la découverte de l'auxine comme composé indolique, la définition des auxines s'est élargie pour y inclure non plus seulement l'acide indole-3-acétique (AIA) mais aussi de nombreux composés aussi bien indoliques que non-indoliques (Srivastava, 2002). De plus, la caractérisation fonctionnelle des auxines comme composés capables d'induire la torsion du coléoptile s'est elle aussi élargie pour y inclure plusieurs autres fonctions, telles que la capacité d'induire l'enracinement chez des boutures et celle de promouvoir la division cellulaire pour les cultures de tissus ou de cellules. Par conséquent, le terme auxine (qui dérive du mot grec "auxein" signifiant augmenter, croître) regroupe un large spectre de composés de structure diversifiée.

Ce groupe de substances de croissance est impliqué dans la croissance des tiges, mais aussi dans l'inhibition des bourgeons latéraux et surtout dans la production de racines adventives (Srivastava, 2002). En fait, depuis les premières recherches sur les auxines, ces dernières ont été connues, qu'elles soient naturelles (AIA, AIB, APA) ou synthétiques (1-ANA), pour stimuler la formation des racines latérales ou adventives (Zimmerman et Wilcoxon, 1935). C'est l'AIB, acide indol-3-butérique, connue comme auxine synthétique depuis très longtemps, qui représente l'auxine la plus utilisée commercialement pour induire la production de racines adventives sur des boutures de tiges ou de feuilles. Cela fait seulement quelques années que l'AIB a été identifiée comme étant une auxine présente à l'état naturel chez plusieurs espèces (Srivastava, 2002). L'1-ANA, ou acide  $\alpha$  naphthalène acétique, une auxine synthétique, est également très utilisé pour l'induction de racines adventives (Hartmann *et al.*, 1997).

La réponse des plantes à l'application d'auxines n'est cependant pas universelle et diffère selon les espèces ou les cultivars. Ainsi, certaines espèces ou cultivars s'enracinent facilement et n'ont aucunement besoin d'application d'auxine pour cela. Cette

caractéristique a été corrélée avec un taux d'AIA endogène élevé. Inversement, les espèces qui ont du mal à s'enraciner ont un taux d'AIA endogène faible (Srivastava, 2002). De même, l'âge du matériel végétal affecterait la capacité d'enracinement. Des boutures de jeunes plants avec quelques feuilles s'enracineraient beaucoup plus facilement que des boutures de branches avec des feuilles matures. Enfin, l'époque de l'année à laquelle on prélève la bouture semble jouer un rôle sur la capacité d'enracinement (Anand et Heberlein, 1975). Ainsi, dans les climats tempérés, les boutures prélevées au printemps ou au début de l'été semblent s'enraciner plus facilement que celles prélevées en automne ou en hiver (Srivastava, 2002). Le transport des auxines est basipète, c'est-à-dire qu'il s'effectue des parties aériennes vers les racines.

## 2.2- L'induction de nouveaux bourgeons

Les auxines et les CK, en plus de jouer les rôles dont nous avons parlé auparavant, sont les deux substances de croissance impliquées dans la dominance apicale et le rapport racines/tiges des cultures de tissus (Chatfield *et al.*, 2000; Srivastava, 2002). Elles ont un effet inhibiteur l'une sur l'autre. La CK est très importante pour l'induction de la division cellulaire, mais inhibe la formation de nouvelles racines adventives, alors que l'auxine, qui favorise la production de racines, joue un rôle très important dans le maintien de la dominance apicale et inhibe donc l'expression des bourgeons latéraux. Il est donc important de bien doser chaque substance de croissance, afin d'obtenir un équilibre dans leur rapport, qui se traduira par un équilibre dans la croissance du végétal. Il est maintenant démontré qu'un rapport plus élevé en auxine favorise la formation des racines, tandis qu'un rapport plus élevé en CK promeut la formation de tiges ou celle de bourgeons latéraux (Hartmann *et al.*, 1997; Srivastava, 2002).

Plusieurs études ont montré qu'une application de CK sur les bourgeons latéraux était capable de lever la dormance de ces derniers imposée par la dominance apicale. Une telle application a stimulé la production de tiges à partir de bourgeons latéraux inhibés chez le poinsettia (Milbocker, 1972), la pomme (Green et Autio, 1989), la plante-panda (*Kalanchoe tomentosa*) (Lyons et Hale, 1987), ainsi que chez l'asperge (Mahotiere *et al.*,

1993). Cependant, contrairement aux auxines, il existe peu de produits commerciaux à base de CK pour le bouturage. Nous pouvons cependant mentionner le "Keiki Grow", destiné à la production d'orchidées mais utilisé aussi avec succès, semble-t-il, pour les trilles (Edgren, 1993).

### 2.3- L'élimination de la dominance apicale

Un moyen simple d'annuler la dominance apicale, et donc de favoriser l'expression ou l'induction des bourgeons latéraux, consiste à enlever le bourgeon apical de chaque segment de rhizome, quand il y en a un (Hartmann *et al.*, 1997). La dominance apicale éliminée, ce sont les bourgeons latéraux qui s'expriment. Les tiges produites pourront alors servir à produire de nouvelles boutures. Dans certains cas où il n'existe pas de bourgeons latéraux, comme chez le trille, il arrive aussi que l'excision du bourgeon apical conduise à l'apparition de nouveaux bourgeons. Cette dernière technique est notamment utilisée pour propager les trilles (Case et Case, 1997). Une fois le bourgeon apical retiré, et la plaie sur le rhizome séchée, il semblerait que de nombreux bourgeons apparaissent le long du rhizome décapité, bourgeons qui pourront se développer et former des bulbilles, petits mais vigoureux. Une variante de cette technique, qui conserve le bourgeon terminal en place, consiste à pratiquer de petites encoches de quelques millimètres sur la face supérieure du rhizome, tout juste derrière le bourgeon terminal. Les rhizomes ainsi scarifiés sont replantés. Au bout d'un an, de nombreuses petites tiges portant chacune une feuille apparaîtront aux sites de scarification. Ces tiges seront ensuite séparées l'année suivante, alors qu'elles présenteront toutes trois feuilles. Les plants de trille blanc ainsi produits fleurissent au bout de quatre ans, contre sept à dix ans requis en conditions naturelles (Blanchette, 1998).

## **3. Objectifs et hypothèses de recherche**

Nous souhaitons multiplier les espèces choisies en utilisant leur aptitude naturelle à la multiplication végétative. La technique utilisée sera du bouturage par division des tiges

dans le cas du bois piquant et par division du rhizome pour les autres espèces. Notre objectif premier est d'obtenir une bonne propagation végétative de ces espèces sauvages dans la but éventuel d'assurer leur commercialisation. Autrement dit, nous souhaitons obtenir un taux de reprise élevé ainsi qu'une bonne croissance des boutures suite à la division du matériel végétal de départ. Nous évaluerons ainsi la capacité des espèces à être bouturées, sans et avec substances de croissance, auxine et CK en l'occurrence, ainsi que sans et avec bourgeon terminal. Les essais de bouturage en absence de substances de croissance, en plus de constituer un témoin pour nos expériences, nous permettront de quantifier la capacité naturelle des espèces à se propager par bouturage, domaine pour lequel nous n'avons encore aucune donnée.

Comme nous l'avons vu, nous nous attendons à ce qu'une application d'auxine résulte en une masse racinaire plus élevée chez les boutures traitées que chez les boutures témoins, c'est-à-dire n'ayant pas reçu d'application de substances de croissance. Un meilleur enracinement pourrait être un atout pour les boutures des espèces de notre étude en milieu naturel, surtout dans le cas de la sanguinaire et du gingembre sauvage, qui produisent peu de racines et ont un enracinement plutôt superficiel. Une masse racinaire plus importante pourrait leur permettre d'explorer davantage le sol pour une meilleure nutrition en éléments minéraux comme en eau. Ceci favoriserait leur survie dans des milieux sujets aux variations environnementales comme peuvent l'être les érablières du Québec, surtout en été.

Une application de CK devrait favoriser, quant à elle, l'émergence d'une ou de plusieurs tiges permettant d'avoir un taux de reprise plus élevé que chez les boutures témoins. Un nombre plus grand de tiges devrait aussi se traduire par une masse des parties aériennes supérieure chez les boutures traitées avec la CK. Nous pensons aussi que les boutures trempées dans de la CK seront celles qui auront le plus de bourgeons. Le fait d'avoir plus de tiges permet de multiplier de façon plus importante le matériel végétal, ce qui est avantageux pour un producteur.

Enfin, nous voulons savoir si le fait d'appliquer de façon combinée ces deux substances de croissance, en quantités équivalentes, permet de maximiser les effets bénéfiques de l'une et

de l'autre sur la croissance des boutures. Avec un ajout d'auxine et de CK, nous espérons ainsi produire des boutures vigoureuses ayant un bon taux de reprise. Nous espérons que ces boutures présenteront à la fois un bon enracinement et une bonne émergence des parties aériennes.

Concernant les essais de bouturages, nous avons donc cinq hypothèses:

- La régénération d'un individu complet et mature est possible à partir de la mise en culture d'une section de rhizome (ou de branche, pour le bois piquant) d'une longueur donnée;
- Les boutures traitées à l'auxine ont un enracinement plus important que les boutures témoins;
- Les boutures traitées à la CK produisent plus de bourgeons et plus de tiges que les boutures témoins;
- Les boutures traitées à la fois à l'auxine et à la CK montrent une quantité de racines, de bourgeons et de parties aériennes plus importante que le traitement témoin;
- Les boutures avec un bourgeon apical produisent moins de bourgeons et moins de tiges que les boutures témoins (qui sont décapitées).

## Chapitre 2

# Germination studies on six North American plant species with underdeveloped embryos

### I- Avant-propos

---

Une synthèse de ce chapitre a été exposée oralement lors du 2<sup>ème</sup> colloque conjoint CRBF / GREFI, tenu à Québec en mars 2004, ainsi qu'à l'« Atelier sur les problématiques reliées à la culture des plantes indigènes forestières », regroupant chercheurs et producteurs autour d'une même table à Drummondville, en janvier 2004. Johanne Turcotte a participé à la phase expérimentale de l'expérience. Andrew P. Coughlan a révisé ce chapitre en vue d'une soumission éventuelle à une revue.

### II- Résumé

---

La production commerciale de nombreuses plantes de sous-bois est souvent limitée par des phénomènes de dormance qui induisent une germination lente. Nous avons testé différents traitements afin de réduire la durée de la phase de dormance pour les graines de six espèces indigènes de l'Amérique du Nord, *Actaea racemosa*, *Asarum canadense*, *Caulophyllum thalictroides*, *Oplopanax horridus*, *Sanguinaria canadensis* et *Trillium grandiflorum*, qui présentent des propriétés horticoles et médicinales intéressantes pour le commerce. Ainsi, les graines ont été soit (i) scarifiées soit (ii) plongées dans de l'acide gibbéréllique (GA<sub>3</sub>) soit encore (iii) plongées dans une solution de GA<sub>3</sub> et de cytokinine (6-BAP). De plus, une seconde combinaison de périodes de stratification a été testée sur les graines témoins et sur les graines traitées avec GA<sub>3</sub>. Après une période expérimentale de dix mois, les graines

d'*O. horridus* et d'*A. racemosa* n'ont pas réussi à germer. Une germination hâtive a été observée chez les graines de *T. grandiflorum* traitées à la GA<sub>3</sub> et les graines scarifiées d'*A. canadense*. Les pourcentages finaux de germination ne différaient pas statistiquement entre les traitements, ni pour l'*A. canadense* (98 %), le *T. grandiflorum* (50 %) et la *S. canadensis* (23 %) ni pour le *C. thalictroides* (6 %), bien que pour ce dernier, les graines scarifiées aient mieux germé (30 %) que les graines témoins (0 %). Bien que la scarification et l'application de gibbérellines semblent intéressantes, de nouveaux essais sont requis pour permettre la germination des graines de ces espèces avant la période hivernale.

### III- Abstract

---

Commercial production of understory plants is often limited due to the inherent slow, dormancy related, germination rate. We have tested different treatments to reduce the dormant period of six indigenous North American plant species, *Actaea racemosa*, *Asarum canadense*, *Caulophyllum thalictroides*, *Oplopanax horridus*, *Sanguinaria canadensis* and *Trillium grandiflorum*, which are of particular interest for horticultural and natural medicinal products industries. Seeds were: (i) scarified or (ii) soaked in gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) or (iii) soaked in a solution of GA<sub>3</sub> and Cytokinin (6-BAP). Moreover, a different combination of stratification periods was tested on both control and GA<sub>3</sub>-treated seeds. After a ten-month experimental period, the seeds of *O. horridus* and *A. racemosa* failed to germinate. An earlier germination occurred for GA<sub>3</sub>-treated seeds of *T. grandiflorum* and for scarified seeds of *A. canadense*. Regarding the final percentage germination, no significant between treatment differences were observed for *T. grandiflorum* (50 %), *A. canadense* (98 %) and *S. canadensis* (23 %). The same picture was true for *C. thalictroides* (6 %), however scarified seeds were shown to have a higher germination rate (30 %) than controls (0 %). Although scarification and gibberellins treatments are promising avenues, new experimentations are required to allow seed germination of these species before winter time.

## IV- Introduction

---

The growing interest regarding the medicinal properties of certain plants and the products derived from them, as well as a growing use of native plants as ornamentals, has increased harvest pressure on wild populations of many indigenous species (Lamoureux and Nantel, 1999). *Actaea racemosa* (L.) Nutt. (Black Cohosh), *Asarum canadense* L. (Wild Ginger), *Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx. (Blue Cohosh), *Oplopanax horridus* (Sm.) Miq. (Devil's Club), *Sanguinaria canadensis* L. (Bloodroot) and *Trillium grandiflorum* (Michx.) Salisb (White Trillium) are all plants with important horticultural or medicinal properties. *Oplopanax horridus* is a shrub that belongs to the same family as ginseng (*Panax quinquefolium*). It grows in coniferous forests along the west coast from Alaska to Oregon where its natural propagation is largely vegetative (Lantz and Antos, 2002). All the other plants are understory herbaceous plants that grow naturally in deciduous forests of eastern North America (Small and Catling, 1999; Lamoureux, 2002). Because they take a number of years (four to seven) to reach maturity, these species are rarely produced under commercial nursery conditions.

Coupled with an inherently slow growth rate, these species also produce seeds that are characterized by a particularly slow germination rate, which is directly linked to one of a number of different dormancy strategies. Indeed dormancy naturally delays emergence of the cotyledons above the soil surface until the first or second spring following seed set. Baskin and Baskin (1998) classified the seeds of the five species from the Northeastern part of North America used in the present study as having deep morphophysiological dormancy (MPD). This type of dormancy is predominant among herbaceous perennial species of mesic deciduous forest of eastern North America (Baskin and Baskin, 1986). Deep morphophysiological dormancy is due both to an under-developed embryo and to factors within the embryo that inhibit germination. For all these species, seeds require a warm stratification to allow the growth of the under-developed embryo and, thus, to overcome morphological dormancy. Furthermore, the seeds also require a cold stratification to overcome the deep physiological dormancy. In the wild, alternating stratification periods allow germination to be completed in the spring of the first year for seeds having a deep

simple epicotyl MPD, or the second or third year for seeds having a deep simple double MPD.

In species that have a deep simple epicotyl MPD, such as *A. racemosa* (Baskin and Baskin, 1985), *A. canadense* (Baskin and Baskin, 1986) and approximately half of *S. canadensis* seeds (Barton, 1944), the radicle emerges in autumn, and the cotyledons the following spring. That is, the seeds require a warm stratification that allows growth of the embryo and the subsequent protrusion of the radicle, followed by a cold stratification, which breaks epicotyl dormancy and, finally, a second warm period to induce the emergence and growth of the cotyledons.

By contrast, seeds of *C. thalictroides* (Barton, 1944), *T. grandiflorum* (Solt 1998a; 2002), and half of the seeds produced by *S. canadensis* (Barton, 1944) exhibit a deep simple double MPD. In this case, seeds need a cold/warm/cold stratification before being able to germinate. This long series of stratification is required to overcome both radicle and epicotyl dormancy. The first cold stratification period breaks radicle dormancy, the first warm stratification allows growth of the radicle and the embryo, the second cold stratification breaks epicotyl dormancy, and a final exposure to warm conditions induces emergence of the cotyledons. Studies by Luna (2001) suggest that seeds of *O. horridus* have a MPD, also, and require an alternating cold/warm/cold/warm stratification period to achieve protrusion of the radicle. In contrast to the other species in the present study, the epicotyl of *O. horridus* seems to emerge at the same time as that of the radicle and, therefore, once the radicle has protruded, there is no additional dormancy to overcome in this species.

The aim of the present study was to test several combinations of pre-treatments and stratification periods in order to identify one or more that would allow radicle and cotyledons emergence of *A. racemosa*, *A. canadense*, *C. thalictroides*, *O. horridus*, *S. canadensis* and *T. grandiflorum* to be achieved within a single year. More precisely, we wanted to identify those treatments that would enable the emergence of the radicle three months after the harvesting of the mature seed. Seeds would be sowed in the fall following

the application of the enhancing treatment, and then radicle would emerge. The seeds could then be subjected to a natural cold stratification during winter, allowing cotyledon emergence of either deep simple epicotyl or deep simple double MPD seeds the following spring. A reduction in the time to germination represents a very promising avenue for both nurseries and agroforestry workers who are interested in these species culture.

## V- Materials and Methods

---

### 1. Plant material

Seeds of *O. horridus* were imported from the Pacific Rim Native Plants (Chilliwack, British Columbia, Canada), seeds of *A. racemosa* were obtained from Atelier Patrick Studio Inc. (Montreal, Quebec, Canada), and seeds of *S. canadensis*, *A. canadense*, *T. grandiflorum* and *C. thalictroides* were collected from a sugar maple forest in the Eastern Townships of Quebec (Canada).

