

RAPPORT

**Potentiel d'utilisation du chitosane comme
facteur de croissance et de protection des
plants d'épinette blanche contre le gel -
Complément :
Analyses chimiques**

Présenté à :

M^{me} Renée Fortin
Secrétariat rural, Agriculture et agroalimentaire

Canada

Référence QC-0016-CD

M. Jean-Marc Hardy, ing.f.

M. Lorenzo Perret

**Ministère des Ressources naturelles du
Québec, Gaspé**

M. Clermont Beaulieu, vice-président

Marinard Biotech

Préparé par :

CERFO

Centre collégial de transfert de technologie en foresterie

François Guillemette, ing.f., M.Sc.

Anick Patry, ing.f.

Sébastien Meunier, ing.f., M.Sc.

Avril 2003

PARTENAIRES DU PROJET

- **CEDFO** Centre collégial de transfert de technologie en foresterie
M. François Guillemette, ing.f., M.Sc.
M^{me} Anick Patry, ing.f.
M. Sébastien Meunier, ing.f., M.Sc.
M. Donald Blouin, ing.f., M.Sc.
- **Marinard Biotech**
M. Clermont Beaulieu, Ph D.
- **SARGIM**
M. Jean-François Lemerle, ing.f.

TABLE DES MATIÈRES

PARTENAIRES DU PROJET	i
LISTE DES FIGURES	iii
LISTE DES TABLEAUX	iv
REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ	vi
1. INTRODUCTION	1
1.1 <i>Hypothèses de recherche</i>	1
2. MÉTHODOLOGIE	2
3. RÉSULTATS	3
3.1 <i>Tissu foliaire</i>	3
3.2 <i>Tissu racinaire</i>	5
3.3 <i>Tourbe</i>	8
4. CONCLUSION	10
5. RÉFÉRENCES	11

LISTE DES FIGURES

Figure 1 -	Concentration en azote foliaire en fonction de la dose de chitosane.....	4
Figure 2 -	Concentration en azote foliaire en fonction de la date de sortie des semis	5
Figure 3 -	Concentration en azote racinaire des semis extraits le 16 octobre 2002 en fonction de la dose de chitosane.....	6
Figure 4 -	Concentration en azote racinaire (traitements A et B seulement) en fonction de la date de sortie des semis	7
Figure 5 -	Concentration en azote dans la tourbe des semis extraits le 16 octobre 2002 en fonction de la dose de chitosane.....	8

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 -	Échantillonnage soumis à l'analyse chimique.....	2
Tableau 2 -	ANOVA sur la concentration en azote (g/kg) par extraction H ₂ SO ₄ dans le tissu foliaire (aiguilles)	3
Tableau 3 -	ANOVA sur la concentration en azote (g/kg) par extraction H ₂ SO ₄ dans le tissu racinaire des semis extraits le 16 octobre 2002	6
Tableau 4 -	ANOVA sur la concentration en azote (g/kg) par extraction H ₂ SO ₄ dans le tissu racinaire des semis ayant reçu les traitements A et B.....	7
Tableau 5 -	ANOVA sur la concentration en azote (g/kg) par extraction H ₂ SO ₄ dans la tourbe des semis extraits le 16 octobre 2002	8
Tableau 6 -	ANOVA sur la concentration en azote (g/kg) par extraction H ₂ SO ₄ dans la tourbe des semis ayant reçu les traitements A et B	9

REMERCIEMENTS

La réalisation de cette recherche a été rendue possible grâce à la collaboration de plusieurs personnes et organismes. Nous tenons tout d'abord à remercier l'équipe de Marinard Biotech inc, notamment MM. Clermont Beaulieu et Serge Lacasse, pour le support offert durant les deux phases du projet. Par ailleurs, nous tenons aussi à souligner la précieuse collaboration de M. Jean-François Lemerle de la pépinière SARGIM. Ce producteur de plants forestiers a en effet permis de mener à bien ce projet en prêtant une partie de ses installations et en contribuant à la mise en place du dispositif de mesures de croissance.

De plus, nos remerciements s'adressent aussi à M. Carol De Blois, chimiste au Laboratoire de chimie organique et inorganique, et à Mme Anick Patry pour l'identification de la méthode d'extraction à réaliser.

