

## AVANT- PROPOS

- **Nom et prénom :** Ghizlane KABIRI
- **Intitulé du travail :** Caractérisation phénotypique, biochimique et moléculaire des ressources génétiques du noyer (*Juglans regia* L.) au Maroc.
- **Directeur de la recherche :** Pr. Abdelmajid HADDIOUI, PES, Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Ressources Phytogénétiques, Faculté des Sciences et Techniques Béni Mellal, Maroc.
- **Co-encadrant :** Pr. Mohamed ELHANSALI, Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Ressources Phytogénétiques, Faculté des Sciences et Techniques Béni Mellal, Maroc.
- **Co-encadrant :** Pr. Said BOUDA, Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Ressources Phytogénétiques, Faculté des Sciences et Techniques Béni Mellal, Maroc.
- **Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Ressources Phytogénétiques, Faculté des Sciences et Techniques Béni Mellal, Maroc.
- **Période de la these :** 2013-2019
- **Rapporteurs:**
  - Mohammed BAAZIZ : Professeur à la Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech
  - Zerhoune MESSAOUDI : Professeur à l'Ecole Nationale d'Agriculture, Meknès
  - Hafida HANINE : Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal
- **Publications et communications auxquelles ce travail a donné lieu :**

### **\*Publications:**

- KABIRI G, BOUDA S, ELHANSALI M, HADDIOUI A, 2018. Morphological and pomological variability analysis of walnut (*Juglans regia* L.) genetic resources from the Middle and High Atlas of Morocco. Atlas Journal of Biology, 575–582.

- KABIRI G, BOUDA S, ELHANSALI M, HADDIOUI A, 2019. Genetic diversity and structure of walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Middle and High Atlas Mountains of Morocco as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Australian Journal of Crop Science 13(12): 1983-1991.
- KABIRI G, BOUDA S, ELHANSALI M and HADDIOUI A, Biochemical characterization and antioxidant activity of walnut kernel (*Juglans regia* L.) of accessions from Middle and High Atlas in Morocco. Acta Scientiarum, Biological Sciences, 41, e46411.

**\*Communications:**

- KABIRI G, BOUDA S, ELHANSALI M and HADDIOUI A, 2015. Evaluation de la diversité génétique du Noyer (*Juglans regia* L.) à l'aide des marqueurs agro-morphologique. 2<sup>ème</sup> Edition de la Journées Doctorales de la Faculté des Sciences et Technique de Beni Mellal, 26-28 Mars.
- KABIRI G, BOUDA S, ELHANSALI M and HADDIOUI A, 2015. Collecte et évaluation des ressources phytogénétiques du Noyer (*juglans rejia* L.) au Maroc. 1<sup>er</sup> Congrès International Polydisciplinaire de la Faculté Polydisciplinaire de Béni Mellal, 5-6 Juin.
- KABIRI G, BOUDA S, ELHANSALI M, AJAL E and HADDIOUI A, 2016. Evaluation of the morphological and pomological variability of Moroccan walnut (*juglans rejia* L.) provenances. 2<sup>ème</sup> Edition du congrès international de la Faculté des Sciences de Rabat, 19-21 Mai.
- KABIRI G, BOUDA S, ELHANSALI M and HADDIOUI A, 2016. Study of morphological and pomological variation of walnut (*Juglans regia* L.) accessions in Morocco ». Workshop national sur la biotechnologie à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, 26-27 Décembre.
- KABIRI G, BOUDA S, ELHANSALI M, AIT BELLA Y and HADDIOUI A, 2017. Biochemical characterization of eleven accessions of walnut (*juglans regia* L.) in Morocco ». 4<sup>ème</sup> Congrès International de la Biodiversité Végétale de la Faculté des Sciences de Ain Chock et Semlalia Marrakech, 5-8 Octobre.

- KABIRI G, BOUDA S, ELHANSALI M and HADDIOUI A, 2018. Biochemical characterization of some Moroccan walnut (*Juglans regia* L.) accessions ». The Fourth International American Moroccan Agricultural Sciences Conference IV. Agropolis, Meknes, Morocco, 9-11Mai.

## **DEDICACE**

*Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyé et m'encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie cette thèse :*

*A mon très cher père **Mohamed***

*Il est et restera toujours un modèle pour moi. Il m'a tout appris, tout donné. Mes actions, mes pensées, mes gestes sont "imprégnés" de lui*

*À ma très chère mère **Fatima***

*Son soutien, sa patience, sa confiance, sa générosité et sa tendresse immense sont le moteur de mon avancée*

*À mes frères **Si Mohamed et Tarik***

*À mes soeurs **Fatiha et Fatima Ezzahra***

*À tous les membres des deux familles **KABIRI et MALIH** sans aucune exception.*

*Et à tous ceux à qui ma réussite tient à coeur*

## **REMERCIEMENTS**

Voici donc venus les derniers mots de la thèse et je veux dire que j'ai eu la chance de réaliser ce travail avec des gens qui marqueront à jamais mon souvenir. J'espère que quelle que soit ma destinée future, les liens que j'aurai créés sauront survivre à la distance et aux nombreuses directions que la vie de chacun prend.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma louange à Allah qui m'a donné la chance, la volonté et le courage pour réaliser mon rêve d'avoir le doctorat.

Je remercie vivement mon Encadrant Mr. Abdelmajid HADDIOUI, Professeur à l'Université Sultan Moulay Slimane, Faculté des Sciences et Techniques, et directeur du laboratoire de biotechnologie et valorisation des ressources phytogénétiques, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissante pour le temps qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

J'adresse mes remerciements à mon Co-encadrant, Mr. Mohamed ELHANSALI Professeur à l'Université Sultan Moulay Slimane, Faculté des Sciences et Techniques, pour son suivi de mes informations et ses encouragements le long de ma thèse.

J'adresse également un chaleureux remerciement à mon Co-encadrant Mr. Said BOUDA, Professeur à l'Université Sultan Moulay Slimane, Faculté des Sciences et Techniques, pour son attention de tout instant sur mes travaux, son suivi de très près, ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Son énergie et sa confiance ont été des éléments moteurs pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec lui et j'ai de la chance.

Je voudrais remercier Pr. M. BAAZIZ, Pr. Z. MESSAOUDI et Pr. H. HANINE, les rapporteurs de cette thèse, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je tiens à remercier tous les docteurs et les doctorants du laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Ressources Phytogénétiques, pour leur aide, leurs conseils et leur bonne humeur. Nous avons partagé de bons moments et inoubliables souvenirs.

Ma famille a également été d'un soutien sans faille. Mes chers parents surtout ma chère maman, mes frères et mes sœurs, qui, chaque fois me demandaient l'air inquiet : "Alors, cette thèse . . . Ça avance, Quand est-ce qu'elle finira ?" sans trop vraiment comprendre de quoi il pouvait bien s'agir ! Même si vous n'avez jamais tenu des

micropipettes ou faites tourner un logiciel de statistique..., cette thèse est autant la vôtre que la mienne. Merci pour vos sacrifices.

Un merci particulier à mes collègues de travail à l'enseignement, pour leur soutien moral et administratif et leurs encouragements au cours de mes années de thèse.

Ainsi s'achèvera cette liste, je sais avec certitude que j'ai oublié plein de personnes, peut-être même certaines pour lesquelles il devrait être évident que je souhaite les évoquer. Croyez bien que votre absence en ces lignes ne détermine rien d'autre que le stress et la fatigue finale, alors que ceux que je n'ai pas cités veuillent bien m'en excuser.

# **Caractérisation phénotypique, biochimique et moléculaire des ressources génétiques du noyer (*Juglans regia* L.) au Maroc.**

## **Résumé**

Pour contribuer au développement de la culture du noyer au Maroc, le présent travail vise l'évaluation de la diversité génétique du patrimoine génétique local de cette espèce à l'aide des descripteurs phénotypiques, biochimiques et moléculaires. Pour ce faire, 11 accessions collectées à travers différentes régions du pays, ont été analysées.

L'étude de la variabilité phénotypique à l'aide de 31 caractères liés aux feuilles et aux fruits a montré une différence très significative entre les accessions pour la majorité des traits analysés. Les accessions Amouguer, Imlil et Ait Bougamez, provenant du Haut Atlas se sont caractérisées par un poids et un pourcentage du cerneau très élevés et une faible épaisseur de la coque, ayant ainsi les traits les plus recherchés. D'autre part, la majorité des descripteurs analysés se sont révélés complémentaires et efficaces pour l'analyse de la variabilité morphologique et pomologique du noyer mais le poids et la longueur de noix, le poids et le pourcentage du cerneau, l'épaisseur de la coque et la taille de la feuille se sont avérés les plus discriminants.

Concernant la caractérisation biochimique, l'étude de 22 paramètres a révélé une variation importante entre les 11 accessions et particulièrement pour la matière grasse, les protéines, les carbohydrates, la valeur énergétique, les fibres, les flavonoïdes, le phosphore, le cuivre, le zinc, le fer, le chrome, le nickel et le bore. Les constituants majoritaires des cerneaux étaient les lipides (60,86%) suivies par les carbohydrates (18,93%), les protéines (15,60%), les fibres (5,51%), l'eau (2,52) et les cendres (2,08). Quant à la composition minérale, le noyer marocain a montré des teneurs élevées en P (569,59 mg/100g), K (261,97 mg/100g) et Mg (125,17 mg/100g), et des teneurs faibles en Na (4,06 mg/100g). Pour les micronutriments, le noyer marocain s'est montré très riche en Cu (5,50 mg/100g) et en Zn (6,80 mg/100g), mais

déficient en Mn (1,25 mg/100g) et en Fe (1,72 mg/100g). En outre, les cerneaux analysés sont dotés d'un pouvoir antioxydant très fort (RSA=80%).

Quant à l'étude des marqueurs ISSR, les valeurs élevées obtenues pour les paramètres PIC (9,65) et Rp (53,98) a prouvé l'efficacité de ces marqueurs pour l'analyse de la variabilité et la différenciation génétique des accessions du noyer. De même les résultats obtenus ont montré l'existence d'une importante variabilité génétique au sein du germoplasme local du noyer ( $H_T=0,25$  et  $I=0,38$ ) et une forte différenciation des accessions analysées ( $F_{ST}=0,28$ ) et un flux de gène restreint entre elles ( $Nem=0,64$ ). En outre, les analyses multivariées ont montré que la structuration de la diversité génétique des accessions en trois groupes s'est faite indépendamment de l'origine géographique, du bioclimat et du type de la chaîne montagneuse.

Ces résultats reflètent une diversité génétique très importante chez le noyer marocain. Ces données sont très importantes pour donner des recommandations judicieuses et trouvent leur application dans les programmes de conservation et d'amélioration de cette espèce.

**Mots clés :** Noyer, variabilité morpho-pomologique, paramètres biochimiques, marqueur ISSR, polymorphisme, différenciation génétique.



# **Phenotypic, biochemical and molecular characterization of genetic resources of walnut (*Juglans regia* L.) in Morocco.**

## **Abstract**

In order to contribute to the development of walnut crop in Morocco, the present work aims to evaluate the diversity genetic of the local genetic resource of this species by phenotypic, biochemical and molecular analysis. Then, 11 accessions of walnut, collected from different areas of Morocco, were analyzed.

The study of phenotypic variability using 31 characters related to leaves and fruits showed a very significant difference between the accessions for the majority of traits analyzed. The Amouguer, Imlil and Ait Bougamez accessions, originating from the High Atlas Mountain, were revealed to have a high level of weight and percentage of kernel and a weak thickness of shell, which are the most researched traits. The traits analyzed were revealed complementary and efficient for the analysis of the morphological and pomological variability of walnut, but the weight of nut, the percentage of kernel, the thickness of shell and size of leaf were proved to be the most powerful for discriminating among accessions.

For the biochemical characterization, the study of 22 parameters revealed a significant variation between the 11 accessions, especially for the fat, the proteins, the carbohydrates, the energetic value, the fibers, the flavonoids, the phosphorus, the copper, the zinc, the iron, the Chromium, the nickel and the boron. The major constituents of kernels were fats (60.86%) followed by carbohydrates (18.93%), proteins (15.60%), fibers (5.51%), water (2.52) and Ash (2.08). For the mineral composition, moroccan walnut showed high levels of P (569.59 mg / 100g), K (261.97 mg / 100g) and Mg (125.17 mg / 100g), but weak level of Na (4, 06 mg / 100g). Concerning micronutrients composition, the walnut analyzed were shown very rich in Cu (5.50 mg / 100g) and Zn (6.80 mg / 100g), but deficient in Mn (1.25 mg / 100g) and Fe (1.72 mg / 100g). Besides, the analyzed kernels are endowed with high antioxidant activity (RSA=80).

In the molecular analysis using ISSR markers, the high values obtained for the PIC (9,65) and Rp (53,98) parameters have proved the efficacy of the ISSR markers

for walnut variability and genetic differentiation analyses. Similarly, the results showed the existence of significant genetic variability within walnut germplasm ( $H_T = 0.25$  and  $I = 0.38$ ) and a very large differentiation among accessions analyzed ( $F_{ST} = 0.28$ ) that was explained by a restricted gene flow ( $Nem = 0.64$ ). In addition, multivariate analyzes showed the structuration of genetic diversity of walnut accessions in three groups, which was done undependably of geographical origin, bioclimate type and mountain range type.

The results obtained reflect a very important genetic diversity in Moroccan walnut. These data are very important for providing sound recommendations that might be applied in breeding and conservation programs for this species.

**Key words:** Walnut, morpho-pomological variability, Biochemical parameters, ISSR marker, polymorphism, genetic differentiation.

## التوصيف المورفولوجي، البيوكيميائي والجزئي للموارد الوراثية للجوز (*Juglans regia* L.)

### بالمغرب.

### ملخص

تكتسي شجرة الجوز (*Juglans regia* L.) ، أهمية اجتماعية واقتصادية كبيرة في المغرب لكنه يوجد من بين المراكز الأخيرة من بين المنتجين العالميين للجوز، وذلك بمساحة مزروعة تقدر بحوالي 4597 هكتار وإنتاج يقدر ب 12 637 طن. وللمساهمة في تطوير هذه الزراعة في المغرب، يهدف البحث الحالي إلى دراسة وتقييم التنوع الوراثي للجوز المحلي وذلك بثلاثة مقاربات مختلفة: التحليل المورفولوجي، البيوكيميائي وكذا التحليل الجزئي، وللقيام بذلك، تمت دراسة 11 أصل من الجوز، تم جمعها من مناطق مختلفة تمثل معظم مناطق زراعته وكشفت النتائج التي تم الحصول عليها من خلال التحليلات الثلاثة عن وجود اختلاف وراثي مهم بين الاصول المدروسة، مما يتيح إمكانية اختيار أنماط جينية ممتازة.

لقد أظهرت الدراسة المورفولوجية باستخدام 31 صفة تخص الأوراق والفاكهة اختلافا مهماً بين الاصول بالنسبة لمعظم الصفات التي تم تحليلها حيث تميزت اصول الاطلس الكبير (اموكر، امليل وايت بوكماز) بوزن ونسبة عالية جداً للنواة وكذا سمك ضعيف للقشرة، وهي الصفات الأكثر طلباً. لقد ظهرت الصفات المدروسة مكتملة وفعالة لتحليل التباين المورفولوجي لاوراق وثمار الجوز، ووجد أن وزن البذرة، نسبة النواة، سمك القشرة وحجم الورقة هي المؤشرات الأكثر أهمية للتمييز بين الاصول.

فيما يتعلق بالتحليل البيوكيميائي، كشفت عملية معايرة 22 عنصر بيوكيميائي عن وجود تباين كبير بين الاصول، خاصة بالنسبة للدهون، البروتينات، الكربوهيدرات، السعرة الحرارية، الألياف، الفلافونويد، الفوسفور، النحاس، الزنك، الحديد، الكروم، النيكل والبور. كما بين هذا التحليل ان المكونات الرئيسية لنواة الجوز هي الدهون (60,86%) تليها الكربوهيدرات (18,93%)، البروتينات (15,16%)، الألياف (5,51%)، الماء (2,52%) و المادة المعدنية (2,08%). بالإضافة الى ان تحليل التركيب المعدني كشف على ان الجوز يحتوي على مستويات عالية من المعادن الاساسية كالفوسفور (569.59 mg/100g)، البوتاسيوم (261,97 mg/100g)، المغنيزيوم (125,17 mg/100g)، ولكنه فقير من حيث الصوديوم (4,06 mg/100g)، اما بالنسبة للمعادن الدقيقة فهو غني جداً بالنحاس (5,05 mg/100g) و الزنك (6,80 mg/100g)، لكنه سجل نقص في كمية المنغنيز (1,25mg/100g) و الحديد (1,72 mg/100g). كما بينت التحليلات ان الجوز المغربي يتميز بقدرة مؤكسدة عالية (RSA=80%). انطلاقاً من نتائج التحليل البيوكيميائي تجدر الإشارة ان اصول الجوز للأطلس الكبير هي التي سجلت مرة اخرى أعلى المستويات لمعظم المكونات البيوكيميائية للنواة.

فيما يخص التحليل الجزئي عبر المؤشرات الجزئية ISSR، لقد أثبتت القيم العالية التي تم الحصول عليها لمعايير  $Pic$  (9,65) و  $Rp$  (53,98) كفاءة هذه المؤشرات لتقييم التباين والتمايز الوراثي بين أصول الجوز. كما أظهرت النتائج المحصل عليها وجود تباين وراثي كبير بين الاصول المدروسة للجوز ( $H_T = 0.25$ ) و  $I = 0.38$  و تباعد واسع جداً بين الاصول التي تم تحليلها ( $F_{ST} = 0.28$ ) و الذي يمكن ارجاعه لضعف

التدفق الجيني بين هاته الاصول (Nem=0,64). كما أظهر التحليل متعدد المتغيرات أن هيكلية الاختلاف الوراثي للأصول المدروسة تمت في شكل ثلاث مجموعات باستقلال عن الاصل الجغرافي، النمط المناخي ونوع السلسلة الجبلية.

تعكس النتائج التي تم الحصول عليها تنوعًا جينيًا مهمًا للغاية في الجوز المغربي. هذه النتائج مهمة جدًا لتقديم توصيات هادفة يمكن تطبيقها في برامج الحفاظ والتحسين الوراثي لهذا النوع.

**الكلمات الرئيسية:** الجوز، التغيرات المورفولوجية، التحليلات البيوكيميائية، المؤشرات ISSR، التباعد الجيني.

## LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment of Length Polymorphism
AMOVA	Analyse de la Variance Moléculaire
ANOVA	Analyse de la Variance
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ARNr	ARN ribosomal
BET	Bromure d'éthidium
dNTP	3' désoxyribonucléoside 5' triphosphate
DO	Densité Optique
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Statistic
IBPGR	The International Board for Plant Genetic Resources
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
ITS	Internal Transcribed Spacer
K	Nombre de population
Kb/ Pb	Kilobases/ paire de bases
ha/Km/m/cm/mm	Hectare /kilomètre/mètre/centimètre/millimètre
LSD	Différence Significative Minimale
M/mM/ $\mu$ M/ N	Molaire/milli molaire/micromolaire/ normalité
ml/ $\mu$ l	Millilitre/microlitre
PCR	Polymerase Chain Reaction
PH	Potentiel d'hydrogène
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment of Length Polymorphism
SAS	Statistical Analysis System
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SSR	Single Sequence Repeat
Ta/ Tm	Annealing Temperature/ Melting Temperature
Taq	Thermophilus aquaticus
t/g/mg/ng	Tonne/ gramme/milligramme/nanogramme
TBE	Tampon Tris - Borate- EDTA
TE	Tampon de resuspension
Tpm	Tour par minute
U / V	Unité / Voltes
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean
UPOV	Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétales
UV-Vis	Ultraviolet Visible

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Arbre du noyer (*Juglans regia* L.).
- Figure 2** : Feuilles (A) et écorce (B) du noyer.
- Figure 3** : Fleurs mâles (C) et fleurs femelles (D) du noyer avant et à maturité (c,d).
- Figure 4** : Fruits (E), fruit à maturité (F), noix dégagée de leur brou (G) et cerneaux du noyer (H).
- Figure 5** : Aire de répartition géographique de *Juglans regia* L.
- Figure 6** : Deux types de greffage ; A : Greffe anglaise ; B : Greffe en écusson.
- Figure 7** : Quelques variétés du noyer mondial.
- Figure 8** : Quelques clones locaux du noyer marocain (Boug 1, Boug2 et Boug 5) et une variété introduite (Silistrenski).
- Figure 9** : Principe de l'ISSR. Si les bases arbitraires de l'amorce sont du côté 5', on obtiendra le produit d'amplification A, si elles sont du côté 3' le produit B
- Figure 10** : Répartition géographique des accessions étudiées.
- Figure 11** : Exemple de la variabilité morphologique des feuilles des accessions étudiées.
- Figure 12** : Formes de la foliole latérale (A) et différentes couleurs du rachis (B) des feuilles des accessions étudiées.
- Figure 13** : Exemple de la forme des noix en vue latérale (C) et en vue ventrale (D) des accessions analysées.
- Figure 14** : Différentes couleurs du cerneau des accessions étudiées.
- Figure 15** : Projection de 11 accessions du noyer dans le plan 1-2 d'un ACP réalisée à partir de 31 variables morpho-pomologiques.
- Figure 16** : Dendrogramme de 11 accessions du noyer basé sur les paramètres morpho-pomologiques.
- Figure 17** : Dispersion des accessions dans le plan défini par les deux premières composantes principales basée sur des traits biochimiques.
- Figure 18** : Dendrogramme de 11 accessions du noyer marocain basé sur des traits biochimiques.
- Figure 19** : Programme d'amplification d'ADN par PCR.
- Figure 20** : Optimisation de la température d'hybridation de l'amorce UBC818 par le PC à gradient de température. Profil du gel d'agarose (a) ; Gradient de température (b).
- Figure 21** : Exemples des profils électrophorétiques obtenus pour les amorces : Amorce UBC818 (A) ; Amorce UBC811 (B) et Amorce UBC834 (C).
- Figure 22** : Dendrogramme illustrant les relations génétiques entre les 66 arbres des 11 accessions étudiées du noyer à partir des données ISSR.
- Figure 23** : Représentation graphique permettant de déterminer le nombre optimal K de clusters selon les paramètres d'Evanno et al. (2005). Le nombre optimal de clusters étant atteint pour K = 3
- Figure 24** : Regroupement génétique des accessions obtenu à partir de l'analyse STRUCTURE (N = 66).

- Tableau 1** : Principaux pays producteurs du noyer.
- Tableau 2** : Les principaux paramètres géographiques et écologiques des accessions étudiées.
- Tableau 3** : Caractères morphologiques et pomologiques mesurés.
- Tableau 4** : Caractères morphologiques mesurés liés aux feuilles des 11 accessions étudiées.
- Tableau 5** : Caractères pomologiques mesurés liés aux noix et aux cerneaux pour les 11 accessions étudiées.
- Tableau 6** : Coefficients de corrélation entre les paramètres morphologiques étudiés.

## **LISTE DES TABLEAUX**

- Tableau 7** : Paramètres biochimiques analysés pour les 11 accessions du noyer.
- Tableau 8** : Eléments minéraux analysés pour les 11 accessions du noyer
- Tableau 9** : Coefficients de corrélation entre les paramètres biochimiques analysés.
- Tableau 10** : Séquence des amorces des marqueurs ISSR utilisées pour évaluer la diversité génétique du noyer.
- Tableau 11** : Caractéristiques des 11 amorces ISSR étudiées.
- Tableau 12** : Diversité génétique de 11 accessions marocaines du noyer révélée par les marqueurs ISSR.
- Tableau 13** : Analyse de la variance moléculaire et F-statistique entre accessions et groupes géographiques et bioclimatiques du noyer.
- Tableau 14** : Indices  $F_{ST}$  spécifiques aux accessions étudiées
- Tableau 15** : Matrice des distances génétiques ( $F_{ST}$ , au-dessous de la diagonale) et géographiques (au-dessus de la diagonale en km) entre les 11 accessions.

