



HAL
open science

Caractérisation du rajeunissement du Noyer (*Juglans* sp.) par une étude spectrophotométrique globale du contenu polyphénolique

C. Jay-Allemand, D. Cornu, J.J. Macheix, G. Chanteloup

► **To cite this version:**

C. Jay-Allemand, D. Cornu, J.J. Macheix, G. Chanteloup. Caractérisation du rajeunissement du Noyer (*Juglans* sp.) par une étude spectrophotométrique globale du contenu polyphénolique. *Annales des sciences forestières*, 1987, 44 (3), pp.303-314. hal-00882418

HAL Id: hal-00882418

<https://hal.science/hal-00882418v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Caractérisation du rajeunissement du Noyer (*Juglans sp.*) par une étude spectrophotométrique globale du contenu polyphénolique

C. JAY-ALLEMAND *, D. CORNU *, J.J. MACHEIX **

avec la collaboration technique de G. CHANTELOUP *

* INRA, Station d'Amélioration des Arbres forestiers,
Centre de Recherches d'Orléans, Ardon, F 45160 Olivet

** U.S.T.L., Laboratoire de Physiologie végétale appliquée, F 34100 Montpellier

Résumé

Cette étude a eu pour objet de rechercher des marqueurs biochimiques de la juvénilité chez le Noyer pour permettre d'apprécier l'état d'aptitude à la multiplication végétative des boutures et des microboutures avant et pendant l'application des traitements (température, lumière, milieux de culture...).

A partir d'analyses spectrophotométriques effectuées sur des extraits purifiés de composés phénoliques de différentes catégories de pousses annuelles (selon l'âge du pied-mère, la taille, le greffage, le recépage), nous avons pu estimer les distances biochimiques entre les états juvéniles, matures et rajeunis par l'étude des fonctions discriminantes. Il a été montré en particulier que d'importantes variations permettent de différencier les pousses juvéniles (jeunes plants issus de semis) des axes d'arbres adultes alors que de fortes affinités biochimiques existent entre des situations juvéniles et rajeunies (rejets de souches). Ces données ont permis, en particulier, de caractériser le phénomène de rajeunissement (processus par lequel la plante retrouve des caractères juvéniles) sur le plan biochimique. L'analyse spectrophotométrique individuelle de certains polyphénols, élués après séparation en chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de cellulose, a permis de comprendre en partie la structure des spectres globaux et de pouvoir ainsi rendre crédible les résultats obtenus. Enfin, les aspects physiologiques liés à l'influence du recépage sur le contenu polyphénolique des rejets ont été abordés.

Mots clés : Noyer, *Juglans sp.*, rajeunissement, juvénilité, polyphénols, spectrophotométrie.

1. Introduction

L'appauvrissement au niveau national des ressources en bois de Noyer (I.D.F., 1979) a conduit la recherche forestière à intégrer dans ses programmes cette espèce qui présente un bois de grande qualité à haute valeur marchande. Actuellement, la création, la sélection et la multiplication par voie végétative d'hybrides interspécifiques performants (*Juglans nigra* × *Juglans regia*) constituent les objectifs principaux de notre programme. Une grande partie des travaux engagés tend à rechercher une adéquation entre la qualité des boutures prélevées sur les plantes-mères et les conditions physico-chimiques appliquées en multiplication végétative. Si des résultats prometteurs en culture *in vitro* ont été obtenus sur le paradoxe (*Juglans hindsii* × *Juglans regia*)

(DRIVER & KUNIYUKI, 1984), la transposition de ces techniques sur notre matériel n'est pas satisfaisante malgré l'utilisation des techniques de rajeunissement (conduisant la plante à retrouver des caractères juvéniles) telles que le recépage et la taille (CORNU, 1977 ; FRANCKET, 1980 ; JAY-ALLEMAND, 1982).