### 2. Pre-treatments

Seeds were cleaned and surface sterilized by soaking in a 1.2 g L<sup>-1</sup> Benomyl<sup>®</sup> solution (5 min) and stored in moist sand at 20°C prior to the germination tests. The tests were carried out under controlled conditions with two replicates of 25 seeds per treatment except for *S. canadensis*, where the number of seeds was limited and only 20 seeds were available for each replicate. Seeds were subjected to the following treatments: soaking for 24 h in a 200 mg L<sup>-1</sup> Gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) solution (Gib), soaking for 24 h in a solution containing 200 mg L<sup>-1</sup> of both GA<sub>3</sub> and Cytokine 6-benzyl-amino-purine (6-BAP) (Gib + Cyt) or physical scarification (Sc) in which a small part of the seed coat was removed. Following the pre-treatment, seeds were placed on moistened Whatman No.1 or No.42 filter paper (depending on seed size) in Petri dishes and incubated in G30 germination cabinets (Convion, Winnipeg, Canada) under different stratification regimes. Each Petri dish was regularly checked to ensure adequate moisture levels and to record the germination state of each

seed. Protrusion of radicle through the seed coat was used as the germination criterion. Epicotyl (cotyledon) emergence was also recorded. Results were compared to those obtained for untreated controls grown under identical conditions.

### **3. Stratification conditions**

The Gib, Gib + Cyt and Sc pre-treated seeds were subjected to a warm/cold (W/C) stratification comprising an 8 week period at 16/12 °C (day/night, 12 h photoperiod) followed by a 12 week period at 5/5 °C (day/night, 12h photoperiod). PPFD at the level of the Petri dishes ranged between 20 and 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , which is sufficient to overcome dark dormancy. A cold/warm/cold (C/W/C) stratification period combination was tested on other seeds soaked for 24 h in 200 mg L<sup>-1</sup> solution of GA<sub>3</sub> (C/W/C + Gib). This treatment comprised a 4 week period at 5/5°C (day/night, 12 h photoperiod), followed by an 8 week period at 16 /12 °C (day/night, 12h photoperiod) and then a further 12 weeks at 5/5 °C. The results obtained were compared to untreated controls that were subject to the same stratification regime (C/W/C + control). Radicles were expected to emerge during the 8-week warm stratification period for both the W/C and C/W/C stratification combinations. The final 12 weeks under the 5/5 °C (day/night, 12 h photoperiod) regime, for both stratification combinations, simulated the low winter temperatures needed to overcome epicotyl dormancy. At the end of both stratification combinations, seeds were returned to warm temperatures 16/12 °C (day/night, 12 h photoperiod) to simulate spring and to stimulate emergence of the cotyledons.

### **4. Data analysis**

Emergence and germination data were recorded for up to one year and presented as cumulative radicle or cotyledon emergence. Data for each species were tested for normality, transformed when necessary and subjected to a one-way ANOVA. Critical differences were calculated using the LSD method.

## VI- Results

---

### **1. *Oplonanax horridus* and *Actaea racemosa***

Seeds of *O. horridus* and *A. racemosa* failed to germinate during the study period.

### **2. *Trillium grandiflorum***

As most germination of this species started to occur only between weeks 32 and 36, the germination trials for *T. grandiflorum* were continued for 52 weeks (from October 2002 to October 2003) instead of the 36-week period used for the other species. Only one treatment, Gib coupled with the W/C stratification regime, resulted in radicle emergence prior to day 67 (equivalent to late autumn). Under this treatment, the radicles of 8 % of the seeds emerged. This treatment was significantly different from the other treatments and the control ( $F_{5,6} = 144$ ,  $P \leq 0.001$ ) (Table 1). In these seeds, radicle emergence occurred under the cold temperature regime that followed the warm stratification period. However, most of the seeds of this species started to germinate only from day 233. At the end of the experiment, all treatments allowed the emergence of both the radicle (Fig. 5A) and the cotyledon (Fig. 5B). Scarified seeds coupled with a W/C stratification led to the highest percentage of radicle and cotyledon emergence (68 %), whereas the lowest (28 %) rate was observed in the control treatment exposed to the C/W/C stratification. However, differences between treatments were not significant (Table 1).

The ratio of cotyledon/radicle emergence varied from 0.84 to 1 depending on treatment (Table 1). Therefore, generally, once the radicle appeared, the cotyledon followed. This usually occurred in the 8 weeks following emergence of the radicle and without any need to modify the growth temperature (Fig. 5B). Treatments with GA<sub>3</sub>, whether coupled with W/C or with C/W/C stratification, showed significantly lower ratios than their respective controls.

Table 1 : Cumulative percentage of radicle and cotyledon emergence for seeds of *T. grandiflorum*. The results show data collected after 67 days (equivalent to late autumn) and at the end of the experiment. The ratio of cotyledon to radicle emergence is also presented as the results of a one-way ANOVA for treatment comparisons of the different combinations of pre-treatments and stratification periods. Within a column, data followed by a different letter are significantly different.

Treatments	Day 67	At the end of the experiment (Day 369)		
	<i>Radicle emergence (%)</i>	<i>Radicle emergence (%)</i>	<i>Cotyledon emergence (%)</i>	<i>Cotyledon / radicle emerged</i>
W/C-Control	0 <sup>b</sup>	48	48	1 <sup>a</sup>
W/C-Gib	8 <sup>a</sup>	56	50	0.90 <sup>b c</sup>
W/C-Gib+Cyt	0 <sup>b</sup>	34	34	1 <sup>a</sup>
W/C-Sc	0 <sup>b</sup>	68	68	1 <sup>a</sup>
C/W/C-Control	0 <sup>b</sup>	30	28	0.94 <sup>a b</sup>
C/W/C-Gib	0 <sup>b</sup>	62	52	0.84 <sup>c</sup>
<sup>1</sup> ANOVA result :	$P \leq 0.001$ <sup>2</sup>	$P = 0.176$	$P = 0.159$	$P = 0.013$

<sup>1</sup> One-way ANOVA: degree of freedom (df) for treatment: 5; df for error term: 6

<sup>2</sup> ANOVA performed on rank transformed data.

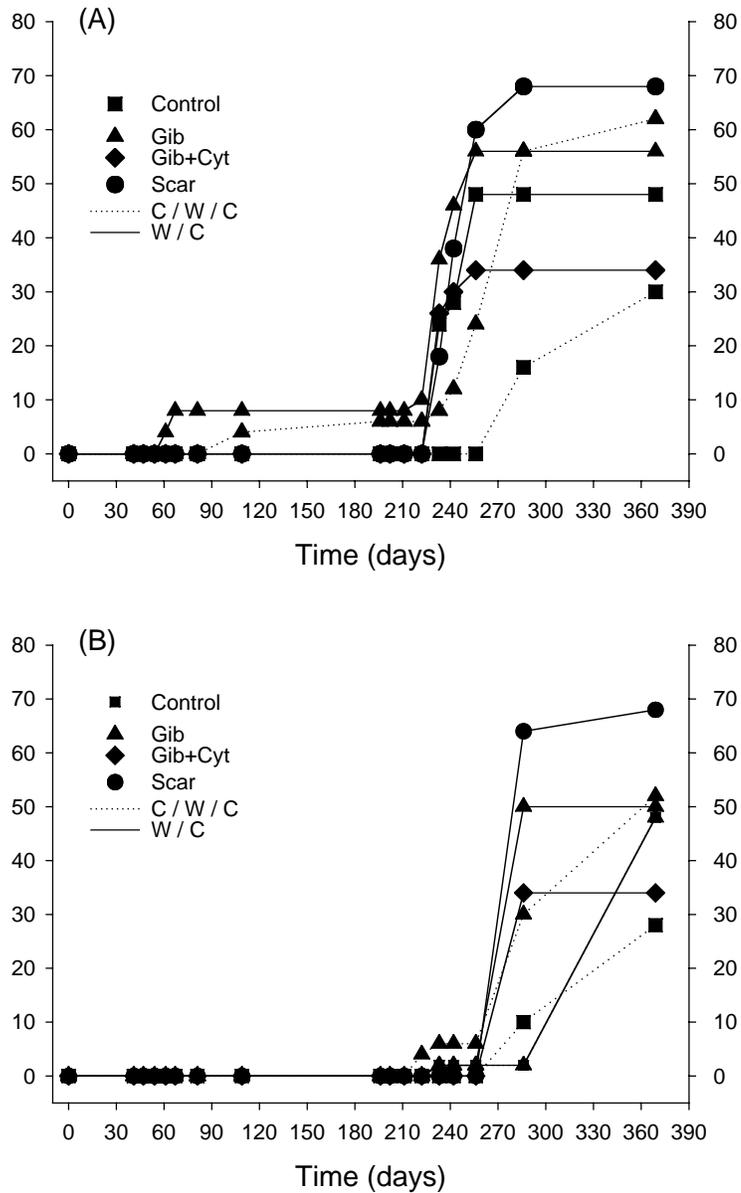


Figure 5. Evolution of *T. grandiflorum* cumulative radicle (A) and cotyledon (B) emergence in response to different pre-treatments and stratification periods. Continuous lines represent the warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures from day 151; dotted lines represent the cold/warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures (from day 181) (See text for further details). Symbols represent pre-treatments applied to seeds: scarified seeds (•), gibberellin treated seeds (▲), gibberellin and cytokinin treated seeds (◆) and control (■). Seeds were treated on day 0 and placed in the Petri dishes.

### 3. *Sanguinaria canadensis*

Only scarified seeds or seeds soaked in GA<sub>3</sub> coupled with either of the stratification periods, led to radicle emergence of *S. canadensis* by day 67 (Fig. 6A and Table 2). However, these three treatments did not differ significantly from each other, or from the other treatments. The average germination percentage was 4.6 % among those that germinated and 2.3 % among all treatments. At the end of the experiment, all treatments, except the control exposed to the C/W/C stratification combination, resulted in radicle emergence. The three treatments that induced the highest percentage radicle emergence in *S. canadensis* were the two GA<sub>3</sub> treatments and the control exposed to the W/C stratification. The average percentage germination for this group of treatments was 23.3 %. These results were significantly greater than those obtained for the three others, which resulted in a mean germination rate of 2.5 % (Table 2).

Only two treatments, the two Gib treatments, resulted in cotyledon emergence during the experimental period (Table 2; Fig. 6B), but the treatments did not differ significantly. The observed results occurred shortly after exposure to the warm temperature regime following the 12 weeks of cold stratification. Mean cotyledon emergence for this species was very low (5 %). In the best treatment response (W/C + Gib), only 27 % of those seeds that produced a radicle produced cotyledons during the experimental period.

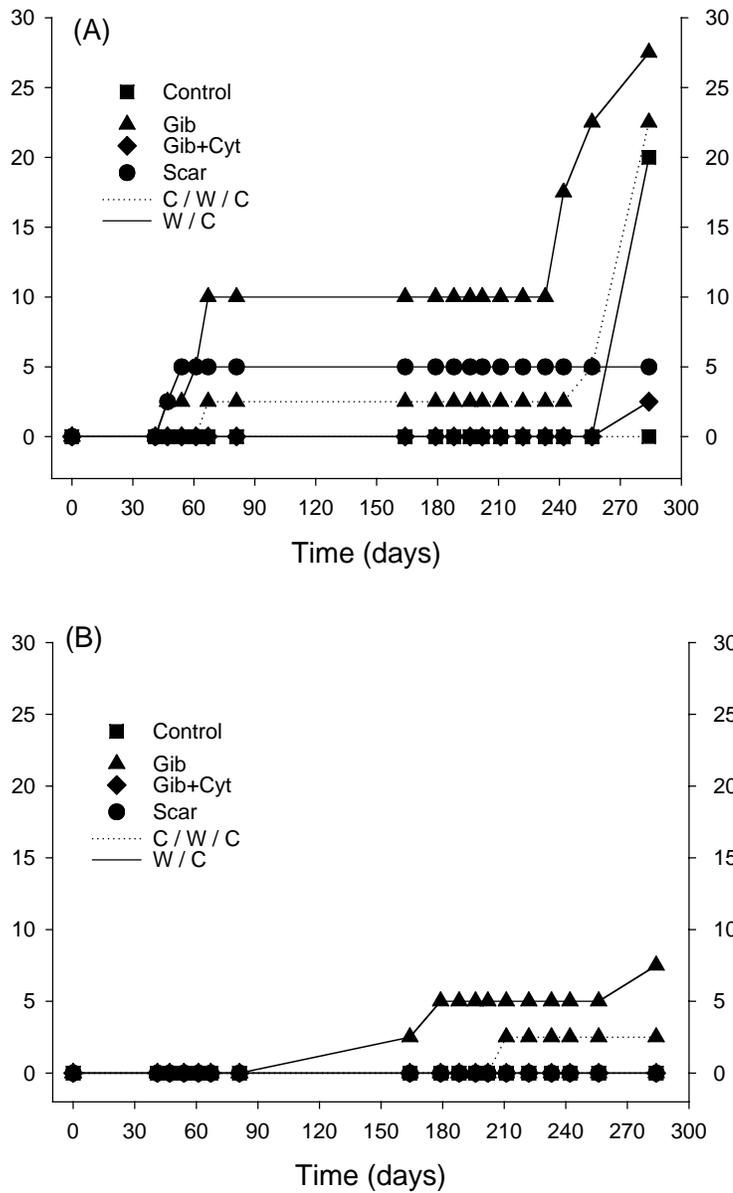


Figure 6. Evolution of *S. canadensis* cumulative radicle (A) and cotyledon (B) emergence in response to different pre-treatments and stratification periods. Continuous lines represent the warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures from day 151; dotted lines represent the cold/warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures (from day 181) (See text for further details). Symbols represent pre-treatments applied to seeds: scarified seeds (•), gibberellin treated seeds (▲), gibberellin and cytokinin treated seeds (◆) and control (■). Seeds were treated on day 0 and placed in the Petri dishes.

Table 2 : Cumulative percentage of radicle and cotyledon emergence for seeds of *S. canadensis*. The results show data collected after 67 days (equivalent to late autumn) and at the end of the experiment. The ratio of cotyledon to radicle emergence is also presented as the results of a one-way ANOVA for treatment comparisons of the different combinations of pre-treatments and stratification periods. Within a column, data followed by a different letter are significantly different.

Treatments	Day 67	At the end of the experiment (Day 278)		
	<i>Radicle emergence (%)</i>	<i>Radicle emergence (%)</i>	<i>Cotyledon emergence (%)</i>	<i>Cotyledon / radicle emerged</i>
W/C-Control	0	20 <sup>a</sup>	0	–
W/C-Gib	8	27.5 <sup>a</sup>	7.5	0.27
W/C-Gib+Cyt	0	2.5 <sup>b</sup>	0	–
W/C-Sc	4	5 <sup>b</sup>	0	–
C/W/C-Control	0	0 <sup>b</sup>	0	–
C/W/C-Gib	2	22.5 <sup>a</sup>	2.5	0.11
<sup>1</sup> ANOVA result :	<i>P</i> = 0.697	<i>P</i> = 0.006	<i>P</i> = 0.586	<i>P</i> = 0.586

<sup>1</sup> One-way ANOVA: df for treatment: 5; df for error term: 6. ANOVA performed on rank transformed data.

#### **4. *Asarum canadense***

Only the scarification treatment coupled with the W/C stratification induced radicle emergence of *A. canadense* prior to day 67 (Fig. 7A). By day 67, 38 % of seeds in this treatment had germinated. This result was significantly higher than in the other treatments (Table 3). Roots continued to emerge during the first 6 weeks of cold stratification. At the end of the experiment (day 278), all the treatments exhibited radicle emergence levels of approximately 98 % in average. Nevertheless, the W/C stratified seeds completed germination six weeks faster than the C/W/C ones. Although the percentage of radicle emergence was high, percentage of cotyledons emergence was low and never exceeded 30 % (Table 3). Cotyledons emerged once the seeds had been returned to the warm temperature regime following the 12-week cold stratification period (Fig. 7B). The best percentage was obtained for scarified and control seeds. These treatments led to an average of 25 % cotyledon emergence. Because radicle emergence was close to 100 %, the figures were identical for the cotyledon/radicle emergence ratio.

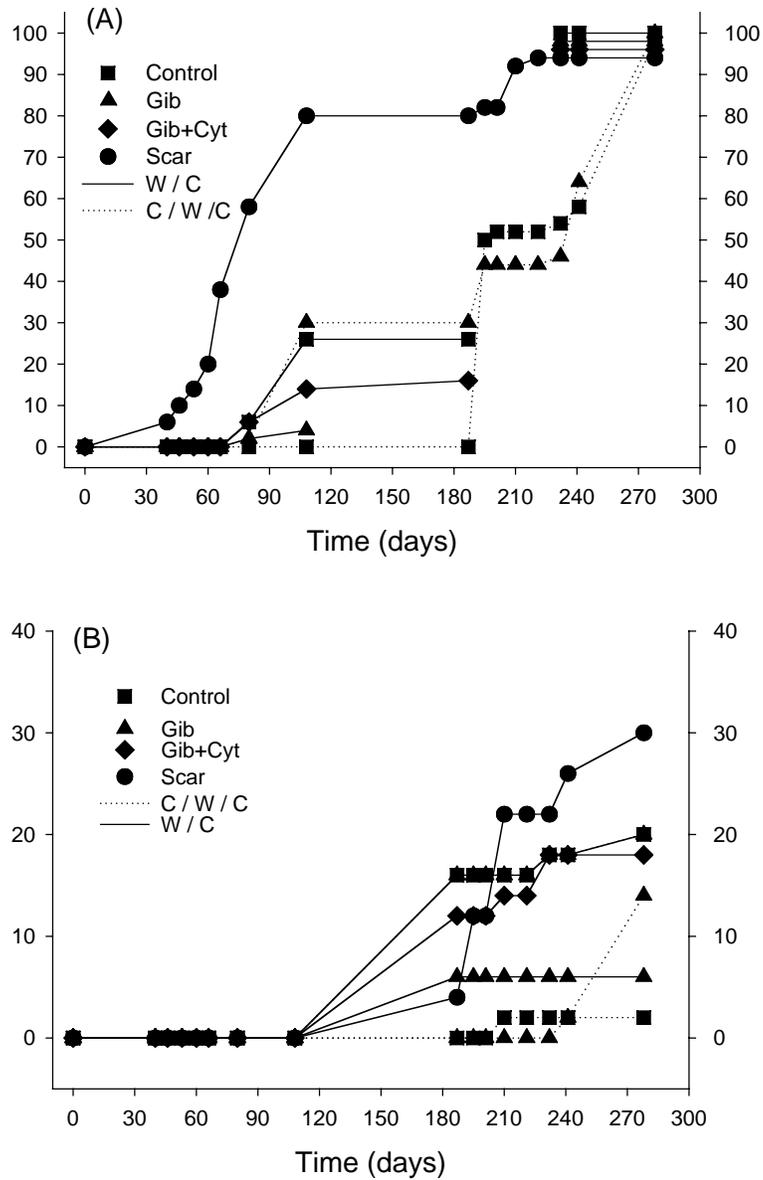


Figure 7. Evolution of *A. canadense* cumulative radicle (A) and cotyledon (B) emergence in response to different pre-treatments and stratification periods. Continuous lines represent the warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures from day 151; dotted lines represent the cold/warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures (from day 181) (See text for further details). Symbols represent pre-treatments applied to seeds: scarified seeds (•), gibberellin treated seeds (▲), gibberellin and cytokinin treated seeds (◆) and control (■). Seeds were treated on day 0 and placed in the Petri dishes.