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>6</b>
I. DONNEES RELATIVES AU NOYER ( <i>JUGLANS REGIA</i> L.) .....	7
I.1. Présentation de l'espèce <i>Juglans regia</i> L. ....	7
I.1.1. Taxonomie .....	7
I.1.2. Données botaniques .....	7
I.1.3. Mode de reproduction .....	13
I.2. Origine et répartition géographique .....	14
I.3. Exigences édapho-climatiques .....	17
I.3.1. Sol .....	17
I.3.2. Température .....	17
I.3.3. Eau .....	17



I.3.4. Lumière et concurrence .....	18
I.4. Modes de propagation.....	18
I.4.1. Semis direct .....	18
I.4.2. Greffage .....	18
I.4.3. Bouturage .....	19
I.5. Production du noyer .....	20
I.5.1. Au niveau mondial .....	20
I.5.2. Au niveau national.....	20
I.6. Valeurs nutritionnelles du cerneau .....	22
I.6.1. Protéines .....	22
I.6.2. Lipides .....	23
I.6.3. Vitamines et minéraux.....	23
I.6.4. Fibres alimentaires .....	24
I.6.5. Composés phénoliques .....	24
I.7. Intérêt du noyer .....	24
I.7.1. Intérêt économique .....	24
I.7.2. Intérêts thérapeutiques et pharmacologiques .....	25
II. RESSOURCES ET DIVERSITE GENETIQUE DU NOYER .....	26
II.1. Ressources génétiques du noyer .....	26
II.1.1. A l'échelle internationale .....	26
II.1.2. A l'échelle nationale .....	27
II.2. Diversité génétique du noyer.....	31
II.2.1. Caractérisation morphologique .....	31
II.2.2. Caractérisation biochimique .....	33
II.2.3. Diversité moléculaire .....	35
II.2.3.1. Marqueurs RAPD .....	35
II.2.3.2. Marqueurs RFLP .....	36
II.2.3.3. Marqueurs AFLP .....	37
II.2.3.4. Marqueurs SSR.....	37
II.2.3.5. Marqueurs ISSR.....	38
II.2.3.6. Marqueur SNP .....	39
<b>CHAPITRE II : ETUDE DE LA VARIABILITE MORPHOLOGIQUE ET POMOLOGIQUE DU NOYER.....</b>	<b>40</b>
I. MATERIEL ET METHODES .....	41
I.1. Matériel végétal .....	41
I.2. Caractères morphologiques et pomologiques considérés .....	41
I.3. Analyses statistiques des données .....	45
II. RESULTATS .....	45
II.1. Etude des caractères séparés.....	45
II.1.1. Traits morphologiques des feuilles .....	46
II.1.2. Traits pomologiques.....	46
II.2. Etude multivariée de la diversité phénotypique .....	54

II.2.1. Matrice des coefficients de corrélations .....	54
II.2.2. Projection des accessions dans le plan 1-2 de l'ACP .....	55
III. DISCUSSION ET CONCLUSION .....	59
<b>CHAPITRE III : CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ACCESSIONS MAROCAINES DU NOYER.....</b>	<b>63</b>
I. MATERIELS ET METHODES .....	64
I.1. Matériel végétal .....	64
I.2. Paramètres mesurés.....	64
I.2.1. Détermination du taux d'humidité et de la matière sèche .....	64
I.2.2. Détermination de la teneur en cendres .....	65
I.2.3. Détermination de la teneur en huile .....	65
I.2.4. Dosage des protéines brutes.....	65
I.2.5. Estimation de la teneur en carbohydrates .....	67
I.2.6. Estimation de la valeur énergétique .....	67
I.2.7. Détermination des fibres brutes .....	67
I.2.8. Dosage des métabolites secondaires et activité antioxydante .....	68
I.2.8.1. Préparation de l'extrait méthanolique .....	68
I.2.8.2. Détermination du pouvoir antioxydant .....	68
I.2.8.3. Dosage des polyphénols totaux.....	69
I.2.8.4. Dosage des flavonoïdes totaux.....	69
I.2.9. Détermination de la matière minérale .....	69
I.3. Analyses statistiques .....	70
II. RESULTATS ET DISCUSSION .....	70
II.1. Etude des paramètres biochimiques pris séparément .....	70
II.1.1. Humidité .....	71
II.1.2. Teneur en cendres .....	71
II.1.3. Teneur en huile.....	71
II.1.4. Protéines brutes .....	72
II.1.5. Teneur en carbohydrates .....	72
II.1.6. Valeur énergétique .....	73
II.1.7. Fibres brutes .....	73
II.1.8. Pouvoir antioxydant .....	73
II.1.9. Polyphénols totaux .....	74
II.1.10. Flavonoïdes totaux .....	74
II.1.11. Matière minérale .....	74
II.2. Etude multivariée des paramètres biochimiques .....	80
III. CONCLUSION .....	85
<b>CHAPITRE IV : ANALYSE DE LA VARIABILITE ET DE LA STRUCTURE GENETIQUES DES ACCESSIONS DU NOYER PAR LES MARQUEURS ISSR. 87</b>	
I. INTRODUCTION.....	88
II. MATERIELS ET METHODES .....	88

II.1. Matériel végétal .....	88
II.2. Extraction d'ADN .....	89
II.3. Test de qualité d'ADN sur gel d'agarose .....	89
II.4. Quantification d'ADN .....	90
II.5. Estimation de la pureté .....	90
II.6. Amplification des fragments d'ADN .....	90
II.6.1. Préparation des concentrations d'ADN .....	90
II.6.2. Amorces ISSR utilisées.....	90
II.6.3. Optimisation des conditions de la PCR .....	91
II.6.4. Etapes de l'amplification .....	91
II.6.5. Electrophorèse et révélation des produits d'amplification.....	91
II.7. Méthodes d'analyse statistique des données .....	93
II.7.1. Informativité des marqueurs .....	93
II.7.2. Analyse de la diversité génétique.....	94
III. RESULTATS ET DISCUSSION .....	98
III.1. Qualité d'ADN extrait.....	98
III.2. Optimisation de la température d'hybridation .....	99
III.3. Polymorphisme des marqueurs ISSR.....	99
III.4. Diversité génétique des accessions .....	105
III.5. Relations génétiques entre accessions.....	112
IV. CONCLUSION .....	117
<b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>119</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>124</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>142</b>

# INTRODUCTION GENERALE

Les ressources phytogénétiques destinées à l'alimentation et l'agriculture sont les fondements biologiques de la sécurité alimentaire et abritent les moyens de subsistance de tous les habitants de la planète. Elles englobent un matériel génétique varié constitué par des espèces sauvages et d'autres cultivées qui procurent à l'homme de la nourriture, des médicaments, du fourrage pour le bétail, de l'énergie et de multiples autres produits. Parmi ces ressources phytogénétiques, seulement 150 espèces végétales sont actuellement cultivées dont 12% assurent environ 75% de notre alimentation. Par contre, de nombreuses cultures locales sont maintenant sous-utilisées ou négligées (FAO, 2001).

Dans un monde où environ un milliard de personnes souffrent de la faim chaque jour, et où l'on prévoit que la population mondiale dépassera les neuf milliards d'habitants d'ici 2050, les pays doivent conjuguer leurs efforts pour promouvoir la sauvegarde et l'utilisation durable de ces ressources phytogénétiques locales (FAO, 2010). En effet, plusieurs programmes d'amélioration et de conservation des ressources phytogénétiques ont été entrepris dans de nombreuses régions du monde.

La région méditerranéenne abrite une diversité biologique de première importance. La plupart des espèces de la flore spontanée, en Afrique du Nord notamment, est résistante et bien adaptée à la sécheresse et à la salinité et constitue une part non négligeable des ressources génétiques locales à valeurs pastorale, fourragère, alimentaire, aromatique et médicinale (Ohba et Amirouche, 2003). Toutefois, un grand nombre de ces espèces sont menacées non seulement par des stress biotiques mais également par des pressions abiotiques notamment une urbanisation intensive, des changements climatiques et une tendance vers une agriculture industrielle basée sur un nombre limité des variétés productives.

Le Maroc présente une richesse floristique importante. Sa flore est estimée à 4500 taxons avec 920 genres et 130 familles (Fennane 2004). Les taxons endémiques stricts sont estimés à 951, soit 21 % des plantes vasculaires marocaines. Les principaux foyers d'endémisme sont situés dans les hauts sommets montagneux.

Néanmoins cette richesse subit toutefois une menace permanente de plusieurs facteurs et surtout de l'activité de l'homme (Franchimont et al., 2001).

Parmi les ressources végétales marocaines, les espèces fruitières, jouant un rôle socio-économique et environnemental très important. Les superficies consacrées à la production fruitière au Maroc ont évolué d'une manière considérable. Le développement de ce secteur, à travers la sélection du matériel végétal performant, revêt une importance capitale pour répondre aux besoins croissants de la population en produits fruitiers (Oukbli et al., 2005).

Le présent travail porte sur l'une des espèces fruitières, qui est le noyer commun (*Juglans regia* L.). Cette espèce est considérée le plus économiquement important par rapport aux autres espèces de cette famille (Aiqing et al., 2014). Le noyer est à la fois un arbre forestier et fruitier producteur des graines d'une valeur nutritionnelle très importante (les noix), du bois noble et des autres produits à grand intérêt économique et sanitaire (les feuilles, le brou, l'écorce). De l'avis des professionnels la production de la noix a un avenir économique important en raison d'une demande croissante sur les marchés marocain, arabe et européen (Serrar, 2006).

Au Maroc, le noyer présente un véritable intérêt pour le développement d'une culture durable surtout en zones montagneuses et constitue une source de revenu vital pour les riverains. Cependant, il est négligé par les programmes de recherche et d'amélioration. D'autres part, et malgré l'étendue de la variabilité phénotypique observée chez cette espèce, ce patrimoine génétique s'avère hautement menacé par une forte érosion génétique pour deux raisons :

- i) La première, consiste en l'âge avancé de certains pieds qui ont dégénéré, ces pieds représentent des variétés anciennes et rares de faible intérêt économique, c'est pour cela qu'ils n'ont pas été remplacés par les mêmes variétés mais par des cultures plus rentables, parce qu'il s'agit des variétés traditionnelles sans importance économique.

ii) La seconde, c'est qu'il n'y a pas de jeunes plants de ces variétés traditionnelles pour perpétuer ce patrimoine local. De plus, il n'existe pas encore de collection ou parc à bois regroupant l'ensemble des variétés autochtones identifiées, d'autant plus qu'on ne rencontre chez les pépiniéristes que quelques variétés d'intérêt économique qui dominent dans les jeunes plantations du noyer.

Il est donc indispensable d'établir une stratégie visant la conservation et l'amélioration génétique des ressources locales de cette espèce. Plusieurs actions sont donc nécessaires pour répondre aux objectifs de cette stratégie. Il s'agit en particulier de dresser l'inventaire des cultivars, de mener des collectes et des actions de conservation in situ et ex situ, d'évaluer la diversité génétique du germoplasme local et de mettre au point une stratégie d'exploitation rationnelle de ces ressources phytogénétiques. Tenant compte de ces considérations, nous nous sommes intéressés à l'analyse de la diversité des ressources génétiques locales du noyer marocain afin de fournir des éléments d'aide à la décision pour la gestion, la conservation, l'amélioration génétique et l'utilisation durable de ce patrimoine génétique. Notre intérêt a porté sur une évaluation adéquate des accessions marocaines du noyer à l'aide d'une caractérisation phénotypique, biochimique et moléculaires.

Cette étude a pour objectif d'une part d'identifier des génotypes performants ayant des caractères recherchés par les sélectionneurs, les agriculteurs et les consommateurs et d'autre part, d'explorer la diversité génétique et le typage moléculaire du germoplasme local de cette espèce. En plus, elle a pour perspectives la conservation et l'amélioration des ressources génétiques de cette espèce, afin de controverser l'une des plus grandes menaces de l'environnement, l'érosion génétique (Watts et al., 2005). Le présent travail constitue la première approche de l'évaluation de la diversité génétique des accessions marocaines du noyer à l'aide des marqueurs moléculaires.

Le premier chapitre est consacré à une analyse bibliographique assez détaillée sur le noyer et l'état actuel des travaux de recherche sur les ressources génétiques de cette espèce.

Dans le deuxième chapitre, nous présenterons les résultats obtenus sur la caractérisation phénotypique des accessions du noyer, basée sur 31 caractères qualitatifs et quantitatifs liés aux feuilles et aux fruits.

Le troisième chapitre concernera une caractérisation biochimique des accessions du noyer.

Dans le quatrième chapitre, nous analyserons la diversité génétique des accessions du noyer à l'aide des marqueurs moléculaires ISSR.



**CHAPITRE I :**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. DONNEES RELATIVES AU NOYER (*JUGLANS REGIA* L.)**

### **I.1. Présentation de l'espèce *Juglans regia* L.**

#### **I.1.1. Taxonomie**

Le noyer (*Juglans regia* L.) est une espèce diploïde ( $2n = 32$ ) qui fait partie de la famille des *Juglandacées*. Cette famille comprend 50 espèces réparties en 8 à 11 genres. Parmi ces derniers le genre *Juglans* comprend 21 espèces subdivisées en fonction de la structure du fruit en quatre sections : Trachycaryon, Cardiocaryon, Rhysocaryon et Dioscaryon (Manning, 1978). Elles sont également classées en fonction des caractéristiques de leur bois en trois grands groupes : Noyers cendres, Noyers blancs et noyer noirs. La section Dioscaryon se compose uniquement de *Juglans regia*, qui a plusieurs noms, parmi eux le noyer des carpathes, français, de perse et de l'Himalaya, bien qu'aujourd'hui il est communément connu par le noyer anglais ou le noyer commun (Manning, 1978). Il est l'espèce la plus largement cultivée et la plus importante économiquement (Arzani et al., 2008 ; Vyas et al., 2003).

#### **I.1.2. Données botaniques**

Le noyer se caractérise par des arbres de grande taille avec des couronnes larges et denses, pouvant atteindre une hauteur de 15 à 35 m (Figure 1). Les arbres plus vieux peuvent avoir un diamètre de tronc supérieur à 1,5–2,5 m (Shalit, 1951 ; Gursky, 1932). Ils peuvent vivre entre 150 et 200 ans (Gellini et Grossoni, 1997), tandis qu'une longévité accrue (300-400 ans) a été rapportée dans des peuplements naturels (Hemery et Popov, 1998 ; Mohni, 2009).

- **Feuille :**

Les feuilles caduques, alternes, pétiolées et imparipennées, de 19–54 cm de long et de 15–40 cm de large (Molnar et al., 2011). Les feuilles matures sont composées de 7 à 9 folioles qui sont généralement vertes foncées, ovées, coriaces et glabres, avec des marges entières. La foliole terminale est la plus grande et la paire de folioles basales est la moins développée (Sabatier, 2006) (Figure 2).

- **Inflorescence :**

Les inflorescences mâles, groupées en chatons et situés au-dessus des cicatrices foliaires à la partie basale de la pousse de l'année précédente, ont 10 cm de longueur en moyenne, elles sont composées de trois bractées et d'un périanthe soudé et une pièce protégeant un nombre variable d'étamines (2 à 32) diminuant vers l'extrémité du chaton (Figure 3). Les anthères portées par un filet très court (1-2mm) se compose de deux loges séparées par un sillon très marqué. Un chaton porte environ 2 millions de grains de pollen (Pesson et Loubeaux, 1984).

Concernant, les fleurs femelles, elles ressemblent à une petite amphore verte de 7 à 10 mm de diamètre et de 10 à 15 mm de hauteur, ornée à son sommet de deux importants stigmates papilleux étalés en panache de part et d'autre de l'axe de la fleur dans un plan contenant l'axe de l'inflorescence (Garavel, 1961) (Figure 3). Les fleurs femelles sont sessiles, isolées ou agrégées, limbe du calice supère, petit, adné à l'ovaire infère. L'ovaire ovoïde avec cavité ovarienne unique, contenant un seul ovule orthotrope, sessile sur le placenta basilaire. (Chevalier, 2016). La partie basale, élargie de la fleur, est enfermée dans un involucre poilu qui est le résultat de la fusion des bractées et des sépales. Ce dernier se développe finalement en brou de la noix (Krueger, 2000).

- **Fruit :**

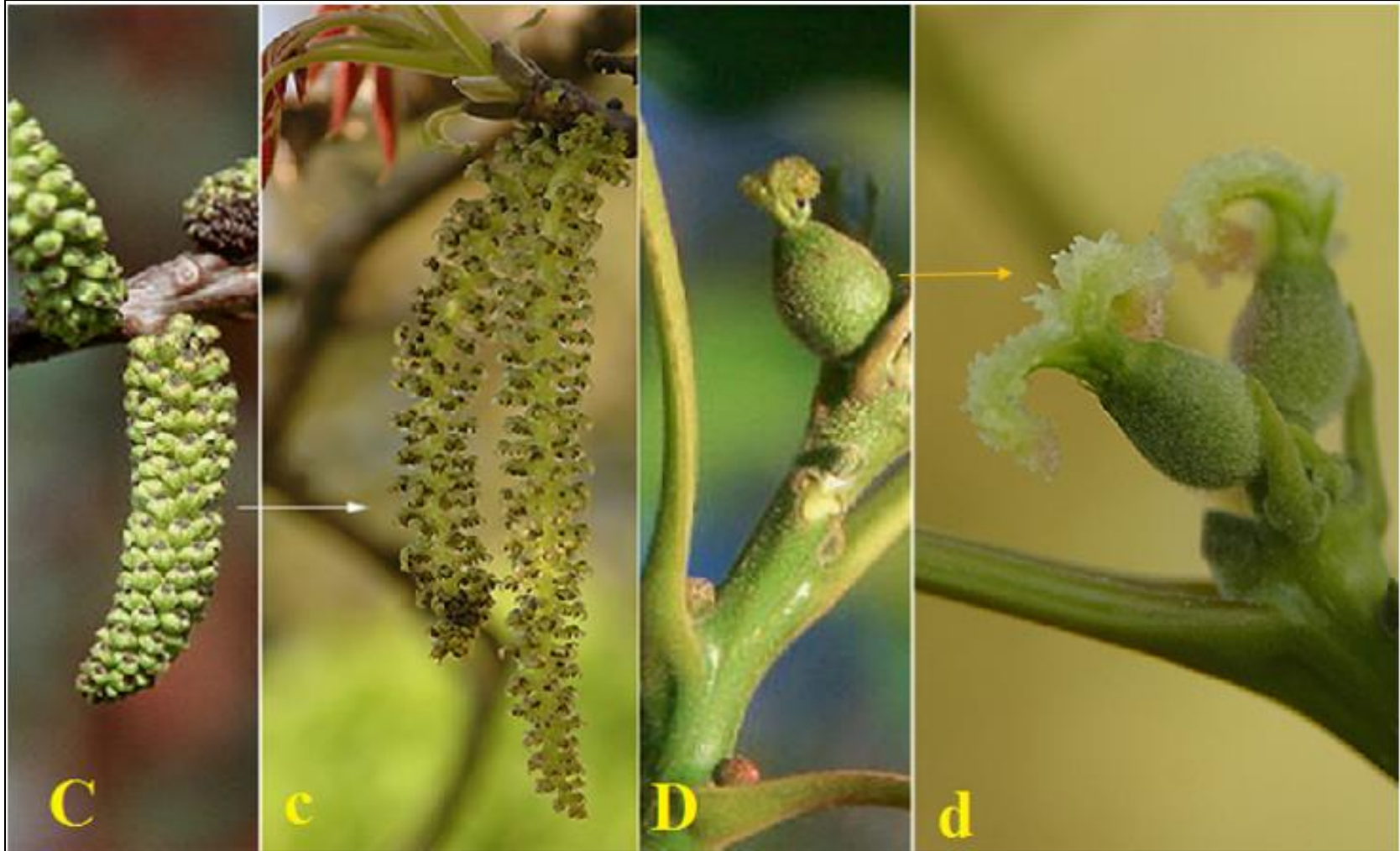
Le fruit sous forme d'une drupe à enveloppe externe (épicarpe et mésocarpe) charnue, souvent très aromatique et riche en tanin, se déchirant irrégulièrement à maturité ou entièrement indéhiscente (Figure 4). L'endocarpe ligneux plus ou moins épais et dur, strié-rugueux extérieurement, s'ouvrant au moment de la germination en 2 valves (rarement en 4), suivant la ligne médio-dorsale et non suivant la commissure, cavité du fruit divisée par 2 doubles parois de séparation coriaces ou osseux en 4 loges incomplètes dans lesquelles s'insèrent les lobes des 2 cotylédons sans albumen, recouverts du tégument de la graine membraneuse; cotylédons entiers et rapprochés au sommet, divisés supérieurement en 2 lobes (Chevalier, 1941).



**Figure 1 :** Arbre du noyer (*Juglans regia* L.)



**Figure 2 :** Feuilles (A) et écorce (B) du noyer (<https://planteset.com/juglans-regia/>).



**Figure 3** : Fleurs mâles (C) et fleurs femelles (D) du noyer avant et à maturité (c,d)  
(<https://oregonstate.edu/dept/ldplants/jure9.htm>).



**Figure 4** : Fruits (E), fruit à maturité (F), noix dégagées de leur brou (G) et cerneaux du noyer (H) (<https://balkanecologyproject.blogspot.com/2015/11/the-essential-guide-to-everything-you.html>).

### **I.1.3. Mode de reproduction**

Le noyer est une espèce monoïque, les fleurs femelles et mâles sont séparées sur le même arbre. (Pesson et Louveaux, 1984). Bien que le noyer soit auto-compatible, sa dichogamie encourage l'allogamie (Verma et al., 2009). En effet la dichogamie comporte deux systèmes de floraison : la protogynie et la protandrie (Bai et al., 2006). Chez le noyer les deux systèmes peuvent coexister chez une population avec un ratio de 1 : 1, on parle d'une espèce hétérodichogame (Kimura et al., 2003 cité in Bai et al., 2006). Comme le décalage entre les périodes de floraison mâle et femelle diminue avec l'âge, la probabilité d'autopollinisation augmente avec le temps (Barengo, 2001). De plus, les facteurs environnementaux peuvent influencer la floraison du noyer tels que : la température, l'humidité de l'air, la pluie, le temps et la durée de floraison ainsi que la nature du système de floraison et le degré de la dichogamie (Cosmulescu et al., 2010).

Les chatons mâles commencent à s'allonger au printemps et à ce moment le pollen est libéré et dispersé par le vent. Les chatons peuvent produire environ deux millions de grains de pollen (Germain et al., 1999). La viabilité du pollen est seulement de 2 à 3 jours (Forde, 1970). Les fleurs femelles du noyer ne sécrètent pas de nectar et de ce fait ne sont pas visitées par les insectes, la pollinisation est donc anémophile. Le pollen, léger est entraîné sur des distances assez grandes (Pesson et Louveaux, 1984). Impiumi et Ramina (1967) ont rapporté que, si la vitesse du vent est faible (0,5 m/s), le pollen du noyer présente une densité uniforme de 160 m autour de la source. Compte tenu de la quantité énorme du pollen produit, le pourcentage d'arbres pollinisateurs n'est pas important. Germain et al. (1975) rapportent que 6 à 8 arbres pollinisateurs par hectare sont suffisants pour assurer une bonne pollinisation.

Au fur et à mesure que la fleur femelle se développe, les stigmates à deux branches relativement grandes, qui sont reliés à l'ovaire par un style court, commencent à se séparer (Krueger, 2000). Les cellules sur la surface du stigmate sécrètent un exsudat collant qui attrape les grains du pollen et agit comme un substrat pour la germination (Krueger, 2000). Lorsque le grain de pollen atteint le stigmate, il



germe et le tube pollinique traverse les cellules situées à la surface du stigmate et se développe à travers le style vers l'ovaire, l'ovule et le sac embryonnaire. De nombreux grains de pollen germent et des tubes polliniques se développent dans le style, mais un seul peut pénétrer et féconder l'œuf. D'autre part, le noyer possède la faculté de produire sans fécondation des noix capables de germer (parthénogenèse) (Barengo, 2001).

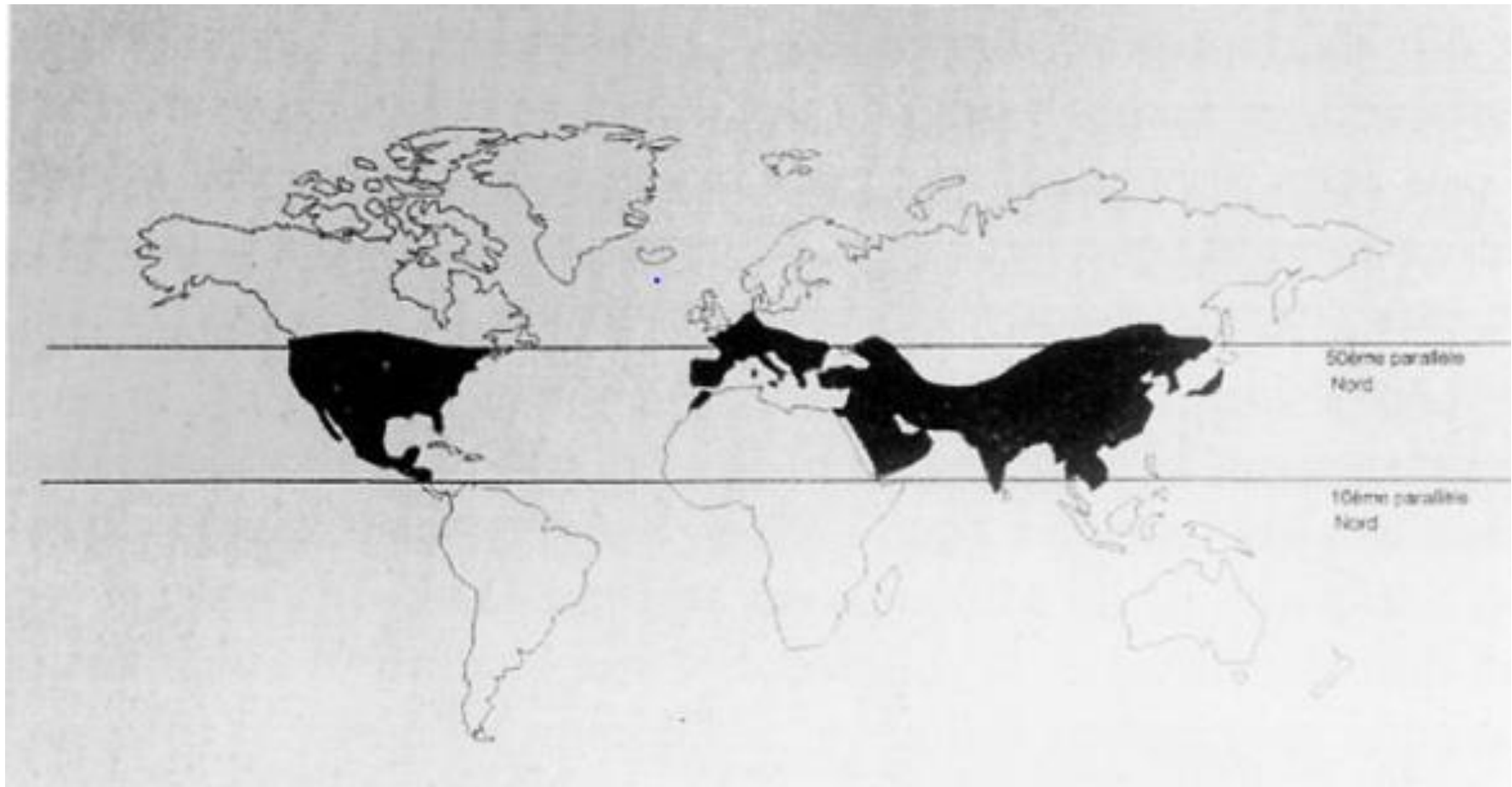
Le poids élevé de la graine complique la propagation et les noix tombent sous l'arbre-mère. Mais divers animaux – écureuils, mulots, corneilles, geais, canards – qui se nourrissent des noix, en transportent, en égarent et contribuent à leur dissémination. Ainsi, on trouve presque partout un riche rajeunissement issu des noix abandonnées par les oiseaux. Les conditions de germination les meilleures semblent apparemment réunies dans des biotopes secs et basiques (Barengo, 2001).