Ainsi, il est apparu nécessaire de se doter de moyens précis et simples pour apprécier l'état physiologique des boutures et microboutures. Ceci nous a amené à rechercher, sur des pousses annuelles de Noyer, des marqueurs biochimiques de nature phénolique des états juvéniles et rajeunis (JAY-ALLEMAND, 1985) conduisant à une croissance vigoureuse et à la formation de racines et de bourgeons. Ces composés se sont déjà révélés comme de bons marqueurs du développement des végétaux (POESSEL, 1983 ; BERES, 1984).

Le dosage en lumière ultra-violette des extraits polyphénoliques est tout d'abord une méthode quantitative globale fiable (POESSEL, 1983) qui permet d'effectuer en série des analyses avec rapidité. L'analyse des spectres (maxima d'absorption) nous a permis ensuite, à partir d'extraits alcooliques ou aqueux purifiés de pousses, d'obtenir des informations multiples d'ordre qualitatif et quantitatif.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Les plants utilisés se répartissent entre 8 génotypes distincts composés essentiellement d'hybrides (*Juglans nigra* × *Juglans regia*) et de Noyers noirs (*Juglans nigra*). Ces plants, d'âge différent, ont subi pour certains d'entre eux des traitements de rajeunissement tels que le recépage et la taille sévère appliqués annuellement. A l'aide de ce matériel, on a pu caractériser 8 principales situations physiologiques différentes qu'il est possible de regrouper en 3 catégories :

JUVÉNILITÉ : Jeunes plants d'un an issus de semis de noix prélevées sur les arbres adultes décrits ci-dessous. La germination a eu lieu en serre.

MATURITÉ OU EN VOIE DE MATURITÉ : Arbres adultes de 30 ans ; arbres de 7 ans issus de boutures de rejets de souches ; arbres greffés (greffons d'arbres adultes, porte-greffes juvéniles).

ÉTAT DE RAJEUNISSEMENT : Souches des arbres adultes précédents ; souches d'arbres jeunes ; arbres greffés taillés annuellement ; arbres adultes élagués dans leur partie basale.

L'ensemble de ces plants est originaire soit de la plantation de l'O.N.F. à Milly (49) soit de la pépinière de l'INRA à Orléans (45).

Pour chacun de ces plants, les analyses ont porté sur des lots de pousses annuelles homologues prélevés à différents niveaux dans l'arbre ainsi qu'à différents stades de développement au cours des phases de croissance et de repos végétatif (JAY-ALLEMAND, 1985). A chaque prélèvement, les pousses sont effeuillées, plongées dans l'azote liquide au moment de la récolte, puis lyophilisées.

2.2. Méthodes

2.21. Extraction et purification

Chaque lot de pousses est broyé à froid dans un broyeur à bille de type Danguomau. Un gramme de chacune des poudres obtenues est ensuite homogénéisé avec de l'éthanol à 80 p. 100 pour extraire les composés phénoliques (MACHEIX, 1974). Après évaporation de l'alcool sous pression réduite, la délipidation et la dépigmentation de la phase aqueuse sont effectuées à l'aide d'éther de pétrole (2 V/V). La grande majorité des polyphénols solubles, purifiés dans la première étape, est ensuite extraite par l'acétate d'éthyle (V/V) après acidification et adjonction de sulfate d'ammonium à la phase aqueuse (FLEURIET & MACHEIX, 1972). Après évaporation à sec de la phase organique, le résidu repris par 2,5 ml d'éthanol constitue l'extrait final analysé (JAY-ALLEMANT, 1985). Par ailleurs, la phase aqueuse est conservée.

2.22. Analyses spectrophotométriques

Spectres globaux : Pour l'ensemble des situations physiologiques étudiées, 217 analyses sont effectuées respectivement sur l'extrait final obtenu et la phase aqueuse restante. Dans les deux cas, les spectres d'absorption sont réalisés entre 200 et 400 nm (spectrophotomètre Perkin Elmer uv-visible λ 3). On détermine ensuite sur les enregistrements ainsi obtenus les maxima d'absorption et les épaulements (fig. 1). Les densités optiques (D.O.) sont lues sur les spectres (fig. 1) à chacun des points correspondant aux maxima d'absorption et aux épaulements (268, 280, 290, 342, 360 et 352 nm) ; elles constituent les données quantitatives brutes sur lesquelles porteront les analyses mathématiques.