Finalement, nous tenons à remercier le Secrétariat rural de Agriculture et alimentaire Canada et le ministère des Ressources naturelles du Québec pour leur soutien financier. **Ce projet a été financé en partie par l'Initiative de développement rural du Partenariat rural canadien, une initiative du gouvernement du Canada conçue pour aider les collectivités rurales et éloignées à élaborer et à adopter des stratégies de développement rural durables et à long terme qui renforceront la capacité de ces collectivités à trouver des solutions locales aux problèmes locaux.**

RÉSUMÉ

Le but du présent projet consistait à étudier les effets du chitosane sur la croissance et la protection contre le gel hâtif des semis destinés au reboisement forestier. Pour ce, une série de dispositifs ont été établis à New Richmond, en Gaspésie, afin de tester l'effet de l'application hebdomadaire de différentes doses de chitosane sur la germination de semences de même que sur la croissance et la tolérance au gel de plants d'épinette blanche lors de leur première et de leur deuxième saisons de croissance.

Dans ce complément au rapport final (Patry et al., 2003), seuls les résultats des analyses chimiques (azote) sur les semis de la première année de croissance sont présentés. Nos résultats indiquent que la contribution en azote par le chitosane a été excédentaire à la fertilisation et n'a donc pas permis d'augmenter la concentration en azote dans le tissu foliaire et dans le tissu racinaire. Cependant, cet apport d'azote s'est accumulé dans la tourbe et pourra être prélevé par la plante au cours de la prochaine saison de croissance, d'où la nécessité de suivre le dosage de l'azote et la croissance de ces semis au cours de la saison de croissance 2003.

1. INTRODUCTION

Dans le cadre du projet *Potentiel d'utilisation du chitosane comme facteur de croissance et de protection des plants d'épinette blanche contre le gel* (Patry et al., 2003), des analyses sommaires avaient permis de déterminer la pertinence d'effectuer une analyse de l'effet du chitosane sur la concentration en azote dans le tissu foliaire, le tissu racinaire et dans la tourbe.

Ce rapport présente donc les résultats de ces analyses chimiques réalisées au *Laboratoire de chimie organique et inorganique* de Québec. Pour de plus amples détails sur le potentiel d'utilisation du chitosane, le lecteur est référé à Blouin et al. (2002).

1.1 HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

- 1** - L'application de chitosane à différentes doses lors du premier été de croissance des semis d'épinette blanche augmente la concentration en azote dans le tissu foliaire à la fin de la saison de croissance.
- 2** - L'effet de l'application de chitosane sur la concentration en azote dans le tissu foliaire varie au cours de l'automne (effet de la date de sortie des semis).
- 3** - L'application de chitosane à différentes doses lors du premier été de croissance des semis d'épinette blanche augmente la concentration en azote dans le tissu racinaire à la fin de la saison de croissance.
- 4** - L'effet de l'application de chitosane sur la concentration en azote dans le tissu racinaire augmente au cours de l'automne (effet de la date de sortie des semis).
- 5** - L'application de chitosane à différentes doses lors du premier été de croissance des semis d'épinette blanche augmente la concentration en azote dans la tourbe à la fin de la saison de croissance.
- 6** - L'effet de l'application de chitosane sur la concentration en azote dans la tourbe augmente au cours de l'automne (effet de la date de sortie des semis).

2. MÉTHODOLOGIE

Les échantillons soumis aux analyses ont été prélevés de façon aléatoire parmi les semis sélectionnés pour les tests de résistance au gel (*cf* Patry et al., 2003) et ce, pour deux dates de récolte : 18 septembre et 16 octobre 2002. Suite à 24 heures de transport entre la pépinière SARGIM de New Richmond et le Centre de foresterie des Laurentides à Ste-Foy, les plants soumis aux analyses ont été entreposés à 2 degrés Celcius jusqu'au mois de mars 2003 pour les analyses chimiques. Cet entreposage a permis d'éviter le gel des plants et leur croissance, mais des translocations des ressources à l'intérieur des plants peuvent avoir eu lieu. Le tableau 1 présente le nombre de semis prélevés en fonction de la date de récolte, du traitement d'application du chitosane au cours de la saison de croissance et de la variable soumise aux analyses chimiques.