Table 3 : Cumulative percentage of radicle and cotyledon emergence for seeds of *A. canadense*. The results show data collected after 67 days (equivalent to late autumn) and at the end of the experiment. The ratio of cotyledon to radicle emergence is also presented as the results of a one-way ANOVA for treatment comparisons of the different combinations of pre-treatments and stratification periods. Within a column, data followed by a different letter are significantly different.

Treatments	Day 67	At the end of the experiment (Day 278)		
	<i>Radicle emergence (%)</i>	<i>Radicle emergence (%)</i>	<i>Cotyledon emergence (%)</i>	<i>Cotyledon / radicle emerged</i>
W/C-Control	0 <sup>b</sup>	100	20 <sup>a b</sup>	0.20 <sup>b</sup>
W/C-Gib	0 <sup>b</sup>	98	6 <sup>c d</sup>	0.06 <sup>c d</sup>
W/C-Gib+Cyt	0 <sup>b</sup>	96	18 <sup>b</sup>	0.19 <sup>b</sup>
W/C-Sc	38 <sup>a</sup>	94	30 <sup>a</sup>	0.31 <sup>a</sup>
C/W/C-Control	0 <sup>b</sup>	98	2 <sup>d</sup>	0.04 <sup>d</sup>
C/W/C-Gib	0 <sup>b</sup>	100	14 <sup>b c</sup>	0.14 <sup>b c</sup>
<sup>1</sup> ANOVA result :	$P \leq 0.001$ <sup>2</sup>	$P = 0.409$ <sup>2</sup>	$P = 0.003$ <sup>2</sup>	$P = 0.002$

<sup>1</sup> One-way ANOVA: df for treatment: 5; df for error term: 6.

<sup>2</sup> ANOVA performed on rank transformed data.

### 5. *Caulophyllum thalictroides*

No seeds of this species had germinated by day 67 (Fig. 8). The first signs of germination appeared around day 210 with radicle emergence occurring in both scarified seeds and seeds soaked in gibberellins coupled with W/C stratification. Seeds germinated somewhat later in the other treatments. For example, for seeds soaked in GA<sub>3</sub> coupled with the C/W/C stratification, radicle emergence was observed for the first time on day 240. Therefore, radicle emergence occurred under warm temperatures following cold stratification. The C/W/C combination of stratification periods did not allow any radicle emergence after the first 4-week cold stratification period, but only after the second cold stratification of 12 weeks.

The percentage of radicle emergence for the three treatments where germination occurred was low (Table 4). The highest value was obtained for scarified seeds, where 30 % of seeds produced radicles, whereas the two GA<sub>3</sub> treatments exhibited between 2 % and 4 % germination. However none of the treatments differed significantly. Radicle emergence was followed by that of the epicotyl. However, by the end of the experiment, none of the cotyledons of this species had opened.

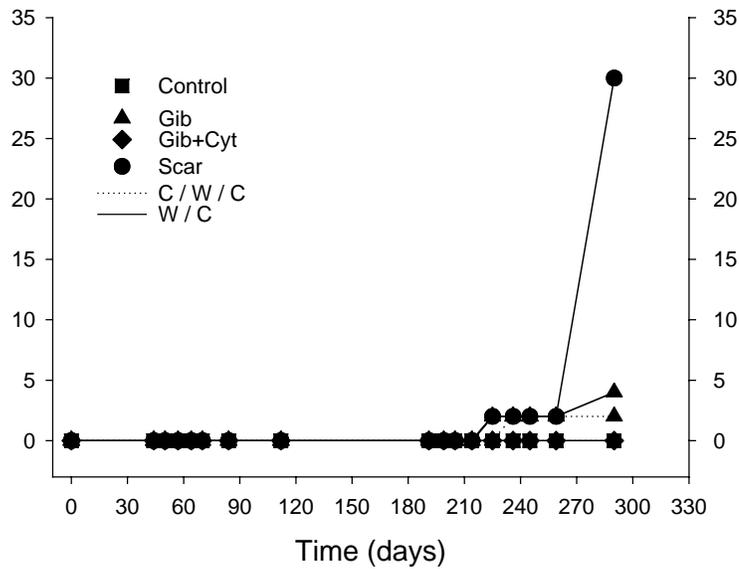


Figure 8. Evolution of *C. thalictroides* cumulative radicle and epicotyl emergence in response to different pre-treatments and stratification periods. Continuous lines represent the warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures from day 151; dotted lines represent the cold/warm/cold stratification followed by exposure to warm temperatures (from day 181) (See text for further details). Symbols represent pre-treatments applied to seeds: scarified seeds (•), gibberellin treated seeds (▲), gibberellin and cytokinin treated seeds (◆) and control (■). Seeds were treated on day 0 and placed in the Petri dishes.

Table 4 : Cumulative percentage of radicle and cotyledon emergence for seeds of *C. thalictroides*. The results show data collected after 67 days (equivalent to late autumn) and at the end of the experiment. The ratio of cotyledon to radicle emergence is also presented as the results of a one-way ANOVA for treatment comparisons of the different combinations of pre-treatments and stratification periods. Within a column, data followed by a different letter are significantly different.

Treatments	Day 67	At the end of the experiment (Day 278)		
	<i>Radicle emergence (%)</i>	<i>Radicle emergence (%)</i>	<i>Cotyledon emergence (%)</i>	<i>Cotyledon / radicle emerged</i>
W/C-Control	0	0	0	-
W/C-Gib	0	4	0	-
W/C-Gib+Cyt	0	0	0	-
W/C-Sc	0	30	0	-
C/W/C-Control	0	0	0	-
C/W/C-Gib	0	2	0	-
<sup>1</sup> ANOVA result :	-	<i>P</i> = 0.112	-	-

<sup>1</sup> One-way ANOVA: df for treatment: 5; df for error term: 6. ANOVA performed on rank transformed data.

## VII- Discussion

---

During this exploratory experiment, we tried as many germination treatments as possible considering the restricted number of seeds available. That none of the seeds of *O. horridus* or *A. racemosa* germinated over the one-year experimental period may have been linked to seed viability. However, this possibility was not examined. With regards to the four species that did germinate, we were able to show relatively few significant differences between treatments. This was possibly linked to the low number of replicates for each treatment due to the low number of seeds that were available, which in turn resulted in a low error term for the ANOVAs, and thus reduced the power of these tests. Based strictly on statistical differences, there was a precocious radicle emergence for *T. grandiflorum* seeds pre treated with GA<sub>3</sub> and exposed to the W/C stratification, and for *A. canadense* when scarified. However, in both cases, this germination precocity did not imply a better final percentage of germination as final percentage of radicle emergence did not differ significantly between treatments. Nevertheless, *T. grandiflorum* seeds treated with GA<sub>3</sub> seemed to show a higher final radicle emergence than in most other treatments. However, while treatment with GA<sub>3</sub> and the W/C stratification combination helped reduce the time to radicle emergence of *T. grandiflorum* seeds, it appears that the GA<sub>3</sub>-treated seeds exhibited a delayed cotyledon emergence. This suggests that the GA<sub>3</sub> treatment could have a negative effect on cotyledon emergence. The GA<sub>3</sub> treatment combined with W/C stratification also tended to reduce the time to emergence of both the radicle and cotyledons of *S. canadensis* seeds, although the difference was not statistically significant. There was also a tendency for higher final radicle emergence in seeds of *T. grandiflorum* and *C. thalictroides* following scarification. Thus, in the present study, the best treatments for enhancing radicle emergence for the four species that germinated appear to be GA<sub>3</sub> application and scarification, although most of the differences observed were not statistically significant.

Gibberellins are known to remove the requirement of various environmental triggers for seed germination, and to counteract the inhibitory effects of abscissic acid (Bewley, 1997; Foley, 2001). However, Baskin and Baskin (1998) and Geneve (2003) suggested that gibberellins are not generally able to substitute for cold stratification in the case of seeds

having a deep physiological dormancy. By contrast, it appears that gibberellins can play this role for seeds of *Taxus mairei*, which express a combination of deep physiological and morphological dormancies (Chien *et al.*, 1998). In the present study, GA<sub>3</sub> permitted a reduction in the time to germination in *T. grandiflorum* seeds, but only for a percentage of the treated seeds. The way the experiments were conducted did not allow us to determine if GA<sub>3</sub> could substitute for the cold stratification requirement of the cotyledons, nevertheless, some GA<sub>3</sub>-treated seeds of *T. grandiflorum* produced a radicle before any exposure to cold temperatures. Thus, although seeds of the four species studied present a combination of deep physiological and morphological dormancies, it could be interesting to test whether GA<sub>3</sub> can have an effect on the release of epicotyl dormancy without cold stratification.

Plant species show different sensitivities to different gibberellins (Srivastava, 2002). In the present study, we used GA<sub>3</sub>, but a combination of GA<sub>4</sub>+GA<sub>7</sub> could have provided different results as it has been shown for *T. mairei* seeds (Chien *et al.*, 1998). In this species, the authors improved germination with an exogenous application of GA<sub>4</sub>+GA<sub>7</sub> (65 %) but not with GA<sub>3</sub> (4 %). It is also likely that a scarification treatment applied before soaking in GA<sub>3</sub> (and Cyt (6-BAP)) would allow a better penetration of the hormone and, consequently, a more pronounced effect on seed germination. The potential value of this approach was recently demonstrated by Phartyal *et al.* (2003), who showed that samara of *Acer caesium* responded promptly to GA<sub>3</sub> and 6-BAP when their pericarp and testa were physically scarified.

The beneficial effect of scarification could be explained by a better permeability to water, light and gas once the seed coat has been damaged (Hartmann *et al.*, 1997). This could make an important difference for *C. thalictroides* seeds since the seed coat in this species is hard. Cullina (2000) wrote that *C. thalictroides* seeds have "extremely hard seed coat that needs time to weather away so that water can permeate" and he suggested scarifying them in a milkshake blender before sowing. This could explain the high percentage of radicle emergence observed for *C. thalictroides* scarified seeds although this percentage is not significantly higher than the others. But, the beneficial effect of scarification is less comprehensible for *A. canadense* seeds, which do not really possess a hard seed coat. Seeds

of *A. canadense* are myrmecochorous, that is, their seeds are dispersed by ants (Lobstein and Rockwood, 1993), which eat the elaiosomes but discard the seeds near their nest, where they later germinate. Perhaps dragging seed back to their nest and eating the elaiosome damages the seed coat enough to have the same effect than a scarification treatment. Two other species producing seeds with elaiosomes, *T. grandiflorum* and *S. canadensis* showed differential response to scarification. While *T. grandiflorum* scarified seeds tended to show higher germination rates than the control group, *S. canadensis* seeds did not respond to the scarification treatment. It is not clear at this point why seeds of *A. canadense* would be more sensible to scarification than seeds of *T. grandiflorum* and *S. canadensis*.

The combined application of GA<sub>3</sub> and 6-BAP did not have a positive effect on the germination of any of the four species that germinated in the present study. By contrast, Nikolaeva (1973) observed an increase in the germination of seeds of the woody shrub *Euonymus europeae* in response to the combined application GA<sub>3</sub> / 6-BAP. It is possible that either the seeds of *A. canadense*, *C. thalictroides*, *S. canadensis* and *T. grandiflorum* are not sensitive to the combined application of these two compounds, or that the way the seeds were treated did not permit an effect to be induced. Nikolaeva (1973) soaked seeds sequentially for 48 h first in a solution of GA<sub>3</sub>, then in a solution of 6-BAP (the order is not important), whereas in the present study, seeds were soaked for 24 h in a solution containing both GA<sub>3</sub> and 6-BAP.

During the present study, we were unable to induce radicle development from seeds of *A. canadense*, *C. thalictroides*, *S. canadensis* and *T. grandiflorum* during the autumn following their production. Although both soaking in GA<sub>3</sub> and scarification showed some promising results, they were not efficient enough to shorten or remove the need for a stratification periods for the majority of the seeds of each species. Similarly, a 4-week cold stratification period did not appear long enough to satisfy the initial need for cold exposure of seeds with a deep simple double MPD. Not only did the present study not reduce the time to radicle protrusion from the seed, but it seems also that our mean germination times were longer than those recorded in the literature. For *T. grandiflorum* seeds, although some seeds treated with GA<sub>3</sub> followed by a W/C stratification showed root protrusion following

the warm stratification period, generally, none of the treatments used succeeded in inducing radicle protrusion before the three months of cold stratification representing winter time. The scarification treatment led to the highest percentage of radicle and cotyledon emergence (70 % on day 286), but this result was not significantly different from those obtained for the other treatments. By comparison, Solt (1998 b), with intact seeds, obtained a radicle emergence level of 70 % by day 150, which is much faster than in the present study.

Although some seeds of *S. canadensis* germinated in the first 67 days, the average percentage of radicle emergence was low (5 %). The majority of seeds of this species began to germinate after day 240. The best treatments, which were the two treatments with GA<sub>3</sub> and the control, had an average radicle emergence of 23.3 %. This result is similar to that obtained by Lobstein and Rockwood (1993) for intact seeds of this species (22 %) after 240 days, but much lower than that obtained for seeds with elaiosomes removed (64 %). The author used the following stratification method: three weeks at 15/5 °C, 20 weeks at 28/15 °C followed by 20 weeks at 20/10 °C. In an experiment done by Barton (1944), 12 weeks of warmth (i.e., 120 days) were needed to obtain 39 % radicle emergence. It is interesting to note that in the studies of Barton (1944) and Lobstein and Rockwood (1993), *S. canadensis* seeds did not require cold stratification prior to the outset of radicle growth. By contrast, in the present study, most seeds did not produce a radicle during the first 8 weeks under the warm temperature regime. While the first warm stratification period may not have been long enough to meet the warm temperature requirements of seeds of this species, it is also possible that most seeds showed a deep simple double MPD. This is supported by the fact that Barton (1944) observed this type of dormancy for approximately half of the *S. canadensis* seeds in his study.

Scarification of *A. canadense* seeds was the treatment that allowed the earliest germination. Using this treatment, we obtained 38 % radicle emergence before the theoretical outset of winter at day 67. Radicles started to emerge at warm temperature but continued to do so even during the early part of the cold period. Baskin and Baskin (1986) obtained a higher percentage of radicle emergence (71 %) for intact seeds but after a warm stratification of

105 days. In the present study, we obtained a similar level of radicle emergence by day 105 using the scarification pre-treatment (Fig. 7A). Baskin and Baskin (1986) also obtained a higher cotyledon emergence than in the present study using a stratification period comprising 8 weeks at 5 °C followed by 8 weeks at 20/10 °C.

The germination time of *C. thalictroides* appears to be longer than for the three previous species. In the present trial, radicles started to emerge 4 weeks after the cold/warm/cold stratification. The best results obtained by Barton (1944) for intact seeds of this species was 47 % germination following 12 weeks at 15/30 °C, 36 weeks at 10 °C and a further 4 weeks at 15/30 °C, that is, after a total of 13 months. By contrast, our best results were obtained using scarified seeds with 30 % germination after 10 months.

In comparison to our work, authors who have studied the germination of *A. canadense*, *C. thalictroides*, *S. canadensis* and *T. grandiflorum* have tended to use longer periods of initial stratification: in studies by Solt (1998b), 12 weeks of cold followed by 6 weeks at warm temperatures resulted in percentage of radicle emergence of 70 % of *T. grandiflorum* seeds; Baskin and Baskin (1986) obtained radicle emergence of 80 % of *A. canadense* seeds after 14 weeks of warmth; Barton (1944) obtained radicle emergence of 39 % of *S. canadensis* seeds after 16 weeks under a warm temperature regime; and radicle emergence of 47 % of *C. thalictroides* seeds following a 12 week warm, 36 week cold and 4 week warm stratification. In spite of the applied pre-treatments used in the present study, it appears that the seeds did not receive a long enough cold or warm stimulus and so remained dormant, waiting until they were under the same conditions again in order to complete their stratification. The short initial stratification period used appeared to delay the time to emergence instead of shortening it. Consequently, the proposed stratification periods, although interesting from a practical point of view as they would allow the production of seeds ready to germinate in autumn, were not sufficient to overcome the deep dormancy of *A. canadense*, *C. thalictroides*, *S. canadensis* and *T. grandiflorum*.

The fact that the cotyledon of *T. grandiflorum* seeds emerged 8 weeks after radicle emergence and without any change in the temperature regime, suggests that the cotyledon

is not dormant in this species and, consequently, probably does not need a stratification period in order to emerge. Therefore, for this species it is only radicle dormancy that needs to be broken. This pattern of radicle and cotyledon emergence is supported by the results obtained by Solt (1998a, b). The author states that she "never saw cessation of growth after the emergence of the root, the juvenile rhizome emerged right after the root followed by the petiole and then the cotyledon". However, the author also mentioned that this species needed a second cold period for the cotyledon to emerge above the soil. The experimental setup used in the present study does not allow us to validate this observation. However, if *T. grandiflorum* seeds do need a second stratification period to elongate their epicotyl, and so break the soil surface, this would explain why Baskin and Baskin (1998) included this species in the group of deep simple double MPD. In the case of *C. thalictroides*, although the epicotyl appeared immediately after the emergence of the radicle, cotyledons were not observed even after several months (data not shown) and, consequently, are probably dormant. This phenomenon is typical of seeds with deep simple double MPD in which epicotyl appears at the same time as the radicle but where the tip of the cotyledons remains inside the seeds and needs a second period of cold stratification to emerge (Baskin and Baskin, 1998). Barton (1944) found that once the radicle of *C. thalictroides* seeds has protruded, the seeds needed a further 12-week cold stratification followed by between 2 and 6 weeks under warm temperature conditions to obtain cotyledons in 60 % of the seeds. In the species *A. canadense* and *S. canadensis*, cotyledons of seeds with an emerged radicle emerged under warm conditions but only after having spent 12 weeks under a cold temperature regime. The epicotyl of these species is probably dormant and once the radicle has been produced, a cold stratification is needed to overcome this dormancy. This need for a cold stratification prior to cotyledon emergence is consistent with the fact that they are classified as seeds showing a deep simple epicotyl MPD, although in the case of *S. canadensis*, there is still the need to clarify whether there is also a radicle dormancy to overcome (Barton, 1944).