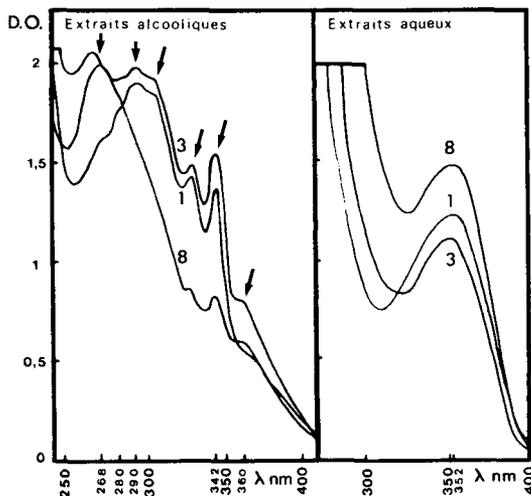


FIG. 1

Spectres d'absorption (densité optique, D.O.) effectués de 240 à 400 nm sur différents extraits alcooliques et aqueux de polyphénols de Noyer : 1 - jeunes plants ; 3 - souche ; 8 - arbre adulte. Les flèches indiquent les principaux maxima et épaulements enregistrés.

Absorption spectra (240 to 400 nm) realized on different alcoholic and aqueous extracts of Walnut polyphenols. 1 - seedlings ; 3 - stump ; 8 - adult tree.

Main maxima and shoulders are arrowed and quantified by different values of optical density (D.O.).

Spectres de composés isolés : Ils ont été effectués à partir d'éluats éthanoliques de taches phénoliques majeures séparées en chromatographie bidimensionnelle sur couches minces de cellulose. Ces différents composés ont été visualisés et localisés sous lumière ultra-violette à 254 et 366 nm (JAY-ALLEMAND, 1985).

2.23. *Analyses discriminantes*

L'étude des fonctions discriminantes (TOMASSONE, 1963) qui est une analyse multivariée permet d'estimer l'ensemble des variables qui interviennent le plus dans l'explication des variations entre populations. Etant donné que chaque variable explicative prend part à la variation totale, cette analyse permet de rechercher une combinaison linéaire entre différentes variables qui explique au mieux l'ensemble de ces variations. Chaque combinaison est représentée par une composante où se situe chaque population : généralement, une représentation graphique des populations est aussi possible, en les repérant par rapport aux composantes prises deux à deux. Près de 90 p. 100 de la variabilité totale sont expliqués par les 3 premières composantes. Par ailleurs, grâce aux calculs de corrélation entre variables initiales et transformées, il est possible de connaître le poids de chacune des variables impliquées pour chaque composante calculée.

Concrètement, l'analyse discriminante nous a permis d'estimer les affinités de nature biochimique (les données spectrophotométriques brutes ou transformées sous la forme de rapports correspondent aux variables explicatives) entre les différentes situations physiologiques étudiées à partir de regroupements déterminés sur les graphes. Les variables initiales fortement corrélées avec les variables discriminantes ont été considérées comme les principaux facteurs biochimiques impliqués dans les différents regroupements.

3. Résultats et discussions

3.1. *Interprétation des analyses discriminantes*

3.11. *Première analyse discriminante (fig. 2)*

Elle porte sur les données brutes, soit donc 6 variables déterminées aux 6 longueurs d'onde précitées, et est établie en fonction de 8 situations physiologiques précédemment définies. Si l'on tient compte simultanément des composantes 1 et 2, nous avons mis en évidence quatre groupes qui s'individualisent de la façon suivante :

- arbres adultes,
- greffes d'arbres adultes,
- greffes taillées d'arbres adultes, arbres élagués, arbres jeunes,
- jeunes plants, souches.