Les analyses chimiques ont été réalisées par M. Carol De Blois, chimiste, au *Laboratoire de chimie organique et inorganique* à Québec. La méthode d'extraction de l'azote est celle au H₂SO₄ no III-01. La méthode consiste à la digestion d'un spécimen de l'échantillon (100 mg de tissus ou 200 mg de sol) avec de l'acide sulfurique concentré en présence de sélénium et de peroxyde d'hydrogène à 370 °C pendant une heure. Après dissolution complète, les métaux sont dosés directement dans la solution acide diluée par spectrométrie d'émission atomique au plasma (modèle : ICAP 61E, compagnie : Thermo Instruments ou modèle : ICAP 9000, compagnie : Thermo Instruments). L'azote sous forme d'ammonium est dosé par colorimétrie avec un spectrophotomètre à flux continu (modèle : Quickchem 8000, compagnie : Lachat).

Les analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées sur les concentrations en azote des tissus et des sols selon un plan entièrement aléatoire à l'aide de la procédure GLM de SAS version 8.1. Des contrastes simples et polynomiaux ont été appliqués pour préciser les effets des doses de chitosane sur la concentration en azote des échantillons (g/kg). Les effets ont été qualifiés de significatifs au seuil d'erreur de 5% et hautement significatifs à un seuil de 1%.

Tableau 1 - Échantillonnage soumis à l'analyse chimique

Variable dépendante	Traitement au chitosane	Date de sortie		
		18 septembre 2002	16 octobre 2002	Total
Aiguilles	A – 4 mg/cavité pendant 8 semaines	10	10	20
	B – 12 mg/cavité pendant 8 semaines	9	10	19
	C – 24 mg/cavité pendant 8 semaines	5	14	19
	D – 12 mg/cavité pendant 16 semaines	10	8	18
	E – 0 mg/cavité pendant 16 semaines	9	8	17
	Total	43	50	93
Racines et tourbe	A – 4 mg/cavité pendant 8 semaines	10	8	18
	B – 12 mg/cavité pendant 8 semaines	8	8	16
	C – 24 mg/cavité pendant 8 semaines	-	8	8
	D – 12 mg/cavité pendant 16 semaines	-	8	8
	E – 0 mg/cavité pendant 16 semaines	-	8	8
	Total	18	40	58

3. RÉSULTATS

3.1 TISSU FOLIAIRE

Hypothèse 1 - L'application de chitosane à différentes doses lors du premier été de croissance des semis d'épinette blanche augmente la concentration en azote dans le tissu foliaire à la fin de la saison de croissance.

FAUX

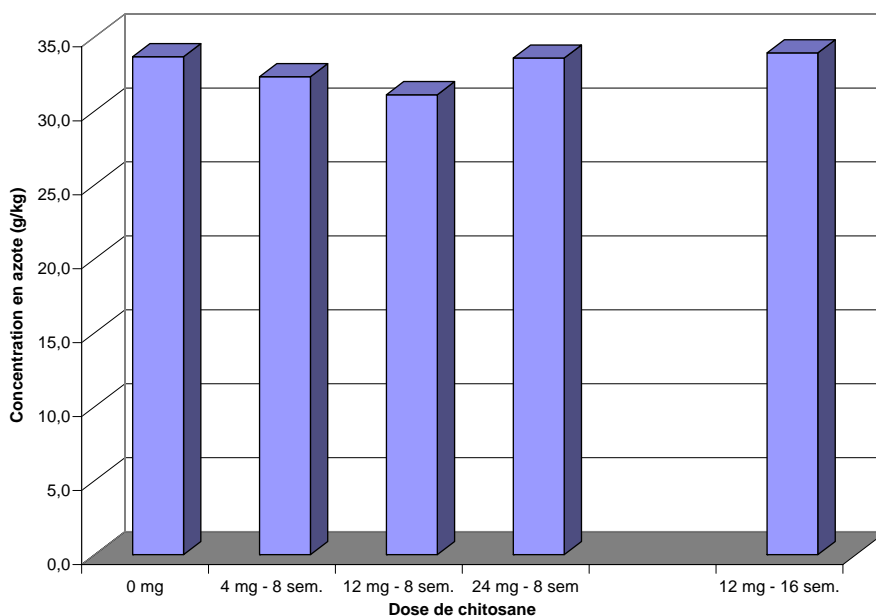
L'application de chitosane a eu un effet significatif sur la concentration en azote foliaire de l'épinette blanche, mais il n'y a pas de différences significatives entre l'ensemble des semis ayant reçu du chitosane et ceux n'en ayant pas reçu (Tableau 2 et figure 1). En l'absence d'interaction significative avec la date de sortie des semis, des contrastes sont présentés seulement pour l'effet principal (Figure 1). C'est le traitement à 12 mg/cavité (8 semaines) qui a la concentration foliaire la plus faible, tel que décrit par l'effet quadratique hautement significatif. Cependant, l'application de cette même dose sur 16 semaines donne des résultats semblables aux autres traitements, indiquant que c'est plutôt la quantité totale de chitosane dans la saison qui est importante.