## **I.2. Origine et répartition géographique**

Le noyer est parmi les plus anciens arbres connus dans la nourriture chez l'homme, remontant à 7000 av. J.-C. Les Romains ont appelé le noyer « le gland de Jupiter ». La première histoire indique qu'est venu de l'ancienne Perse, où il a été réservé à la royauté (Tajamul et al., 2014). Il est indigène dans les forêts de ravins des Balkans et de l'Asie du Sud-ouest. On le trouve dans plusieurs pays : la Chine, le Kazakhstan, l'Ouzbékistan et les montagnes du Népal, le Tibet, le Nord de l'Inde, le Pakistan, l'Afghanistan, le Turkménistan, l'Iran, l'Azerbaïdjan, l'Arménie, la Géorgie et l'Est de la Turquie.

La culture de cette espèce était répandue dans presque toutes les régions du monde avec un climat tempéré (McGranahan et al., 1991) (Figure 5). Elle est cultivée pour la production du fruit de bonne valeur nutritionnelle, du bois de haute qualité et pour l'ombre (Prasad, 2003). Il a été introduit en Europe depuis l'Antiquité grecque (Germain, 1992). On spéculer sur des présences autochtones en Europe centrale et on suppose qu'il existe des populations naturelles dans le sud-ouest de l'Allemagne et

dans le nord-ouest de la Suisse. Les forêts alluviales de Haute-Autriche abritent des formes sauvages à petits fruits, assez résistantes au gel et dont l'origine n'est pas expliquée (Barengo, 2001). Au XXème siècle, il a été introduit au Chili et en Californie (Germain, 1992). Aujourd'hui, il est cultivé également en Australie, en Nouvelle-Zélande et en Afrique du Sud. L'introduction de cette espèce dans les ravins des montagnes du Maghreb (Maroc, Algérie et Tunisie) est attribuée aux Romains (Germain, 1992 ; Maire, 1961). En effet, l'existence des arbres très âgés dans certaines plantations traditionnelles au Maroc témoigne l'ancienneté de la culture de cette espèce (Bamouh, 2006).



**Figure 5 :** Aire de répartition géographique de *Juglans regia* L. (DE Corcelles et al, 1995).

### **I.3. Exigences édapho-climatiques**

#### **I.3.1. Sol**

D'après Becquey (1997), le noyer commun a besoin d'un sol profond, aéré et riche pour bien pousser. Les meilleurs sols sont les loams (argile > 25%, limon 30,50% et sable 30,50%) (Wani et al., 2016). Il est peu sensible aux variations du pH du sol avec une fourchette de pH se situant entre 6,5 et 7,5 et supporte les sols basiques (Becquey, 1997). Pour échapper à la chlorose, Becquey (1997) conseille de planter le noyer sur des sols à pH élevé (8.0 à 8.5).

#### **I.3.2. Température**

L'effet bénéfique du froid sur la levée de dormance des arbres du noyer a été reconnu depuis longtemps (Mauget et al., 1983). Le noyer est sensible aux gelées hivernales et printanières tardives, les premières étant particulièrement dommageables parce que l'espèce présente souvent une activité végétative précoce (Mohni et al., 2009). Les températures annuelles moyennes optimales sont comprises entre 10,5 et 15 °C et les températures hivernales moyennes doivent être supérieures à 2,5 °C. Le besoin de froid est compris entre 1000 et 1100 heures (Charrier et al., 2009).

#### **I.3.3. Eau**

Pour une croissance optimale, le noyer nécessite 700-800 mm de pluie par an, idéalement bien répartie tout au long de l'année. Bien que le noyer puisse tolérer une période de sécheresse, les précipitations ne doivent jamais tomber en dessous de 100-150 mm pendant la période de croissance (Mohni et al., 2009). Un manque d'eau peut compromettre gravement la récolte tant en quantité qu'en qualité. Le manque d'eau en juin provoque une réduction excessive des noix et une sécheresse en juillet, hypothèque la récolte de l'année suivante en endommageant les bourgeons à fruits et les cerneaux de la même année seront de piètre qualité. En août et septembre un manque de breuvage rend les cerneaux très médiocres (DE Corcelles et al., 1995). D'autre part, le noyer ne supporte pas l'excès d'eau et les milieux asphyxiants (Becquey, 1997).

### **I.3.4. Lumière et concurrence**

Le noyer est un arbre dont le branchage s'étale considérablement avec une densité importante du feuillage et qui exige beaucoup de lumière (Ben Baaziz, 2012). En effet, les feuilles et les racines contiennent une substance toxique, la juglone, qui inhibe la croissance des autres arbres, y compris les jeunes noyers. Il s'agit d'un moyen pour préserver un maximum d'espaces et minimiser la compétition sur la lumière. A une certaine tolérance à l'ombrage dans le jeune âge, répond une forte exigence en lumière à l'âge adulte. L'éclairage latéral entraîne la déformation des troncs en direction de la lumière (phototropisme prononcé) (Ben Baaziz, 2012).

## **I.4. Modes de propagation**

### **I.4.1. Semis direct**

Le semis fut pendant longtemps le seul mode de multiplication du noyer. Cette méthode permet de garder la racine intacte et d'éviter le choc de plantation. Les vergers les plus anciens de la plupart des pays producteurs du noyer, comme l'Italie (Avanzato et Tamponi, 1988), la Turquie (Barut, 1996), l'Inde (FAO, 2001), la Roumanie (Achim et Botu, 2001) et l'Iran (Vahdati et Zareie, 2006) sont constitués d'arbres issus des semis caractérisés par une longue période juvénile. De même, au Maroc, le noyer local comprend essentiellement des arbres issus de semis, donnant des arbres de longue période juvénile avec des noix souvent de petit calibre. Ce mode de multiplication a généré une variabilité génétique importante (Oukabli, 2006).

### **I.4.2. Greffage**

Le perfectionnement progressif des techniques de greffage, depuis la fin du XIXe siècle, a rendu possible la culture des variétés les plus intéressantes du noyer sur des porte-greffes adaptés (Delbos et al., 1984). Pour la multiplication clonale, les horticulteurs français ont été les premiers qui ont réussi à greffer les noyer (Leslie et McGranahan, 1998).

Aujourd'hui, la greffe en écusson et le greffage anglais au cours de la saison végétative sont généralement considérés comme des techniques classiques de propagation du noyer (Reil et al., 1998) (Figure 6). Cependant, plusieurs chercheurs conviennent que ces méthodes aboutissent à un succès limité et variable dans des conditions de terrain incontrôlées (Karadeniz, 2005 ; Erdogan, 2006). Le moment approprié pour la greffe de cette espèce est la dernière semaine de février à la mi-mars (Verma, 2014). Les porte-greffes les plus utilisés sont le franc du noyer noir (*Juglans nigra*) et le franc du noyer commun (*Juglans regia*) (Oukabli, 2006). La première espèce induit une mise à fruit légèrement rapide, en comparaison avec la seconde et elle est moins sensible aux maladies racinaires dues au *phytophthora* et au *Pourridié*, cependant, elle est sensible à la maladie des lignes noires, qui peut rapidement tuer un arbre mature. Elle confère une vigueur réduite et une faible longévité (Oukabli, 2006 ; Serrar, 2007 ; Verma, 2014). De même, *Juglans nigra* présente des potentialités de pousser dans des conditions de différents types du sol (Verma, 2014). Alors que le type *Juglans regia* est rustique et tolérant au virus *cherry leaf roll*, mais sensible aux maladies racinaires. Il induit une bonne vigueur et elle est adapté aux variétés à fructification terminale (Serrar, 2007).

Une multitude de facteurs influencent le succès du greffage chez le noyer, tels que le choix des cultivars, la qualité du porte-greffe, le temps de la collecte de greffons des arbres parents, le temps et la méthode du greffage, la température et l'humidité relatives dans la chambre du greffage (Gandev, 2007 ; Avanzato, 2009).

#### **I.4.3. Bouturage**

Le noyer est considéré comme une espèce difficile à multiplier par bouturage. Toutefois divers travaux ont montré qu'il était possible de le bouturer (Fourcy et Lantelme, 1965 ; Shreve, 1974 ; Farmer, 1971 ; Carpenter, 1975). Les meilleurs enracinements sont obtenus pendant l'été avec du matériel semi-lignifié provenant de plants « réjuvenilisés ».

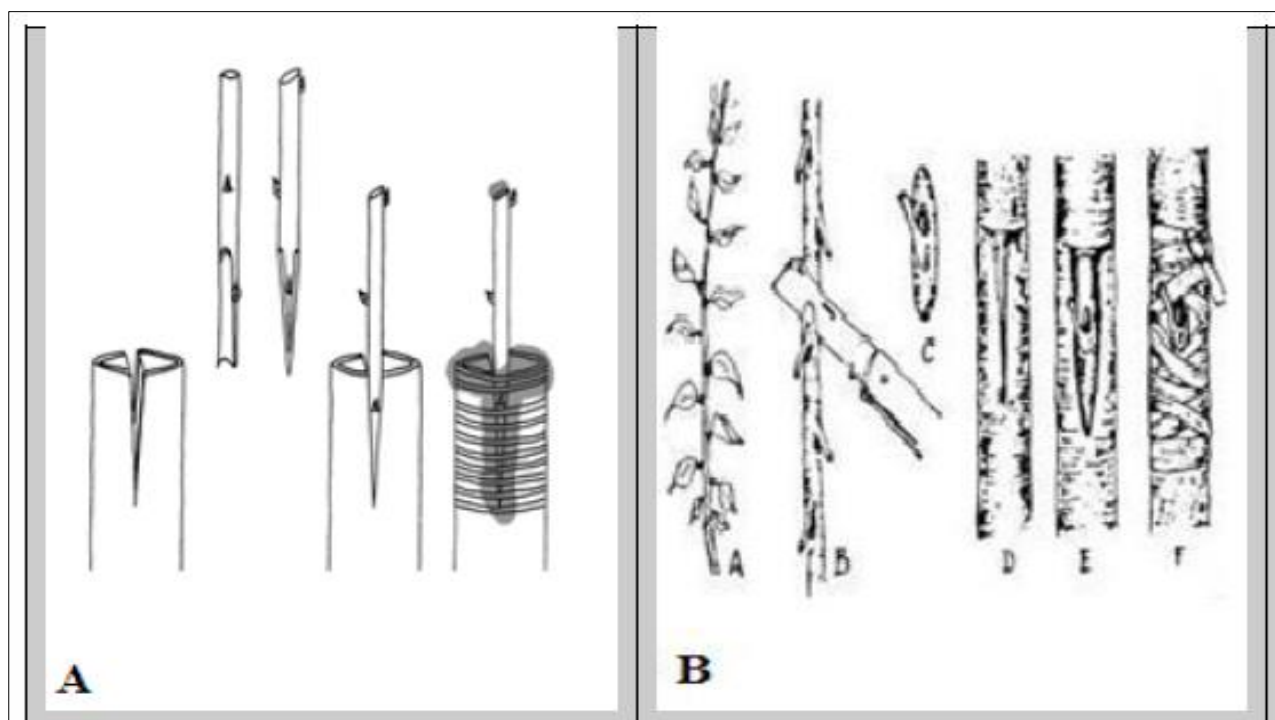
## **I.5. Production du noyer**

### **I.5.1. Au niveau mondial**

La production du noyer montre une allure croissante, en réponse à une demande de plus en plus élevée encouragée par son intérêt économique et thérapeutique. En 2017, la production mondiale de la noix a atteint 3 829 626 de tonnes avec une superficie de 1.18 millions d'hectares. Le tableau 1 présente les principaux pays producteurs du noyer, tels que la Chine vient en tête des pays producteurs avec 51,15% de la production mondiale répartis sur une superficie de 487 007 ha. Les Etats Unis d'Amérique occupe le deuxième rang avec 15,18%, suivis par l'Iran (9,27%) et la Turquie (5.57%) (FAOSTAT, 2018).

### **I.5.2. Au niveau national**

La culture du noyer couvre au Maroc une superficie d'environ 7459 ha avec une production estimée à 12 637 tonnes des noix non décortiquées (FAO, 2018). Les plantations existantes sont des populations situées dans les vallées montagneuses ayant des altitudes situées entre 1200 m et 1700 m comme celles d'Azilal, Amezmiz, Ourika, Rif, Midelt et Rich (Oukabli et al., 2006). Le noyer est planté principalement au bord des courants d'eau et à la limite des parcelles, en ilots et/ou en arbres isolés (Oukabli et al., 2006). Les rendements sont généralement faibles (1.7 t/ha) (FAO, 2018). Ceci est dû à plusieurs stress abiotiques et biotiques tels que la sécheresse et les maladies (anthracnose, bactériose, carpocapse) et à l'itinéraire technique inapproprié pratiqué par les agriculteurs (Bamouh, 2006). D'autre part, les accessions locales utilisées n'ont subi aucune amélioration génétique.



**Figure 6** : Deux types de greffage ; A : Greffe anglaise ; B : Greffe en écusson (DE Corcelle et al., (1995).

**Tableau 1** : Principaux pays producteurs du noyer (FAOSTAT, 2018).

Pays	Production (t)
Chine	1 925 403
États-Unis d'Amérique	571526
Iran	349192
Turquie	210000
Mexique	147198
Ukraine	108 660
Chili	81 163
Ouzbékistan	48 391
Roumanie	43 720
France	40 683
Inde	32 000
Grèce	28 000
Egypte	24 000



## **I.6. Valeurs nutritionnelles du cerneau**

Le noyer a été utilisé dans la nutrition humaine depuis l'Antiquité grâce à sa haute teneur en huile et en protéines. La structure botanique du noyer est comparée à celle du cerveau humain et considéré de la sorte comme un nutriment du cerveau (Sen, 2013). Le fruit constitue un aliment végétal très nutritif et il a été utilisé traditionnellement pour traiter la toux, les maux d'estomac et le cancer en Asie et dans les pays européens (Fukuda et al., 2003). Par conséquent, le noyer est classé comme une espèce stratégique pour la nutrition humaine et il est inclus dans la liste des plantes prioritaires de la FAO (Gandev, 2007). Le cerneau est consommé frais, grillé, ou mélangé avec d'autres confiseries. Il est aussi une source importante de vitamines et de minéraux, flavonoïdes, stérols, acides polyphénols. La composition nutritionnelle varie en fonction de plusieurs facteurs tels que : le génotype, les conditions de culture et l'environnement (Martinez et al., 2010 ; Muradoglu et al., 2010 ; Caglarirmak, 2003).

### **I.6.1. Protéines**

Les protéines du fruit du noyer sont considérées comme une source additionnelle des protéines végétales pour l'alimentation de l'Homme (Mao et al., 2014). La valeur moyenne des protéines dans la noix est de 18,1% (Savage, 2001 ; Amaral et al., 2003 ; Muradoglu, 2005 ; Muradoglu, 2010). Ces produits sont principalement constitués de glutélines (70%), de globulines (18%), d'albumines (7%) et de prolamines (5%) (Martinez et al., 2010). Les protéines du cerneau contiennent tous les acides aminés essentiels requis pour les besoins d'un Homme adulte. Le rapport lysine / arginine dans les protéines du noyer est inférieur à celui observé dans d'autres protéines végétales, et ce fait a été identifié comme une caractéristique positive dans la réduction du développement de l'athérosclérose (Sza-Tao et al., 2000 ; Martinez et al., 2010). En général, les protéines contiennent une valeur relativement faible en Lysine et élevée en Arginine, acide Glutamique et Aspartique (Ruggeri et al., 1998 ; Martinez et al., 2010 ; Mao et al., 2014).

### **I.6.2. Lipides**

Le noyer contient généralement 52 à 70% d'huile (Savage et al., 2001 ; Çağlarırmak et al., 2003 ; Özkan et al., 2005) dans lesquels les acides gras polyinsaturés représentent 70% et le reste est constitué par les acides gras monoinsaturés (18%) et les acides gras saturés (12%) (Milind et Deepa, 2011). Ces teneurs varient en fonction du génotype, des conditions climatiques et du taux d'irrigation (Prasad, 2003). Les principaux acides gras présents dans l'huile du noyer sont les acides linoléique ou  $\omega$ -6 (8 à 15,5%), oléique ou  $\omega$ -9 (13,8 à 26,1%) et linoléique ou  $\omega$ -3 (49 à 63%). D'autres acides gras présents comprennent l'acide palmitique (6,7 à 8,7%) et l'acide stéarique (1,4 à 2,5%) (Shahidi, 2006). Les niveaux élevés des acides gras polyinsaturés (AGPI) sont plus souhaitables en raison de leurs avantages pour la santé. D'autre part les acides linoléiques et les acides linoléiques peuvent prolonger la durée de conservation (Cunnane et al., 1993). En plus, l'huile qui est riche en acide oléique présente une grande stabilité à l'oxydation (Tajamul et al., 2014).

### **I.6.3. Vitamines et minéraux**

Les noix contiennent plusieurs types de vitamines : les vitamines hydrosolubles comme l'acide ascorbique (C), Thiamine (B1), Riboflavine (B2), l'acide Folique (B9), l'acide Pantothénique (B5), et la Niacine (B3), ainsi que les vitamines liposolubles : vitamine A, K et E (Milind et Deepa, 2011). Les tocophérols totaux sont des antioxydants majeurs avec une teneur qui varie de 28,4 à 42,4 mg/100 g de l'huile du noyer extraite avec une prédominance du  $\gamma$ -tocophérol (Rabrenovich et al., 2011).

De même, la noix présente une teneur très importante en matière minérale (1.65-2.4% du poids du grain) (Germain et al., 1999 ; Bujdoso et al., 2010). Elle est riche en minéraux précieux comme le phosphore, le potassium, le sodium, le magnésium et le zinc (Lavedrine et al., 2000). Ces éléments jouent un rôle important pour de nombreuses activités enzymatiques en particulier comme cofacteur (Abu Taha et Al-wadaan, 2011).

#### **I.6.4. Fibres alimentaires**

Les fibres sont citées parmi les huit constituants positifs possibles des fruits à coque (Hu et al., 1998). Concernant la noix, elle est riche en fibres, environ 9.7 grammes de fibres sont présents dans chaque 100 g de noix comestibles. Ces fibres alimentaires aident à réduire le cholestérol sérique et à prévenir les maladies cardiovasculaires et les accidents vasculaires cérébraux. De même, la noix contient environ 2% de matières pectiques dans la matière sèche. Ceci améliore la teneur en fibres et avoir une valeur nutritive telle que les effets hypocholestérolémiants, l'augmentation de l'excrétion des stérols fécaux et la capacité à lier les sels biliaires. En plus, elles ralentissent l'absorption des hydrates de carbone solubles, provoquant une faible augmentation du niveau post-prandial de la glycémie (Milind et Deepa, 2011).

#### **I.6.5. Composés phénoliques**

La saveur délicate et légèrement astringente du noyer est associée à la présence des composés phénoliques. Prasad, (2003) a signalé que le cerneau contient de l'acide syringique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide vanillique, l'acide gallique, l'acide protocatéchique, l'acide phénylacétique et le juglone en très petites quantités, allant de 2 à 20 µg / 100 g. En plus, la pellicule qui ne représente que 5% du poids du fruit, elle est naturellement riche en composés phénoliques en particulier en acide syringique, juglone et acide ellagique qui aident à protéger le cerneau de l'oxydation (Anderson et al., 2001). Les composés phénoliques du noyer ont une influence positive sur la santé humaine, notamment dans la diminution des maladies coronariennes et la prévention de plusieurs types de cancer. En plus de l'activité antioxydante, les polyphénols du noyer présentent des activités anti-inflammatoires, antibactériennes et antimutagènes (Anderson et al., 2001 ; Sousa et al., 2006).

### **I.7. Intérêt du noyer**

#### **I.7.1. Intérêt économique**

Le noyer a une valeur commerciale très importante. Le cerneau est très demandé dans le marché mondial des fruits secs. La couleur claire est la plus désirée

(McGranahan et Forde 1985 ; Korac et al. 1997). Cependant, les cerneaux noirs ne sont pas comestibles et sont surtout utilisés pour la fabrication de l'huile de cuisson (Ganie et al, 2013). De même, le cerneau contient des acides gras qui sont utilisés dans la fabrication des vernis protecteurs, les médicaments, les produits cosmétiques et en tant que stabilisant dans les formulations plastiques (Hosamani et al., 2000 ; Eganathan et al., 2006). En plus, la teinte extraite à partir du brou, est utilisée pour la teinture des couvertures (Ganie et al, 2013) et les cheveux (Milind et deepa, 2011). L'endocarpe pierreux est utilisé comme carburant (Ganie et al, 2013). D'autre part, l'arbre du noyer produit également du bois noble et précieux dont la réputation et la valeur dérivent de ses propriétés techniques qui le destinent à un usage de choix. C'est un bois à structure homogène, moyennement lourd, demi dur, dont les propriétés physiques et mécaniques en font un bois facile à travailler, convenant excellemment à tous les emplois pour la menuiserie et la sculpture. Il acquiert la plénitude de sa valeur grâce aux qualités esthétiques tenant à sa coloration (Serrar, 2007).

### **I.7.2. Intérêts thérapeutiques et pharmacologiques**

Le fruit du noyer est très bénéfique pour la santé humaine, par conséquent, il peut être utilisé comme ingrédient dans de nombreux produits alimentaires pour améliorer la valeur nutritive du produit (Mexis et al., 2009). Le cerneau, le brou et les feuilles sont utilisés dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques et sont considérés comme source des antioxydants naturels, tels que les composés phénoliques (Sharafati-Chaleshtori et al., 2011). En plus, les feuilles du noyer sont principalement utilisées dans les médicaments traditionnels comme antimicrobiens, antihelminthiques, astringentes, kératolytiques, antidiarrhéiques, hypoglycémiques, dépuratives, toniques, carminatives et pour le traitement de la sinusite, du froid et des maux d'estomac (Girzu et al., 1998 ; Mouhajir et al., 2001 ; Vaidyaratnam, 2005). En plus, l'écorce et le péricarpe du fruit immature ont été utilisés longtemps pour traiter le cancer de l'estomac, du foie et du poumon (Baytop, 1999 ; Liu et al., 2004). L'écorce est utilisée pour le nettoyage des dents (Ibrar et al., 2007). Au Népal, la pâte d'écorce est recommandée dans l'arthrite, les maladies de la peau, les maux de dents et la croissance des cheveux. (Kunwar et Adhikari, 2005). La coque est utilisée dans la

médecine traditionnelle pour soigner le paludisme (Tagarelli et al., 2010). En outre, l'institut de la recherche fondamentale en déficience intellectuelle a rapporté que le noyer améliore les symptômes de la maladie d'Alzheimer. D'autre part, l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux a autorisé une allégation de santé indiquant que les régimes, y compris le noyer peuvent réduire le risque de maladie cardiaque (Xiaoying et al., 2014 ; Aryapak et Ziarati, 2014.,2014). De même, une étude de l'école de médecine de Harvard a montré que le noyer aide à réduire le poids corporel (Tabasum et al., 2018).