Cette répartition obtenue selon les deux axes principaux (composantes 1 et 2) permet tout particulièrement de regrouper les états juvéniles (jeunes plants, point 1) avec des situations de rajeunissement (rejets de souches, points 2 et 3). Cet ensemble s'oppose d'une part par la composante 1 à l'état de maturité représenté par des pousses d'arbres adultes (point 8) et d'autre part par la composante 2 aux pousses issues de plants non taillés (points 4 et 7).

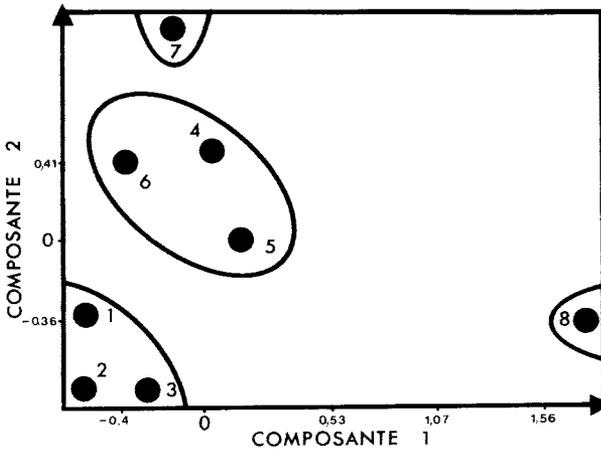


FIG. 2

Analyse discriminante effectuée sur les données spectrophotométriques (D.O. lues aux 6 différents maxima d'absorption) en fonction de 8 situations physiologiques différentes.
Canonical discriminant analysis realized with spectrophotometric data (optical densities determined at 6 different absorption maxima) and at 8 different physiological situations.

1 - jeunes plants d'un an ; 2 - souches d'A.J. ; 3 - souches d'A.A. ; 4 - arbres jeunes (A.J.) ; 5 - A.A. élagués ; 6 - greffes taillées d'A.A. ; 7 - greffes d'A.A. ; 8 - arbres adultes (A.A.).

1 - seedlings ; 2 - stumps of Y.T. ; 3 - stumps of A.T. ; 4 - young trees (Y.T.) ; 5 - A.T. pruned ; 6 - grafts pruned of A.T. ; 7 - grafts of A.T. ; 8 - adult trees (A.T.).

L'observation de cette figure souligne donc le contraste qui existe entre d'une part les affinités de nature biochimique des situations de types juvénile et rajeuni (points 1, 2, 3) et d'autre part, dans le cas des arbres non traités, les différences importantes de nature biochimique opposant les états juvéniles (point 1), matures (point 8) et en voie de maturité (point 4).

On remarque également que le greffage (points 6 et 7) et dans une moindre mesure l'élagage (point 5) modifient radicalement le contenu phénolique général des pousses d'arbres adultes (point 8). En outre, il semble que cette composition phénolique soit alors comparable à celle des arbres jeunes (point 4).

On peut aller plus loin et regarder les variables qui sont les plus discriminantes suivant la composante considérée grâce aux corrélations calculées entre les variables initiales et transformées (tabl. 1). Ainsi, les distances observées entre les différentes situations s'expliquent essentiellement pour la composante 1 par les D.O. lues à 268 et 360 nm et pour la composante 2 par la D.O. lue à 342 nm.

TABLEAU 1

Corrélations entre variables initiales et variables discriminantes au niveau des points moyens de l'analyse discriminante réalisée à partir des données spectrophotométriques brutes. Les variables correspondent aux densités optiques liées à chacune des 6 longueurs d'onde retenues (268 nm, 280 nm...).

Correlations between initial and discriminant variables for average points of canonical discriminant analysis realized with simple spectrophotometric data. Different variables are represented by optical densities read at 6 wavelengths studied (268 nm, 280 nm...).

| Variables | Composante 1 | Composante 2 |
|-----------|--------------|--------------|
| 268 | 0,78 | - 0,57 |
| 280 | 0,73 | - 0,64 |
| 290 | 0,71 | - 0,68 |
| 342 | 0,34 | - 0,88 |
| 352 | - 0,41 | - 0,63 |
| 360 | 0,87 | - 0,41 |