Comme les plants ont reçu la concentration habituelle de fertilisant, il serait intéressant d'isoler l'effet du chitosane en l'utilisant comme seul fertilisant azoté.

Tableau 2 - ANOVA sur la concentration en azote (g/kg) par extraction H₂SO₄ dans le tissu foliaire (aiguilles)

Source de variation	dl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
Chitosane (C)	4	103,382	25,845	2,54	0,0456 *
Contrastes – effet chitosane					
Présence vs absence chitosane	1	12,098	12,098	1,19	0,2784
8 vs 16 semaines (dose 12 mg)	1	73,248	73,248	7,21	0,0088 **
Effet linéaire (traitements sur 8 sem.)	1	0,123	0,123	0,01	0,9126
Effet quadratique (traitements sur 8 sem.)	1	77,451	77,451	7,62	0,0071 **
Date sortie (D)	1	45,297	45,297	4,46	0,0378 *
C x D	4	99,183	24,796	2,44	0,0532
Erreur	83	843,477	10,162		
Total	92	1082,090			

Figure 1 - Concentration en azote foliaire en fonction de la dose de chitosane

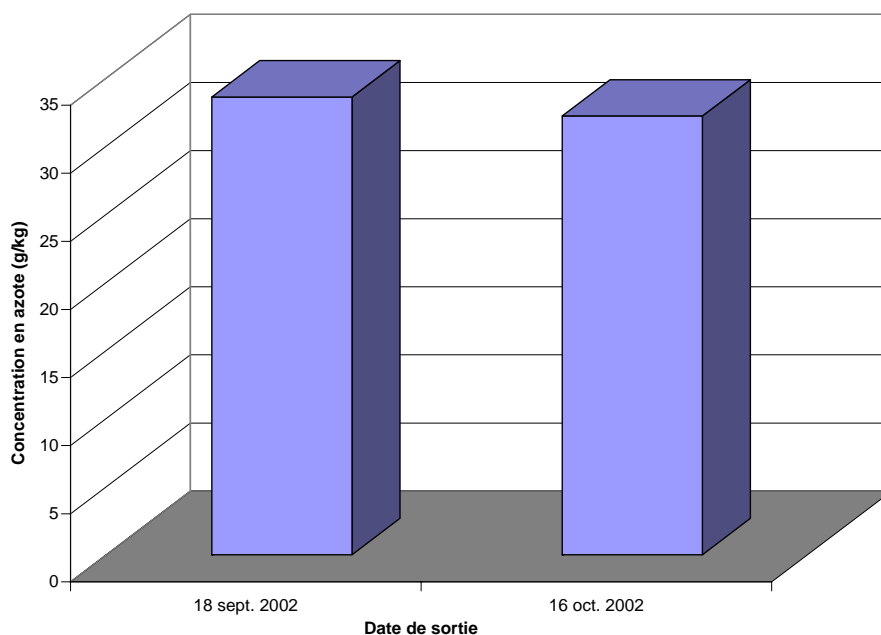


Hypothèse 2 – L'effet de l'application de chitosane sur la concentration en azote dans le tissu foliaire varie au cours de l'automne (effet de la date de sortie des semis).

FAUX

Il n'y a pas eu d'interaction significative entre la date d'extraction des semis et l'application de chitosane (Tableau 2), mais il y a quand même une tendance presque significative ($Pr = 0,0532$). La concentration foliaire en azote pour les semis sortis au 18 septembre 2002 est significativement supérieure à celle des semis du 16 octobre 2002, indépendamment de l'application de chitosane (Figure 2).