## **II. RESSOURCES ET DIVERSITE GENETIQUE DU NOYER**

### **II.1. Ressources génétiques du noyer**

#### **II.1.1. A l'échelle internationale**

Parmi les principales variétés du noyer cultivées dans le monde pour la production du fruit, se trouvent les variétés italiennes (Bleggiana, Malizia, Feltrina, Lombardia et Sorrente), les variétés françaises (Franquette, Mayette, Parisienne, Marbot, Lara, Solèze, Meylannaise, Ronde de Montignac), les variétés américaines (Hartley, Payne, Serr, Vina, Chandler, Pedro, Chico, Amigo, Tehama, Adams10, Chase D9, Geisenheim), les variétés bulgares (Drianovski, Djinovski, Cheinovo, Proslavski, Perouchtenski, Slivinski, Silistrinski, Starozagorski, Mirkovski, Izvor), les variétés espagnoles (maire, Onteniente, Baldo II, Carcagente, Cerdá, Escrivá et Villena), la variété Sibisel en Roumanie, Geisenheim en Allemagne, As-1 au Chili et Rego au Portugal (Napoli et Mercurio, 2008), les variétés chinoises ( Liaoning, Xiang Ling, Lubo, Fen Gui, Xinzaofeng, Xifu, Lipin, Jinlong) (Serrar, 2007) et les variétés du noyer Turc (Sebin, Yalova 1, Yalova 2, Yalova 3, Yalova 4 et Bilecik). Divers génotypes indigènes du noyer d'Albanie et d'Inde, ont été considérés comme prometteurs de la culture de cette espèce grâce à certaines caractéristiques physiques et chimiques du cerneau (Figure 7). Certains de ces génotypes sont supérieurs aux cultivars améliorés (Mahmoodi, 2016).

Les principaux programmes de sélection et d'amélioration de cette espèce ont été basés sur la sélection des critères de la qualité des fruits tels que le poids des noix,

le poids du cerneau, les rapports cerneau / noix, l'épaisseur de la coque, la couleur de la coque et la quantité des protéines et d'huile (Muradoğlu, 2005). Des programmes d'hybridation pour créer de nouvelles variétés ont été réalisés dans l'Inde à l'Institut Central de l'Horticulture Tempérée, à l'Université des Sciences et Technologies Agricoles et à l'Université de l'Horticulture et des Forêts, ainsi que dans l'Université de Californie (USA) et l'Unité de recherches sur les espèces fruitières et la vigne (France) (Verma, 2009).

### **II.1.2. A l'échelle nationale**

Au Maroc, plus de la moitié des arbres du noyer cultivés sont issus des semis. Ils se retrouvent essentiellement dans des zones montagneuses de 800 et 1800 m d'altitude sous différentes conditions environnementales, ce qui se traduit par une variabilité génétique au niveau de la vigueur des arbres, de la période de la floraison, des caractères pomologiques et du type de fructification (Oukabli et Mamouni, 2006). Les prospections menées dans les différentes régions du Maroc par l'ENA et l'INRA ont permis de repérer une centaine de clones (Figure 8) dont certains ont des noix de gros calibres (poids : 15 g ; longueur : 40 mm) et un cerneau de 5 à 6 g de poids moyen. Ces performances sont comparables à certaines variétés d'intérêt commercial comme Franquette et Lara.

Concernant le noyer introduit, il est constitué des variétés Bulgares (Djinovo, Drianovo, Cheinovo, Izvor) introduites en 1984 dans le cadre des actions de développement agricole soutenues par le ministère de l'agriculture (Oukabli et Mamouni, 2006). Parmi ces variétés, on trouve celles qui ont une fructification terminale comme Scheinovo et d'autres qui présentent une fructification latérale comme Izvo (Serrar, 2007). Environ 650000 plantes ont été distribuées et installées dans différentes régions du Maroc. Les agriculteurs dénomment ce noyer par le terme Roumi (Oukabli et Mamouni, 2006). Une étude a été réalisée sur ces variétés par L'INRA de Mèknès concernant leur comportement dans les conditions edapho-climatiques du domaine expérimental de Ain Taoujdate. Les résultats obtenus ont montré que ces variétés sont à débourrement précoce et que ce matériel végétal ne

présente pas une authenticité certaine. Les plantes introduites sont des semis de noix non greffés (Bamouh, 2006).



**Figure 7 :** Quelques variétés du noyer mondial (Bernard, 2018)





**Clone marocain Boug. 1**



**Clone marocain Boug.2**



**Variété Silistrenski**



**Clone marocain Boug.5**

**Figure 8 :** Quelques clones locaux du noyer marocain (Boug 1, Boug2 et Boug 5) et une variété introduite (Silistrenski) (Bamouh, 2006)

## **II.2. Diversité génétique du noyer**

Généralement l'étude de la diversité génétique des espèces végétales est effectuée à l'aide de trois types de marqueurs génétiques : les marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires (Govindaraj et al., 2015). Ces marqueurs sont devenus un outil primordial pour définir les méthodes et les priorités dans les programmes de conservation et d'amélioration des espèces végétales (Stockwell et al. 2003). Ils fournissent des opportunités pour les sélectionneurs afin de développer des cultivars améliorés avec les caractéristiques désirées, qui comprennent à la fois les caractères préférés par les agriculteurs (rendement, qualité du fruit, etc.) et les caractères recherchés par les sélectionneurs (résistance aux parasites et aux maladies et photosensibilité, etc.).

Au cours de la dernière décennie, plusieurs travaux ont été effectués dans l'objectif d'évaluer la diversité génétique du noyer impliquant aussi bien les paramètres morpho-pomologiques que les marqueurs moléculaires. Les résultats de l'ensemble de ces études ont été d'une grande utilité pour comprendre la structure génétique des formes cultivées et sauvages de cette espèce.

### **II.2.1. Caractérisation morphologique**

Dans les programmes de sélection des plantes, les caractères morphologiques sont les premiers à être observés. Ces caractères sont utilisés pour estimer la variation intra et inter-population. Cette méthode nécessite un échantillonnage important et rigoureusement organisé (Govindaraj et al., 2015). Les marqueurs morphologiques sont généralement limités en nombre de caractères relevés, dominants et influencée par l'environnement. Néanmoins, ils fournissent des informations utiles pour décrire et identifier le matériel biologique (Andersson et al. 2006). Ces marqueurs morphologiques sont la première étape à entamer dans les programmes d'évaluation de la diversité génétique des espèces végétales. Ils ne doivent pas être négligés malgré leurs limites car ils constituent les critères utilisés pour décrire et identifier les taxons, les lignées et les variétés chez les végétaux (Rampant, 2006). Ainsi, plusieurs travaux se sont intéressés à la caractérisation morphologique des cultivars du noyer.

Dans ce contexte, une étude des paramètres morphologiques des noix et des cerneaux a révélé une grande diversité entre les cultivars iraniens (Ghasemi et al., 2012). D'autre part, cette étude a montré que les génotypes ayant un poids de noix, un poids du cerneau et un pourcentage du cerneau supérieurs à 6 g, 12 g et 50%, respectivement, pourraient être utilisés pour la culture ou comme parents dans les programmes de sélection des nouvelles variétés.

En Inde également, Angmo et al. (2015) ont étudié quatre génotypes du noyer, sélectionnés des différentes régions du Ladakh ( $G_1$  de Skara,  $G_2$  de Nurla,  $G_3$  de Temisgam et  $G_4$  de Dhomkhar), afin d'évaluer la diversité génétique de cette espèce dans cette région. Les génotypes étudiés ont montré une variabilité importante des caractères liés à l'arbre, aux feuilles, aux noix et aux cerneaux. Les génotypes  $G_2$ ,  $G_3$  et  $G_4$  se sont distingués en termes de la qualité du fruit et peuvent être utilisés dans des programmes d'amélioration de la culture de cette espèce.

En plus, un travail a été effectuée par Akca et al. (2015), afin d'évaluer la diversité génétique et de sélectionner le génotype performant entre 25 000 arbres du noyer cultivés dans le district de Kemah Turc. Le résultat a permis de déterminer le rapport de la fructification latérale (50 to 80%) et le temps de feuillage qui est révélé moyen. Le poids, la longueur, le diamètre et l'épaisseur de la coque variaient respectivement de 11,18 à 15,20 g, de 32,55 à 36,62 mm, de 31,58 à 36,15 mm et de 1,11 à 2,33 mm. D'autre part, le poids et le pourcentage du cerneau varient de 6,14 g à 8,00 g et de 47,08 à 58,57%. En plus, le cerneau a montré une teneur en graisse et en protéines qui se situe entre 55,18 et 65,70% et entre 14,70 et 20,10%, respectivement.

Dans le même but, une autre étude, concernant 20 populations du noyer dans l'ouest de l'Espagne à l'aide de 20 traits pomologiques, a été réalisée. Les résultats obtenus ont révélé des différences très significatives entre et au sein des populations. Des variations géographiques ont été obtenues pour certains traits morphologiques.

Des corrélations significatives ( $p < 0,01$ ) ont été détectées entre les traits morphologiques et certains traits géographiques, climatiques et édaphiques.

De même, Hussain et al. (2016) ont étudié 19 écotypes locaux collectés de différentes régions du Pakistan (Hunza-Nagar, Gilgit et Gilgit-Baltistan) dans le but d'évaluer la diversité génétique et d'identifier les cultivars performants. En fait, les résultats obtenus ont révélé une large diversité génétique entre les écotypes étudiés. Alors que, les écotypes HKK de Karimabad et GNAG de Nagaral Gilgit ont été signalés comme des prometteurs avec un pourcentage du cerneau plus élevé.

Concernant le Maroc, Kodad et al. (2014) ont réalisé une étude de la diversité phénotypique de 25 géotypes qui proviennent de quatre régions : Bni Mtir, Imlile, Oukaimeden et Er-Rich. Les résultats obtenus ont montré que le noyer marocain se caractérise par une grande variabilité morphologique et que les géotypes IM5 d'Imlile, BM1 et BM3 de Bni Mtir, AM3 d'Er-Rich et MT3 de Midelt pourraient être considérés comme des sources des semences pour la multiplication du noyer au Maroc.

### **II.2.2. Caractérisation biochimique**

Une évaluation biochimique du noyer iranien, a été réalisée par Aryapak et al. (2014) sur 12 cultivars de Téhéran et de Karaj, pour évaluer sa teneur en protéines, en fibres brutes et en acides gras. Les résultats obtenus ont révélé des teneurs très élevées de ces composants et que les cerneaux du noyer iranien constituaient une source potentielle d'huile précieuse et pouvant être utilisée pour des applications comestibles et autres applications industrielles.

De même, Polat et al. (2015) ont mené une étude sur les géotypes supérieurs du noyer, durant les années 2009-2012, au sein des populations de semis dans le district central de Bitlis Turc. Des paramètres physiques et chimiques liés au fruit (la teneur en protéines, la teneur en huile et en cendres, ainsi que les teneurs en minéraux à savoir le K, le Ca, le Mg, le Cu et le Zn) ont été dosés chez 120 géotypes du noyer.

Les résultats ont montré que 17 génotypes du noyer ont été jugés prometteurs et pourraient être recommandés pour les agriculteurs de la région.

Ainsi que, une analyse des paramètres physiques et chimiques (Poids du fruit, les cendres, l'huile totale, les protéines, les glucides totaux et les polyphénols totaux) des fruits du noyer, appartenant à neuf régions du plateau de Suceava de Roumanie, a été réalisée. Les résultats obtenus ont montré certaines différences de ces paramètres entre les neuf échantillons étudiés. En plus le résultat a révélé que le cerneau roumain est principalement riche en protéines, en huile et en polyphénols (Leahu et al., 2013).

Au Portugal aussi, la composition biochimique, l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne des six cultivars du noyer, ont été analysées par Pereira et al. (2008). Les résultats obtenus ont montré que la teneur en huile allant de 78,83% à 82,14%. L'acide linoléique est le principal acide gras avec une valeur maximale de 60,30%, suivi par les acides oléique, linoléique et palmitique. En outre, tous les extraits du noyer étudiés ont montré des activités antioxydante et antimicrobienne contre différents microorganismes (bactéries et champignons).

Pour le Nouvelle Zélande, une étude réalisée sur 12 génotypes du noyer (américains, européens et néo-zelandais), cultivés dans un verger expérimental de l'Université Lincoln, a montré une teneur en huile qui varie de 62,6 à 70,3% et une teneur en protéines brutes qui varie de 13,6 à 18,1%. De même, les fibres alimentaires ont oscillé entre 4,2 à 5,2% tandis que la teneur en amidon est de 2,8% de la partie restante du cerneau. Ces données montrent bien que les noix sont riches d'un certain nombre de nutriments qui semblent avoir un effet positif sur la santé humaine (Savage et al., 2001).

Quant au Maroc, Kodad et al. (2016) ont déterminé la teneur en protéines et en huile, la composition en acides gras et la concentration du tocophérol, chez dix génotypes du noyer de la région d'Asni du Haut Atlas pendant deux ans (2009-2010). Leur résultat a montré une variabilité dans les génotypes étudiés, confirmant la

présence d'une grande diversité du noyer dans les montagnes de l'Atlas. En plus, l'effet de l'année de récolte est significatif pour tous les composants chimiques, à l'exception de la teneur en huile et du pourcentage d'acide palmitique. Pourtant, certains génotypes ont présenté des teneurs élevées en huile et en  $\gamma$ -tocophérol au cours des années d'étude et peuvent, ainsi, constituer une source de semences pour la multiplication du noyer dans la région.

### **II.2.3. Diversité moléculaire**

Contrairement aux marqueurs morphologiques et biochimiques, les marqueurs moléculaires ne sont pas influencés par les fluctuations de l'environnement et sont indépendants de l'organe analysé et des stades de développement des plantes. Ces marqueurs deviennent aujourd'hui un outil essentiel pour l'amélioration des plantes et ouvrent de nouvelles perspectives pour le sélectionneur (Najimi et al., 2003). Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de développer plusieurs marqueurs moléculaires pour l'étude de la diversité des espèces végétales tels que les marqueurs de type RFLP, AFLP, RAPD, ISSR, SSR, SNP...

#### **II.2.3.1. Marqueurs RAPD**

La technique RAPD (**R**andom **A**mplification of **P**olymorphic **D**NA) développée par Williams et al. (1990) consiste à l'amplification par PCR des fragments de l'ADN génomique en utilisant des amorces arbitraires de taille courte (10 pb). Une amorce RAPD permet généralement l'amplification d'une dizaine de fragments correspondant à des locus dominants. Cette technique est simple, rapide et ne nécessite ni un marquage radioactif ni une connaissance préalable de la séquence nucléotidique. Néanmoins, sa grande faiblesse est la dominance des marqueurs et la faible reproductibilité, puisqu'elle est très sensible à la concentration de l'ADN et aux conditions d'amplification (Williams et al., 1990).

En effet, cette technique a été réalisée chez huit génotypes du noyer turc. Au total, 45 amorces ont été testées, mais 37 amorces qui sont révélées polymorphes et reproductibles. Ces amorces ont produit 513 bandes, dont 340 sont polymorphes. Le

dendrogramme réalisé à partir de ces marqueurs a divisé les huit génotypes en trois principaux groupes. Les différences enregistrées entre ces génotypes suggèrent qu'ils proviennent des parents génétiquement divergents ou ont une adaptation au microclimat de leurs régions (Erturk et al., 2011).

### **II.2.3.2. Marqueurs RFLP**

Les marqueurs RFLP (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) constituent des marqueurs moléculaires basés sur les techniques d'hybridation. Les RFLP sont les premiers marqueurs moléculaires développés et ont été utilisés en 1980 dans la construction de la carte génétique humaine (Bostein et al., 1980). Quelques années plus tard, ces marqueurs sont adoptés pour la cartographie du génome végétal (Helentjaris et al., 1986). La technique RFLP développée par Botstein et al. (1980), repose sur la mise en évidence de la variabilité de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction révélée par hybridation avec une sonde marquée. Bien que cette technique soit codominante, elle est lente et laborieuse. Les étapes de transfert et d'hybridation empêchent une automatisation du travail (Najimi et al., 2003). Le polymorphisme entre deux individus peut être détecté chaque fois que des fragments de restriction des tailles différentes sont révélés par la même enzyme (Et-Touil, 1998).

Ces marqueurs ont été appliqués par Fjellstrom et al. (1994) pour étudier la diversité génétique de 48 cultivars du noyer de la Californie et des différents pays du monde. 16 marqueurs RFLP de l'ensemble de 21 marqueurs testés, étaient polymorphes chez les accessions étudiées. En plus, les résultats ont montré que le germoplasme du noyer californien contient 60% de la diversité allélique mondiale. Le matériel génétique de la Californie est associé au matériel génétique de la France, d'Europe centrale et d'Iran et il a une faible similitude génotypique avec le matériel génétique du Népal, de la Chine, de la Corée et du Japon.

### **II.2.3.3. Marqueurs AFLP**

La technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) a été décrite pour la première fois par Vos et al. (1995). Elle est fondée sur la mise en évidence conjointe du polymorphisme des sites de restriction et d'hybridation des amorces arbitraires. Cette technique, rapide et stable, connaît une large application dans l'identification des cultivars et la détermination de leur relation phylogénétique (Lamara, 2010).

En Chine, une évaluation de la diversité génétique de 35 cultivars du noyer, provenant de huit régions du plateau occidental du Sichuan et les régions montagneuses de Qinba, est réalisée par Xu et al. (2012) à l'aide de 28 marqueurs AFLP et 32 marqueurs RAPD. Les résultats obtenus ont montré que 324 et 2155 fragments ont été produits par les marqueurs RAPD et d'AFLP respectivement. Ainsi, un pourcentage de polymorphisme de 86,1% pour RAPD et de 57,2% pour AFLP. La grande diversité génétique détectée avec l'usage de ces marqueurs indique que la Chine occidentale possède un important pool de la diversité génétique du noyer.

### **II.2.3.4. Marqueurs SSR**

Les SSR ou les microsatellites sont constitués des répétitions en tandem des motifs mono, di, tri, ou tétra-nucléotidiques sur une longueur inférieure à 100 paires de bases (Tautz 1989). De tels motifs sont très nombreux dans le génome des organismes eucaryotes. En effet, les SSR présentent un taux du polymorphisme extrêmement élevé qui repose sur la variation du nombre des unités de répétition (n) constituant le microsatellite. Chaque locus microsatellite est encadré par des séquences qui lui sont spécifiques et qui permettent d'y définir des amorces pour en faire l'amplification par PCR. Les microsatellites sont des marqueurs codominants, extrêmement polymorphes, faciles à manipuler et permettant le multiplexage. Ils requièrent très peu d'ADN et sont bien répartis dans le génome. Ces marqueurs sont très reproductibles et moins lourds d'utilisation que les RFLP ou AFLP avec une bonne résolution analytique. Un inconvénient qui reste cependant est le développement des marqueurs microsatellites,



c'est-à-dire la définition des amorces bordantes spécifiques, qui est un travail assez lourd. (Lamara, 2010).

En Italie, Vischi et al. (2017) ont réalisé une étude sur 215 accessions sauvages du noyer à l'aide de 22 amorces SSR. Les résultats obtenus ont montré une diversité génétique modérée avec 80 allèles. L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) a révélé que la grande diversité moléculaire réside entre les individus (98%). D'autre part, les résultats ont élaboré la formation de deux groupes. Le premier groupe englobe la plupart des échantillons et il a révélé un excellent mélange génétique, alors que le deuxième groupe est constitué seulement des trois échantillons introduits de la Russie au début du 20ème siècle.

De même, une étude effectuée sur 189 génotypes, provenant de 14 pays des trois continents à l'aide de dix marqueurs SSR, a montré une différenciation globale relativement faible entre les régions étudiées ( $F_{ST} = 0,07$ ). En plus, l'analyse hiérarchique n'a pas montré de regroupement en fonction de l'origine géographique. D'autre part, le logiciel STRUCTURE a confirmé ces résultats et il a divisé les accessions en deux principaux groupes, en séparant les accessions provenant de l'Europe et de l'Afrique du Nord de celles qui proviennent de la Grèce et du Proche-Orient. Ces résultats indiquent la présence d'un centre probable de la diversité du noyer en Europe de l'Est et du Sud-Est (Ebrahimi et al., 2016).

### **II.2.3.5. Marqueurs ISSR**

L'ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) est une technique basée sur l'amplification des régions situées entre les microsatellites (SSR), en utilisant des amorces constituées de 15 à 20 nucléotides à simple séquence répétée comme [AC] $n$  (Kahl, 2001) (Figure 9). En général, les locus microsatellites sont régulièrement distribués en grand nombre à travers le génome d'eucaryote, fournissant ainsi un pool riche en potentiels marqueurs ISSR convenables pour révéler la diversité génétique étroitement associée aux accessions (Wiesner et Wiesnerová, 2003). Les ISSR sont donc des marqueurs non spécifiques de locus, de type dominant. L'avantage de cette

technique est qu'elle ne nécessite pas de connaissance préalable de la séquence étudiée (Dubé, 2009) et qu'elle permet d'amplifier un grand nombre de fragments d'ADN par réaction. Par conséquent, elle révèle un taux de polymorphisme élevé et elle est reproductible, à cela s'ajoute la simplicité et le faible coût (Zietkiewicz et al., 1994).

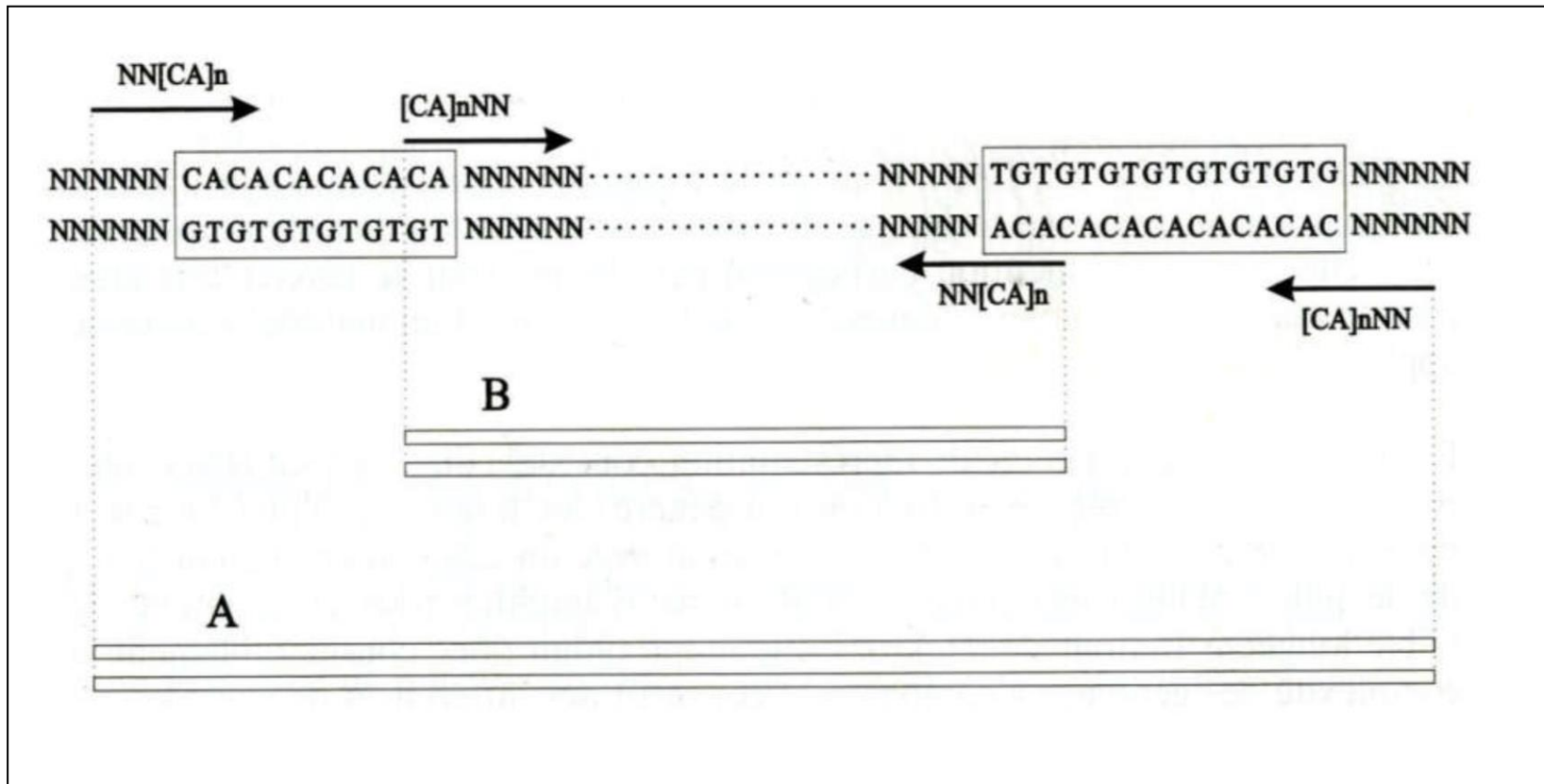
Christopoulos et al. (2010) ont utilisé ces marqueurs moléculaires pour évaluer et comparer la diversité génétique entre le noyer sélectionné des populations indigènes grecques et des génotypes qui proviennent des autres pays. Les résultats obtenus ont montré que les valeurs du coefficient de similarité entre les 56 accessions examinées varient de 0,13 à 0,93, ce qui indique la présence d'un niveau élevé de la variabilité génétique. En plus, les génotypes de la population indigène grecque ont été plus diversifiés que les cultivars des autres pays. Ce résultat suggère l'utilisation des écotypes locaux dans les programmes de sélection et de gestion du germoplasme afin de maximiser la diversité génétique du noyer cultivé.