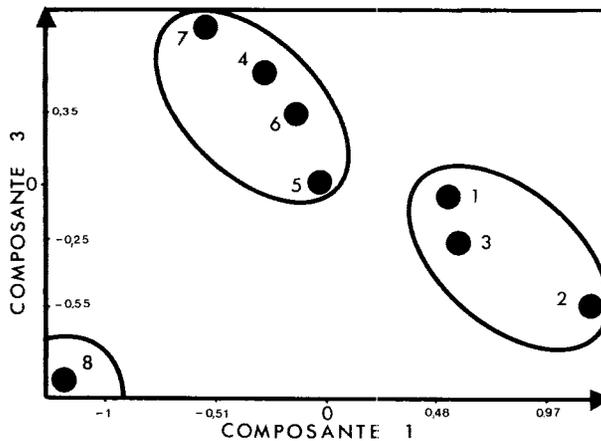


FIG. 3

Analyse discriminante effectuée sur les données spectrophotométriques transformées (rapports entre D.O. lues aux 6 différents maxima d'absorption) en fonction de 8 situations physiologiques différentes.

Canonical discriminant analysis realized with modified spectrophotometric data (ratios between optical densities determined at 6 different absorption maxima) and with 8 different physiological situations.

1 - jeunes plants d'un an ; 2 - souches d'A.J. ; 3 - souches d'A.A. ; 4 - arbres jeunes (A.J.) ; 5 - A.A. élagués ; 6 - greffes taillées d'A.A. ; 7 - greffes d'A.A. ; 8 - arbres adultes (A.A.).

1 - seedlings ; 2 - stumps of Y.T. ; 3 - stumps of A.T. ; 4 - young trees (Y.T.) ; 5 - A.T. pruned ; 6 - grafts pruned of A.T. ; 7 - grafts of A.T. ; 8 - adult trees (A.T.).

3.12 *Seconde analyse discriminante* (fig. 3)

Elle porte sur 15 variables (données transformées, rapports entre D.O.) et est établie en fonction des 8 situations physiologiques précitées.

La composante 1 crée une distribution continue des différentes situations sur son axe. On constate, en particulier, un premier regroupement entre les états juvéniles et rajeunis (points 1, 2, 3) que l'on peut opposer nettement aux états adultes (point 8). Entre ces deux types de situations tranchées, on trouve des situations intermédiaires représentées par les plants taillés et élagués d'une part (points 5 et 6), et les arbres jeunes et les greffes d'arbres adultes d'autre part (points 4 et 7).

On dispose finalement d'une composante capable de classer les différentes catégories de pousses étudiées. Ce classement, qui s'explique essentiellement par 4 variables (tabl. 2) : rapports 268/280, 342/360, 342/290, 352/268, est fonction d'un certain degré de maturité des pousses qui augmente lorsqu'on se déplace vers la gauche le long de l'axe 1, lequel correspond à une perte progressive de l'aptitude à la multiplication végétative *in vitro* (JAY-ALLEMAND, 1982).

Cet axe permet d'apprécier en particulier l'acquisition de qualités biochimiques juvéniles par les rejets de souches (caractéristiques communes avec les jeunes plants). Il caractérise de cette manière le phénomène de rajeunissement qui n'avait jusqu'alors été

TABLEAU 2

Corrélations entre variables initiales et variables discriminantes au niveau des points moyens de l'analyse discriminante réalisée à partir des données spectrophotométriques transformées.

Les variables correspondent aux rapports entre densités optiques lues aux 6 différentes longueurs d'onde retenues (268 nm, 280 nm...).

Correlations between initial and discriminant variables for average points of canonical discriminant analysis realized with modified spectrophotometric data.