Figure 2 - Concentration en azote foliaire en fonction de la date de sortie des semis



3.2 TISSU RACINAIRE

Hypothèse 3 - L'application de chitosane à différentes doses lors du premier été de croissance des semis d'épinette blanche augmente la concentration en azote dans le tissu racinaire à la fin de la saison de croissance.

FAUX.

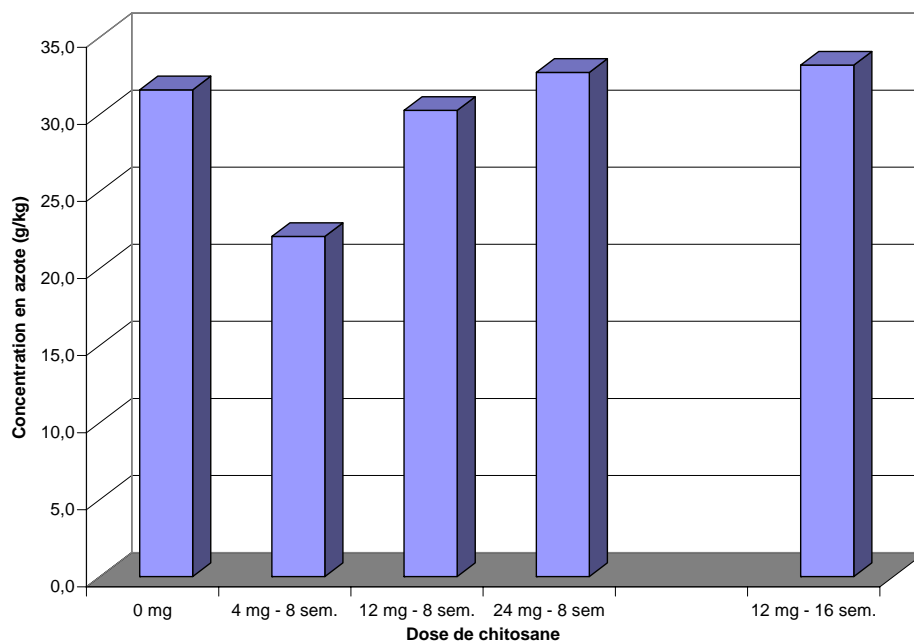
Malgré que le chitosane ait eu un effet significatif sur la concentration en azote racinaire, l'application des contrastes a démontré que les plants traités ne différaient pas significativement des témoins (Tableau 3). Cependant, le traitement à 4 mg/cavité présente la plus faible concentration racinaire d'azote (Figure 3).

Encore une fois, il serait intéressant d'isoler l'effet du chitosane en l'utilisant comme seul fertilisant. En effet, les semis ont reçu une fertilisation en azote adaptée à leurs besoins en plus du chitosane.

Tableau 3 - ANOVA sur la concentration en azote (g/kg) par extraction H₂SO₄ dans le tissu racinaire des semis extraits le 16 octobre 2002

Source de variation	dl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
Chitosane	4	663,193	165,798	9,94	<,0001 **
Contrastes – effet chitosane					
Présence vs absence chitosane	1	26,406	26,406	1,58	0,2168
8 vs 16 semaines (dose 12 mg)	1	34,516	34,516	2,07	0,1593
Effet linéaire (traitements sur 8 sem.)	1	117,167	117,167	7,02	0,0120 *
Effet quadratique (traitements sur 8 sem.)	1	75,180	75,180	4,5	0,0409 *
Erreur	35	584,088	16,688		
Total	39	1247,280			

Figure 3 - Concentration en azote racinaire des semis extraits le 16 octobre 2002 en fonction de la dose de chitosane