Studies on *A. canadense*, *C. thalictroides*, *S. canadensis* and *T. grandiflorum* are scarce and the few articles published on their seed germination requirements are based on seeds harvested in the Northeastern part of the USA. Environmental conditions in this area are

somewhat different from those found in southern Quebec. Numerous publications have already shown that seeds of populations collected from different latitudes differ in the degree of dormancy exhibited and the duration of the cold stratification period required to break this dormancy (Meyer *et al.*, 1995; Schütz and Milberg, 1997; Baskin and Baskin, 1998). This might explain both the lower germination rates obtained in the present study and also the relatively longer times to germination. Furthermore, the length of the growing season in a particular locality might affect the exact duration of the initial warm stratification period required to alleviate morphological dormancy. Further studies on the stratification requirements of seeds of the four species (*A. canadense*, *C. thalictroides*, *S. canadensis* and *T. grandiflorum*) collected from southern Quebec are needed before testing other pre-treatments that will shorten the stratification periods.

In conclusion, the most promising pre-treatments to reduce the time to germination of *A. canadense*, *C. thalictroides*, *S. canadensis* and *T. grandiflorum* are GA<sub>3</sub> and scarification. However, the duration of the first warm stratification period appears to be critical. This period should be long enough to allow protrusion of the radicle. If not, both radicle and cotyledon emergence risk being delayed by a year. On the other hand, it is important to keep in mind the fact that, from a commercial point of view, it is essential to reduce the length of this first stratification period as much as possible in order to supply the market with seeds that are ready to germinate in the fall. Further studies should thus focus on the time to emergence of the radicle and attempt to optimise the first stratification period by testing different temperature regimes and different pre-treatments such as scarification and soaking in solutions of GA<sub>3</sub>.

## Chapitre 3

### Influence of auxin and cytokinin on the growth and survival of cuttings of five Canadian understory plant species

#### I- Avant-propos

---

L'expérience n'a malheureusement pas été menée pour l'espèce *Actaea racemosa* par manque de matériel végétal au moment de l'expérience. En juin 2003, les résultats préliminaires de cette expérience ont fait l'objet d'une affiche présentée au huitième congrès agroforestier d'Amérique du Nord organisé par l'AFTA (Association for Temperate Agroforestry). Une synthèse de ce chapitre a été exposée oralement lors du 2<sup>ème</sup> colloque conjoint CRBF / GREFI, tenu à Québec en mars 2004, ainsi qu'à l'« Atelier sur les problématiques reliées à la culture des plantes indigènes forestières », organisé à Drummondville en janvier 2004. Marie-Ève Leclerc a collaboré à la réflexion concernant le dispositif expérimental et la méthodologie de cette expérience, ainsi qu'au suivi expérimental. Andrew P. Coughlan a révisé ce chapitre en vue d'une soumission éventuelle à une revue.

#### II- Résumé

---

Les cinq plantes de sous-bois *Asarum canadense*, *Caulophyllum thalictroides*, *Sanguinaria canadensis* et *Trillium grandiflorum* rencontrées dans les érablières à sucre de l'est du Canada, et *Oplopanax horridus*, provenant des forêts tempérées de l'Ouest canadien, présentent des propriétés horticoles et médicinales intéressantes pour le commerce. Il est dès lors nécessaire de développer une méthode de propagation rapide et efficace afin de

permettre la culture de ces espèces, notamment en système agroforestier sous érablière. Dans ce but, nous avons étudié l'effet de l'auxine (AIB) et celui d'une cytokinine (kinetine (K)) sur la croissance de sections de rhizome ou de tige. Celles-ci ont été plongées dans : (i) de l'AIB ou (ii) de la K ou encore (iii) un mélange d'AIB et de K. Pour chacune des espèces, des témoins non traités ont été inclus et pour l'*A. canadense*, la *S. canadensis* et le *T. grandiflorum* d'autres témoins comportant un bourgeon apical intact ont été également utilisés. Aucune propagation végétative n'a été obtenue chez le *T. grandiflorum*. Chez l'*O. horridus* et le *C. thalictroides*, de bons taux de survie et de croissance des boutures, similaires à ceux obtenus après traitement, ont été observés chez les témoins. Chez l'*A. canadense* et la *S. canadensis*, l'enracinement a été significativement amélioré par les traitements AIB et AIB + K. La présence d'un bourgeon apical sur les segments témoins de ces deux espèces a également permis de favoriser soit la survie soit la reprise ainsi que la croissance des boutures. Nos résultats démontrent que le bouturage représenterait une méthode de propagation efficace pour l'*A. canadense*, le *C. thalictroides*, l'*O. horridus* et la *S. canadensis*, ce qui pourrait réduire la pression exercée sur les populations sauvages de ces espèces.

### III- Abstract

---

The five following understory plants, *Asarum canadense*, *Caulophyllum thalictroides*, *Sanguinaria canadensis*, *Trillium grandiflorum*, encountered in the Eastern Canadian sugar maple forests, and *Oplopanax horridus*, from western Canadian temperate forests, are of particular interest for horticultural and natural medicinal products industries. A rapid and efficient propagation method is needed in order to cultivate these plants and allow their production in agroforestry programs using managed stands of sugar maple. In order to achieve this, the effect of auxin (IBA) and/or cytokinin (kinetin (K)) on the growth of rhizomes or stem cuttings was investigated. Cuttings were soaked in either: (i) IBA, (ii) K or (iii) IBA and K. Non treated controls were included for each species and additional control cuttings with an intact apical bud were included for *A. canadense*, *S. canadensis* and *T. grandiflorum*. No vegetative propagation was obtained for *T. grandiflorum*. In *O.*

*horridus* and *C. thalictroides*, good survival and growth rates were observed both for control and treated cuttings. In *A. canadense* and *S. canadensis*, rooting was improved by IBA and IBA + K treatments. For these two species, the presence of an apical bud promoted either survival or emergence as well as growth of cuttings. Our results show that cuttings might provide an efficient method to propagate *A. canadense*, *C. thalictroides*, *O. horridus* and *S. canadensis* and so reduce pressures on wild populations.

#### IV- Introduction

---

The market for medicinal plants, which has an estimated annual growth rate that ranges between 15 and 20 %, is the most rapidly growing branch of the North American pharmaceutical industry (Small and Catling, 1999). Among these plants, are understory shrubs and herbaceous species that have traditionally been harvested from the wild. In addition to pressures on those plants with medicinal properties, there is a growing demand by the North American horticultural market for indigenous woodland species. The lack of information with regards to the most suitable cultivation methods for these species, coupled with their generally slow growth (Lamoureux and Nantel, 1999), has generally discouraged nurseries from attempting to grow them commercially. Harvesting from the wild results not only in a reduction in the ability of the exploited population to regenerate, but also in a product of variable quality. In an attempt to overcome these problems, we selected four herbaceous understory species traditionally harvested from northeast North America, *Asarum canadense* L. (Wild Ginger), *Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx. (Blue Cohosh), *Sanguinaria canadensis* L. (Bloodroot) and *Trillium grandiflorum* (Michx.) Salisb. (Large-flowered Trillium), and one woody shrub from northwest North America, *Oplopanax horridus* (Sm.) Miq. (Devil's Club). Commercial interest for these species, *T. grandiflorum* aside, is relatively recent and little is known concerning the appropriate techniques for propagating them on a commercial basis. While propagation from seeds is an interesting approach as it can lead to the production of a number of individuals from a single mother plant, the plant species in question require complex stratification treatments

and seedling growth is slow (Baskin and Baskin, 1998; Luna 2001). Vegetative propagation can, on the other hand, lead to mature individuals after a single year of cultivation.

Several methods exist for the vegetative propagation of *T. grandiflorum*, all are based on the same principles. Briefly, this consists of diminishing or abolishing apical dominance to induce the production of new buds along the rhizome or to stimulate existing dormant buds, both of which result in the formation of small offsets. After the flowering season, the terminal bud can be either girdled or removed and the rhizome replanted. It is also possible to remove the terminal bud together with a small section of rhizome and to plant this along with the original rhizome. In certain cases, the buds on the rhizome develop, sprout and even bloom the following year (Edgren, 1993; Case and Case, 1997; Blanchette, 1998). However, these techniques are probably suboptimal as, to the best of our knowledge, they are not used on a commercial basis. The other herbaceous species selected for the present study naturally undergo vegetative propagation by rhizome growth (Muir, 1995; Lamoureux, 2002), while lateral branches of *O. horridus* form adventitious roots when in contact with soil (Lantz and Antos, 2002). Rhizome pieces or sections of stem are therefore likely to be promising avenues of investigation for the vegetative propagation of these species.

The production of rooted cuttings is often associated with the use of auxins and, more specifically, with indole-3-butyric acid (IBA). This is the major auxin used in commercial nurseries and is often referred to as the "rooting hormone". One of the most important effects of auxins is the induction of adventitious root formation on stem and leaf cuttings (Hartmann et al., 1997; Srivastava, 2002), which is a prerequisite for successful propagation using cuttings.

Cytokinins are another class of growth substances that could be useful in stimulating shoot development of cuttings. It has been repeatedly demonstrated that a high cytokinin to auxin ratio promotes bud formation and shoot development in plant tissue cultures (Srivastava, 2002). When Kinetin (K), a synthetic cytokinin, is directly applied to buds of whole poinsettia and *Kalanchoe tomentosa* plants, it induces axillary shoot development (Lyons

and Hale, 1987). Benzyladenine, another synthetic cytokinin, also released axillary buds of apple from the inhibition caused by apical dominance (Green and Autio, 1989).

The present study was designed to evaluate the capacity of either stem or rhizome cuttings of *A. canadense*, *C. thalictroides*, *O. horridus*, *S. canadensis* and *T. grandiflorum* to sprout with or without the application of root and/or shoot inducing growth substances. The results should help identify the treatments and cutting characteristics needed to enhance emergence and subsequent growth of cuttings of these five Canadian understory species during their first year of establishment.

## V- Materials and Methods

---

Wild-grown plants of the herbaceous species *A. canadense*, *C. thalictroides*, *S. canadensis* and *T. grandiflorum* were harvested from an *Acer saccharum* dominated forest in Joliette (Quebec, Canada) in October 2002. Stem sections of the woody species *O. horridus* were supplied by Pacific Rim Native Plants (Chilliwack, British Columbia, Canada). All tissues were maintained at 4 °C prior to the outset of the experiment in January 2003.

### 1. Experimental manipulation of cuttings

Pieces of rhizome of *A. canadense*, *C. thalictroides*, *S. canadensis* and *T. grandiflorum*, and stem sections of *O. horridus* were soaked (15 min) in a 1.2 g L<sup>-1</sup> solution of the fungicide Benomyl<sup>®</sup>. The tissues were then cut, using surface sterilized tools, into sections that ranged from 3 to 10 cm in length depending on the plant species in question (*S. canadensis*: 3 cm, *T. grandiflorum*: 3 cm, *A. canadense*: 6 cm, *O. horridus*: 7 cm and *C. thalictroides*: 10 cm). The cuttings were either treated with auxin (indol 3-Butyric Acid (IBA)), cytokinin (Kinetin (K)) or a mix of auxin and cytokinin (IBA+K), or left as untreated controls (C). The concentration of IBA and K used was that recommended by Hartmann *et al.* (1997) and Luna (2001), and was 1 000 ppm for the four herbaceous species and 3 000 ppm for *O. horridus*. Solutions containing IBA and/or K were applied to the roots of *C. thalictroides*

and to the basal tip of the rhizome or stem sections of the other species, for a period of 15 seconds.

Apical buds were removed on rhizome sections of *A. canadense*, *S. canadensis* and *T. grandiflorum* prior to treatment, but were left in place for a second control (C+AB) that served to examine the importance of apical dominance on the growth of cutting. In *C. thalictroides*, there were numerous buds along the length of the rhizome so apical dominance probably did not have a strong influence on subsequent growth. Consequently, for this species, all buds present on the rhizome sections were left in place. For *O. horridus*, stem sections were checked for the presence of at least one bud and buds longer than 1 cm were systematically removed. The impact of apical dominance was not tested for this species as most sections did not have a terminal bud.

A second propagating technique, based on the methods described by Edgren (1993), Case and Case (1997) and Blanchette (1998), was tested for *T. grandiflorum*. Briefly, whole rhizomes each bearing an apical bud were used. Two incisions were made on the top surface of each rhizome in order to induce the production of plantlets. The basal part of the whole rhizomes was subsequently cut and soaked in one of the treatment solutions.

Once treated, the stem or rhizome sections were weighed and placed horizontally in 15 cm plastic pots containing "Plantation III Mix" (Fafard, Quebec, Canada), vermiculite and perlite (3:1:1). The pots were transferred to a greenhouse, and maintained at 24/18 °C (day/night, 16 h photoperiod) and watered as needed (approximately once every two days). Light in the greenhouse was reduced by the presence of a 50 % shade cloth. After three months growth, the plants were fertilised twice, at a two-week interval, with a 1 g L<sup>-1</sup> solution of 20:20:20 (N: P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: K<sub>2</sub>O). Plants were harvested after four months.

## **2. Biometric measurements**

Shoot production was recorded on emergence and leaf area was measured either at the outset of leaf senescence, or shortly before harvesting if senescence had not occurred

during the four-month growth period. Allometric relations between the leaf area, and leaf length and width, were established for all herbaceous species using measurements obtained from natural populations (data not shown). The number of roots and buds produced during the four-month growth period were determined at harvesting. Roots were divided into new (i.e., paler) and old (i.e., roots that were present at the time of planting) categories, and dried and weighed. Visual observations strongly suggested that old roots did not grow during the 4-month period; their biomass was thus a good estimate of the initial root biomass at planting. Dry biomass values were also obtained for the rhizome or stem section and the shoots. Rhizome growth was estimated using two methods. The "loss or gain of rhizome mass" was evaluated using the equation:

$$(\text{Dry rhizome biomass})_{\text{final}} - (\text{Dry rhizome biomass})_{\text{initial}}$$

This variable is presented in the figures. The "percentage of rhizome growth" was estimated using the equation:

$$[(\text{Dry rhizome biomass})_{\text{final}} - (\text{Dry rhizome biomass})_{\text{initial}}] / (\text{Dry rhizome biomass})_{\text{initial}}$$

This variable is presented in the tables. The initial dry biomass of the rhizome or stem was calculated using a fresh mass/dry mass ratio that was established using 12 rhizomes or stem of each species at the outset of the experiment.

### **3. Data analysis**

The experimental unit comprised a single pot containing a single cutting. Each experimental unit was replicated 20 times for each treatment, giving a total of either 80 or 100 (for species with a C+AB control) plants per species. Experimental units were gathered by species through the greenhouse. As light and temperature were variable across the greenhouse unit, species were put at the most appropriate place based on what is known of their light and heat requirements (Small and Catling, 1999; Cullina, 2000; Lamoureux, 2002). For example, *A. canadense* and *C. thalictroides* were put in shadier sections of the

greenhouse while *O. horridus* was placed in the sunniest area. For a same species, all the 80 or 100 experimental units were randomised (in a complete bloc).

Only plants considered to be alive at the time of harvesting were used for statistical analyses. The percent emergence was calculated as the number of plants that produced at least one viable shoot out of the 20 plants used for each treatment. The percent survival was estimated as the number of alive cuttings, i.e. which produced at least one new structure (shoot, root or bud) during the experimental period. The differences in percent survival and percent emergence between treatments were tested using a  $\chi^2$  test. The effect of initial rhizome biomass, and the presence of roots at planting, on emergence and survival of cuttings, was investigated using *t* tests. The impact of the IBA and/or K treatments on the different morphometric variables (i.e., the production of new roots, shoots and buds, and rhizome growth) was investigated using ANCOVAs with initial rhizome biomass, shoot number (used for one variable in *O. horridus*) and initial root biomass (when present) as covariables. When covariables were not significant, ANOVA result is presented in the “ $P_{ANOVA / ANCOVA}$ ” column of the tables. When one or the two covariables was/were significant, it is the ANCOVA result that is presented in the “ $P_{ANOVA / ANCOVA}$ ” column.  $P_{ANCOVA}$  presented is obtained by ANCOVA of the most significant covariable. The analyses were run twice, either with or without the control group possessing an intact apical bud (C+AB). The Pearson’s correlation coefficient was also calculated to investigate possible relations between the different initial morphometric variables and subsequent growth of the cuttings. When one of the initial characteristics of the cutting (i.e., initial root biomass or initial rhizome mass) appeared to strongly influence either emergence, or one of the growth variables, *t*-tests or ANOVAs were used to more fully characterise the parameter that was likely to enhance emergence and growth of cuttings for a given species.

## VI- Results

---

### 1. *Asarum canadense*

For *A. canadense*, 61.2 % of the cuttings produced new structures. The 48.75 % of cuttings that sprouted, did so after a period of approximately six weeks under glass. Of the cuttings, 47.5 % had developed new roots and shoots, while 1.25 % developed only shoots, 2.5 % developed only roots and 10 % developed new buds along the section of rhizome. No treatment effect on either emergence or survival of *A. canadense* was detected (Table 5). However, all growth variables except shoot dry biomass and the number of new buds were influenced to some extent by the treatments ( $P < 0.05$ ). The best growth responses were obtained using auxin (IBA) and in particular when IBA was combined with K (Table 5, Fig. 9). The latter treatment resulted in the production of a significantly greater number and biomass of roots, and a final total leaf area twice that of the two other treatments. Although shoot biomass did not differ significantly between groups ( $P = 0.06$ ), it showed a similar trend to that of total leaf area. Treatments with IBA induced an increase in rhizome biomass whereas the control and the K treatments resulted in a loss of rhizome biomass. Plants treated with IBA+K showed the highest increase in rhizome biomass (79,6 %) at harvest. Cuttings from all groups produced a mean of approximately 3 new buds.