Different variables are represented by ratios between optical densities read at 6 wavelengths studied (268 nm, 280 nm...).

| Variables | Composante 1 | Composante 3 |
|-----------|--------------|--------------|
| 268/280 | - 0,92 | 0,09 |
| 268/290 | - 0,53 | 0,58 |
| 268/360 | 0,19 | - 0,60 |
| 280/290 | - 0,48 | 0,36 |
| 280/360 | 0,30 | - 0,66 |
| 290/360 | 0,41 | - 0,76 |
| 342/268 | 0,63 | 0,45 |
| 342/280 | - 0,52 | - 0,77 |
| 342/290 | 0,74 | 0,62 |
| 342/360 | - 0,83 | - 0,34 |
| 352/268 | 0,71 | 0,06 |
| 352/280 | 0,46 | 0,1 |
| 352/290 | 0,64 | 0,31 |
| 352/342 | 0,52 | 0,17 |
| 352/360 | 0,79 | 0,08 |

abordé que sur un plan descriptif (JAY-ALLEMAND, 1982). Le regroupement des situations physiologiques 4, 5, 6 et 7 (fig. 3) provoqué par la composante 3 est de même nature que celui obtenu dans la première analyse discriminante (fig. 2).

3.2. Relations polyphénols-spectres

A partir d'une étude en couche mince de cellulose, les principaux polyphénols présents dans les extraits alcooliques ont été caractérisés individuellement en spectrophotométrie. Leur spectre U.V. a permis ainsi de décomposer les spectres globaux et de relier chaque maximum d'absorption à certains polyphénols majeurs. On s'aperçoit en particulier (fig. 4) que le composé A dont la structure reste encore indéterminée est caractérisé par 3 maxima (307, 326, 342 nm) et s'insère entre les 2 maxima d'absorption (363 et 268 nm) du composé B (hétéroside de flavonol). Par ailleurs, le maximum enregistré à 290 nm sur les spectres globaux (fig. 1) correspond pour une part au composé C (dérivé benzoïque) (JAY-ALLEMAND, 1985).

Cette distribution des maxima renforce la crédibilité des résultats obtenus par une étude des fonctions discriminantes et par conséquent l'intérêt porté aux spectres globaux. Cette approche analytique rapide permet d'estimer différents équilibres entre composés les plus abondants et ayant de fortes capacités d'absorption dans l'U.V. (composés A et B, fig. 4). Cependant on ne peut éviter les interférences d'absorption entre composés qui peuvent avoir tendance, dans certains cas, à masquer des variations intéressantes. Malgré tout, cette méthode d'analyse globale paraît particulièrement adaptée aux extraits alcooliques des phénols solubles du Noyer alors qu'elle peut n'apporter pour d'autres matériels, que des informations très limitées (POESSEL, 1983).

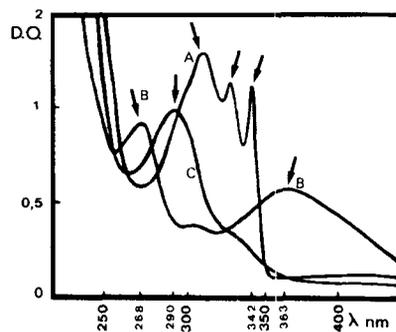


FIG. 4

Spectres d'absorption (densité optique D.O.) effectués de 240 à 440 nm de 3 polyphénols (A, B, C) individualisés en chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de cellulose et élués dans l'éthanol.

Les flèches indiquent les maxima d'absorption obtenus.

Absorption spectra (240 to 440 nm) realized on 3 polyphenols (A, B, C) separated in thin layer chromatography and eluted in alcohol. Absorption maxima are arrowed and quantified by different values of optical density (D.O.).