#### **II.2.3.6. Marqueur SNP**

Les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) et prononcé « snip » sont basés sur des changements ponctuels d'une base dans une séquence donnée. Ils constituent la forme de variation la plus simple et la plus fréquente au sein des génomes. Les SNP sont des substitutions d'un seul nucléotide engendré par une mutation ponctuelle qui crée différents allèles à un même locus. Ces marqueurs sont généralement bi-alléliques, codominants et permettent d'appréhender les variations des gènes impliqués dans le contrôle des caractères d'intérêt (Ben Ayed, 2017).

En Italie, Ciarmiello et al. (2011) ont analysé 18 cultivars du noyer provenant de l'Italie, de la Hongrie, de la France, des États-Unis, de l'Espagne, du Portugal et de la Grèce. Ces auteurs ont caractérisé le premier et le second espaceur interne transcrits (ITS1 et ITS2) ainsi que la région codante 5.8S intermédiaire du gène de l'ARNr. Ils ont trouvé une variance de la longueur allant de 257 à 263 bases et de 217 à 219 bases, pour ITS1 et de ITS2, respectivement. La variation du contenu en GC a également observée (55–56,7% pour ITS1 et 57,1-58,9% pour ITS2). Ces données ont montré la

présence de polymorphisme entre les cultivars étudiés. L'alignement des séquences ITS1-5.8S-ITS2 de 18 cultivars du noyer a montré qu'il existe 244 polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) et 1 courte insertion-délitions (indel) à l'extrémité 5' de ITS1. Les résultats ont montré que les régions ITS1 et ITS2 peuvent être utilisées pour la discrimination du noyer.



**Figure 9** : Principe de l'ISSR. Si les bases arbitraires de l'amorce sont du côté 5', on obtiendra le produit d'amplification A, si elles sont du côté 3' le produit B (De Vienne,1998)

**CHAPITRE II :**  
**ETUDE DE LA VARIABILITE**  
**MORPHOLOGIQUE ET**  
**POMOLOGIQUE DU NOYER**

Dans le but de préserver les ressources génétiques du noyer au Maroc, il est nécessaire de repérer les différentes accessions dans leur aire de répartition et d'évaluer leur diversité génétique qui présente une importance capitale pour tout programme visant à conserver et améliorer la culture de cette espèce. Dans cette optique, il a été procédé dans une première étape à une évaluation de la diversité phénotypique des cultivars provenant de diverses régions du Maroc. Nous décrivons dans une première partie le matériel biologique utilisé et les méthodes d'évaluation de la diversité phénotypique et dans une deuxième partie, nous présentons les résultats expérimentaux de la variabilité morphologique des accessions considérées.

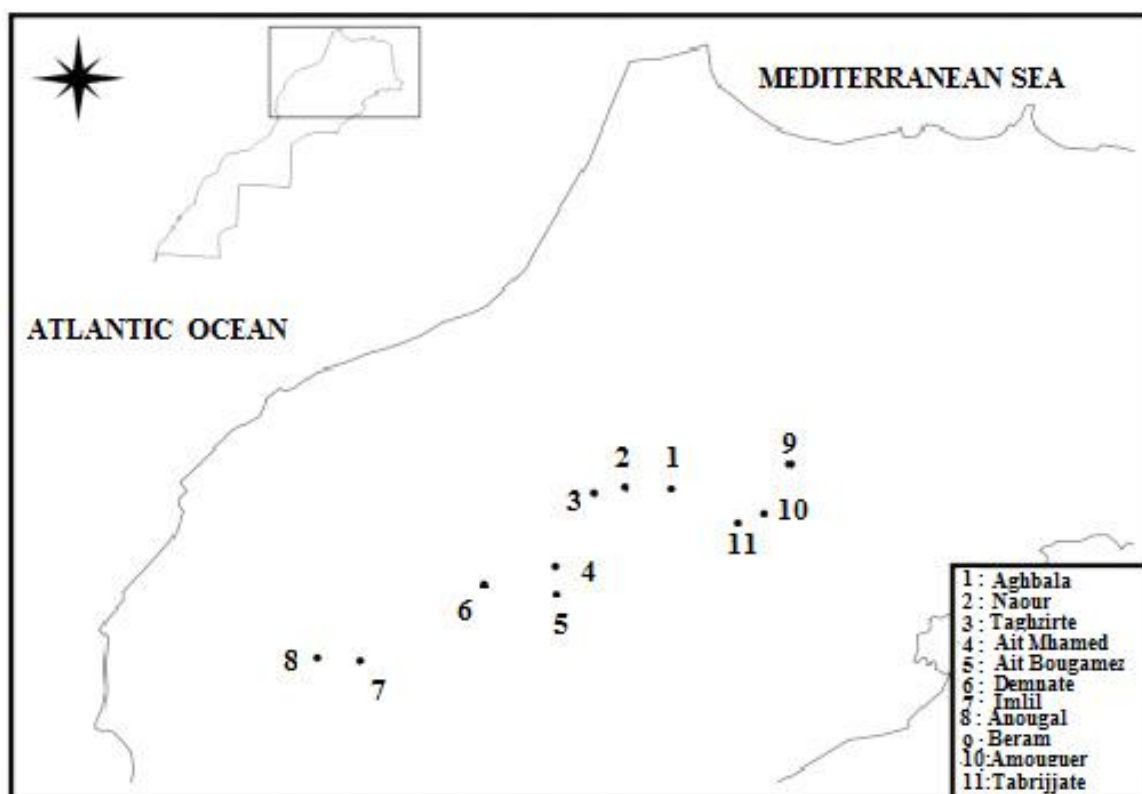
## **I. MATERIEL ET METHODES**

### **I.1. Matériel végétal**

Les prospections menées au début de l'année 2014 dans les zones de la culture du noyer au Maroc, ont permis de repérer 11 sites. La localisation géographique et les principaux facteurs écologiques des accessions étudiées sont résumés dans la figure 10 et le tableau 2. Dix arbres sont échantillonnés de chaque accession, en prenant en considération la distance entre les arbres. Pour chaque arbre, dix feuilles bien développées et 20 fruits mûrs et sains sont prélevés de différents côtés et hauteurs de l'arbre.

### **I.2. Caractères morphologiques et pomologiques considérés**

L'évaluation de la diversité phénotypique des arbres du noyer a été abordée par des critères liés aussi bien aux feuilles qu'aux fruits. Nous avons mesuré 31 caractères morphologiques qui figurent dans les descripteurs du noyer de l'IPGRI (International Board for Plant Genetic Resources, 1994) et de l'UPOV (International Union for The protection of New Varieties of Plants, 1999). Le choix des caractères est basé sur l'importance économique et la possibilité de leur introduction dans les programmes d'amélioration de cette espèce (Tableau 3). Les observations et les mesures sont réalisées selon les illustrations citées dans les mêmes descripteurs. Les caractères liés aux fruits sont mesurés un mois après la récolte, une fois la teneur en eau dans les fruits est inférieure à 8 %.



**Figure 10** : Répartition géographique des accessions étudiées.

**Tableau 2** : Les principaux paramètres géographiques et écologiques des accessions étudiées.

Accessions	Code	Origine	Zone	Altitude (m)	Pluviométrie (mm/an)	Température minimale et maximale
<b>Aghbala</b>	AGH	32 Km Nord-Est d'Aghbala	Moyen Atlas	1799	450	10°C ; 37°C
<b>Naour</b>	NAO	Centre de Naour	Moyen Atlas	1300	600	5°C ; 30°C
<b>Taghzirte</b>	TAG	12 Km Est de Tagzirte	Moyen Atlas	650	700	9°C ; 45°C
<b>Ait Bougamez</b>	ABZ	Centre d'Ait Bougamez	Haut Atlas	1996	580	1°C ; 30°C
<b>Ait Mhamed</b>	AMD	20 Km Sud-Est d'Azilal	Haut Atlas	1728	450	5°C ; 36°C
<b>Demnate</b>	DEM	3 km Sud-Est de Demnate	Haut Atlas	932	350	5°C ; 39°C
<b>Imlil</b>	IML	17 km Sud d'Asni	Haut Atlas	1763	459	5°C ; 35°C
<b>Anougal</b>	ANG	40 km Sud d'Amzmiz	Haut Atlas	1569	681	3°C ; 48°C.
<b>Beram</b>	BER	5 km Sud de Midelt	Haut Atlas	1521	210	5°C ; 19°C
<b>Amouguer</b>	AMG	40 km Oust de Rich	Haut Atlas	1569	250	4° C ; 38°C
<b>Tabrijjate</b>	TBR	70 km Est d'Imilchil	Haut Atlas	1831	319	5° C ; 38°C

<b>-Les caractères des feuilles</b>		Largeur du bourrelet de suture	IBS
Longueur des feuilles	LF	Importance du bourrelet de suture	IBS
Largeur des feuilles	IF	Forme de la base perpendiculaire à la suture	FBPS
Nombre des folioles	NFI	Forme du sommet perpendiculaire à la suture	FSPS
Forme de la foliole latérale	FFIL	Importance de la pointe	IP
Largeur des folioles	IFI	Structure de la surface de la coque	SSCq
Longueur des folioles	LFI	Couleur de la coque	CrCq
Marge des folioles	MFI	Rigidité de la coque	RCq
Couleur des feuilles	CF	Adhérence des deux moitiés de la coque	ADMCq
Couleur du rachis	CR	Epaisseur de la coque	ECq
<b>-Caractères des noix</b>		<b>-Caractères du cerneau</b>	
Forme de la noix en vue latérale	FNVL	Difficulté d'extraction du cerneau	DEC
Forme de la noix en vue ventrale	FNVV	Poids du cerneau	PC
Largeur de la noix	IN	Pourcentage du cerneau	PrC*
Longueur de la noix	LN	Remplissage du cerneau	RmC
Poids de la noix	PN	Couleur du cerneau	CrC
Position du bourrelet de suture	PBS	Flaveur du cerneau	FC

**Tableau 3 :** Caractères morphologiques et pomologiques mesurés.

$$* \text{ Pourcentage du cerneau} = \frac{\text{Poids du cerneau}}{\text{poids de la noix}} \times 100$$





### **I.3. Analyses statistiques des données**

Les variables mesurées ont été soumises à différentes méthodes d'analyses statistiques : analyse de la variance, comparaison des moyennes, analyses en composantes principales et une classification hiérarchique ascendante. Ces techniques d'emploi sont généralisées dans l'évaluation des ressources phytogénétiques. Les caractères étudiés sont considérés comme des variables dont la description peut être résumée par deux paramètres statistiques : la moyenne et la variance.

- **Analyse de variance :**

Une analyse de variance à un seul critère de classification a été utilisée pour comparer les différences entre les accessions. Dans le cas où l'hypothèse d'homogénéité des moyennes n'est pas acceptée, le test de la différence significative minimale (LSD) est utilisé pour comparer les moyennes des accessions.

- **Analyse en composantes principales :**

Pour mieux estimer la divergence entre les accessions, nous avons procédé à une analyse multivariée traitant simultanément toutes les données : il s'agit de l'analyse en composantes principales (ACP). Cette analyse décrite par de nombreux auteurs est basée sur des combinaisons des caractères quantitatifs. Ensuite une classification hiérarchique ascendante, selon la méthode des groupes-paires non pondérés avec moyenne arithmétique (UPGMA), est exécutée en utilisant le logiciel Statistica StatSoft (1997).

## **II. RESULTATS**

### **II.1. Etude des caractères séparés**

Dans ce qui suit nous rapportons les résultats des analyses statistiques tout en focalisant sur les caractères pris séparément en ciblant une analyse de la variance suivie d'une comparaison des moyennes.

L'analyse de la variance à un seul facteur de classification (effet génotype) montre un effet significatif voir hautement significatif pour la majorité des paramètres

témoignant d'une hétérogénéité importante entre les accessions étudiées du noyer. Ce résultat révèle que les caractères utilisés se montrent très efficaces aussi bien pour l'estimation de la variabilité génétique que pour la discrimination des accessions étudiées.

### **II.1.1. Traits morphologiques des feuilles**

Les résultats obtenus ont montré que les traits morphologiques présentent une différence très importante entre les accessions à l'exception du nombre et la marge des folioles (Tableau 4).

Les feuilles révélées avec une couleur verte, sont caractérisées par une longueur moyenne qui varie de 37,98 cm (Aghbala) à 44,25 cm (Anougal) avec une moyenne générale de 41,52 cm et une largeur qui varie de 24,46 cm (Taghzirte) à 27,17 cm (Beram) avec une moyenne générale de 25,85 cm (Figure 11). En outre, elles sont composées d'un nombre de folioles oscillant entre 5 et 9 avec une foliole latérale d'une forme elliptique large chez toutes les accessions à l'exception de l'accession Demnate, qui a montré une foliole latérale elliptique. Elles ont aussi montré une marge entière et une couleur du rachis variant entre le vert, le jaune et le rouge (Figure 12).

Les dimensions des folioles ont enregistré également une variation importante. En effet, la longueur de la foliole a enregistré une valeur minimale de 9,37 cm (Taghzirte) et une valeur maximale de 11,16 cm (Imlile) avec une moyenne générale de 10,75 cm. Concernant la largeur des folioles, la valeur la plus élevée a été enregistré chez Tabrijjate (6,22 cm) et la valeur la plus faible a été obtenue chez Taghzirte (4,98 cm), avec une moyenne générale de 5,48 cm.

### **II.1.2. Traits pomologiques**

Pour les caractères relatifs aux fruits, on note que l'ensemble des paramètres mesurés montrent des différences significatives entre les accessions étudiées (Tableau 5, Figure 13). Ceci montre bien que ces accessions présentent une diversité phénotypique très importante.

En général, les accessions étudiées se sont révélées avec des noix d'une forme elliptique large avec un poids qui varie de 8,26 g pour Aghbala à 10,20 g pour Tabrijjate et une moyenne générale de 9,48 g. Concernant la taille de noix, on note également une variabilité entre les accessions étudiées, avec une longueur qui varie de 32,08 mm (Demnate) à 38,11 mm (Imlil) et une largeur, elle varie de 27,39 mm chez Demnate à 31,50 mm chez Tabrijjate. Pour l'épaisseur de coque de la noix, elle oscille entre 1,33 mm pour Amouguer et 1,83 mm pour Ait Mhamed avec une valeur moyenne de 1,60 mm. D'une part, on note que les noix des différentes accessions présentent un bourrelet de suture avec une largeur étroite ou moyenne qui s'est étalé soit sur la moitié supérieure ou sur les deux tiers supérieurs de la coque, ou bien sur la totalité de la coque comme le cas d'Ait Bougamez. En outre, on remarque que 27% des noix analysées sont révélées avec une couleur claire, 64% avec une couleur moyenne, et 9% avec une couleur foncée, mais elles se sont toutes révélées moyennement sillonnées, avec une dureté intermédiaire. De même, les noix ont montré une adhérence moyenne des deux valves de la coque. Ce résultat est très intéressant, puisque ce caractère est très recherché par les sélectionneurs, parce qu'il influence la manière d'extraction du cerneau.

Concernant le cerneau qui présente la partie comestible, on note que l'accession Amouguer présente la valeur la plus élevée (4,13 g). Cependant, l'accession Aghbala présente la valeur la plus faible (2,86 g) avec une moyenne générale chez l'ensemble des accessions étudiées de 3,71 g. Ainsi, l'accession Amouguer se distingue par un pourcentage de cerneau élevé (43,76). Le poids et le pourcentage du cerneau sont très influencés par la facilité d'extraction qui est généralement moyenne. Pour la couleur du cerneau, qui est un critère très recherché, on note que 9% des accessions se sont révélées avec un cerneau clair, 55% avec un cerneau ambre et 36% avec un cerneau très ambre (Figure 14). De même pour la saveur, qui est également un critère indispensable, elle est révélée satisfaisante chez toutes les accessions.

**Tableau 4** : Caractères morphologiques mesurés liés aux feuilles des 11 accessions étudiées.

Cractères	Taghzirte	Tabrijjate	Amouguer	Anougal	Ait Mhamed	Imlil	Beram	Aghbala	Naour	Ait bougamez	Demnate	Moyenne	F
<b>LF (cm)</b>	39,14±3,19a	42,14±3,76b	39,39±4,14a	<b>44,25±6,51b</b>	43,35±5,54b	44,14±5,88b	42,80±4,19b	<b>37,98±3,85a</b>	39,28±4,06a	40,17±4,75a	44,08±3,12a	41,52	4,68***
<b>IF (cm)</b>	<b>24,46±2,20ab</b>	25,91±4,29a	27,11±3,06c	25,47±3,95a	24,90±2,99a	27,03±3,67c	<b>27,17±3,09c</b>	24,7±4,11a	25,50±6,42b	25,46±3,20a	26,65±4,09c	25,85	6,23***
<b>NFI</b>	<b>8,75± 0,62b</b>	7,5±1,06 a	8,05±1,03ac	8,34±0,90bc	8,62±0,68b	8,56±0,98b	8,67±0,94b	7,6±1,03a	<b>7,38±1,66a</b>	8,37±0,83bc	8,60±0,77b	8,24	1,77
<b>FFIL</b>	2,46±0,76ab	<b>2,95±0,20c</b>	2,52±0,64b	2,42±0,65ab	2,77±0,42bc	2,93±0,24c	2,52±0,66b	<b>2,20±0,84a</b>	2,3±0,59ab	2,67±0,70bc	2,93±0,36c	2,61	3,33***
<b>IFl (cm)</b>	<b>4,98±0,77a</b>	<b>6,22±0,96c</b>	5,31±0,67ab	5,75±1,51bc	5,59±0,78b	5,49±0,86b	5,34±0,80ab	5,35±0,95ab	5,56±1,02b	5,27±0,81ab	5,40±1,25ab	5,48	4,33***
<b>LFl (cm)</b>	<b>9,37±1,42a</b>	11,02±1,68b	10,78±1,37b	10,72±1,84b	10,51±1,14b	<b>11,16±1,57b</b>	10,53±1,56b	10,48±1,74b	10,65±2,01b	10,59±1,40b	10,49±1,65b	10,57	3,09**
<b>MFI</b>	1±00a	1±00a	1±00a	1±00a	1±00a	1±00a	1±00a	1±00a	1±00a	1±00a	1±00a	1	1,22
<b>CrF</b>	<b>5,68±1,09b</b>	5,66±0,96b	<b>4,78±1,01a</b>	5,45±1,29b	5±00a	4,81±1,55a	5±00a	5,33±1,06b	5±00a	5,12±0,49a	5±00a	5,17	3,75***
<b>CrR</b>	3,68±1,30a	3,33±0,96a	4,63±0,78c	<b>3±00a</b>	4,18±1,00bc	4,43±1,84bc	4,11±1,00b	4±1,36b	<b>6,86±0,50d</b>	4,06±1,01b	3,06±0,36a	4,12	4,14***

Les valeurs en gras sont le minimum et le maximum, niveau de signification : \*\*\*P <0,001, \*\*P <0,01, Différentes lettres indiquent des différences significatives (LSD au niveau 0,05)

**Tableau 5** : Caractères pomologique mesurés liés aux noix et aux cerneaux des 11 accessions étudiées.

Cractères	Taghzirte	Tabrijjate	Amouguer	Anougal	Ait Mhamed	Imlil	Beram	Aghbala	Naour	Ait bougamez	Demnate	Moyenne	F
<b>FNVL</b>	6,32±1,74cd	<b>4,97 ±1,97a</b>	6,43±2,02c	5,27±1,96a	5,78±2,13c	5,34±2,58b	5,86±1,92c	6,57±1,13c	5,57±2,05a	6,23±1,70c	<b>6,97±1,65d</b>	5,95	10,34***
<b>FNVV</b>	6,65±0,72d	<b>4,77 ±2,39a</b>	<b>6,70±1,30c</b>	5,94±1,56c	5,54±2,11c	5,01±2,44b	6,09±1,71c	6,65±1,10c	5,54±2,25a	6,35±1,87dc	6,26±1,81d	5,97	6,67***
<b>IN (mm)</b>	29,67±2,47b	<b>31,50±3,17a</b>	29,18±2,69b	31,24±2,74c	31,36±4,60a	31,39±2,55c	29,77±3,29ab	29,50±1,95b	30,13±2,87b	30,30±1,94a	<b>27,39±8,81a</b>	30,1	19,87***
<b>LN (mm)</b>	34,13±2,81b	35,07±3,62bc	35,11±3,53c	37,02±3,36d	36,45±4,63a	<b>38,11±3,27e</b>	34,84±4,36ac	35,23±2,12ac	36,08±3,77a	36,74±3,13d	<b>32,08±10,82a</b>	35,46	17,27***
<b>PN (g)</b>	9,24±1,61c	<b>10,20±2,11b</b>	9,42±2,83c	9,84±2,14b	10,14±4,00b	9,28±2,12c	9,71±2,64b	<b>8,26±2,05b</b>	9,79±2,94b	9,54±1,55b	8,91±3,51b	9,48	7,61***
<b>PBS</b>	2,15±0,75d	1,58±0,75b	1,61±0,91b	<b>1,22±0,48a</b>	1,73±0,68b	1,74±0,76b	1,86±0,77c	1,96±0,93c	2,15±0,65d	<b>2,44±0,79e</b>	2,03±1,04c	1,86	13,12***
<b>LBS</b>	3,94±0,99b	4,68±0,80ef	4,84±0,73f	<b>5,24±0,86g</b>	4,60±1,53e	5,04±0,94g	4,36±0,97cd	4,34±0,94d	4,12±1,31c	<b>3,59±0,93a</b>	3,70±0,95a	4,4	8,95***
<b>IBS</b>	4,32±1,10a	4,94±0,58c	4,60±1,13b	4,86±0,86c	4,64±0,76b	5,02±0,92cd	<b>5,26±1,12d</b>	4,98±0,77c	<b>4,19±0,99a</b>	4,48±0,96b	4,51±1,37b	4,71	6,2***
<b>FBPS</b>	1,77±0,50b	2,15±0,62d	<b>1,45±0,55a</b>	2,19±0,51d	2,02±0,47c	<b>2,20±0,63d</b>	1,78±0,71b	1,54±0,73a	2,06±0,93c	1,72±0,69b	1,82±1,20a	1,88	9,25***
<b>FSPS</b>	<b>3,06±0,64d</b>	2,84±0,58bc	2,68±0,46b	2,69±0,54b	2,41±0,55a	2,24±0,80a	2,85±0,85c	2,25±0,53a	<b>2,17±0,87a</b>	2,62±0,73b	3,03±0,94c	2,62	11,3***
<b>IP</b>	<b>3,05±0,64a</b>	3,87±0,99b	3,54±0,95a	3,94±1,09b	3,72±1,03ab	<b>4,9±0,77d</b>	3,99±1,20b	4,4±1,16c	3,58±0,92a	4,02±1,10b	3,89±1,09b	3,9	3,05***
<b>SSCq</b>	2±00bc	2,38±0,49d	<b>1,76±0,65a</b>	2,35±0,64d	2,62±0,86ef	2,51±0,64e	<b>2,70±0,81f</b>	2,65±0,55ef	2,16±0,36c	2,14±0,37c	2,10±0,30bc	2,31	18,32***
<b>CrCq</b>	<b>6,42±1,48f</b>	4,40±2,48cd	3,96±1,71bc	4,15±1,19c	5,15±2,20e	5,25±1,45e	3,86±1,45b	3,88±1,66b	4,40±1,99d	<b>3,37±1,65a</b>	4,97±0,61e	4,53	40,79***
<b>RCq</b>	4,70±0,77b	5,48±1,15d	4,68±0,93b	5,53±1,35d	5,27±0,91d	4,34±1,10a	5,32±0,88cd	5,1±0,99c	5,18±0,70cd	<b>4,33±1,00a</b>	<b>5,71±1,83d</b>	5,06	7,19***
<b>ADMCq</b>	4,65±0,78b	5,24±0,73d	4,47±0,88b	<b>4,18±1,30a</b>	5,21±1,02d	4,30±1,25ab	5,15±1,15cd	5,12±1,01cd	<b>5,5±0,99e</b>	4,35±1,00ab	4,96±0,84c	4,83	9,84***
<b>ECq (mm)</b>	1,57±0,32c	1,71±0,30d	<b>1,33±0,40a</b>	1,69±0,46d	<b>1,83±0,51e</b>	1,55±0,38c	1,66±0,41d	1,50±2,88bc	1,61±0,36cd	1,44±0,38b	1,72±0,34d	1,6	4,07***
<b>DEC</b>	4,3±1,01a	<b>5,7±1,22a</b>	4,56±0,98b	5,28±1,18d	4,87±1,36c	4,7±1,34bc	4,66±1,41bc	4,3±1,16a	4,79±1,14c	<b>4,25±0,99a</b>	5,24±1,32d	4,79	8,58***
<b>PC (g)</b>	3,71±1,12bc	4,02±1,15ce	<b>4,13±1,48 e</b>	3,62±1,38bc	3,61±1,36bc	3,87±1,36c	3,78±1,27bc	<b>2,86±1,11a</b>	3,77±1,69bc	4,01±1,12ce	3,45±1,25b	3,71	5,56***
<b>PrC (%)</b>	39,45±8,94cd	38,72±7,23c	<b>43,76±9,74e</b>	35,49±9,40ab	36,71±11,17b	41,16±10,23d	38,8±8,14c	33,61±10,03a	37,73±9,67c	42,01±8,42de	<b>33,65±9,90ab</b>	38,28	5,3***
<b>RmC</b>	6,39±1,17d	<b>6,45±1,24d</b>	5,82±1,50bc	<b>5,26±1,58a</b>	6,31±1,33cd	5,60±1,62b	6±1,37c	5,56±1,68b	6,27±1,12d	<b>6,45±1,15d</b>	6,24±1,34cd	6,03	9,55***
<b>CrC</b>	<b>3,6±0,58</b>	2,72±0,96	3,32±0,66	3,21±0,76	2,94±0,78	3,36±0,89	3,22±0,69	<b>2,57±0,99</b>	3,25±0,82	2,73±0,78	3,25±0,51	3,11	26,07***
<b>FC</b>	1,06±0,25	1,04±0,20	1,05±0,22	1,30±0,46	1,06±0,25	1,15±0,36	<b>1,07±0,26</b>	1,31±0,46	<b>1,02±0,14</b>	1,02±0,14	1,08±0,28	1,11	7,83***

Les valeurs en gras sont le minimum et le maximum, niveau de signification : \*\*\*P <0,001, \*\*P <0,01, Différentes lettres indiquent des différences significatives (LSD au niveau (0,05))



**Figure 11** : Exemple de la variabilité morphologique des feuilles des accessions étudiées.



**Figure 12** : Formes de la foliole latérale (A) et différentes couleurs du rachis (B) des feuilles des accessions étudiées.