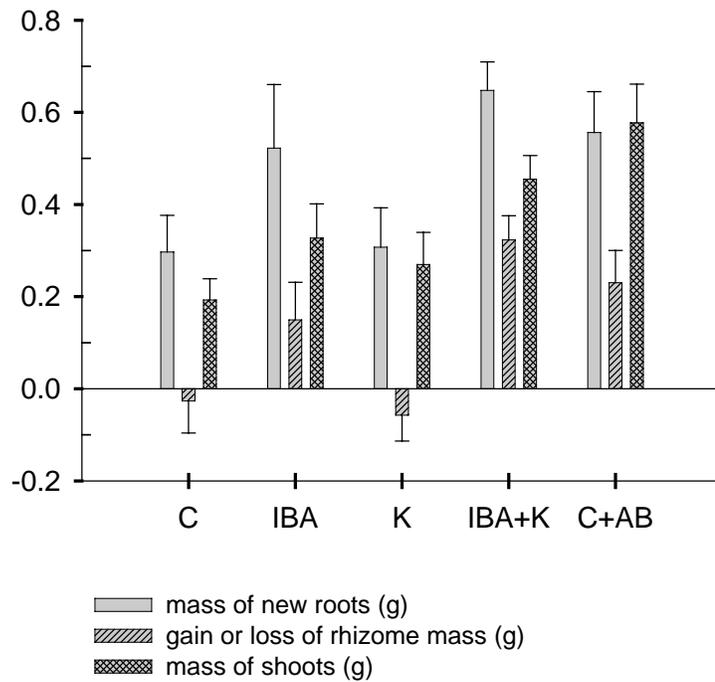


Figure 9. Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on the dry biomass (g) of new root, shoot and rhizome tissues of *Asarum canadense* cuttings after a four-month growth period. Rhizome growth is expressed as (final – initial) rhizome biomass. The results for control (C) and control cuttings with an apical bud (C+AB) are shown.

Table 5 : Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on percent survival, number of new roots, new root biomass, total leaf area, shoot biomass, percent rhizome growth and bud number of *Asarum canadense* cuttings. *P* values for  $\chi^2$  (percent survival) and ANCOVA analyses are presented together with the *P* values of the covariables “initial rhizome biomass” and “initial root biomass”. Data within a given row followed by a different letter are significantly different.

Variables	Treatments				P values		
	Control	IBA	K	IBA+K	<sup>1</sup> <i>P</i> <sub>ANOVA/</sub> ANCOVA	<sup>2</sup> Covariables used	
						Initial rhizome mass	Initial root mass
Survival rate (%)	75	60	65	45	$P_{\chi^2}:0.27$	-	-
Number of new roots	5.13 <sup>b</sup>	8.83 <sup>ab</sup>	6.00 <sup>b</sup>	11.33 <sup>a</sup>	0.018	0.650	0.046
Mass of new roots (g)	0.30 <sup>b</sup>	0.52 <sup>ab</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.65 <sup>a</sup>	0.024	0.180	0.016
Total leaf area (cm <sup>2</sup> )	24.78 <sup>b</sup>	42.20 <sup>ab</sup>	32.22 <sup>b</sup>	65.15 <sup>a</sup>	0.011	0.140	0.053
Mass of shoots (g)	0.19	0.33	0.27	0.45	0.060	0.084	0.039
Rhizome growth (%)	-8.0 <sup>b</sup>	28.8 <sup>b</sup>	-12.6 <sup>b</sup>	79.6 <sup>a</sup>	$\leq 0.001$	0.429	0.006
Number of new buds	3.5	3.08	2.85	3.89	0.652	0.322	0.033

1 This column presents *P* value of ANOVA when none of the covariables are significant and *P* value of ANCOVA of the most significant covariable, when covariables are significant.

df for treatment: 3; df for error term: 45

2 This column presents *P* value of the linear regression between the covariable used and the variable studied.

The initial root dry biomass was correlated with several growth variables (Table 6). Cuttings that had roots at the time of planting exhibited a greater subsequent growth of the rhizome (52 % increase) than cuttings with no roots (6 % increase). The presence of roots at the outset of the experiment also influenced the number and the dry biomass of new roots, the dry biomass of shoots and the number of new buds. Values for these growth variables were nearly twice that of rhizomes lacking roots at planting (Table 6). There was a strong correlation between dry biomass of the new roots and total leaf area ( $r = 0.90$ ,  $P \leq 0.001$ ; data not shown).

Table 6 : Effect of the presence of roots at the time of planting on the subsequent growth of the rhizome and on the production of new roots, shoots and buds on *Asarum canadense* cuttings (mean  $\pm$  SE).  $P$  values for the  $t$  tests are also shown.

State of cuttings at planting	Rhizome growth (%)	Number of new roots	Mass of new roots (g)	Mass of shoots (g)	Number of new buds
Absence of roots	5.96 $\pm$ 11.70	7.87 $\pm$ 1.05	0.30 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.04	2.63 $\pm$ 0.32
Presence of roots	51.73 $\pm$ 13.38	13.09 $\pm$ 1.36	0.68 $\pm$ 0.08	0.58 $\pm$ 0.08	4.48 $\pm$ 0.30
$P$ ( $t$ test)	0.025	0.005	0.001	0.002	$\leq 0.001$

The C+AB cuttings showed significantly greater percent survival and emergence (100 %) than the other treatments (data not shown). For the percent increase in rhizome biomass (54.5 %), number of new roots (15), dry biomass of shoots (Fig. 9) and total leaf area (64.6 cm<sup>2</sup>), investigations using ANOVA showed significant differences. C+AB cuttings exhibited similar results to the IBA+K treatment. For the other variables, ANOVA tests did not reveal any significant difference between treatments. Cuttings with an apical bud produced a mean of 3.15 new lateral buds per rhizome.

## 2. *Oplopanax horridus*

For *O. horridus*, 73.75 % of cuttings sprouted and produced new structures. Most of them rooted as well since only 8.75 % of the sprouting cuttings developed no roots. There was no significant treatment effect on the different morphometric variables. For the majority of the stem cuttings, sprouting started two weeks after the outset of the experiment. The original cuttings did not grow; instead, new shoots were produced from dormant buds present at the time of planting. At the end of the four-month experimental period, cuttings had developed at least one vertical stem with four to five leaves. Buds were produced at two locations on the vertical stems: in a crown around the base of the stem and at the point of attachment of the petiole. K had a negative effect on root and shoot biomass, and on the number of buds produced (Fig. 10, Table 7). The IBA+K treatment resulted in the highest number of new roots. However, for *O. horridus*, the number of roots was highly variable and root biomass was considered a more representative estimate of the cutting's capacity to absorb water and nutrients. For this parameter, the K treatment gave the lowest figure. Because of the close correlation between the number of buds and the size of the aerial stems (see above), shoot dry biomass was used as a covariable in the ANCOVA test for the number of new buds. As a result, there was no significant difference between treatments in new bud production. The initial dry biomass of the stem at planting was significantly correlated with the dry biomass of new roots and shoots, and with the number of buds produced (Table 7).

The initial biomass of the stem section directly influenced the sprouting capacity of *O. horridus* cuttings ( $P = 0.023$ ; data not shown). Cuttings that sprouted had an initial stem biomass significantly higher (12.18 g dry weight; 26.6 g fresh weight) than cuttings that failed to sprout (7.64 g dry weight; 16.69 g fresh weight).

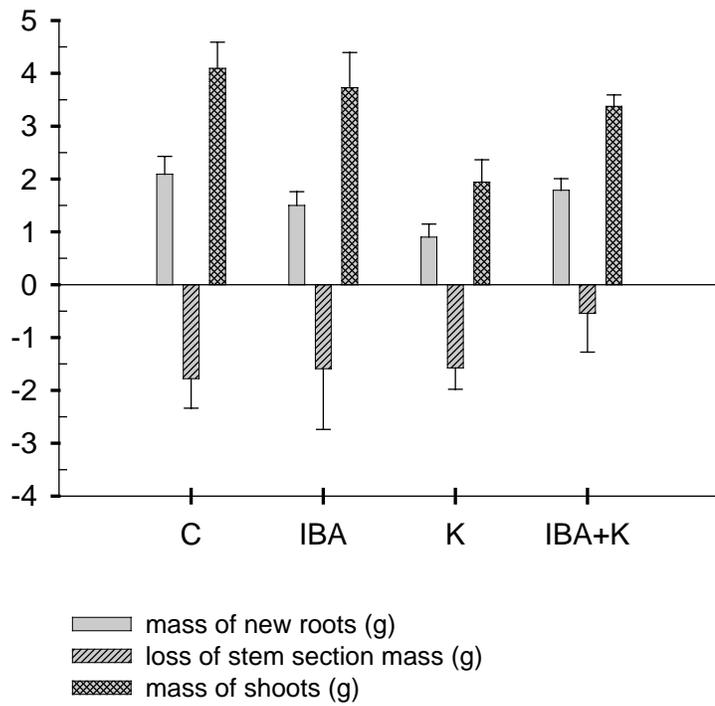


Figure 10. Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on the dry biomass (g) of new root, shoot and stem tissues of *Oplopanax horridus* cuttings after a four-month growth period. Stem growth is expressed as (final – initial) stem biomass. The results for control (C) cuttings are shown.

Table 7: Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on percent survival, number of new roots, new root biomass, shoot biomass, percent stem growth and bud number of *Oplopanax horridus* cuttings. *P* values for  $\chi^2$  (percent survival) and ANCOVA analyses are presented together with the *P* values of the covariables “initial stem biomass” and “shoot biomass”. Data within a given row followed by a different letter are significantly different.

Variables	Treatments				P values		
	Control	IBA	K	IBA+K	<sup>1</sup> <i>P</i> <sub>ANOVA/ANCOVA</sub>	<sup>2</sup> Covariables used	
						Initial stem mass	Mass of shoots
Survival rate (%)	80	60	80	75	$P_{\chi^2}:0.43$	-	-
Number of new roots	3.88 <sup>b</sup>	5.25 <sup>b</sup>	5.06 <sup>b</sup>	8.66 <sup>a</sup>	0.004	0.911	-
Mass of new roots (g)	2.09 <sup>a</sup>	1.50 <sup>a</sup>	0.90 <sup>b</sup>	1.79 <sup>a</sup>	0.017	0.038	-
Mass of shoot (g)	4.09 <sup>a</sup>	3.73 <sup>a</sup>	1.94 <sup>b</sup>	3.38 <sup>a</sup>	0.006	0.003	-
Stem section growth (%)	-13.5	-7.3	-16.8	-1.3	0.073	0.514	-
Number of new buds	8.63 <sup>a</sup>	7.83 <sup>a</sup>	4.69 <sup>b</sup>	7.53 <sup>a,b</sup>	0.038	≤ 0.001	≤ 0.001

1 This column presents *P* value of ANOVA when none of the covariables are significant and *P* value of ANCOVA of the most significant covariable, when covariables are significant.

df for treatment: 3; df for error term: 55

2 This column presents *P* value of the linear regression between the covariable used and the variable studied.

### 3. *Sanguinaria canadensis*

For *S. canadensis*, an average of 91.25 % of cuttings produced new structures (Table 8) and there was no significant ( $P_{\chi^2}=0.63$ ) between treatments difference on the survival rate. However, and in contrast to all other species tested, only 5 % of the cuttings produced new leaves. Furthermore, those that did produce leaves suffered from a *Pythium*-induced damping off. The infection did not damage the rhizome. The development of new shoots was not treatment dependant ( $P_{\chi^2}=0.55$ ). Of the cuttings, 82.5 % produced new roots and 8.75 % formed only buds as new structures. All cuttings that produced new shoot tissue also produced new roots. The IBA treatment produced the highest root biomass (Fig. 11) while the number of new roots was higher for the two treatments containing IBA (IBA and IBA+K) than for the other treatment or the control (Table 8). Following application of IBA, the number of new roots was approximately five times greater and the dry biomass roughly twice as high as that of the control treatment. Because of the low percent emergence it was not possible to evaluate the effect of IBA and K on shoot production. On average, a 31 % decrease in rhizome biomass was observed. All surviving cuttings formed at least one new bud. The number of new buds produced showed a significant ( $P_{\chi^2}: \leq 0.001$ ) treatment effect, with controls producing more buds than the other treatments. However, the low number of plants with 0 or 2 buds reduced the power of the  $\chi^2$  test. There was a significant ( $P = 0.027$ ) and positive relation between the initial dry biomass of the cutting and the number of new buds produced (Fig. 12).

Ninety-five percent of the C+AB produced new structures and emergence reached 80 %. All cuttings that sprouted also produced new roots. Of these controls, 10 % only produced roots and 5 % only produced new buds. However, 35 % of the C+AB cuttings senesced prematurely due to a *Pythium* infection shortly after shoot emergence. These cuttings and the 5 % that did not produce any new structure were not used for further analysis. The remaining C+AB produced a statistically higher number (14.9) ( $P \leq 0.001$ ) and dry biomass (0.036 g) ( $P = 0.013$ ) of new roots than the control and K treated cuttings but as many as treatments with IBA or IBA plus K. The C+AB also showed, along with the control group, the highest production of new buds (2.3) ( $P = 0.020$ ). Finally, treatments differed strongly

( $P = 0.010$ ) in terms of rhizome growth (Fig. 11): C+AB cuttings showed an increase of 102 % from their initial rhizome biomass, while all other groups showed a mean decrease of 31 %. As a whole, the C+AB cuttings doubled their weight during the four-month experimental period.

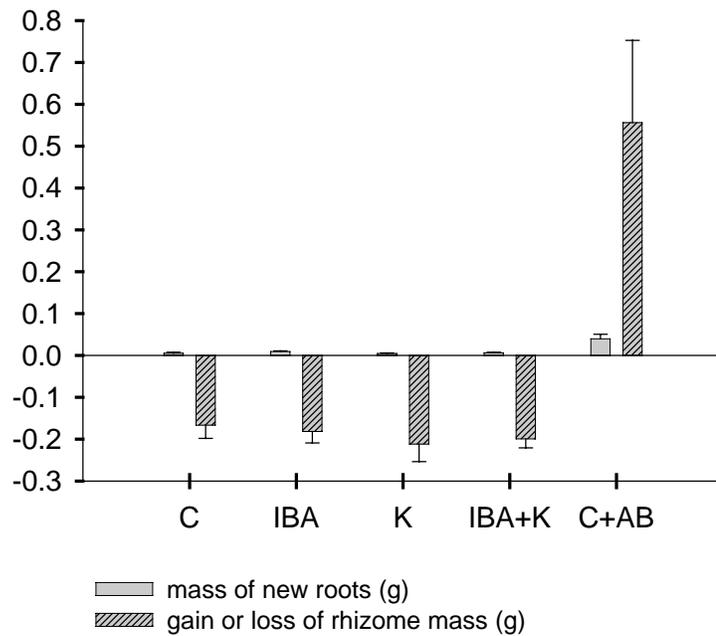


Figure 11. Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on the dry biomass (g) of new root and rhizome tissues of *Sanguinaria canadensis* cuttings after a four-month growth period. Rhizome growth is expressed as (final – initial) rhizome biomass. The results for control (C) and control cuttings with an apical bud (C+AB) are shown.

Table 8 : Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on percent survival and emergence, number of new roots, new root biomass, percent rhizome growth and bud number of *Sanguinaria canadensis* cuttings. *P* values for  $\chi^2$  (percent survival and emergence) and ANCOVA analyses are presented together with the *P* values of the covariables “initial rhizome biomass” and “initial root biomass”. Data within a given row followed by a different letter are significantly different.

Variables	Treatments				P values		
	Control	IBA	K	IBA+K	<sup>1</sup> <i>P</i> <sub>ANOVA/ ANCOVA</sub>	<sup>2</sup> Covariables used	
						Initial rhizome mass	Initial root mass
Survival rate (%)	95	95	85	90	$P_{\chi^2}:0.63$		
Emergence rate	10 %	5 %	5 %	0 %	$P_{\chi^2}:0.55$		
Number of new roots	3.61 <sup>c</sup>	15.79 <sup>a</sup>	2.94 <sup>c</sup>	11.50 <sup>b</sup>	$\leq 0.001$	0.624	0.232
Mass of new roots (g) <sup>#</sup>	0.005 <sup>b</sup>	0.009 <sup>a</sup>	0.005 <sup>b</sup>	0.006 <sup>b</sup>	0.008	0.446	0.448
Percent rhizome growth (%)	-29.2	-27.9	-32.1	-34.9	0.507	0.030	0.045
Number of new buds	1.68	1.16	1.22	1.11	$P_{\chi^2}: \leq 0.001$		

1 This column presents *P* value of ANOVA when none of the covariables are significant and *P* value of ANCOVA of the most significant covariable, when covariables are significant.

df for treatment: 3; df for error term: 69

2 This column presents *P* value of the linear regression between the covariable used and the variable studied.

<sup>#</sup>Statistic analyses were done on rank transformed data.

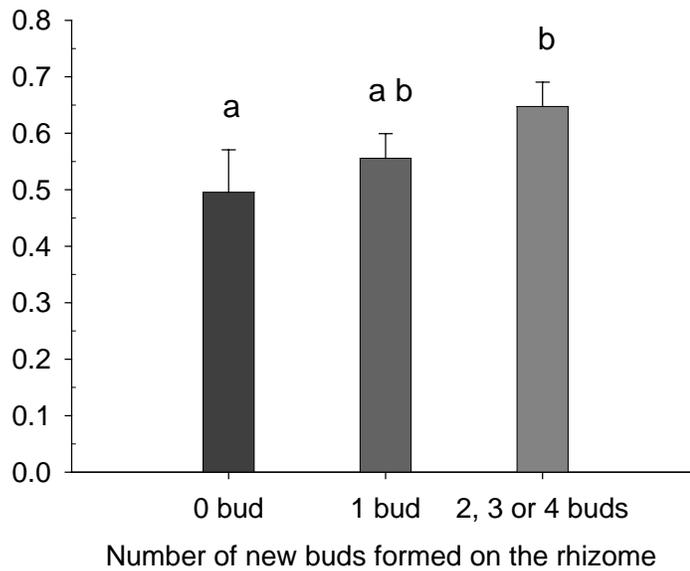


Figure 12. Effect of the initial dry biomass (g) of the rhizome on the production of buds by cuttings of *Sanguinaria canadensis*. Data for bars with a different letter are significantly different.