3.3. Aspects physiologiques

L'élément essentiel de ces résultats est l'influence du recépage appliqué aussi bien à des arbres jeunes qu'adultes, sur le contenu polyphénolique des rejets. Le rapprochement entre la partie aérienne et le système racinaire est probablement à l'origine des caractères juvéniles acquis par les rejets et mis en évidence sur les jeunes plants. Si le volume racinaire est capable de modifier les paramètres de croissance des pousses (vigueur des rejets de souche), la proximité des apex aériens et racinaires semble plus étroitement associée à la morphologie des axes (jeunes plants et rejets de souches) (JAY-ALLEMAND *et al.*, 1986). Ces différences morphologiques peuvent se traduire par des variations de l'équipement phénolique des pousses étudiées. En effet, les proportions entre les divers groupes de polyphénols peuvent varier en fonction de l'organe ou encore du tissu considéré (TRONCHET, 1972 ; TISSUT & RAVANEL, 1980 ; POESSEL, 1983 ; JAY-ALLEMAND, 1985). Ainsi, au niveau de notre étude, la lecture des spectres des 3 extraits alcooliques (fig. 1) indique nettement que dans le cas des situations juvéniles (1 et 3), les rapports d'absorption à 342 et 268 nm sont beaucoup plus importants que dans les situations matures (8). Ces variations traduisent des modifications dans l'équipement phénolique des différentes catégories de pousses analysées ; elles peuvent être attribuées à certains polyphénols majeurs (fig. 4) caractérisés individuellement en spectrophotométrie.

4. Conclusion

L'analyse mathématique des données quantitatives obtenues par les analyses spectrophotométriques ont permis tout d'abord de révéler les affinités biochimiques entre des situations juvéniles (jeunes plants) et rajeunies (rejets de souche) et d'en dégager des caractéristiques spécifiques (fig. 2). Les rapports entre maxima ou épaulements ont également conduit à caractériser une expression phénolique du rajeunissement. Les rapports calculés apparaissent effectivement comme des données plus performantes que les données brutes initiales.

Une valorisation complète de ces résultats consisterait à utiliser directement les analyses discriminantes en tant que tests de juvénilité de pousses annuelles. On a réussi en effet à regrouper différentes situations physiologiques en les soumettant à des variables de nature biochimique (tests). Des extraits phénoliques quelconques soumis au mêmes tests devraient alors pouvoir être rattachés à un de ces groupes. Dans cette optique, les rapports les plus discriminants (rapports 268/280, 342/360) de la composante 1 (seconde analyse) apparaissent comme de véritables marqueurs biochimiques de la juvénilité du Noyer.

Notons qu'une analyse en chromatographie liquide haute performance est venue confirmer et préciser ces premières données et a permis ensuite de délimiter des comportements de types juvéniles et mature au cours de la période de végétation des pousses et ceci sur plusieurs génotypes différents (JAY-ALLEMAND, 1985).

Reçu le 12 janvier 1987.

Accepté le 10 mars 1987.

Summary

Characterization of Walnut (Juglans sp.) rejuvenation by spectrophotometric studies of the polyphenol content

Although positive results on the vegetative propagation of Paradox (*Juglans hindsii* × *Juglans regia*) were obtained, many difficulties with regard to the *in vitro* culture or the propagation via cuttings of Walnut hybrids (*Juglans nigra* × *Juglans regia*) remain.

Therefore, attempts have been made to find biochemical markers of juvenility in the annual shoots of Walnut. In this respect the paper describes research on :

- 1) The identification of the more favorable physiological stages for vegetative propagation (optimization of the sampling time for cuttings).
- 2) The improvement of the different treatments for propagation (temperature, light, culture, medium, etc.) on mother trees or cuttings.

In order to achieve the above aims, polyphenols of different Walnut material (seedlings, adult trees, sprouts, grafts, pruned trees) were extracted and subsequently the polyphenol content of the alcoholic and aqueous extracts were analyzed by U.V.-spectrophotometry and T.L.C. In addition, optical densities read at six wavelengths (268, 280, 290, 342, 352 and 360 nm) or ratios between these readings (transformed data) were used for discriminant analysis of all extracts ; the latter analyses giving an idea of the « biochemical separation » of the different types of shoots (fig. 2 and 3) (Additional discriminating variables being shown in tables 1 and 2).

A comparison of the crude spectrophotometric data demonstrates further a clear cut difference between juvenile and mature shoots (fig. 2, points 1 and 8) ; the more important variables characterizing the latter physiological stages being the two ratios between the optical densities read at four different wavelengths : 268/280 nm, 342/360 nm. Moreover, rejuvenated shoots (stump sprouts) appeared to be closely related to juvenile shoots (fig. 3, points 1, 2 and 3).