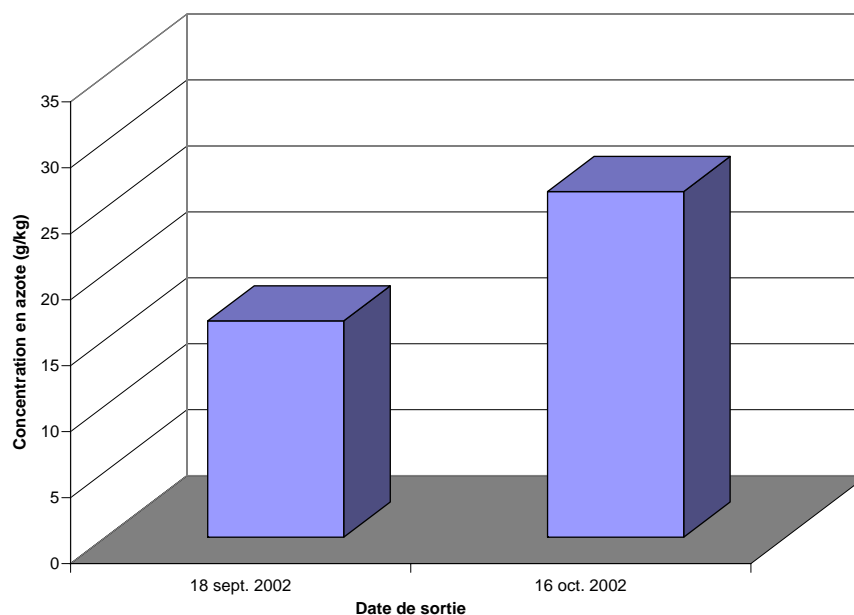
Hypothèse 4 – L’effet de l’application de chitosane sur la concentration en azote dans le tissu racinaire augmente au cours de l’automne (effet de la date de sortie des semis).

Compte tenu des restrictions budgétaires, seuls les traitements A (4 mg, 8sem.) et B (12 mg, 8 sem.) ont été soumis à l’analyse chimique du tissu racinaire. Il n’a donc pas été possible de comparer l’effet du chitosane avec un traitement témoin. Cependant, la concentration en azote racinaire est significativement supérieure le 16 octobre 2002 par rapport au 18 septembre 2002 (Figure 4) et il n’y a pas d’interaction significative avec la dose de chitosane pour ces deux traitements (Tableau 4). L’accumulation d’azote entre ces deux dates pourrait être due à l’entrée en dormance des semis. D’ailleurs, les résultats démontrent que du 18 septembre au 16 octobre 2002 la concentration en azote dans le feuillage a diminué de façon significative, alors que celle dans les racines a augmenté. Ainsi, il y aurait eu translocation de l’azote du feuillage vers les racines.

Tableau 4 - ANOVA sur la concentration en azote (g/kg) par extraction H₂SO₄ dans le tissu racinaire des semis ayant reçu les traitements A et B

Source de variation	dl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
Chitosane (C)	1	253,234	253,234	15,88	0,0004 **
Date (D)	1	806,078	806,078	50,55	<,0001 **
C x D	1	60,992	60,992	3,83	0,0599
Erreur	30	478,357	15,945		
Total	33	1617,075			

Figure 4 - Concentration en azote racinaire (traitements A et B seulement) en fonction de la date de sortie des semis



3.3 TOURBE

Hypothèse 5 - L'application de chitosane à différentes doses lors du premier été de croissance des semis d'épinette blanche augmente la concentration en azote dans la tourbe à la fin de la saison de croissance.