#### 4. *Caulophyllum thalictroides*

For *C. thalictroides*, 96.25 % of the cuttings produced new structures and 81.25 % sprouted. All cuttings that sprouted developed new roots, only 8.75 % of cuttings rooted without producing shoots and 6.25 % only formed new buds. Most of the cuttings emerged one week after planting. There was no treatment dependant effect on either sprouting or the other measured variables (Fig. 13). At the end of the experiment, the rhizome cuttings had lost an average of 20.3 % of their initial biomass (Table 9). The mean number of roots produced was 46 for a dry biomass of 1g. On average, cuttings developed two stems with a total leaf area of 560 cm<sup>2</sup>. At the end of the experimental period, there were, on average, 13 new buds per rhizome.

The initial presence of roots, it is to say roots at the time of planting, was strongly correlated ( $P \leq 0.001$ ) with new root dry biomass production ( $r = 0.517$ ), shoot dry biomass ( $r = 0.788$ ) and total leaf area ( $r = 0.680$ ) (Table 9). The initial biomass of the rhizome was also a significant but less strong covariable for a number of variables. Pearson's correlation tests confirmed the relationship between initial rhizome biomass and root, shoot and bud production. There was an unexpected negative correlation between initial rhizome biomass and the percentage increase in rhizome biomass ( $r = -0.430$ ,  $P \leq 0.001$ ), with heavier initial rhizome sections exhibiting lower growth. The cuttings that showed an increase in rhizome biomass (between 0 and 50 %) were those that exhibited the lowest initial rhizome biomass (data not shown). We ran further correlation analyses to better characterise this negative correlation and found that bigger rhizomes produced bigger shoots ( $r = 0.342$ ,  $P = 0.005$ ), but that the increase was not linear, that is, bigger rhizomes produced proportionally less shoot biomass and leaf area than smaller rhizomes. There was thus a negative correlation between initial rhizome biomass and shoot biomass ( $r = -0.599$ ,  $P \leq 0.001$ ) or total leaf area ( $r = -0.644$ ,  $P \leq 0.001$ ) when both were expressed on a per g of initial rhizome mass.

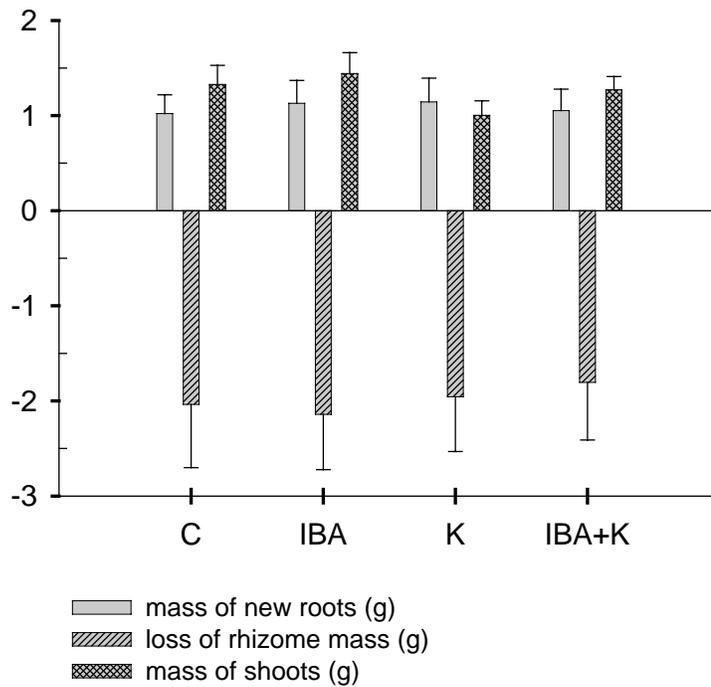


Figure 13. Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on the dry biomass (g) of new root, shoot and rhizome tissues of *Caulophyllum thalictroides* cuttings after a four-month growth period. Rhizome growth is expressed as (final – initial) rhizome biomass. The results for control (C) cuttings are shown.

Table 9 : Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on percent survival, number of new roots, new root biomass, total leaf area, shoot biomass, percent rhizome growth and bud number of *Caulophyllum thalictroides* cuttings.  $P$  values for  $\chi^2$  (percent survival) and ANCOVA analyses are presented together with the  $P$  values of the covariables “initial rhizome biomass” and “initial root biomass”. Data within a given row followed by a different letter are significantly different.

Variables	Treatments				P values		
	Control	IBA	K	IBA+K	<sup>1</sup> $P_{ANOVA/ANCOVA}$	<sup>2</sup> Covariables used	
						Initial rhizome mass	Initial root mass
Survival rate (%)	90	100	100	95	$P_{\chi^2}:0.28$		
Number of new roots #	42.78	50.65	39.15	51.33	0.603	0.002	$\leq 0.001$
Mass of new roots (g) #	1.02	1.13	1.14	1.05	0.482	0.003	$\leq 0.001$
Total leaf area (cm <sup>2</sup> ) #	555.90	651.88	563.01	552.86	0.839	0.053	$\leq 0.001$
Mass of shoots (g)	1.33	1.44	1.00	1.27	0.387	0.004	$\leq 0.001$
Percent rhizome growth (%)	-18.0	-20.6	-20.8	-19.9	0.861	$\leq 0.001$	0.002
Number of new buds #	12.7	15.2	10.4	15.0	0.533	$\leq 0.001$	0.127

1 This column presents  $P$  value of ANOVA when none of the covariables are significant and  $P$  value of ANCOVA of the most significant covariable, when covariables are significant.

df for treatment: 3; df for error term: 73

2 This column presents  $P$  value of the linear regression between the covariable used and the variable studied.

# Statistic analyses were done on rank transformed data.

## 5. *Trillium grandiflorum*

For *T. grandiflorum*, only 20 % of rhizome cuttings produced new structures and none sprouted. The limited data for rhizomes with new structures did not allow between treatment comparisons. Cutting rhizomes of *T. grandiflorum* in two was not a successful propagation method, even when combined with IBA and/or K treatments, and many rhizome sections died.

Of those *T. grandiflorum* rhizomes that had incisions cut in the top half (scarified), 96.3 % sprouted (Table 10). There were no between treatment differences for percent emergence or the other growth variables measured. On average, rhizomes produced seven new roots for a mean dry biomass of 0.119 g, developed 0.352 g of new shoot tissue and exhibited a mean increase in rhizome biomass of 26.4 %. Only two rhizomes (one control and one IBA-treated cutting) produced new buds at the site of the incisions. For all the other rhizomes, the wounded areas had healed over. The initial dry biomass of the rhizome positively influenced shoot biomass, and the initial root dry biomass was positively correlated with most of the measured variables. Pearson's correlation tests confirmed the strong relation between both initial rhizome biomass and initial root biomass, and shoot biomass ( $r = 0.710$ ;  $P \leq 0.001$  and  $r = 0.641$ ;  $P \leq 0.001$ , respectively). Overall, a high initial rhizome biomass, coupled with a high root biomass at planting, enhanced subsequent shoot production.

Table 10 : Effect of auxin (IBA), cytokinin (K) and a dual auxin/cytokinin (IBA+K) treatment on percent survival, number of new roots, new root biomass, shoot biomass, percent rhizome growth and bud number of *Trillium grandiflorum* cuttings. *P* values for  $\chi^2$  (percent survival) and ANCOVA analyses are presented together with the *P* values of the covariables for “initial rhizome biomass” and “initial root biomass”. Data within a given row followed by a different letter are significantly different.

Variables	Treatments				P values		
	Control	IBA	K	IBA+K	<sup>1</sup> <i>P</i> <sub>ANOVA/ ANCOVA</sub>	<sup>2</sup> Covariables used	
						Initial rhizome mass	Initial root mass
Survival rate (%)	95	95	100	95	$P_{\chi^2}:0.79$		
Number of new roots	7.11	7.56	7.47	6.32	0.580	0.128	0.055
Mass of new roots (g) #	0.092	0.117	0.082	0.069	0.623	0.178	0.007
Mass of shoots (g)	0.343	0.417	0.325	0.325	0.730	≤ 0.001	≤ 0.001
Percent rhizome growth (%)	31.1	35.1	17.0	22.5	0.742	0.112	0.017
Number of new buds ##	1.000	1.053	1.000	0.900	$P_{\chi^2}:0.91$		

1 This column presents *P* value of ANOVA when none of the covariables are significant and *P* value of ANCOVA of the most significant covariable, when covariables are significant.

df for treatment: 3; df for error term: 73

2 This column presents *P* value of the linear regression between the covariable used and the variable studied.

# Statistic analyses were done on square root transformed data.

## The buds counted were both terminal buds and the few buds associated with the incisions.

## VII- Discussion

---

### 1. Percent survival of cuttings

Cuttings of the species tested differed in their ability to survive and grow. The use of cuttings seem to be a satisfactory technique for the propagation of *O. horridus*, *S. canadensis* and *C. thalictroides* which showed a survival rate of 73, 91 and 96 % respectively. By contrast, the average survival rate of cuttings of *A. canadense* was only 61 %. However, growth parameters for this species were improved with a combined application of IBA and K. Survival was not linked to initial rhizome biomass in this species (data not shown). However, the presence of roots at planting was positively correlated with new root biomass, shoot biomass and percent rhizome growth. It is possible that the initial presence of roots also influenced cutting survival. Yu *et al.* (2001) observed that the survival of poplar stem cuttings was positively linked to root system quality. Unfortunately, this point could not be verified as dead rhizomes had decomposed before the end of the experimental period. It is also possible that the watering regime was too high for this species, which caused rotting of the rhizomes before sprouting could occur as noticed by G. Dostie (pers. comm.). *A. canadense* is apparently prone to rotting when not well rooted.

The high survival rates obtained for stem cuttings of *O. horridus* is probably due to the natural ability of this species to sprout from fragmented sections of horizontal stem tissue. Under natural conditions, vegetative growth of this species occurs via layering and resprouting from basal stem buds, with the latter insuring the first ramet recruitment after disturbances such as clear-cutting (Lantz and Antos, 2002). In the present study, we found that larger cuttings were more likely to survive than smaller ones, supporting results obtained from previous studies on woody and semi-woody species (Palanisamy and Kumar, 1997; Chalapathi *et al.*, 2001). The influence of the initial stem section biomass on survival of the cuttings may be due to the lower carbohydrate content of smaller cuttings. Total non-structural carbohydrates have been shown to influence rooting by providing energy reserves

and a carbon skeleton to support root initiation and subsequent growth (Haissig, 1986; Veierskov, 1988).

In the present study, all attempts to propagate *T. grandiflorum* failed. *T. grandiflorum* rhizome cuttings, without the application of growth substances, remain the traditional propagation methods for this species (Case and Case, 1997). Although percentage success using this technique is low, the rhizome is normally cut into two unequal parts: a small one containing the apical bud and a bigger one consisting of the remaining part. We cut rhizome into two equal parts and maybe this difference of cuttings length is responsible for the difference in percent survival. With regards to the incised or scarified rhizomes, lack of food storage or differences in cutting cannot be implicated, as the rhizomes remained largely intact. In contrast to the results obtained by Edgren (1993) and Blanchette (1998), scarifications on whole rhizomes, whether disbudded or not, did not allow formation of buds in the present study. However, the incisions may have been too shallow (Blanchette (1998) used 3 to 5 mm deep incisions) and perhaps healed over before being able to induce bud formation. Another possible reason underlying the unsuccessful results with this species may relate to differences between colonies or populations, which are manifested by a lower capacity of certain individuals to regenerate vegetatively. This possibility was advanced by Case and Case (1997), who observed high vegetative reproduction rates for certain of their own *T. grandiflorum* clones, while the cloning ability of this species was considered by Hanzawa and Kalisz (1993) to be non-existent. Further support is provided by Lamoureux (2002), who also characterised vegetative propagation of *T. grandiflorum* as rare. Thus, intra-specific genetic variations may dramatically affect the ability of a given species to propagate clonally. Results from studies using woody species also support the potentially important role played by plant genotype in determining success of vegetative propagation attempts (Zsuffa *et al.*, 1993; Scaltsoyiannes *et al.*, 1997). Therefore, studying the intra-specific genetic variation of *T. grandiflorum* with regards to cloning ability could be of considerable practical value for future commercial propagation of this species.

## 2. Treatment effects

In *A. canadense* and *S. canadensis*, treatments with IBA (IBA or IBA+K) enhanced root production due to the general effect of auxin on adventive root production (Loach, 1988; Hartmann *et al.*, 1997; Srivastava, 2002). In the case of *A. canadense*, enhanced root production was positively correlated with rhizome growth. Plants with more roots probably accumulated more reserves, which could then be used for growth of the rhizome or accumulated for future growth of the plant. Root production was also strongly correlated with shoot production. This suggests that better rooted cuttings were able to take advantage of an increase in shoot biomass and leaf area which likely increased the plant's photosynthetic rate and resulted in higher resources for rhizome growth compared to less rooted cuttings. Therefore, it appears that providing favourable conditions to promote good rooting is important for the production of healthy *A. canadense* cuttings. This in turn will enhance survival of outplanted cuttings, and may be of particular importance for species that are normally characterized by a limited number of superficial roots such as *A. canadense* and *S. canadensis*. Sugar maple forests in Quebec exhibit widely fluctuating environmental conditions between spring and summer. Drought can occur in summer and adversely affect tree growth in sugar maple forests (Payette *et al.*, 1996) and could also affect understory plants that live in them. The production of well-rooted plants could help tolerate drought and improve plant survival.

In *O. horridus*, the IBA-based treatments had no significant effect on root production. This species undergoes natural layering (Lantz and Antos, 2002) and thus has a good inherent rooting capacity. In the present study, cuttings produced a large root biomass irrespective of treatment. IBA application also failed to improve the rooting capacity of *C. thalictroides*. It is possible that the application of auxin to the roots of this species, rather than to the basal part of the rhizome, may have impeded the expected root-promoting effect of the IBA treatment. By contrast, presence of initial roots on rhizome sections at planting was important and positively influenced both production of new roots and shoots. Although the present study was unable to show a positive affect of auxin on root formation, it will be important to test the effect of IBA on poorly rooted stem sections of *C. thalictroides*.

Interestingly, those species that exhibited the lowest ability to root (i.e. *A. canadense* and *S. canadensis*) were also those that were the most sensitive to IBA application. This situation is frequently observed and could be explained by the fact that the ability of a given species or cultivar to root seems to be correlated to its endogenous IAA content (Srivastava, 2002). An exogenous auxin application would consequently correct for the lack of IAA in *A. canadense* and *S. canadensis*, while it would not have any effect on species such as *O. horridus*, which might already have a high level of endogenous IAA.

Kinetin did not show any positive effect on the growth of cuttings, and had a negative effect on root, shoot and rhizome growth of *O. horridus*. This is probably explained by the fact that the K treatments unbalanced the natural auxin/cytokinin ratio. It has been shown that cuttings of poplar exhibiting high natural cytokinins levels are more difficult to root than those exhibiting low cytokinins levels (Okoro and Grace, 1978). Cytokinins, when in too high a concentration, are known to have an adverse effect on root formation (Srivastava, 2002) and this may explain why there were often fewer roots on K-treated cuttings than on cuttings in the other groups. This in turn probably explains why K-treated cuttings exhibited lower growth rates than cuttings in the other treatments.

With regards to the release of axillary buds from apical dominance-induced inhibition by cytokinins (reviewed by Cline, 1991), the present results show that K-treated cuttings failed to produce the highest number of shoots or new buds. It has been shown that cytokinin benzyl adenine, when applied basally, apically, or both, had relatively little effect on the development of lateral buds (Chatfield et al., 2000). On the other hand, cytokinins have been observed to stimulate bud development when applied to the lateral buds of plants with an intact apex, or to decapitated plants to which inhibitory concentrations of apical auxin were applied (Mok, 1994). Thus, it appears that the application of exogenous cytokinins to lateral buds, and not to either tip of the cutting, is required in order to release lateral buds from inhibition. This finding has been confirmed by Srivastava (2002), who further suggested that application of cytokinins, alone or with auxin, to a cut stump, not only has no effect on the release of lateral bud from inhibition, but may also reinforce inhibition. This corroborates the present results and explains why K application to the basal tip of the

cuttings failed to stimulate lateral bud development. Nevertheless, in the case of *A. canadense*, each C+AB cutting produced, on average, three new lateral buds, indicating that apical dominance is weak in this species and unlikely to influence its vegetative propagation. Similarly, C+AB cuttings of *S. canadensis* produced two buds on average, suggesting that two shoots would sprout the following year.

### **3. Rhizome growth**

In the present study, experiments were stopped after four months and measures were taken at shoot senescence for each species except *O. horridus*, which was harvested before senescence occurred. Nevertheless, a reduction in rhizome biomass was observed for all species except *A. canadense*. Such a loss was anticipated for cuttings of *S. canadensis*, which used existing reserves to produce new buds and roots without producing shoots. This is supported by the fact that control plants of *S. canadensis* possessing an intact apical bud (C+AB), of which nearly all sprouted, showed an important increase in rhizome biomass and length. With regards to *O. horridus*, examination of the cuttings revealed an old dehydrated stem section, suggesting that the new shoots became partially or totally independent of the initial horizontal stem section. Independent ramet production has also been reported in vine maple (*Acer circinatum*) (O' Dea *et al.*, 1995), which shows a clonal propagation similar to *O. horridus* (Lantz and Antos, 2002). Decomposition of the old stem section and the related reduction in biomass, combined with the independence of newly produced cutting, is probably an intermediate stage in the process of regeneration of this species that occurs after clear cutting, but before natural layering resumes. This process probably explains the loss of stem biomass despite obtaining new rooted shoots.