In a second set of analyses (fig. 3) and again using transformed data, a regular distribution with the physiological age along the first « mathematical component » of the samples was observed. The same « component » allowed also the characterization of the rejuvenation phenomena of Walnut.

After bidimensional T.L.C. several of the separated polyphenols were eluted with alcohol and subsequently analysed by means of U.V.-spectrophotometry (fig. 4). These analyses contributed to the better understanding of the spectra of the crude extracts. From the results obtained follows further that the phenolic composition of the plant tissues may be related to the distance between the buds and the roots and to the morphology of the stems.

Finally, the results described in this paper suggest that discriminant analysis may help in determining the juvenility level of the plant material and that the phenolic compounds could be used as biochemical markers of juvenility. H.P.L.C.-analyses of the foregoing extracts have already confirmed the latter statement (JAY-ALLEMAND, 1985).

Key words : Walnut, *Juglans* sp., rejuvenation, juvenility, polyphenols, spectrophotometry.

Références bibliographiques

- BERES C., 1984. Phenol and non-structural carbohydrate contents in the leaves of *Quercus petraea*. *Acta Botanica Hungarica*, **30** (3-4), 461-467.
- CORNU D., 1977. La multiplication végétative du noyer hybride. Résultats d'une première campagne. Perspectives d'avenir. *Revue Française forestière, technique et forêt*, **29** (6), 457-463.
- DRIVER J.A., KUNIYUKI A.H., 1984. *In vitro* propagation of Paradox Walnut rootstock. *Hort-science*, **19** (4), 507-509.
- FLEURIET A., MACHEIX J.J., 1972. Séparation et dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide chlorogénique et des catéchines des fruits. *J. Chromatogr.*, **74**, 339-345.

- FRANCLÉT A., 1980. Rajeunissement et propagation végétative des ligneux. *Ann. A.F.O.C.E.L.*, 11-40.
- I.D.F., 1979. *La culture de Noyer à bois*. Ed. : Institut pour le développement forestier, 23, avenue Bosquet, Paris 7^e, 88 p.
- JAY-ALLEMAND C., 1982. *Culture in vitro du Noyer (Juglans sp.). Etude expérimentale sur l'ensemencement d'embryons isolés et de bourgeons*. D.E.A. d'agronomie. U.S.T.L. Montpellier, 125 p.
- JAY-ALLEMAND C., 1985. *Les marqueurs biochimiques de la juvénilité chez le Noyer (Juglans nigra et Juglans nigra × Juglans regia)*. Thèse de doctorat, U.S.T.L. Montpellier, 278 p.
- JAY-ALLEMAND C., CORNU D., MACHEIX J.J., 1986. *Caractérisation de la croissance des pousses annuelles de Noyer (Juglans sp.) par des marqueurs endogènes de nature phénolique*. Colloque intern. sur l'arbre, U.S.T.L. Montpellier, 9-14 sept. 1985. *Naturalia monspeliensia*, 535-546.
- MACHEIX J.J., 1974. *Les esters hydroxycinnamiques de la pomme : Identification, variation au cours de la croissance du fruit et métabolisme*. Thèse doctorat état sci. nat., Paris, 168 p.
- POESSEL J.L., 1983. *Composés phénoliques et peroxydases de l'abricotier (Prunus armeniaca L.). Etude comparative de deux variétés (Luizet et Canino) en relation avec l'incompatibilité au greffage*. Thèse de 3^e cycle, U.S.T.L. Montpellier, 182 p.
- TISSUT M., RAVANEL P., 1980. Répartition des flavonols dans l'épaisseur des feuilles de quelques végétaux vasculaires. *Phytochemistry*, **19**, 2077-2081.
- TOMASSONE R., 1963. Application des fonctions discriminantes à des problèmes biométriques. *Ann. Ec. natl. Eaux Forêts*, **20** (4), 585-613.
- TRONCHET J., 1972. Dérivés flavoniques de surface et dérivés flavoniques internes. *Ann. Sc. Univ. Besançon*, 3^e série, Botanique, **12**, 39-47.