**Figure 13** : Exemple de la forme des noix en vue latérale (C) et en vue ventrale (D) des accessions analysées.



**Figure 14 :** Différentes couleurs du cerneau des accessions étudiées.

## **II.2. Etude multivariée de la diversité phénotypique**

Afin d'élucider la structure globale de la variabilité morphologique, il est nécessaire de réaliser une analyse conjointe de toutes les variables. Les valeurs obtenues ont été soumises à une analyse en composantes principales (ACP) qui donne une matrice de corrélation entre les caractères retenus ainsi qu'une représentation graphique des individus dans un espace défini par les composantes principales.

### **II.2.1. Matrice des coefficients de corrélations**

L'examen de cette matrice des coefficients de corrélation montre que pour les 450 corrélations obtenues entre les différentes variables, 416 corrélations sont hautement significatives (Tableau 6). Plusieurs constatations découlent de l'analyse de ce tableau.

De fortes corrélations positives sont enregistrées entre de nombreux paramètres

:

- La longueur de la feuille (LF) est corrélée à la largeur de la feuille ( $r=0,97^{***}$ ), à la longueur de la foliole (LFI) ( $r=0,96^{***}$ ) et à la longueur de la noix (LN) ( $r=0,95^{***}$ ), alors que la largeur (IF) est corrélée avec la longueur de la foliole (LFI) ( $r=0,95^{***}$ ) et la longueur de la noix (LN) ( $r=0,93^{***}$ ).
- Le nombre de folioles (NFI) a enregistré une forte corrélation avec la forme de la foliole latérale (FFIL) ( $r=0,98^{***}$ ) et la largeur de la noix (IN) ( $r=0,68^{***}$ ).
- Le poids du cerneau (PC) est corrélé au nombre de folioles (NFI) ( $r=0,97^{***}$ ), à la forme de la foliole latérale (FFIL) ( $r=0,97^{***}$ ), à la forme de la noix (FNVV) ( $r=0,97^{***}$ ) et au pourcentage du cerneau (PrC) ( $r=0,98^{***}$ ).
- Le poids de la noix (PN) est corrélé à la longueur et à la largeur de la feuille (LF,  $r=0,92^{***}$ ; IF,  $r=0,90^{***}$  respectivement), à la longueur de la foliole (LFI,  $r=0,92^{***}$ ), à la longueur de la noix (LN,  $r=0,94^{***}$ ), à la forme de la base perpendiculaire à la suture (FBPS,  $r=0,92^{***}$ ), au remplissage (RmC,  $r=0,93^{***}$ ) et à la couleur du cerneau (CrC,  $r=0,95^{***}$ ).

- Le remplissage du cerneau (RmC) est corrélé au poids de la noix (PN ;  $r=0,93^{***}$ ), à la couleur du cerneau (CrC,  $r=0,97^{***}$ ) et à la longueur et à la largeur des feuilles ( $r=0,94^{***}$ ,  $r=0,92^{***}$  respectivement).

De même, des corrélations négatives élevées ont été enregistrées entre certains paramètres :

- Le nombre de folioles est corrélé à la longueur et à la largeur de la feuille et au poids et à la longueur de la noix (LF,  $r=-0,95^{***}$  ; IF,  $r=-0,93^{***}$  ; PN,  $r=-0,90^{***}$  ; LN,  $r=-0,91^{***}$  ; respectivement).

- Une forte corrélation entre le poids du cerneau (PC) et la longueur de la feuille (LF), la largeur de la feuille (IF), la longueur de la foliole (LFl), la longueur de la noix (LN), le poids de la noix (PN), la forme de la base perpendiculaire à la suture (FBPS), le remplissage du cerneau (RmC) et la couleur du cerneau (CrC) avec des coefficients respectifs de  $-0,95$  ;  $-0,93^{***}$  ;  $-0,93^{***}$  ;  $-0,93^{***}$  ;  $-0,92^{***}$  ;  $-0,91^{***}$  ;  $-0,95^{***}$  ;  $-0,90^{***}$  et  $-0,96^{***}$ .

- Le poids de la noix est corrélé au nombre de folioles (NFl,  $r=-0,90^{***}$ ), à la forme de la noix (FNVV,  $r=-0,91^{***}$ ), à l'importance de la pointe (IP) ( $r=-0,90^{***}$ ), au poids du cerneau (PC) ( $r=-0,91^{***}$ ) et au pourcentage du cerneau (PrC) ( $r=-0,91^{***}$ ).

## **II.2.2. Projection des accessions dans le plan 1-2 de l'ACP**

L'examen de l'absorption de la variabilité totale par les composantes principales montre que les deux premiers axes absorbent 71,29% de la variabilité totale. L'axe 1, première composante principale représente 45,88% de la variabilité. Il est corrélé positivement au poids et au pourcentage du cerneau plus la forme et le nombre de folioles et négativement au poids et à la longueur de la noix, à la couleur et au remplissage du cerneau et à la longueur et à la largeur de la feuille. L'axe 2 absorbe 25,41% de l'inertie globale. Il est corrélé positivement à l'épaisseur de la coque, à la facilité d'extraction du cerneau et à la couleur du rachis. La figure 15 présente la projection des différentes accessions étudiées dans le plan défini par les deux premiers axes. L'analyse de cette figure montre la formation de trois groupes. Le premier groupe est composé de deux accessions du Moyen Atlas : Naour (NAO) et Taghzirte (TAG) et deux accessions du Haut Atlas : Ait Bougamaz (ABZ) et Amouguer (AMG)

qui sont caractérisées surtout par un poids et un pourcentage du cerneau élevés et une faible épaisseur de la coque. Le deuxième groupe est formé de cinq accessions du Haut Atlas à savoir Ait Mhamed (AMD), Imlil (IML), Beram (BER), Tabrijjate (TAB) et Anougal (ANG) qui se distinguent par des feuilles larges et des noix de taille relativement grande. Quant au troisième groupe, il est formé de deux accessions, l'une du Moyen Atlas (Aghbala, AGH) et l'autre du Haut Atlas (Demnate, DEM) qui se caractérisent par des feuilles et des noix de taille relativement petite.

Le dendrogramme établi à partir des distances Euclidienne a révélé des regroupements qui rappellent ceux constatés par les représentations graphiques de l'analyse en composantes principales (Figure 16). Trois groupes phénotypiques se distinguent :

- Le premier groupe rassemble les accessions Taghzirte (TAG) et Naour (NAO) originaires du Moyen Atlas et les accessions Amouguer (AMG) et Ait Bougamaz (ABZ) provenant du Haut Atlas.

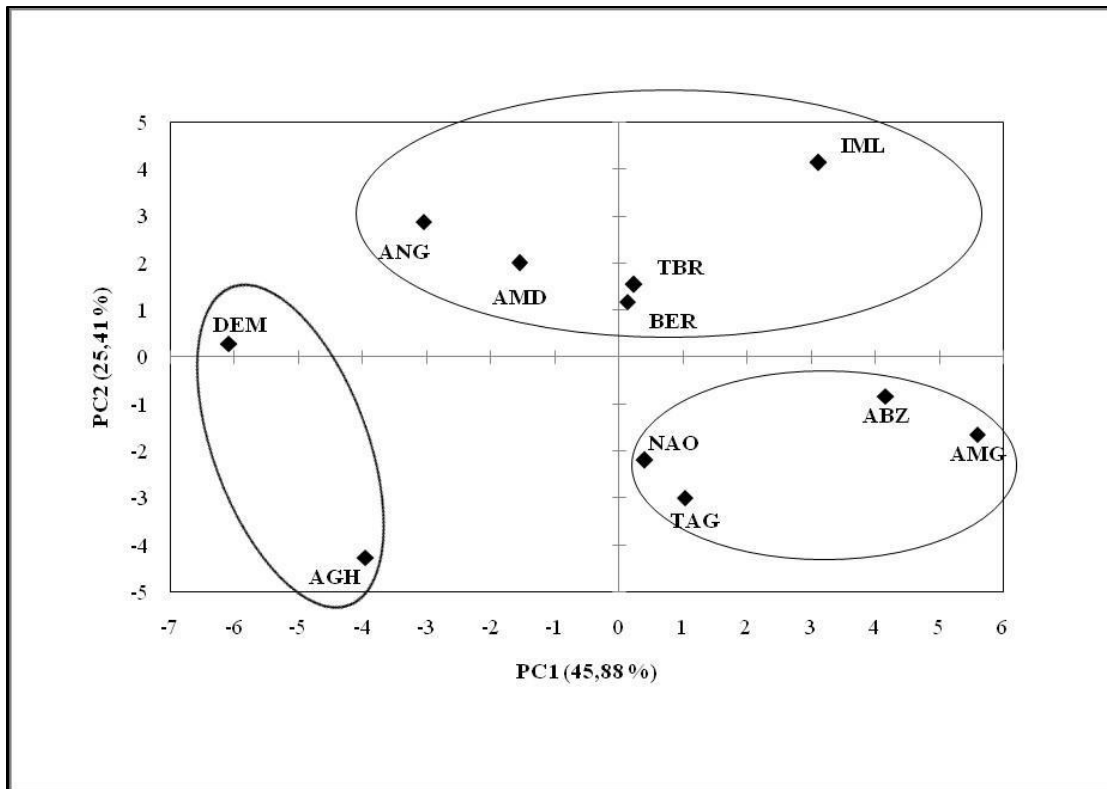
-Le deuxième groupe est constitué par les accessions Ait Mhamed (AMD), Imlil (IML), Barem (BER), Tabrijjate (TBR) et Anougal (ANG) originaires du Haut Atlas.

Le troisième groupe, il est représenté uniquement par deux accessions : Demnate (DEM) et Aghbala (AGH).

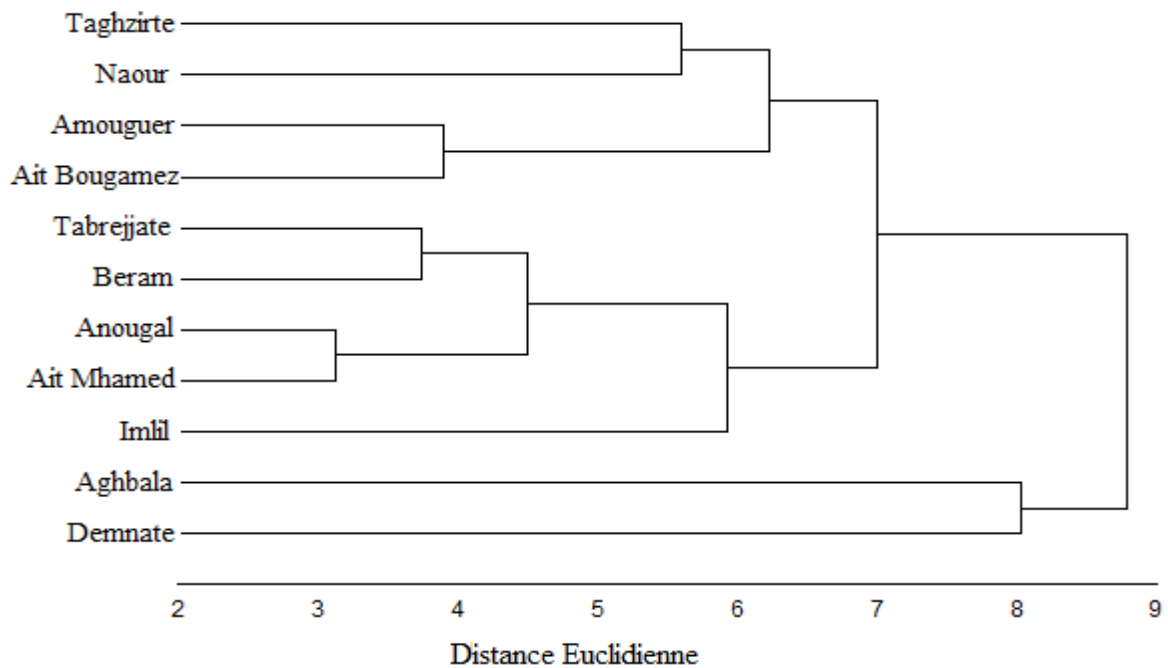
**Tableau 6 : Coefficients de corrélation entre les paramètres morphologiques étudiés,**

	LF	IF	NFI	FFIL	IFI	LFI	MF	CrF	CrR	FNVL	FNVV	Ln	LN	PN	PBS	IBS	IBS	FBPS	FSPS	IP	SSCq	CrCq	RCq	ADMCq	ECq	DEC	PC	PrC	RmC	CrC				
<b>Lf</b>	0,97																																	
<b>NFI</b>	-,95	-,93																																
<b>FFIL</b>	-,95	-,93	0,98																															
<b>IFI</b>	-,59	-,58	0,732	0,71																														
<b>LFI</b>	0,96	0,95	-,93	-,93	-,56																													
<b>MF</b>	-,83	-,82	0,85	0,84	0,62	-,82																												
<b>CrF</b>	0,15	0,14	-,10	-,13	-,02 <sub>NS</sub>	0,17	-,07 <sub>NS</sub>																											
<b>CrR</b>	-,36	-,32	0,38	0,42	0,29	-,37	0,24	-,24																										
<b>FNVL</b>	-,04 <sub>NS</sub>	0,01 <sub>NS</sub>	0,03 <sub>NS</sub>	0,05 <sub>NS</sub>	0,05 <sub>NS</sub>	-,03 <sub>NS</sub>	-,06 <sub>NS</sub>	-,07 <sub>NS</sub>	0,48																									
<b>FNVV</b>	-,95	-,93	0,97	0,97	0,69	-,93	0,84	-,13	0,38	0,05 <sub>NS</sub>																								
<b>Ln</b>	-,59	-,57	0,68	0,7	0,64	-,56	0,56	0,01 <sub>NS</sub>	0,36	0,06 <sub>NS</sub>	0,68																							
<b>LN</b>	0,95	0,93	-,91	-,93	-,51	0,93	-,80	0,19	-,38	-,01 <sub>NS</sub>	-,91	-,47																						
<b>PN</b>	0,92	0,90	-,90	-,91	-,58	0,92	-,81	0,17	-,37	-,02 <sub>NS</sub>	-,91	-,49	0,94																					
<b>PBS</b>	-,72	-,72	0,73	0,73	0,52	-,71	0,83	-,06 <sub>NS</sub>	0,15	-,08*	0,74	0,52	-,69	-,71																				
<b>Lbs</b>	-,23	-,21	0,25	0,24	0,20	-,17	0,21	0,41	-,05 <sub>NS</sub>	-,13*	0,25	0,29	-,17	-,13	0,22																			
<b>IBS</b>	-,27	-,23	0,30	0,34	0,28	-,29	0,17	-,21	0,62	0,33	0,30	0,30	-,29	-,28	0,09*	-,09*																		
<b>FBPS</b>	0,98	0,95	-,95	-,95	-,60	0,95	-,83	0,16	-,38	-,05 <sub>NS</sub>	-,95	-,59	0,95	0,92	-,72	-,21	-,26																	
<b>FSPS</b>	-,47	-,45	0,59	0,56	0,57	-,45	0,50	0,01 <sub>NS</sub>	0,17	-,05 <sub>NS</sub>	0,57	0,56	-,42	-,45	0,43	0,25	0,11**	-,44																
<b>IP</b>	-,94	-,93	0,96	0,98	0,67	-,92	0,83	-,15	0,43	0,06 <sub>NS</sub>	0,96	0,70	-,92	-,90	0,72	0,23	0,36	-,94	0,59															
<b>SSCq</b>	-,79	,77	0,84	0,84	0,74	-,78	0,70	-,15	0,38	0,07 <sub>NS</sub>	0,84	0,67	-,72	-,76	0,61	0,17	0,31	-,79	0,66	0,87														
<b>CrCq</b>	0,87	0,85	-,84	-,84	-,53	0,89	-,76	0,17	-,33	-,02 <sub>NS</sub>	-,84	-,47	0,85	0,86	-,68	-,14**	-,24	0,88	-,34	-,84	-,69													
<b>RCq</b>	0,89	0,87	-,85	-,87	-,51	0,87	-,65	0,19	-,42	-,09*	-,86	-,50	0,88	0,85	-,52	-,14**	-,34	0,90	-,28	-,86	-,70	0,82												
<b>ADMCq</b>	-,87	-,85	0,87	0,87	0,54	-,84	0,76	0,1*	0,30	-,07 <sub>NS</sub>	0,87	0,59	-,85	-,81	0,67	0,43	0,21	-,86	0,51	0,88	0,72	-,74	-,76											
<b>ECq</b>	-,11**	-,07 <sub>NS</sub>	0,15	0,19	0,15	-,16	0,03 <sub>NS</sub>	-,08*	0,54	0,37	0,15	0,2	-,15	-,15	-,01 <sub>NS</sub>	-,16	0,60	-,13**	0,07 <sub>NS</sub>	0,20	0,19	-,13**	-,21	0,07 <sub>NS</sub>										
<b>DEC</b>	-,38	-,31	0,37	0,40	0,23	-,38	0,23	-,15	0,52	0,31	0,37	0,27	-,39	-,35	0,14	0,05 <sub>NS</sub>	0,43	-,38	0,13**	0,40	0,33	-,34	-,43	0,33	0,55									
<b>PC</b>	-,95	-,93	0,97	0,97	0,69	-,93	0,84	-,13**	0,38	0,05 <sub>NS</sub>	0,97	0,67	-,92	-,91	0,74	0,24	0,29	-,95	0,57	0,97	0,84	-,84	-,86	0,88	0,15	0,37								
<b>PrC</b>	-,95	-,93	0,96	0,98	0,68	-,93	0,83	-,14	0,41	0,06 <sub>NS</sub>	0,97	0,70	-,92	-,91	0,73	0,23	0,34	-,95	0,55	0,98	0,84	-,84	-,86	0,87	0,20	0,41	0,98							
<b>RmC</b>	0,94	0,92	-,91	-,92	-,50	0,92	-,79	0,19	-,37	-,03 <sub>NS</sub>	-,91	-,48	0,97	0,93	-,68	-,17	-,30	0,94	-,42	-,91	-,71	0,84	0,88	-,84	-,16	-,38	-,90	-,91						
<b>CrC</b>	0,97	0,95	-,96	-,97	-,62	0,96	-,83	0,17	-,40	-,03 <sub>NS</sub>	-,96	-,58	0,97	0,95	-,72	-,21	-,32	0,97	-,49	-,96	-,80	0,88	0,89	-,87	-,17	-,40	-,96	-,96	0,97					
<b>FC</b>	0,81	0,79	-,79	-,81	-,48	0,79	-,58	0,15	-,37	-,09*	-,80	-,41	0,84	0,84	-,47	-,11*	-,35	0,81	-,35	-,81	-,67	0,71	0,85	-,72	-,22	-,40	-,79	-,80	0,87	0,86				

Niveau de signification : \*\*: P< 0,01 ; \* : P<0,0 ; NS : Non significative ; les autres valeurs sont très hautement significatives



**Figure 15 :** Projection de 11 accessions du noyer dans le plan 1-2 d'une ACP réalisée à partir de 31 variables morpho-pomologiques.



**Figure 16 :** Dendrogramme de 11 accessions du noyer basé sur les paramètres morpho-pomologiques.

### III. DISCUSSION ET CONCLUSION

Au cours de cette partie, notre travail a porté sur la mise à profit des paramètres morpho-pomologiques afin d'explorer la variabilité phénotypique chez quelques accessions marocaines du noyer. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur les paramètres quantitatifs et qualitatifs liés aux feuilles et aux fruits. En effet, l'analyse de la diversité phénotypique de ces accessions a montré une large hétérogénéité phénotypique entre les accessions étudiées et confirme la recommandation de l'IPGRI et l'UPOV quant à leur utilisation comme descripteurs du noyer.

D'une façon générale, les accessions étudiées présentent des feuilles de grande taille avec une longueur qui varie de 37,98 à 44,25 cm et une largeur de 24,46 à 27,17 cm. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Angmo et al. (2015) chez les cultivars indiens, qui présentent des feuilles avec une longueur qui varie de 32,50 à 49 cm et une largeur de 26,5 à 29 cm. D'autre part, ces feuilles se sont révélées vertes avec des folioles latérales d'une forme elliptique ou elliptique large, d'une marge entière et un rachis d'une couleur qui varie entre le vert, le jaune et le rouge. De même, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez les feuilles du noyer indien qui sont de couleur verte, d'une marge entière et d'une feuille latérale de forme elliptique large (Sharma et al., 2014).

Concernant les analyses des paramètres pomologiques, les résultats obtenus ont montré que le poids de noix varie de 8,26 à 10,20 g. Ces valeurs restent inférieures à celles obtenues chez des génotypes iraniens (6 à 16,89 g) (Arzani et al., 2008 ; Ghasemi et al., 2012 ; Ahandani et al., 2014) des génotypes turcs (7,46 à 15,21g) (Karadag et Akça, 2011) et des génotypes roumains (6,9 à 16,27 g) (Cosmulescu, 2013). De même, la longueur de noix a enregistré des valeurs qui varient entre 32 et 38 mm et la largeur a montré des valeurs entre 27 et 31 mm. Ces valeurs sont comparables à celles trouvées chez le noyer iranien par Arzani et al. (2008), Ghasemi et al. (2012) et Ahandani et al. (2014) qui ont obtenu des longueurs qui varient de 27 à 44 mm et des largeurs de 22 à 42 mm. Concernant, la coque, elle s'est révélée moyennement sillonnée avec une épaisseur qui varie de 1,33 à 1,83 mm. Ce



résultat est en accord avec celui obtenu par Karadag et Akça (2011) et Akça et al. (2015) pour le noyer turc respectivement (0,95 à 1,60 mm et 1,11 à 2,33 mm). Cependant, il est supérieur à celui obtenu par Sharma et al. (2014) chez le noyer indien (1,24 mm). En effet, une importante épaisseur de la coque protège le cerneau des facteurs extérieurs. Selon Zhadan et Strukov (1977), une noix prometteuse doit avoir une épaisseur de la coque comprise entre 0,7 et 1,5 mm. En plus, une noix idéale devrait avoir une coque solide et mince, une forte adhérence des deux valves et un poids entre 12 et 18 g (Akça et Ozogun 2004). En outre les résultats ont révélé que 64% des noix ont une couleur moyenne, 27% avec une couleur claire et 9% avec une couleur foncée. Ces données sont comparables avec celles enregistrées chez le noyer indien où 50% des noix de la région de Ladakh présentent une couleur moyenne, 25% une couleur claire et 25% une couleur foncée (Angmo et al., 2015).

Concernant le poids du cerneau, il varie entre 2,86 et 4,13g. Ce résultat est inférieur aux données obtenues par Ahandani et al. (2014) chez le noyer iranien (4 à 7 g) et par Asma et al. (2012) chez le noyer turc (6 à 9 g). De même, le pourcentage du cerneau a oscillé de 33,65 % à 43,76 %. Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues chez le noyer turc (46,15 à 63,16 %) (Karadag et Akça, 2011) et le noyer iranien (48 à 59 %) (Ahandani et al., 2014). Pour la couleur du cerneau, notre résultat a montré que 9% des accessions se sont révélées avec un cerneau clair, 55% avec un cerneau ambré et 36% avec un cerneau très ambré. Selon Simsek, (2010), la couleur du cerneau peut varier en fonction des propriétés génétiques et de la densité lumineuse. Le poids de la noix et le pourcentage du cerneau sont des critères de qualité chez le noyer. En plus, la couleur claire des noix et des cerneaux est la plus préférée surtout de la part du consommateur. Ainsi, les génotypes qui se sont révélés avec un cerneau clair sont les plus demandés dans les programmes de sélection du noyer (Korac et al., 1997).