In the case of *C. thalictroides*, some of the correlations established during this study suggest that while the presence of an extensive root system at planting play a positive role in the production of new roots and shoots, the planting of large sections of rhizome negatively affects subsequent growth. At the end of the experimental period, a reduction in rhizome biomass was observed irrespective of treatment. The reason behind this is unclear.

The rhizomes of these cuttings were alive with no sign of decay, and the cuttings, which had undergone a four-month growth period, had all senesced naturally. Translocation of carbon reserves toward the rhizome should have occurred prior to harvesting. The fact that bigger rhizomes produced proportionally less shoot biomass and leaf area than smaller rhizomes might explain this negative correlation between rhizome size and growth. Larger rhizomes would not produce enough leaf area to allow rhizome growth either through production of new tissues or accumulation of reserves. However, it is still to be explained what limits shoot production in larger rhizomes.

In conclusion, vegetative propagation from cuttings of *C. thalictroides*, *S. canadensis*, and *O. horridus*, is easy and gives good results even in the absence of any growth substance treatments. Section of rhizome of *C. thalictroides* responded well to cutting provided that the cuttings are not large and that they are well furnished with roots at the time of planting. Stem sections of *O. horridus* rapidly establish new roots and shoots, and application of growth substances did not enhance the growth of cuttings. However, the initial weight of stem sections is important, as small cuttings (<25 g fresh weight) did not sprout. Cuttings of *S. canadensis* exhibited a high survival rate. The new buds produced during the first growing season would be expected to emerge the following year. An application of IBA was shown to enhance formation of new roots for this species. It should also be highlighted that *Pythium* outbreaks can occur on *S. canadensis* cuttings if the substrate is too moist (J. M. Davis, 2002, North Carolina State University, pers. comm.). Rhizome sections of *A. canadense* generally responded well when used as cuttings, but appeared susceptible to rotting when not well rooted. As IBA and IBA+K treatments resulted in enhanced rooting of this species, auxin application is recommended for vegetative propagation by cutting. The vegetative propagation of *T. grandiflorum* appears to be difficult and none of the treatments tested resulted in established plants. Deeper incision of the rhizome is perhaps one possible avenue of research. However, the possibility that clones differ in their ability to propagate vegetatively (Case and Case, 1997) should be investigated further. Other possible solutions for cultivating this recalcitrant species include *in vitro* propagation techniques (Pence and Soukup, 1993) and production from seeds (Solt, 2002). The present study has shown that untreated cuttings of *O. horridus* and *C. thalictroides*, and IBA-

treated cuttings of *A. canadense* and *S. canadensis*, offer an efficient method for the propagation of these four near-endangered species. Such techniques can be easily used in commercial nurseries, but could also be used to set up plantations in commercially exploited sugar maple stands.

## Conclusion générale

Afin de faire un premier pas vers la culture des espèces médicinales et ornementales que sont la sanguinaire, le gingembre sauvage, le trille blanc, le caulophylle faux-pigamon, l'actée à grappes et le bois piquant, nous avons souhaité tester la capacité de propagation de ces espèces canadiennes via, à la fois, les graines et les boutures. Ce qui est intéressant en tout premier lieu, dans cette étude, est justement d'avoir pu comparer ces deux types de propagation pour chacune de nos espèces. Ainsi, il est apparu que les espèces pour lesquelles nous avons obtenu de bons résultats concernant la germination des graines étaient aussi celles qui semblaient avoir le plus de difficultés à se reproduire de façon végétative, et vice-versa. Ainsi, alors que nous n'avons pas du tout réussi à propager le trille blanc, nous avons réussi à faire germer 50 % des graines quelque soit le traitement appliqué. Cette préférence marquée du trille blanc pour la reproduction sexuée au détriment de la reproduction végétative semble refléter la réalité. En effet, Lamoureux (2002) parle d'une propagation exclusive par les graines en ce qui concerne la plupart des trilles pédonculés (dont fait partie le trille blanc). Ailleurs, il est même clairement affirmé que le trille blanc ne se propage pas de façon végétative (Hanzawa et Kalisz, 1993). Ceci viendrait donc conforter nos résultats. Cependant, Case et Case (1997), qui sont devenus des spécialistes des trilles au fil de leurs travaux, arrivent sans aucune difficulté à propager certaines de leurs variétés de trille blanc, tout simplement en enlevant le bourgeon terminal et en replantant les nouveaux bulbilles produits le long du rhizome décapité. Ces résultats laissent à penser que les différentes variétés de trille blanc n'ont pas toutes la même facilité à former des clones, c'est-à-dire que la génétique jouerait un rôle très important dans la capacité du trille blanc à se reproduire végétativement. Une telle hypothèse, si elle est confirmée, pourrait avoir un impact majeur sur la propagation commerciale de cette espèce. Il suffirait alors de sélectionner un cultivar ayant un pool génétique favorable à la multiplication végétative pour rendre la propagation végétative du trille blanc rentable.

À l'opposé du trille blanc se trouve le bois piquant. Nos résultats nous indiquent que pour cette espèce, il n'y a eu aucune germination des graines, tandis que les boutures à partir de tiges ont eu un taux de reprise appréciable de 74 %. Comme nous l'avons déjà mentionné au chapitre 2, il est probable que la non-germination soit due aux mauvaises conditions de conservation de ces graines. Les graines de bois piquant et d'actée à grappes que nous avons commandées nous sont arrivées sèches, alors que les graines ayant une dormance morphophysiologique ne supportent pas la dessiccation et doivent être conservées dans un endroit humide (Baskin et Baskin, 1998; Cullina, 2000). Ceci est le cas des graines de toutes les espèces à l'étude, mais c'est également le cas des graines du ginseng, espèce appartenant à la famille des Araliacées tout comme le bois piquant. Malgré cette mise en garde, il semble que la germination des graines de bois piquant soit faible, de manière générale, et un événement plutôt rare en condition naturelle. Comme les fruits de bois piquant sont fréquemment mangés par les ours, on pourrait s'attendre à ce que le passage des graines dans leur tractus digestif leur serve de scarification et les aide à germer. Mais une étude sur le sujet a montré qu'il n'en était rien (Traveset et Willson, 1997). Le taux de germination des graines après passage dans l'intestin était le même que celui des graines témoin, c'est-à-dire un peu moins de 2 % et ce au bout de deux ans. Ce très faible taux de germination concorde avec les observations sur le terrain où trouver une plantule de bois piquant fait figure d'exception. Lantz et Antos (2002) n'ont trouvé aucune plantule de l'espèce sur leurs parcelles expérimentales situées dans la partie sud de l'île de Vancouver, tandis que Roorbach (1999), pendant ses deux ans de maîtrise consacrés à l'écologie du bois piquant, n'a réussi à trouver que deux plantules dans des populations en Oregon! Le bois piquant apparaît donc ici, à l'opposé du trille blanc, comme une espèce clonale dont la propagation ne repose que très rarement sur les graines.

Entre ces deux extrêmes, se trouvent les autres espèces à l'étude, qui font intervenir à la fois et à différents degrés la reproduction sexuée et la reproduction végétative pour assurer leur propagation. Nos résultats laissent à penser que le gingembre sauvage se propage aussi bien par les graines (avec un taux de germination de 98 % qui concorde avec les résultats de Baskin et Baskin (1986)), que par bouturage du rhizome, avec un taux de reprise des boutures de 61 %. Quant à la sanguinaire, notre étude montre un taux de germination

moyen assez faible, égalant 23 % seulement. Cependant, d'autres études ont montré qu'il était possible d'obtenir 39 % de germination, en deux fois moins de temps que dans notre expérience (Barton, 1944) ou encore 64 % de germination mais en un temps beaucoup plus long que celui de notre expérience (Lobstein et Rockwood, 1993). Ainsi, la germination des graines de sanguinaire, pourvu qu'elles soient dans des conditions favorables, ne semble pas être un obstacle à la propagation de cette espèce. La propagation végétative, quant à elle, a donné des résultats très satisfaisants dans notre étude, avec un taux de reprise des boutures de 91 % en moyenne, bien que l'émergence ne soit attendue que pour l'année suivante. Ainsi, tout comme le gingembre sauvage, la sanguinaire aurait un mode de propagation, faisant intervenir à la fois la propagation par les graines et la multiplication végétative.

Si les essais de bouturage du rhizome chez le caulophylle faux-pigamon ont montré un très bon taux de reprise (96 %), les essais de germination, en revanche, ont conduit à un résultat beaucoup moins enthousiasmant avec un taux moyen de germination de 6 % seulement. Il est à noter, cependant, que la scarification des graines a permis de faire germer 30 % des graines en 10 mois bien que ce résultat ne soit pas statistiquement différent de la valeur moyenne de germination observée. À notre connaissance, seule Barton (1944) a publié une étude sur la germination des graines de cette espèce. Or, cette étude mentionne un taux de germination de 47 % au bout de 13 mois. Ce résultat est comparable au taux de germination obtenu pour les graines scarifiées. Placées dans des conditions favorables, les graines du caulophylle faux-pigamon sont donc capables de germer, mais en un temps relativement long. De plus, même en conditions favorables, la germination ne semble pas s'élever au-delà des 50 %. Le caulophylle faux-pigamon, qui peut donc lui aussi se propager à la fois végétativement et par les graines, aurait une facilité accrue pour la propagation clonale et se rapprocherait donc du bois piquant un peu plus que les autres espèces en ce qui a trait au mode de propagation privilégié. Enfin, aucune germination n'a été observée chez l'actée à grappes. Comme nous n'avons pas pu nous procurer de rhizomes pour cette espèce, nous n'avons pas non plus de données concernant la propagation végétative par bouturage du rhizome pour cette espèce. La non-germination a été reliée à l'état déshydraté des graines, comme nous l'avons vu pour le bois piquant. Mais contrairement à cette dernière espèce, la littérature rapporte que les graines d'actée à grappes germent très bien. Ainsi, Baskin et

Baskin (1985) ont obtenu 72 % de germination au bout de deux mois et demi et Cullina (2000) trouve l'espèce tellement prolifique, en termes de propagation par les graines, qu'il étête fréquemment ses plants afin d'éviter une propagation envahissante de l'espèce. Les résultats préliminaires d'une nouvelle expérience de germination avec un nouvel arrivage de graines ont d'ailleurs conduit à des résultats totalement différents. En moyenne, 80 % des graines ont germé (Jobin P., 2004, données non publiées), ce qui vient confirmer que l'actée à grappes se propage très bien par les graines. Les rhizomes compacts, bien enracinés et pourvus généreusement en bourgeons (obs. pers.) sont très comparables aux rhizomes de caulophylle faux-pigamon, ce qui laisse à penser que la propagation végétative de l'actée à grappes est aussi efficace que celle du caulophylle faux-pigamon. Ainsi, quelque soient les techniques employées, chaque espèce se propage plus ou moins facilement par les graines ou par bouturage. Il importe donc de prendre en compte la propension naturelle de l'espèce à se propager soit par les graines, soit végétativement, afin de réussir efficacement à propager l'espèce ou les espèces choisie(s).

Les essais de germination ont permis de mettre en évidence deux points importants. Le premier concerne le régime de températures. La première stratification au chaud s'est révélée être plus intéressante que la stratification froid / chaud pour faire germer les quatre espèces avec lesquelles nous avons obtenu des résultats positifs (trille blanc, gingembre sauvage, sanguinaire et caulophylle faux-pigamon). Pour ces espèces, l'émergence des cotylédons semble relativement aisée une fois les graines germées. Il suffisait en effet d'une stratification au froid suivie d'un retour à des températures clémentes, tel que mentionné dans la littérature, pour faire émerger les cotylédons des graines germées. L'émergence de la radicule trois mois après la récolte des graines s'est révélée, quant à elle, beaucoup plus problématique. La première période pendant laquelle les graines étaient au chaud n'était probablement pas suffisamment longue pour permettre l'émergence de la plupart des radicules quelque temps après le démarrage de nos essais. Cela s'est traduit par une émergence des radicules retardée jusqu'à la seconde période au chaud, plusieurs mois plus tard. Le point critique sur lequel repose le succès de la germination de ces espèces en temps voulu réside donc, à mon sens, dans la bonne combinaison de stratification à chaud et de

températures automnales qui permettra à toutes les graines des espèces étudiées de faire émerger leur radicule avant l'hiver.

D'autre part, les traitements comme la scarification (caulophylle faux-pigamon et gingembre sauvage) et le trempage dans la gibbérelline (sanguinaire et trille blanc), qui ont permis d'accélérer la sortie de la radicule au travers des téguments pour un certain nombre de graines, auraient probablement un effet beaucoup plus marqué sur une période à chaud plus longue que celle utilisée lors de la présente étude. Les différents graphiques montrent en effet que le pourcentage de germination commence tout juste à augmenter à la fin de la stratification au chaud pour les graines traitées et qu'il est, peu de temps après, stoppé par la stratification au froid. Le deuxième point important qu'ont souligné les essais de germination concerne l'effet de la scarification sur la germination des graines de caulophylle. Alors que pour tous les autres traitements, le taux de germination atteint au mieux 6 %, les graines scarifiées germent à hauteur de 30 %. Comme ces résultats ne sont pas statistiquement différents l'un de l'autre, pour l'instant, cette différence ne peut être attribué qu'au hasard. Cependant, avec un tel écart entre les pourcentages de germination, un traitement de scarification mériterait très certainement d'être testé de nouveau sur des graines de caulophylle faux-pigamon mais avec un plus grand nombre de répétitions. De plus il est possible que le régime de stratification n'ait pas été optimal, ne permettant pas à ce traitement d'exprimer son plein potentiel.

Les essais de bouturage ont, quant à eux, permis de démontrer que toutes les espèces, sauf le trille blanc, étaient capables de se propager par bouturage du rhizome, ou de tige dans le cas du bois piquant. Cette propagation est très simple puisqu'il suffit de fragmenter le rhizome, ou la tige, et de replanter le tronçon tel quel pour obtenir des résultats de propagation très satisfaisants, du moins dans le cas du caulophylle faux-pigamon et du bois piquant. Pour le gingembre sauvage et la sanguinaire, une application d'auxine sur les sections de rhizome permettrait d'améliorer la croissance des boutures. Cependant, alors que la sanguinaire a un très bon taux de reprise, celui du gingembre sauvage est plutôt mitigé (61 %). La propagation végétative de ces espèces pourrait être optimisée en déterminant la longueur optimale des boutures, suffisamment longue pour qu'il y ait assez

de réserves permettant la reprise et la croissance des boutures, mais suffisamment courte pour qu'un plant mère puisse être propagé en un maximum de plants filles. Nous n'avons pas testé ce paramètre qui, pourtant, revêt une grande importance dans le cadre d'une propagation commerciale.

Le choix du producteur pour un type de propagation plutôt qu'un autre doit se faire d'abord en fonction de l'espèce, comme nous l'avons vu. Ainsi, au stade actuel des connaissances, vouloir à tout prix propager le bois piquant par les graines ou le trille blanc par bouturage risque fort de mener le producteur à l'échec. Pour les espèces pour lesquelles les deux types de propagation sont possibles, la décision dépendra du type de production. La propagation par bouturage a l'avantage de produire des individus matures en un an, voire en deux ans dans le cas de la sanguinaire, si elle émerge bien au bout de la deuxième année comme nous nous y attendons. Lorsque l'on parle d'individus matures, on veut dire par là que les plants propagés sont prêts à fleurir, donc commercialisables en horticulture et qu'ils auront un rhizome beaucoup plus gros que des plantules, ce qui est intéressant aussi pour l'industrie des produits naturels qui recherche les composés actifs présents dans le rhizome ou le bois (pour le bois piquant). Cependant, dans le contexte d'un système agroforestier où le travail de terrain peut difficilement être mécanisé à cause de la présence des arbres, on privilégiera plutôt la propagation par les graines, qui est plus longue mais beaucoup plus facile à mettre en œuvre que la propagation végétative. Cette dernière exige de déterrer les plants mères, de les nettoyer, de les sectionner, puis de creuser des trous, ce qui est délicat dans un érablière où les racines s'enchevêtrent, et enfin de replanter les boutures. Pour ce genre de travaux, un producteur fait généralement appel à de la main d'œuvre extérieure, ce qui ajoute un coût supplémentaire à la production. Au contraire, pour les graines, il suffit de les récolter mûres sur les pieds mères, de les traiter éventuellement (des méthodes de scarification et de stratification de masse existent), de déplacer la litière sur le terrain de semis, de semer les graines à la volée, puis de replacer la litière sur les graines afin de conserver un bon taux d'humidité. Ainsi, pour un acériculteur désireux de diversifier sa production sans trop d'investissement, la propagation des espèces par graines sera plus intéressante que la propagation végétative alors qu'un producteur horticole ou un

producteur qui travaille en plein champ sous ombrière privilégiera davantage la propagation végétative de ces espèces.

Il apparaît donc que ces espèces qui sont réputées difficiles à propager ne le sont pas tant que ça. Mais de là à parler d'une propagation commerciale pleinement maîtrisée, du chemin reste à faire, surtout en ce qui a trait à la germination des graines. Concernant cet aspect, notre travail « appliqué », plus que « fondamental », n'a pas permis de déterminer les mécanismes qui sous-tendent la dormance des graines, ce qui permettrait éventuellement de surmonter cette dormance, mais a tout juste permis d'évoquer des pistes de solutions, qui restent à creuser, vers une germination plus rapide. Par contre, la production de ces espèces en système agroforestier, dans les érablières par exemple, s'avère tout à fait adaptée à ce type d'espèces sciaphytes qui se propagent bien végétativement et dont les délais de germination découragent les producteurs. Ainsi, la « culture en forêt » pourrait occuper une niche économique actuellement délaissée par les pépiniéristes. Afin d'être en mesure de proposer aux acériculteurs intéressés une régie de culture complète, les expériences, pour les six espèces étudiées, se poursuivent in situ, sous des érablières du sud du Québec.