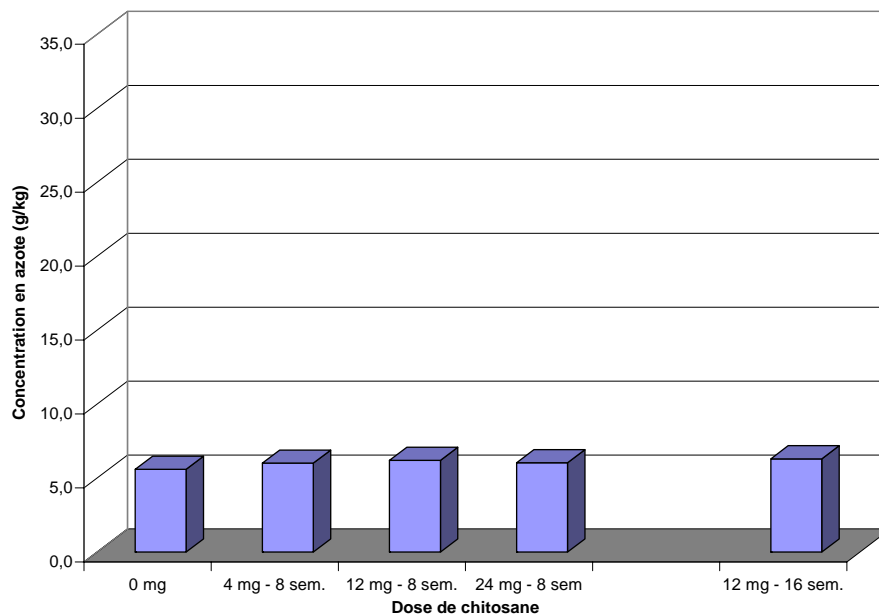
VRAI

L'application de chitosane a un effet linéaire hautement significatif sur la concentration en azote dans la tourbe (Tableau 5). Plus l'application de chitosane a été importante (dose ou durée), plus l'azote semble s'accumuler dans la tourbe (Figure 5). Cette accumulation pourrait servir de fertilisant disponible à la plante suite à sa mise en terre en forêt.

Tableau 5 - ANOVA sur la concentration en azote (g/kg) par extraction H₂SO₄ dans la tourbe des semis extraits le 16 octobre

Source de variation	dl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
Chitosane	4	2,384	0,596	4,79	0,0035 **
Contrastes – effet chitosane					
Présence vs absence chitosane	1	1,936	1,936	15,55	0,0004 **
8 vs 16 semaines (dose 12 mg)	1	0,040	0,040	0,32	0,5744
Effet linéaire (traitements sur 8 sem.)	1	0,589	0,589	4,73	0,0364 *
Effet quadratique (traitements sur 8 sem.)	1	0,963	0,963	7,73	0,0087 **
Erreur	35	4,356	0,124		
Total	39	6,740			

Figure 5 - Concentration en azote dans la tourbe des semis extraits le 16 octobre 2002 en fonction de la dose de chitosane



Hypothèse 6 – L'effet de l'application de chitosane sur la concentration en azote dans la tourbe augmente au cours de l'automne (effet de la date de sortie des semis).

FAUX.

La concentration en azote dans la tourbe n'a pas varié de façon significative entre les deux dates de sortie des semis (Tableau 6). Entre ces deux dates, il n'y a pas eu d'application de chitosane et le prélèvement de la plante dans la tourbe ne semble pas avoir été significatif pour ces deux traitements, probablement en raison de l'entrée en dormance.

Tableau 6 - ANOVA sur la concentration en azote (g/kg) par extraction H₂SO₄ dans la tourbe des semis ayant reçu les traitements A et B

Source de variation	dl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
Chitosane (C)	1	0,172	0,172	0,62	0,4356
Date (D)	1	0,717	0,717	2,61	0,1167
C x D	1	0,006	0,006	0,02	0,8801
Erreur	30	8,249	0,275		
Total	33	9,144			

4. CONCLUSION

Dans cette expérience, le chitosane a été appliqué aux semis en supplément à la fertilisation habituelle qui est adaptée pour répondre aux besoins des semis. Ainsi, la contribution en azote par le chitosane a été excédentaire et n'a donc pas permis d'augmenter la concentration en azote dans le tissu foliaire et dans le tissu racinaire. Cependant, cet apport d'azote s'est accumulé dans la tourbe et pourra être prélevé par la plante au cours de la prochaine saison de croissance. D'où la nécessité de suivre le dosage de la tourbe et la croissance de ces semis au cours de la saison de croissance 2003 afin de suivre l'absorption du produit. De plus, il serait pertinent d'isoler l'effet du chitosane en l'utilisant comme seul fertilisant.

5. RÉFÉRENCES

Blouin, D., Patry, A., Boulfroy, E. et I. Legault. 2002. Étude sur le potentiel d'utilisation du chitosane comme facteur de croissance et de protection des plants contre le gel et les maladies. Centre collégial de transfert de technologie en foresterie. Référence CERFO 2002-07. 55 p.

Patry, A., Meunier, S. et F. Guillemette. 2003. Potentiel d'utilisation du chitosane comme facteur de croissance et de protection des plants d'épinette blanche contre le gel. Centre collégial de transfert de technologie en foresterie. Référence CERFO 2003-01. 65 p.