Par ailleurs, l'exploitation des données morpho-pomologiques par l'analyse en composante principale a révélé la formation de trois groupes distincts indépendamment de l'origine géographique et du type de la chaîne montagneuse des

accessions. Le premier groupe comprend les accessions Naour, Taghzirte, Ait Bougamez et Amouguer qui sont caractérisées par un poids et un grand pourcentage du cerneau et une faible épaisseur de la coque. Quant au deuxième groupe, il est formé des accessions Ait Mhamed, Imlil, Beram, Tabrijjate et Anougal qui se distinguent par des feuilles et des noix de grande taille. En fin, le troisième groupe est constitué des deux accessions Aghbala et Demnate avec des feuilles et des noix de petite taille.

La mise en évidence de plusieurs caractères discriminants constitue une base de données pour les programmes d'amélioration génétique du noyer, notamment la mise au point de cultivars à haut rendement. En effet, le poids et la longueur de noix, le poids et le pourcentage du cerneau, l'épaisseur de la coque et la taille de la feuille se sont avérés les plus puissants pour la discrimination des accessions.

La variabilité phénotypique enregistrée chez le noyer marocain peut être due aux variations génotypiques en conjonction avec les conditions environnementales (Ghasemi et al., 2012). Par ailleurs, les espèces à noix sont monoïques et hétérodichogames, favorisant l'allogamie (Ebrahimi et al., 2016). D'autre part, la multiplication par semences chez cette espèce favorise une variabilité génétique très importante qui apparaît au niveau de la période de floraison, des caractères pomologiques des noix, de la vigueur de l'arbre et du type de fructification, ce qui permet à chaque région géographique de maintenir une population diversifiée (Lansari et al., 2001). D'une façon générale, le système de reproduction et la dispersion des grains du pollen par le vent chez les espèces ligneuses influencent considérablement la diversité génétique au sein des espèces et des populations (Hamrick et al., 1991).

Sur la base de l'importance économique de certains caractères du fruit à savoir le gros calibre de la noix, le pourcentage du cerneau le plus élevé et la faible épaisseur de la coque, les accessions Amouguer, Ait Bougamez et Imlil du Haut Atlas, présentent les meilleurs individus qui peuvent être multipliés et utilisées par la suite dans des programmes de sélection et d'amélioration de la culture de cette espèce au Maroc. De même, ces individus peuvent être conservés in situ, ce qui constitue une

richesse et un patrimoine national pouvant servir ultérieurement dans un programme d'amélioration génétique ou pour l'extension de cette culture.

Toutefois, étant donné que les caractères phénotypiques sont fortement influencés par les conditions de l'environnement, l'estimation de la diversité génétique se trouve souvent imprécise. Pour pallier ces difficultés nous avons entrepris une étude des paramètres biochimiques et des marqueurs moléculaires.

**CHAPITRE III :**

**CARACTERISATION**

**BIOCHIMIQUE ET EVALUATION**

**DU POUVOIR ANTIOXYDANT DU**

**FRUIT**

L'objectif de cette partie de notre travail est d'analyser et de comparer la composition biochimique du cerneau chez les accessions marocaines du noyer dans le but d'identifier les meilleurs cultivars du point de vue qualité du fruit.

## **I. MATERIELS ET METHODES**

### **I.1. Matériel végétal**

Le matériel végétal évalué est constitué de 11 accessions utilisées précédemment dans l'analyse morpho-pomologique (Tableau 2, Figure 10). Des noix mûres et saines de différents côtés et élévations de trois arbres par accessions sont recueillies. Ces noix sont conservées dans des sacs en plastique portant le nom et le numéro de l'échantillon. Au laboratoire, les noix séchées sont décortiquées et broyées manuellement à l'aide d'un mortier. La caractérisation biochimique des accessions marocaines a été réalisée sur un ensemble de 22 paramètres liés aux fruits.

### **I.2. Paramètres mesurés**

#### **I.2.1. Détermination du taux d'humidité et de la matière sèche**

La teneur en eau (H) et en matière sèche (MS) sont déterminées selon le protocole décrit par Simsek (2010). 5g du cerneau broyé sont mis dans des creusets préalablement séchés à 105°C et pesés. Ensuite, les creusets sont placés dans une étuve à 105°C pendant 24 heures. Après refroidissement à l'abri de l'humidité dans un dessiccateur, les creusets sont pesés.

-La teneur en matière sèche est calculée selon la formule suivante :

$$MS (\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Où :

- m0 : Masse du creuset sec (g)
- m1 : Masse du creuset-échantillon (g)
- m2 : Masse du creuset-échantillon étuvé (g)

- Le taux d'humidité est déterminé comme suit :

$$H (\%) = 100 - MS.$$

### **I.2.2. Détermination de la teneur en cendres**

La teneur en matière minérale des échantillons est déterminée après calcination selon la méthode standard (AOAC, 1995). Une quantité de 5g du cerneau broyé est placée dans un creuset en porcelaine préalablement pesé. Par la suite, les échantillons ont subi une carbonisation sur une plaque chauffante puis une calcination dans le four à moufle à 600 °C pendant 4 heures. Ainsi, la teneur en cendres (Ash) est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Ash (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Où :

- $m_0$  : Masse du creuset (g)
- $m_1$  : Masse du creuset-échantillon (g)
- $m_2$  : Masse du creuset-échantillon calcinée (g).

### **I.2.3. Détermination de la teneur en huile**

Les huiles totales ont été estimées selon la méthode décrite par AOAC (1990). Dans le Soxhlet, on introduit une cartouche, contenant 5g du cerneau broyé de chaque échantillon, dans le tube extracteur et 250 ml d'hexane (96%) dans le ballon de cet appareil. Ensuite, on procède à l'ébullition (55-60°C) à l'aide du chauffe-ballon pendant 8 heures. A la fin de l'opération la cartouche et les huiles sont récupérées. La quantité des huiles est déterminée par la différence de la masse de l'échantillon avant et après l'extraction par rapport à la masse initiale de l'échantillon.

$$\text{Huile (\%)} = \frac{P_0 - P_e}{P_0} \times 100$$

Où :

- $P_0$  : Masse de l'échantillon avant l'extraction (g).
- $P_e$  : Masse de l'échantillon après l'extraction (g).

### **I.2.4. Dosage des protéines brutes**

La méthode de Kjeldahl constitue la procédure la plus connue du dosage des protéines brutes.

### \*Minéralisation :

Un échantillon de 0,25g du matériel végétal, parfaitement broyé et homogénéisé, est introduit avec une tablette de catalyseur dans un tube de digestion. Par la suite, l'acide sulfurique concentré (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) est ajouté de façon progressive. Après une agitation manuelle, les tubes sont placés dans le bloc de digestion à 420°C pendant 4 heures sous la hotte. Après refroidissement des solutions, on ajoute l'eau distillée en ajustant le volume jusqu'à 100 ml. Un témoin (B) est préparé dans les mêmes conditions.

### \*Distillation et titration

La distillation se fait dans une unité de BÜCHI B-324, on ajoute au tube 40 ml de NaOH (10N). Le liquide distillé est connecté dans un erlenmeyer contenant 10ml de la solution acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 1N avec quelques gouttes de l'indicateur de Tachiro. Une fois la distillation est terminée, la solution récupérée sera titrée avec l'acide sulfurique (0,05N) à l'apparition de la coloration rose.

- Les résultats peuvent être exprimés en azote totale (N) :

$$N (\%) = \frac{(V_E - V_B) \times N \times 14,01}{P} \times 100$$

Où V<sub>E</sub> : Volume d'acide sulfurique pour titrer l'échantillon (ml)

: V<sub>B</sub> : Volume d'acide sulfurique pour titrer le blanc (ml)

N : Normalité de l'acide sulfurique

14,01 : Poids molaire de l'azote

- $\frac{P}{100}$  : Poids de l'échantillon (g)

o

u

centage des protéines :

Les protéines des diverses matières premières contiennent une teneur en azote située aux environs de 16%. La valeur d'azote obtenue par le titrage, multipliée par le coefficient 100/16 c'est-à-dire 6,25, nous conduit à une valeur relativement

conventionnelle qui est exprimée en protéines brutes ou mieux encore en protéines azotées totales (Mariotti et al., 2008).

$$\text{Protéines brutes (\%)} = \text{Azote total} \times 6,25.$$

### **I.2.5. Estimation de la teneur en carbohydrates**

La teneur en carbohydrates est estimée par la formule décrite par Grosso et al. (2000) :

$$\text{Carbohydrates (\%)} = 100 - (\text{Humidité (\%)} + \text{Protéines (\%)} + \text{Lipides (\%)} + \text{Cendres (\%)}).$$

### **I.2.6. Estimation de la valeur énergétique**

Selon Tapsell et al. (2009), les protéines et les glucides fournissent 4 calories par gramme, tandis que les graisses fournissent 9 calories par gramme. L'estimation de la valeur énergétique est calculée selon la formule proposée par Pereira et al. (2008).

$$\text{Valeur énergétique (VEng) (Kcal/100g)} = 4 \times (\text{protéines} + \text{carbohydrates}) + 9 \times (\text{lipides}).$$

### **I.2.7. Détermination des fibres brutes**

La teneur en fibres est déterminée selon la méthode décrite par Aryapak et Ziarati, (2014). Ainsi, 5g du cerneau broyé est digéré dans 100 ml de l'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1,25%) avec quelques gouttes d'un anti-mousse. Après 45 minutes d'ébullition le bouillon est filtré et lavé avec de l'eau distillée chaude. Ensuite, le filtrat est digéré une deuxième fois dans 100 ml de NaOH (1,25%) pendant 60 minutes avec l'ajout de quelques gouttes d'anti-mousse. En fin, le filtrat est lavé avec de l'eau désionisée chaude et après le séchage, le résidu est mesuré et incinéré dans un four à 550 ° C pendant 3 heures. La perte du poids représente la quantité de fibres brutes (Ranganna, 1977). La teneur en fibres s'exprime comme suit :



$$\text{Fibres (\%)} = \frac{M_2 - M_3}{M_1} \times 100$$

- Où
- $M_1$  : Poids initial (g)
  - $M_2$  : Poids du résidu avant incinération (g)
  - $M_3$  : Poids du résidu après incinération (g).

## **I.2.8. Dosage des métabolites secondaires et activité antioxydante**

### **I.2.8.1. Préparation de l'extrait méthanolique**

L'extraction des métabolites secondaires est réalisée selon le protocole décrit par Rorabaugh et al (2011). En effet, 5g du cerneau broyé sont mises à macérer dans 50ml de méthanol 80% sous la température ambiante. Le mélange ainsi obtenu subit une agitation douce et continue pendant 48 heures à la température ambiante à l'aide d'un agitateur multimatique (J.P. Selecta, s.a). Ensuite, une centrifugation de 4200 rpm est réalisée pendant 10min suivie d'une filtration. Finalement, le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rota-vapeur (BUCHI B-490).

### **I.2.8.2. Détermination du pouvoir antioxydant**

Pour étudier l'activité antiradicalaire des extraits obtenus, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Hatano et al. (1988). 0,3 ml d'échantillon est mélangé avec 2,7 ml d'une solution méthanolique de DPPH ( $6.10^{-5}$  mol/l). Le mélange est agité vigoureusement et incubé à l'obscurité et la température ambiante pendant 60 min. Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 0,3ml de méthanol avec 2,7ml de la solution méthanolique de DPPH. L'absorbance est mesurée à 517nm à l'aide du spectrophotomètre UV-Vis (JASCO V-630) contre un blanc. L'activité antioxydante est exprimée en termes du pourcentage du piégeage du radical DPPH (RSA), en appliquant la formule suivante :

$$\text{RSA (\%)} = \left( \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \right) \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$  : Absorbance du contrôle

Où  $A_{\text{échantillon}}$  : Absorbance de l'échantillon

### **I.2.8.3. Dosage des polyphénols totaux**

La teneur en composés phénoliques (PPT) est estimée par un dosage colorimétrique basé sur la méthode décrite par Singleton et Rossi (1965). A 1 ml de chaque échantillon, 1 ml d'une solution de réactif du Folin-Ciocalteu (1/10) est ajouté. Après 3 minutes, 1 ml de solution saturée de carbonate de sodium (20%) est ajouté au mélange puis on ajuste à 10 ml avec de l'eau distillée. La réaction est maintenue dans l'obscurité pendant 90 minutes. L'absorbance est mesurée à 725 nm contre un blanc à l'aide du spectrophotomètre UV-Vis (JASCO V-630). La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de la gamme d'étalonnage établie dans les mêmes conditions avec l'acide gallique (Annexe 1). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par 100g de la matière sèche (mg EAG/100g MS).

### **I.2.8.4. Dosage des flavonoïdes totaux**

La teneur totale en flavonoïdes (FLV) des extraits est quantifiée à l'aide de la méthode colorimétrique (Yang et al., 2009). En effet, 0,25 ml des extraits dilués (1/10) sont mélangés avec 1,25 ml de l'eau distillée et 0,07 ml de nitrite de sodium (5%). Après 5 minutes, on ajoute 0,15 ml de chlorure d'aluminium (10%) et par la suite 0,5 ml de la solution d'hydroxyde de sodium (1M). Finalement, 1 ml de l'eau distillée a été ajouté pour tous les échantillons. L'absorbance est mesurée immédiatement à 510 nm contre un blanc par le spectrophotomètre UV-Vis (JASCO V-630). La concentration des flavonoïdes totaux est calculée à partir de l'équation de la gamme d'étalonnage établie dans les mêmes conditions avec de la rutine (Annexe 1). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent de rutine par 100g de la matière sèche (mg ER/100g MS  $\pm$  SE).

### **I.2.9. Détermination de la matière minérale**

La matière minérale est déterminée par la méthode de Ranganna, (1995). Une quantité de 5g du cerneau broyée et calcinée, est humidifiée avec de l'eau distillée (1 ml), par la suite on ajoute 1ml de Hcl concentré. Après évaporation, on additionne 5

ml de Hcl (1N). Le mélange est filtré après 10 minutes à l'aide du papier filtre. Finalement, le filtrat est ajusté dans une fiole à jager de 50ml par l'ajout de Hcl (1N). Cette solution minérale est utilisée pour estimer la quantité des éléments minéraux suivants :P, K, Mg, Na, Cu, Zn, Mn, Fe, Cr, Ni et B, par Spectrométrie d'Emission Atomique de Plasma d'argon à Couplage Inductif (ICP-AES). La teneur en élément minéral est donnée par l'expression suivante :

$$\text{Elément minéral} = \left( \frac{(A - T) \times B}{C} \right) \times F$$

- Où
- A : Concentration du métal dans la solution dosée (mg/l)
  - T : Concentration du métal dans le témoin (mg/l)
  - B : Volume final de l'échantillon (ml)
  - C : Poids d'échantillon utilisé (g)
  - F : Facteur de dilution.

### **I.3. Analyses statistiques**

Les données obtenues sont soumises à l'analyse de variance (ANOVA) et la corrélation de Pearson ( $\alpha = 0,05$ ) à l'aide du logiciel SPSS (IBM SPSS Statistics 20). Ensuite, l'ordination et la classification des accessions sont effectuées par l'analyse en composantes principales (ACP) en utilisant le logiciel XLSTAT (2017) et l'analyse hiérarchique ascendante selon la méthode d'agrégation UPGMA par le logiciel STATISTICA StatSoft (1997).

## **II. RESULTATS ET DISCUSSION**

### **II.1. Etude des paramètres biochimiques pris séparément**

Pour examiner la variabilité des paramètres biochimiques chez le noyer marocain, une analyse de la variance a été effectuée sur chaque paramètre. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 7 et 8. Parmi les 22 paramètres mesurés, 13 montrent des différences significatives ou hautement significatives entre les accessions étudiées.

### **II.1.1. Humidité**

Les valeurs obtenues pour l'humidité se situent entre 1,44 et 3,24 %, tels que les accessions Tabrijjate (1,44%) et Anougal (1,96%) ont montré les valeurs les plus faibles, tandis que l'accession d'Ait Mhamed (3,03%) et Ait Bougamez (3,24%), qui proviennent de la région d'Azilal, ont montré la teneur en eau la plus élevée avec une moyenne générale de 2,52%. Ces valeurs sont similaires à celles obtenues par Muradoglu et al. (2010) (1,1-2,7%) et Polat et al. (2015) (2,14-3,98%) chez le noyer turc. Cependant, ces valeurs sont inférieures à celles trouvées chez des cultivars portugais par Pereira et al. (2008) (3.85-4.50%) et des cultivars roumains par Leahu et al. (2013) (3,85-4,58%). D'après la Norme CEE-ONU (2012) de la commercialisation et le contrôle de la qualité commerciale des noix en coque, la teneur en eau des cerneaux ne doit pas être supérieure à 8%. D'après les résultats obtenus au cours de ce travail, on peut conclure que les accessions marocaines du noyer présentent une faible humidité ce qui est en faveur de leur conservation pour une longue durée.

### **II.1.2. Teneur en cendres**

La teneur en cendres a oscillé entre 1,67% pour Ait Mhamed et 2,53% pour Amouguer avec une moyenne générale de 2,08%. Ces valeurs sont en accord avec celles obtenues chez des cultivars turcs par Ozkan et al. (2010), Muradoglu et al. (2010) et Polat et al. (2015) (1,99-2,53%, 1,5-2,8%, 1,44-2,14% respectivement) et chez des cultivars romains par Leahu et al. (2013) (1,7-2,2%). Néanmoins, les valeurs rapportées par Tapia et al. (2013) chez des génotypes espagnols sont relativement plus faible (1,12-1,29%). Cependant, les résultats obtenus chez des cultivars portugais sont relativement plus importants (3,31 à 4,26%) (Pereira et al., 2008). D'une façon générale, les proportions obtenues montrent que le noyer présente une source non négligeable des minéraux importants pour la nutrition humaine.

### **II.1.3. Teneur en huile**

D'une façon générale, l'ensemble des accessions étudiées présentent des teneurs très élevées en huile qui varient de 54,50% chez l'accession Aghbala à 65,48% chez l'accession Ait Mhamed avec une teneur moyenne de 60,86%. Des résultats similaires

ont été également signalés chez le noyer roumain par Leahu et al. (2013) (53,81-66,1%), le noyer espagnol par Tapia et al. (2013) (58,3-65,2%) et le noyer turc par Polat et al. (2015) (58,44-67,14%). En effet, l'huile du noyer est très riche en acides gras polyinsaturés, qui peuvent présenter jusqu'à 78% de la teneur totale en acides gras (Abu Taha et Al-wadaan, 2011). Des études cliniques ont révélé que les acides gras polyinsaturés (oméga-3 et oméga-6) jouent un rôle très important dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Davis et al., 2007). En plus, une huile riche en acide oléique (Oméga-9) présente une plus grande stabilité à l'oxydation (Abu Taha et Al-wadaan, 2011).

#### **II.1.4. Protéines brutes**

La teneur en protéines brutes s'est révélée plus élevée chez les accessions Amouguer, Ait Mhamed, Demnate et Beram (19,25%, 18,67%, 18,17% et 18,08% respectivement). Cependant la valeur la plus faible est celle de l'accession Tabrijjate (8,17%). Ces données sont comparables à celles trouvées chez d'autres génotypes de différentes origines telle que la Turquie : 10,58-18,19% (Yerlikaya et al., 2012) et 12,8-22,3% (Muradoglu et al., 2010), la Roumanie : 13,81-17,22% (Leahu et al., 2013) et l'Iran 13,50-20,20% (Aryapak et Ziarati, 2014). Selon plusieurs travaux de recherche, les protéines végétales sont associées à une faible crise cardiovasculaire par rapport aux protéines d'origine animale (Yang et al. 2009, Carvalho et al., 2010). D'après ces résultats, le noyer peut constituer une bonne source de protéines végétales et peut être intégré dans le régime végétarien.

#### **II.1.5. Teneur en carbohydrates**

Une faible teneur en carbohydrates est apparue chez Ait Mhamed (11,15%), tandis qu'une teneur importante est révélée chez Ait bougamez (23,63%), Aghbala (24,44%) et Tabrijjate (25,85%), avec une moyenne générale de 18,93%. Cette teneur est similaire à celle trouvée chez le noyer roumain (12,1-24,38%) (Leahu et al., 2013), mais plus élevée que les valeurs enregistrées chez le noyer portugais (3,75-7,16%) (Pereira et al., 2008). Les carbohydrates sont les principaux fournisseurs d'énergie

alimentaire parmi les macronutriments, représentant entre 50 et 75% de l'apport énergétique total (Mann et al., 2008).

#### **II.1.6. Valeur énergétique**

La valeur énergétique des accessions étudiées se situe entre 648,41kcal "Aghbala" à 713,83kcal "Demnate" avec une moyenne générale de 685,86 kcal. Ces valeurs sont comparables avec celles trouvés chez le noyer turc (682-728 kcal) (Yerlikaya et al., 2012) et le noyer portugais (711-727.4 kcal) (Pereira et al., 2008). Tous les types de noix fournissent de l'énergie mais une seule portion du noyer fournit jusqu'à 90% de l'apport quotidien recommandé en acides gras oméga-3 (Makwana, 2015).

#### **II.1.7. Fibres brutes**

La teneur en fibres brutes varie entre 4,17% (Amouguer) et 6,75% (Naour). On note que ces valeurs sont supérieures à celles enregistrées chez le noyer turc (3,77-3,90) (Özcan et al., 2010) et chez quelques cultivars du noyer de la Nouvelle-Zélande (3,1-5,2 g) (Savage, 2000). Donc le noyer marocain s'est révélé avec une grande teneur en fibres, qui sont mentionnées comme l'un des huit constituants positifs des fruits à coque (Hu et al., 1998).

#### **II.1.8. Pouvoir antioxydant**

Le pouvoir antioxydant des cerneaux à piéger les radicaux libres de DPPH varie de 75,02% pour Tabrijjate à 85,96% pour Amouguer avec un pourcentage moyen de 79,73%. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux publiés par Akbari et al (2014) (53,83-94,09%) chez des cultivars iraniens du noyer. Ces valeurs confèrent au fruit un intérêt nutritionnel supplémentaire. Des études récentes ont montré que le cerneau contient plusieurs composés phénoliques comme les tanins, qui contribuent in vitro et in vivo à l'activité antioxydante globale de l'extrait du cerneau (Ito et al., 2007).

### **II.1.9. Polyphénols totaux**

La détermination de la teneur en composés phénoliques du fruit suscite de plus en plus d'intérêt, grâce à ses molécules bioactives et ses propriétés antioxydantes (Anderson et al., 2001 ; Fukuda et al., 2003). Les résultats de la composition en polyphénols totaux montrent que les accessions de Taghzirte (1017 mg EAG/100g MS) et Amouguer (1154 mg EAG/100g MS) enregistrent les teneurs les plus faibles, tandis que les accessions de Ait Bougamez (3487 mg EAG/100 g MS) et Ait Mhamed (3739mg EAG/100g MS) ont montré les teneurs les plus élevées avec une moyenne générale de 2579 mg EAG/100 g MS. Ces valeurs sont en accord avec celles montrées par Leahu et al. (2013) (1728-2352mg EAG/100g MS) chez le noyer roumain. Le noyer est classé comme le deuxième fruit le plus consommable pour son taux élevé d'antioxydants (Fu et al., 2016). Les composants phénoliques les plus abondants dans le noyer comprennent l'acide syringique, l'acide férulique, l'acide coumarique, l'acide vanillique, la myricétine et le juglone (Cosmulescu et Trandafir, 2011). Des études récentes ont montré que les facteurs extrinsèque, tels que les facteurs géographiques et climatiques, les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Aganga, 2001 ; Pedneault et *al.*, 2001 ; Fiorucci, 2006).

### **II.1.10. Flavonoïdes totaux**

Les flavonoïdes présentent également une différence entre les accessions étudiées. Les teneurs les plus élevées sont enregistrées chez Aghbala (62,11 mg ER/100 g MS) et Demnate (59,47 mg ER/100 g MS), alors que la plus faible est déterminée chez Amouguer (12,59 mg ER/100 g MS) avec une moyenne générale de 37,18 mg ER/100 g MS. On remarque que ces valeurs sont inférieures à celles rapportées par Akbari et al. (2012) chez le noyer iranien (61 à 124 mg EC/100 g).

### **II.1.11. Matière minérale**

Pour les macronutriments, les valeurs les plus élevées du phosphore sont celles des deux accessions originaires du Haut Atlas ("Amouguer" (675,87 mg/100g MS) et "Tabrijjate" (662,26 mg/100g MS)), tandis que la plus faible valeur est celle de

l'accession "Aghbala" du Moyen Atlas (338,1mg/100g MS) avec une moyenne générale de 569,59 mg/100g MS. En comparaison avec plusieurs travaux (Gharibzahedi et al., 2011 : 289-365 mg/100g ; Ozkan et al., 2010 : 222,62-260,42 mg/100g ; Muradoglu et al., 2010 ; 299,1-434,7 mg/100g) et aussi avec USDA (346 mg/100 g) publiée en 2018, le noyer marocain s'est révélé très riche en phosphore.