## Références

- Ahmad N, Gupta S, Hussain MM, Heiskanen KM, Muktar H.** 2000. Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clinical Cancer Research* 6: 1524-1528.
- Anand VK et Heberlein GT.** 1975. Seasonal changes in the effect of auxins on rooting in stem cuttings of *Ficus infectoria*. *Physiologia Plantarum* 34: 330-334.
- Anonyme.** 2003. *Cimicifuga racemosa* - Monograph. *Alternative Medicine Review* 8: 186-189.
- Babiker AGT, Butler LG, Ejeta G, Woodson WR.** 1993. Enhancement of ethylene biosynthesis and germination by cytokinins and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Striga asiatica* seeds. *Physiologia Plantarum* 89: 21-26.
- Barton VL.** 1944. Some seeds showing special dormancy. *Contribution from Boyce Thompson Institute* 13: 259-271.
- Baskin CC et Baskin JM.** 1985. Epicotyl dormancy in seeds of *Cimicifuga racemosa* and *Hepatica acutiloba*. *Journal of the Torrey Botanical Club* 112: 253-257.
- Baskin CC et Baskin JM.** 1998. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego (CA). 666 p.
- Baskin CC et Baskin JM.** 1986. Seed germination ecophysiology of the woodland herb *Asarum canadense*. *American Midland Naturalist* 116: 132-139.
- Bewley JD.** 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Bewley JD et Black M.** 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Peplum Press, New York (NY). 445 p.

- Blanchette L.** 1998. Asexual propagation of *Anemonella*, *Dodecatheon*, and *Trillium*. *The International Plant Propagator's Society Combined Proceedings* 48: 327-329.
- Bodinet C et Freudenstein J.** 2002. Influence of *Cimicifuga racemosa* on proliferation of oestrogen receptor-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 76: 1-10.
- Cain M et Damman H.** 1997. Clonal growth and ramet performance in the woodland herb, *Asarum canadense*. *Journal of Ecology* 85: 883-897.
- Campbell NA.** 1995. *Biologie*, 3<sup>ème</sup> éd. Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., Saint Laurent (Québec), Canada. 1189 p.
- Case FW Jr et Case RB.** 1997. *Trilliums*. Timber Press Inc, Portland (OR). 285 p.
- Cavallito CJ et Bailey JH.** 1946. Antibacterial substances from *Asarum canadense*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal of American Chemical Society* 68: 489-492.
- Chalapathi MV, Thimmegowda S, Kumar ND, Rao GCE, Mallikarjuna K.** 2001. Influence of length of cutting and growth regulators on vegetative propagation of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bert.). *Crop Research* 21: 53-56.
- Chang SH et Yang JC.** 1996. Enhancement of plant formation from embryo cultures of *Taxus mairei* using suitable culture medium and PVP. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 37: 35-40.
- Chatfield SP, Stirnberg P, Forde BG, Leyser O.** 2000. The hormonal regulation of auxiliary bud growth in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 24: 159-169.
- Chaturvedi MM, Kumar A, Darnay BG, Chainy Gagan BN, Agarwal S, Aggarwal BB.** 1997. Sanguinarine (Pseudochelerythrine) is a potent inhibitor of NF- $\kappa$ B activation, I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, and degradation. *Journal of Biological Chemistry* 272: 30129-30134.
- Chien CT, Kuo-Huang LL, Lin TP.** 1998. Changes in ultrastructure and abscissic acid level, and response to applied gibberellins in *Taxus mairei* seeds treated with warm and cold stratification. *Annals of Botany* 81: 41-47.

- Cline MS.** 1991. Apical dominance. *The Botanical Review* 57: 318-358.
- Couillard L.** 2004. Présentation de la loi E 1201 lors de l'Atelier sur les problématiques liées à la culture des plantes indigènes forestières. Gouvernement du Québec, ministère de l'Environnement et de la Faune, Direction de la conservation et du patrimoine écologique, Québec. Projet de loi présenté dans la *Gazette Officielle du Québec* du 11 août 2004, 136<sup>ème</sup> année, n°32 : 3742-3743.
- Crocker W.** 1916. Mechanisms of dormancy in seeds. *American Journal of Botany* 3: 99-120.
- Cullina W.** 2000. The New England Wildflower Society's Guide to Growing and Propagating Wildflowers. Houghton Mifflin Co., Boston (MA). 322 p.
- Davis JM.** 2002. Personal communication. Associate Professor, North Carolina State University, Dept of Horticultural Science. Extension Specialist, North Carolina Cooperative Extension Service. North Carolina Specialty Crops Program Coordinator. Home page: <http://www.ncherb.org/> updated February 2003
- Edgren M.** 1993. Vegetative propagation of *Trillium chloropetalum*. *Bulletin of the American Rock Garden Society* 51: 169-172.
- Flemion F et Waterbury.** 1945. Further studies with dwarf seedlings of non-after-ripened peach seeds. *Contribution from Boyce Thompson Institute* 13:415-422.
- Foley ME.** 2001. Seed dormancy: an update on terminology, physiological genetics, and quantitative trait loci regulating germinability. *Weed Science* 49: 305-317.
- Fukuda N, Imamura N, Saito E, Nohara T, Kawasaki T.** 1981. Steroid saponins and saponinins of underground parts of *Trillium kamtschaticum* Pall.4. Additional oligoglycosides of 18 norspirostane derivatives and other steroidal constituents. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 29: 325-335.
- Geneve RL.** 2003. Impact of temperature on seed dormancy. *HortScience* 38: 336-341.
- Gordon AM et Newman SM.** 1997. Temperate Agroforestry Systems. CAB International, New York (NY). 269 p.

- Green DW et Autio WR.** 1989. Evaluation of benzyladenine as chemical thinner on 'McIntosh' apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 14: 68-73.
- Haissig BE.** 1986. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. In: Jackson MB (ed). *New Root Formation in Plants and Cuttings*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 141-190.
- Hanzawa FM et Kalisz S.** 1993. The relationship between age, size, and reproduction in *Trillium grandiflorum* (Liliaceae). *American Journal of Botany* 80: 405-410.
- Hartmann TH, Kester DE, Davies FT Jr, Geneve RL.** 1997. *Plant Propagation: Principles and Practices*, 6<sup>th</sup> ed. Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River (NJ). 770 p.
- Khan AA.** 1971. Cytokinins: Permissive role in seed germination. *Science* 171: 853-859.
- Kobaisy M, Abramowski Z, Lermer L, Saxena G, Hancock REW, Towers GHN, Doxsee D, Stokes RW.** 1997. Antimycobacterial polyynes of Devil's Club (*Oplopanax horridus*), a North American native medicinal plant. *Journal of Natural Products* 60: 1210-1213.
- Lamoureux G.** 2002. *Flore printanière*. Fleurbec éditeur, Saint-Henri-de-Lévis (Québec), Canada. 575 p.
- Lamoureux G et Nantel P.** 1999. *Cultiver des plantes sauvages... sans leur nuire*. Fleurbec éditeur, Saint-Henri-de-Lévis (Québec), Canada. 80 p.
- Lang GA.** 1987. Dormancy: A new universal terminology. *HortScience* 22: 817-820.
- Lantz TC et Antos JA.** 2002. Clonal expansion in the deciduous understory shrub, devil's club (*Oplopanax horridus*; Araliaceae). *Canadian Journal of Botany* 80: 1052-1062.
- Lapointe L.** 1998. Fruit development in *Trillium* - Dependence on stem carbohydrate reserves. *Plant Physiology* 117: 183-188.

- Le Page-Degivry MT.** 1973. Influence de l'acide abscissique sur le développement des embryons de *Taxus baccata* L. cultivés *in vitro*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 70: 406-413.
- Le Page-Degivry MT et Garello G.** 1992. *In situ* abscisic acid synthesis. A requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiology* 98: 1386-1390.
- Lieberman S.** 1998. A review of the effectiveness of *Cimicifuga racemosa* (black cohosh) for the symptoms of menopause. *Journal of Women's Health* 7: 525-529.
- Liske E.** 1998. Therapeutic efficacy and safety of *Cimicifuga racemosa* for gynecologic disorders. *Advances in Therapy* 15: 45-53.
- Loach K.** 1988. Hormone applications and adventitious root formation in cuttings - a critical review. *Acta Horticulturae* 227: 126-133.
- Lobstein ML et Rockwood LL.** 1993. Influence of elaiosome removal on germination in five ant-dispersed plant species. *Virginia Journal of Science* 44: 59-72.
- Locock RA.** 1995. *Asarum*: Canada Snakeroot. *Canadian Pharmaceutical Journal* 128: 33-35.
- Luna T.** 2001. Propagation protocol for Devil's club (*Oplopanax horridus*). *Native Plants Journal* 2: 106-108.
- Lyke J.** 2001. Conservation status of *Cimicifuga rubifolia*, *C. americana* and *C. racemosa*. *Medicinal Plant Conservation* 7: 20-24. aussi disponible à: <http://www.nps.gov/plants/medicinal/pubs/2001appendixf.htm> Mis en ligne par le National Park Service, mis à jour le 30 avril 2002, accédé le 20 Août 2004.
- Lyons RE et Hale CL.** 1987. Comparison of pinching methods on selected species of *Columnea*, *Kalanchoe*, and *Crassula*. *HortScience* 22: 72-74.
- Mahotiere S, Jonhson C, Howard P.** 1993. Stimulating asparagus seedling shoot production with benzyladenine. *HortScience* 28: 229.

- Marles R et Farnsworth N.** 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2: 137-189.
- Mathe A et Franz C.** 1999. Good agricultural practice and the quality of phytomedicines. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 6: 101-113.
- McCutcheon AR, Stockes RW, Thorson LM, Ellis SM, Hancock REW, Towers GHN.** 1997. Antimycobacterial screening of British Columbian medicinal plants. *International Journal of Pharmacognosy* 35: 77-83.
- McGuffin M et Young AL.** 2001. Comments of the American Herbal Products Association on the request for information and changes to the CITES appendices. American Herbal Products Association, 13 p.
- McKenna DJ, Jones K, Humphrey S, Hughes K.** 2001. Black cohosh: efficacy, safety, and use in clinical and preclinical application. *Alternative Therapies in Health & Medicine* 7 : 93-100.
- Meyer SE, Kitchen SG, Carlson SL.** 1995. Seed germination timing patterns in intermountain *Penstemon* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 82: 377-389.
- Milbocker DC.** 1972. Axillary shoot stimulation in poinsettia with kinetin. *HortScience* 7: 483-484.
- Mok MC.** 1994. Cytokinins and plant development - an overview. In Mok DWS et Mok MC (eds). Cytokinins, Chemistry, Activity and Function. CRC Press, Boca Raton, pp. 155-156.
- Motto MG et Secord NJ.** 1985. Composition of the essential oil from *Asarum canadense*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33: 789-791.
- Muir AM.** 1995. The cost of reproduction to the clonal herb *Asarum canadense* (wild ginger). *Canadian Journal of Botany* 73: 1683-1686.

- Newton SM, Law C, Gurcha SS, Besra GS, Wright CW.** 2002. The evaluation of forty-three plant species for *in vitro* antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 79: 57-67.
- Nikolaeva MG.** 1977. Factors affecting the seed dormancy pattern. In Khan AA (ed). *The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy, and Germination*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 51-76.
- Nikolaeva MG, Daletskaya TV, Razumova MV, Kofanova NN.** 1973. Effects of gibberellin and kinetin on embryo growth and seed germination in Spindle tree and Tartar maple. *Soviet Plant Physiology* 20: 600-605.
- Nortier JL, Schmeiser HH, Muniz Martinez MC, Arlt VM, Vervaet C, Garbar CH, Daelemans P, Vanherweghem JL.** 2003. *Case report: Invasive urothelial carcinoma after exposure to Chinese herbal medicine containing aristolochic acid may occur without severe renal failure.* *Nephrology Dialysis Transplantation* 18: 426-428.
- O'Dea ME, Zasada JC, Tappeiner JC II.** 1995. Vine maple clone growth and reproduction in managed and unmanaged coastal Oregon Douglas-fir forest. *Ecological Applications* 5: 63-73.
- Okoro OO et Grace J.** 1978. The physiology of rooting *Populus* cuttings. II. Cytokinin activity in leafless hardwood cuttings. *Physiologia Plantarum* 44: 167-170.
- Palanisamy K et Kumar P.** 1997. Effect of position, size of cuttings and environmental factors on adventitious rooting in neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *Forest Ecology and Management* 98: 277-280.
- Paul V et Handa KL.** 1963. *Trillium govavianum* as a source of diosgenin. *Indian Journal of Chemistry* 1: 101-102.
- Payette S, Fortin MJ, Morneau C.** 1996. The recent sugar maple decline in southern Quebec: probable causes deduced from tree rings. *Canadian Journal of Forest Research* 26: 1069-1078.

- Pence VC et Soukup VG.** 1993. Factors affecting the initiation of mini-rhizomes from *Trillium erectum* and *T. grandiflorum* tissues *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35: 229-235.
- Phartyal SS, Thapliyal RC, Nayal JS, Joshi G.** 2003. Seed dormancy in Himalayan maple (*Acer caesium*) I: Effect of stratification and phyto-hormones. *Seed Science and Technology* 31: 1-11.
- Powell LE.** 1987. Hormonal aspects of bud and seed dormancy in temperate-zone woody plants. *HortScience* 22: 845-850.
- Power FB et Salway AH.** 1913. The constituents of the rhizome and roots of *Caulophyllum thalictroides*. *Journal of the Chemical Society* 103: 191-209.
- Ren C et Kermode AR.** 1999. Analyses to determine the role of megagametophyte and other tissues in dormancy maintenance of yellow cedar (*Chamaecyparis nootkatensis*) seeds: morphological, cellular and physiological changes following moist chilling and during germination. *Journal of Experimental Botany* 50: 1403-1419.
- Ringius GS et Sims RA.** 1997. *Plantes indicatrices des forêts canadiennes*. Service canadien des forêts, Ressources naturelles Canada, Ottawa (Ontario), Canada. 217 p.
- Roorbach AH.** 1999. The Ecology of Devil's Club (*Oplopanax horridum* (J.E. Smith) Miq.) in Western Oregon. M.Sc. thesis, department of Forest Science, Oregon State University, Corvallis (OR). 100 p.
- Sawkins MC et McGough HN.** 1993. The genus *Trillium* in trade. *Traffic Bulletin* 13: 117-121.
- Scaltsoyiannes A, Tsoulpha P, Panetsos KP, Moulalis D.** 1997. Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*Juglans regia*). *Silvae Genetica* 46: 326-332.
- Schaneberg BT, Applequist WL, Khan IA.** 2002. Determination of aristolochic acid I and II in North America species of *Asarum* and *Aristolochia*. *Pharmazie* 57: 686-689.

- Schilcher H.** 1989. Quality requirements and quality standards for medicinal, aromatic and spice plants. *Acta Horticulturae* 249: 33-44.
- Schmitz N, Abrams SR, Kermode AR.** 2000. Changes in abscissic acid content and embryo sensitivity to (+)-abscissic acid during the termination of dormancy of yellow cedar seeds. *Journal of Experimental Botany* 51: 1159-1162.
- Schütz W et Milberg P.** 1997. Seed dormancy in *Carex canescens*: regional differences and ecological consequences. *Oikos* 78: 420-428.
- Scott CC et Chen KK.** 1943. The pharmacological action of N-methylcystisine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 79: 334-339.
- Small E et Catling PM.** 2000. Les cultures médicinales canadiennes. Presses scientifiques du CNRC, Ottawa (Ontario), Canada. 281 p. (version française)
- Small E and Catling PM.** 1999. Canadian medicinal crops. National Research Council of Canada, Ottawa (Ontario), Canada. 240 p. (version anglaise)
- Solt S.** 1998 a. Commercial propagation of *Trillium*. *The International Plant Propagators' Society Combined Proceedings* 48: 329-333.
- Solt S.** 1998 b. The effect of temperature on *Trillium grandiflorum* and *Trillium erectum*. *The International Plant Propagators' Society Combined Proceedings* 48: 486-488.
- Solt S.** 2002. Propagation protocol for *Trillium* L. (Liliaceae). *Native Plants Journal* 3: 18-20.
- Southard GL, Parson LG, Thomas LG Jr, Boulware RT, Woodall IR, Jones BJB.** 1987. The relationship of *Sanguinaria* extract concentration and zinc ion to plaque and gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* 14: 315-319.
- Srivastava LM.** 2002. Plant Growth and Development. Hormones and Environment. Academic Press, San Diego (CA). 772 p.
- Thommasen HV, Wilson RA, McIlwain RG.** 1990. Effect of devil's club tea on blood glucose levels in diabetes mellitus. *Canadian Family Physician* 36: 62-65.

- Traveset A et Willson MF.** 1997. Effect of birds and bears on seed germination of fleshy-fruited plants in temperate rainforests of southeast Alaska. *Oikos* 80: 89-95.
- Tyler VE.** 1999. Tyler's Honest Herbal, 4<sup>th</sup> ed. The Harworth Herbal Press, Binghamton (NY). 442 p.
- Veierskov B.** 1988. Relations between carbohydrates and adventitious root formation. *In* Davis TD, Haissig BE, Sanhla N (eds). *Adventitious Root Formation in Cuttings*. Dioscorides Press, Portland (OR), pp. 70-78.
- Warnecke G.** 1985. Beeinflussung klimakterischer Beschwerden durch ein Phytotherapeutikum. Erfolgreiche Therapie mit Cimicifuga-Monoextrakt. *Med Welt* 36: 871-874.
- Wills R et Lipsey R.** 1999. An Economic Strategy to Develop Non-Timber Forest Products and Services in British Columbia. (Forest Renewal BC Project No. PA 97538) Cognetics International Research Inc., Victoria (BC). 139 p. (aussi disponible sur: [http://www.sfp.forprod.vt.edu/pubs/ntfp\\_bc.pdf](http://www.sfp.forprod.vt.edu/pubs/ntfp_bc.pdf))
- Young JA et Young CG.** 1986. *Collecting, Processing and Germinating Seeds of Wildland Plants*. Timber Press, Portland (OR). 236 p.
- Yu Q, Mäntyla N, Salonen M.** 2001. Rooting of hybrid clones of *Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx by stem cuttings derived from micropropagated plants. *Scandinavian Journal of Forest Research* 16: 238-245.
- Zimmerman PW et Wilcoxon F.** 1935. Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. *Contribution from Boyce Thompson Institute* 7: 209-229.
- Zsuffa L, Sennerby-Forsse L, Weisberger H, Hall RB.** 1993. Strategies for clonal forestry with poplar, aspen and willows. *In*: Ahuja MR and Libby WJ (eds). *Clonal Forestry. Vol. II. Conservation and Application*. Springer, Berlin, pp. 91-119.