Pour le potassium, les valeurs obtenues varient de 210,1mg/100g MS (Ait Mhamed) à 338,93mg/100g MS (Beram) avec une moyenne générale de 261,97mg/100g MS. Concernant la teneur en Magnésium, elle varie de 79,15mg/100g (Tabrijjate) à 374,53mg/100g MS (Naour) avec une moyenne générale de 125,17mg/100g MS. Le potassium a atteint des niveaux appréciables dans le noyer marocain et il est accompagné d'une grande quantité de magnésium. Leurs quantités dans le noyer marocain sont supérieures à celles établies par USDA (2018) (K (441 mg/100g MS et Mg 158 mg/100g MS) et inférieure aux résultats publiés chez le noyer iranien par Aryapak et Ziarati (2014) (K (546,46-617,36 mg / 100g), Mg (580,11-692,49 mg / 100g)).

La faible quantité de sodium est enregistrée chez les deux accessions Ait Mhamed (1,17mg/100g MS) et Ait Bougamez (1,78 mg/100g MS) qui proviennent d'Azilal, alors que celle la plus élevée est révélée chez Amouguer (12,63mg/100g MS) avec une moyenne générale de 4,06mg/100g MS. Ce résultat est inférieur à celui obtenu pour le noyer iranien par Aryapak et Ziarati, (2014) (58,42 à 66,54 mg / 100 g) et le noyer turc (48.9 - 26.1 mg / 100 g) (Muradoglu et al., 2010). Ainsi, l'accession Amouguer pourrait être considérée comme une source abondante de sodium pour le noyer marocain.

Concernant les micronutriments, la plus forte teneur en Cuivre est observée chez Beram (6,67mg/100g MS), tandis que la teneur la plus faible est obtenue chez Aghbala (2,09mg/100g DM) avec une moyenne générale de 5,56mg. En comparaison avec notre résultat le noyer turc et roumain ont montré des teneurs très faibles en Cu



(0,92-1,80 (Yerlikaya et al., 2012) ; 0,18-3,22 mg/100g (Cosmulesco et al., 2009) respectivement).

L'accession d'Ait Mhamed et Tabrijjate ont présenté les teneurs les plus faibles en Zinc (3,39mg/100g MS, 4,10 mg/100g MS respectivement). Par contre, l'accession d'Aghbala a présenté la forte teneur en Zn (18,63mg/100g MS) avec une moyenne générale de 6,80mg/100g MS. Les valeurs obtenues sont supérieures à celles révélées chez le noyer roumain (0,20-3,61 mg / 100g) (Cosmulesco et al., 2009) et le noyer turc (2,7- 4,3 mg/100g (Muradoglu et al., 2010)).

Pour les autres micronutriments, les cerneaux contiennent des faibles quantités, c'est le cas de Mn, de Fe, de Cr, de Ni et de B ((0,79-1,67 mg/100g MS), (1,17-2,64 mg/100g MS), (0,16-0,20 mg/100g MS), (1,26-1,45 mg/100g MS), (0,07-1,49 mg/100g MS) respectivement). En général, ces quantités s'inscrivent dans la fourchette enregistrée chez le noyer turc (Mn (1,75-2,22 mg / 100g), Fe (1,78-2,18 mg /100g), Cr (0,10-0,33 mg / 100g) et B (1,2-1,51 mg / kg) (Ozkan et al., 2010). Le fer est un peu moins représenté dans le noyer marocain par rapport à d'autres pays comme l'Iran (444,02-559,52mg/100 g) (Aryapak et Ziarati, 2014). Le manganèse est considéré comme un nutriment essentiel pour notre organisme, car il est nécessaire au fonctionnement normal du système nerveux et de nombreux systèmes enzymatiques de l'organisme. Les futurs programmes d'amélioration devraient prendre en compte la teneur en fer et en manganèse comme des critères de sélection. L'apport adéquat de chrome pour l'Homme est d'environ 0,030 mg par jour, donc la consommation du cerneau des accessions étudiées peut couvrir la quantité requise. Concernant le nickel, on note que cinq parmi les 11 accessions étudiées présentent des valeurs supérieures à la moyenne (1,42 mg/100 g). Ce résultat est supérieur à celui trouvé chez le noyer turc (0,24mg/100g) (Ozkan et al., 2010).

Ainsi, l'ordre décroissant des teneurs en éléments nutritifs (mg/100g) chez les accessions étudiées est : P> K> Mg> Zn> Cu> Na> Fe> Ni> Mn> B> Cr, alors que chez les cultivars iraniens l'ordre est le suivant : P>K>Mg>Ca>Fe>Mn>Zn>Cu>Na

(Gharibzahedi et al., 2011), chez des cultivars turcs : K>P>Mg>B>Mn>Na>Fe>Zn>Zn>Cr>Cu>Ni (Ozcan, 2009) et pour le noyer roumain K>Mg>Ca>Mn>Fe>Zn>Cu>Na>Cr>Al>Se (Cosmulesco et al., 2009). L'ordre en fonction de la teneur en éléments minéraux du noyer marocain est conforme à celui édité par la base de données nationale de la composition des aliments pour les références standards (USDA, 2018), à l'exception du phosphore et du zinc qui sont classés respectivement au deuxième et au septième rang des éléments minéraux répertoriés par l'USDA, et au premier et au quatrième rang pour les accessions marocaines.

**Tableau 7 :** Paramètres biochimiques analysés pour les 11 accessions du noyer.

Paramètres	Aghbala	Naour	Taghzirte	Ait Bougamez	Ait Mhamed	Demnate	Imlil	Anougal	Beram	Amouguer	Tabrijjate	Moyenne	F
<b>Matière sèche (%)</b>	97,38±1,34	96,98±1,31	97,86±0,96	<b>96,75±0,21</b>	96,97±0,31	97,41±0,91	97,49±1,25	98,03±1,53	97,67±0,64	97,11±0,68	<b>98,56±0,31</b>	97,47	0,91
<b>Humidité (%)</b>	2,62±1,34	3,02±1,31	2,14±0,96	<b>3,24±0,21</b>	3,03±0,30	2,59±0,92	2,51±1,25	1,96±1,53	2,32±0,64	2,89±0,68	<b>1,44±0,31</b>	2,52	0,91
<b>Cendres (%)</b>	1,84±0,65	2±0,20	2,25±0,17	1,80±0,10	<b>1,67±0,12</b>	2,08±0,21	2,13±0,12	2,25±0,61	2,11±0,28	<b>2,53±0,18</b>	2,26±0,33	2,08	1,71
<b>Teneur en huile (%)</b>	<b>54,50±0,00</b>	59,93±0,89	65,23±1,78	58,49±3,71	<b>65,48±4,42</b>	65,09±1,68	61,30±6,57	59,15±4,78	58,89±2,29	58,88±1,87	62,54±4,77	60,86	2,85*
<b>Protéines brutes (%)</b>	15,17±2,67	15,17±5,63	15,71±1,75	12,83±3,64	18,67±0,01	18,17±1,88	14,00±1,75	16,33±4,04	18,08±1,01	<b>19,25±3,03</b>	<b>8,17±3,64</b>	15,60	3,27*
<b>Carbohydrates (%)</b>	24,44±3,24	19,88±4,63	14,67±3,00	23,63±0,65	<b>11,15±5,22</b>	13,83±3,09	19,47±4,25	20,30±7,22	18,58±1,84	16,69±4,36	<b>25,58±6,97</b>	18,93	3,15*
<b>Valeur énergétique(kcal/100g)</b>	<b>648,91±6,09</b>	679,56±7,62	708,56±11,85	672,28±18,69	708,62±21,69	<b>713,83±17,53</b>	685,60±37,74	678,85±30,13	676,63±10,38	673,70±9,21	697,89±23,8	685,86	2,83*
<b>Fibres brutes (%)</b>	4,97±1,45	<b>6,75±0,73</b>	6,49±0,21	6,36±0,36	6,49±0,21	5,60±0,17	4,35±0,48	4,85±1,34	4,65±0,82	<b>4,17±0,16</b>	5,95±0,54	5,51	5,03**
<b>RSA (%)</b>	80,28±2,69	79,43±5,92	78,64±4,16	78,16±3,73	82,27±2,10	79,98±6,00	81,31±2,75	78,64±4,06	77,37±6,42	<b>85,96±1,59</b>	<b>75,02±1,65</b>	79,73	1,44
<b>Polyphénols (mg GAE/100g)</b>	2659±230	1394±277	1017±155	3487±229	<b>3739±1202</b>	3389±1451	3236±1044	2307±1458	2587±1125	<b>1154±707</b>	3396±2205	2579	2,22
<b>Flavonoïdes (mg RE/100g)</b>	<b>62,11±26</b>	29,25±14,35	15,70±12,13	50,11±23,66	49,40±17,74	59,47±28,66	39,09±8,40	21,46±15,31	28,05±7,09	<b>12,59±10,96</b>	41,72±30,76	37,18	2,32*

RSA : Pourcentage du piégeage du radical DPPH ; Les valeurs en gras sont le minimum et le maximum ; Niveau de signification, \* : P< 0.05; \*\*: P<0.01; \*\*\*: P<0.001.

**Tableau 8 :** Eléments minéraux analysés pour les 11 accessions du noyer

Pramètres	Aghbala	Naour	Taghzirte	Ait Bougamez	Ait Mhamed	Demnate	Imlil	Anougal	Beram	Amouguer	Tabrijjate	Moyenne	F
<b>P (mg/100g)</b>	<b>338,1±46,45</b>	610,83±3,43	555,77±14,79	576,23±120,55	485,10±55,32	514,17±75,24	640,87±43,70	559,77±141,03	646,47±2,29	<b>675,87±46,45</b>	662,267±117,72	569,59	3,83**
<b>K (mg/100g)</b>	251,63±79,78	249,2±48,00	249,07±24,63	269,07±12,75	<b>210,10±15,74</b>	227,47±38,94	291,23±29,14	261,63±57,74	<b>338,93±88,33</b>	266,80±13,92	266,53±50,70	261,97	1,42
<b>Mg(mg/100g)</b>	101,25±9,08	<b>374,54±542,39</b>	99,84±7,83	100,53±17,62	94,65±10,25	91,88±12,58	96,62±11,77	100,38±20,69	117,57±6,67	120,53±10,27	<b>79,15±62,98</b>	125,17	0,76
<b>Na (mg/100g)</b>	4,15±2,54	2,46±0,80	2,63±0,86	1,78±0,56	<b>1,17±0,84</b>	2,95±2,06	2,86±1,14	6,80±2,05	3,57±2,50	<b>12,63±11,52</b>	3,48±1,18	4,06	2,14
<b>Cu (mg/100g)</b>	<b>2,08±1,56</b>	3,06±0,81	4,82±0,26	5,59±0,37	6,24±0,27	5,96±0,45	6,50±0,06	6,43±0,07	<b>6,67±0,29</b>	6,65±0,08	6,56±0,22	5,50	21,74***
<b>Zn (mg/100g)</b>	<b>18,63±6,68</b>	6,73±0,92	4,78±1,20	6,41±1,03	<b>3,39±0,68</b>	6,03±2,92	4,97±2,82	8,52±2,70	4,31±1,15	6,94±4,09	4,10±1,43	6,80	6,28***
<b>Mn (mg/100g)</b>	1,61±0,95	1,05±0,05	1,04±0,34	1,55±1,19	<b>0,79±0,16</b>	1,65±0,35	0,96±0,54	1,34±0,48	<b>1,67±0,54</b>	1,05±0,59	0,99±0,18	1,25	0,90
<b>Fe (mg/100g)</b>	1,88±0,06	1,85±0,54	1,78±0,10	1,66±0,63	1,85±0,27	1,45±0,32	1,71±0,40	<b>2,64±0,54</b>	<b>1,17±0,45</b>	1,30±0,28	1,68±0,18	1,72	2,90*
<b>Cr (mg/100g)</b>	0,18±0,01	0,19±0,00	0,19±0,00	0,19±0,00	<b>0,20±0,00</b>	<b>0,20±0,00</b>	0,19±0,00	0,18±0,02	0,19±0,00	<b>0,16±0,00</b>	0,19±0,00	0,19	2,54*
<b>Ni (mg/100g)</b>	<b>1,26±0,04</b>	1,42±0,02	1,41±0,05	1,43±0,06	1,39±0,03	1,43±0,02	1,41±0,02	<b>1,45±0,01</b>	1,42±0,03	1,40±0,05	1,44±0,01	1,42	5,23**
<b>B (mg/100g)</b>	<b>1,49±0,41</b>	0,50±0,17	0,46±0,11	0,70±0,28	0,29±0,22	0,25±0,05	0,35±0,27	0,18±0,14	0,26±0,20	0,56±0,02	<b>0,07±0,03</b>	0,46	10,00***

Les valeurs en gras sont le minimum et le maximum ; Niveau de signification, \* : P< 0.05; \*\*: P<0.01; \*\*\*: P<0.001.

## II.2. Etude multivariée des paramètres biochimiques

### II.2.1. Matrice de corrélation

La corrélation entre les paramètres biochimiques mesurés est présentée dans le tableau 9. Les résultats obtenus ont montré des corrélations positives entre les paramètres suivants :

- La valeur énergétique et la teneur en huile ( $r = 0,97^{**}$ ) plus les carbohydrates ( $0,66^*$ ).
- La teneur en protéines et le pourcentage du piégeage du radical DPPH ( $r = 0,68^{**}$ ).
- Les polyphénols totaux et la teneur en flavonoïdes ( $r = 0,79^{**}$ ) et aussi le pourcentage du piégeage du radical DPPH ( $r = 0,70^{**}$ ).
- Le P et les cendres ( $0,63^*$ ), le K ( $r = 0,53^{**}$ ), le Cu ( $r = 0,64^*$ ) et le Ni ( $r = 0,76^{**}$ ).
- Le B et le Zn ( $r = 0,87^{**}$ ).
- Le Cu et le Ni ( $r = 0,69^{**}$ ).
- Les cendres avec le Na ( $r = 0,74^{**}$ )

De même, des corrélations négatives et significatives ont été également observées entre les paramètres suivants :

- Les carbohydrates et la teneur en huile ( $r = -0,69^{**}$ ) plus la teneur en protéines ( $r = -0,71^{**}$ ).
- Les cendres avec les polyphénols ( $r = -0,57^*$ ), et les flavonoïdes ( $r = -0,73^{**}$ ).
- Les flavonoïdes et le P ( $r = -0,64^*$ ).
- Le Na avec les fibres, les polyphénols et les flavonoïdes ( $r = -0,66^*$ ,  $r = -0,51^*$ ,  $r = -0,55^*$  respectivement).
- Le Zn et la teneur en huile, la valeur énergétique, le P, le Cu, et le Ni ( $r = -0,73^{**}$ ,  $r = -0,73^{**}$ ,  $r = -0,72^{**}$ ,  $r = -0,72^{**}$  et  $r = -0,81^{**}$  respectivement).
- Le B et la teneur en huile ( $-0,67^*$ ), la valeur énergétique ( $-0,71^{**}$ ), le Ni ( $r = -0,88^{**}$ ), le Cu ( $r = -0,78^{**}$ ) et le P ( $r = -0,67^*$ ).
- Le Fe et le Cr ( $r = -0,71^{**}$ ).

L'huile, le constituant prédominant du noyer, est un ingrédient important dans les régimes alimentaires en raison de sa valeur énergétique élevée (Jørgensen et

Fernandez, 2000). En effet, nos résultats ont montré une forte corrélation positive entre la teneur en huile et la valeur énergétique ( $r=0,97^{**}$ ). En outre, L'activité antioxydante du cerneau est apparue très importante. Elle est principalement attribuée à la présence d'une forte teneur en polyphénols, considérés parmi les antioxydants naturels les plus puissants (Pereira et al., 2008 ; Gharibzahedi et al., 2011 ; Akbari et al., 2012). Cette association est confirmée par la forte corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante ( $r = 0,70^{**}$ ). Par conséquent, cette étude indique que le noyer marocain peut être considéré comme une bonne source de l'énergie et des composés naturels à activité antioxydante. Ainsi, il peut être utilisé dans le régime alimentaire comme un aliment thérapeutique et un aliment énergétique naturel qui apporte l'énergie nécessaire.

### **II.2.2. Structuration des accessions du noyer**

Les deux premiers axes de l'ACP absorbent 64,53% de la variation totale. 46,76% de l'information est expliquée par la première composante (PC1), contre 17,76% donnée par la deuxième composante (PC2). La figure 17 illustre la projection des différentes accessions étudiées dans le plan défini par les deux premières composantes. On note l'isolement de l'accession (AGH) du Moyen Atlas riche en carbohydrates, en Zn, en P et en B, par rapport aux autres accessions (AMG, BER, ANG, IML, TAB, AMD, ABZ, DET, NAO et TAG) qui forment un seul groupe. Ces dernières sont surtout caractérisées par une teneur élevée en huile, en valeur énergétique, en fibres, en flavonoïdes, en protéines, en Cu et en Cr. Ainsi, il en ressort qu'une variabilité typiquement continue caractérise les accessions étudiées.

### **II.2.3. Etablissement du dendrogramme**

La matrice des moyennes, engendrées pour les différents paramètres biochimiques est analysée par le logiciel STATISTICA via la méthode UPGMA. Le dendrogramme obtenu a identifié deux principaux groupes (Figure 18). Le premier est composé d'une seule accession du Moyen Atlas Aghbala, qui semble divergente des autres, avec une haute teneur en flavonoïdes, en Zn et en B. Cependant le deuxième groupe est formé par l'ensemble des autres accessions et il est subdivisé en deux sous-

groupes : le premier sous-groupe est formé uniquement par une accession du Moyen Atlas "Naour" caractérisée par une grande teneur en fibres et en Mg, tandis que le deuxième sous-groupe est ramifié en deux branches. La première branche est constituée d'une accession du Moyen Atlas (Taghzirte) et quatre accessions du Haut Atlas (Anougal, Ait Bougamez, Ait Mhamed et Demante) qui sont caractérisées par un niveau élevé d'huile, de valeur énergétique, des composés phénoliques, de Fe, de Cr et de Ni. La deuxième branche inclut les accessions Imlil, Tabrijjate, Amouguer et Beram qui appartiennent au Haut Atlas avec des niveaux élevés de protéines, de carbohydrates, de cendres, du pouvoir antioxydant, de P, de K, de Cu, de Na et d'une faible teneur en humidité.

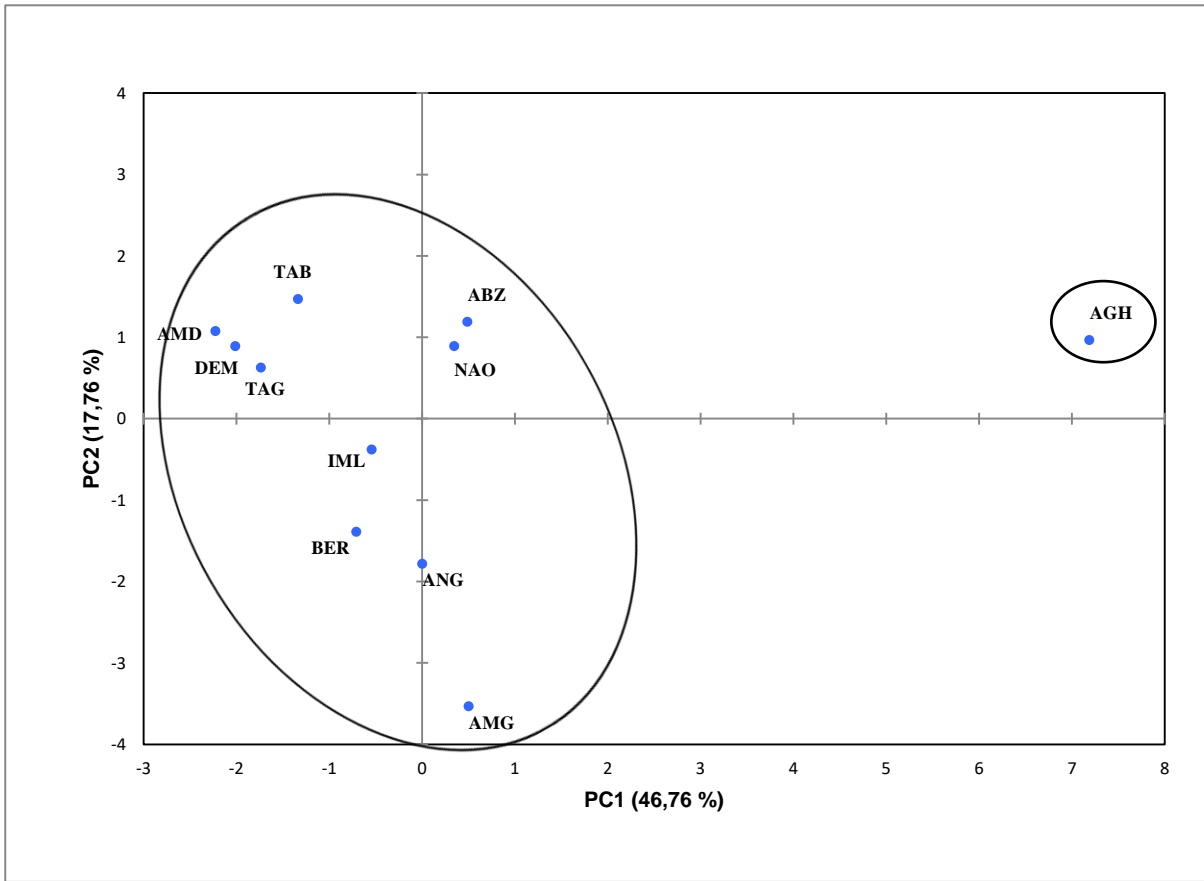
**Tableau 9** : Coefficients de corrélation entre les paramètres biochimiques analysés.

	MS	H	Ash	Huile	Prot	Crhydt	VEng	Fibres	RSA	PPT	FLV	P	K	Mg	Na	Cu	Zn	Mn	Fe	Cr	Ni	
<b>H</b>	-																					
<b>Ash</b>	1,00**																					
<b>Huile</b>	0,52	-,51																				
<b>Prot</b>	0,17	-,16	0,03																			
<b>Crhydt</b>	-,47	0,47	0,01	0,08																		
<b>VEng</b>	0,29	-,29	0,02	-,69**	-,71**																	
<b>Fibres</b>	0,23	-,23	0,07	0,97**	0,06	0,66*																
<b>RSA</b>	-,18	0,18	-,50	0,47	-,27	-,13	0,44															
<b>PPT</b>	-,59*	0,59*	0,12	-,05	0,68*	-,51	-,11	-,37														
<b>FLV</b>	-,02	0,02	-,57*	0,11	-,33	0,20	0,13	0,06	0,70**													
<b>P</b>	-,22	0,22	-,73**	-,03	-,20	0,17	-,02	0,20	-,15	0,79**												
<b>K</b>	0,21	-,21	0,63*	0,17	-,18	0,04	0,19	-,18	-,07	-,19	-,64*											
<b>Mg</b>	0,25	-,25	0,33	-,45	-,12	0,40	-,43	-,55*	-,28	-,05	-,35	0,53*										
<b>Na</b>	-,36	0,37	-,08	-,15	0,05	0,04	-,17	0,36	0,04	-,46	-,22	0,16	-,06									
<b>Cu</b>	0,07	-,07	0,74**	-,37	0,33	0,02	-,35	-,66*	0,55	-,51*	-,55*	0,30	0,16	-,09								
<b>Zn</b>	0,28	-,28	0,40	0,41	0,08	-,28	0,44	-,33	0,03	0,29	-,29	0,64*	0,29	-,51	0,24							
<b>Mn</b>	-,10	0,11	-,19	-,73**	0,02	0,45	-,73**	-,26	0,13	-,10	0,35	-,72**	-,11	0,01	0,20	-,72**						
<b>Fe</b>	-,06	0,06	-,16	-,48	0,15	0,28	-,40	-,24	-,28	0,22	0,36	-,33	0,33	-,16	-,03	-,19	0,45					
<b>Cr</b>	0,23	-,23	-,14	-,08	-,18	0,17	-,08	0,17	-,17	-,02	-,04	-,34	-,36	0,06	-,08	-,21	0,29	-,17				
<b>Ni</b>	-,20	0,2	-,04	0,64*	-,01	-,41	0,62*	0,3	0,02	0,26	0,06	0,48	0,02	-,08	-,30	0,48	-,78**	-,26	-,71**			
<b>B</b>	0,24	-,24	0,34	0,48	-,14	-,15	0,52	0,17	-,29	0,03	-,45	0,76**	0,17	0,06	0,01	0,69**	-,81**	-,18	0,02	0,42		
	-,41	0,41	-,35	-,67*	0,05	0,34	-,71**	-,09	0,26	-,12	0,35	-,67*	-,10	0,06	0,06	-,78**	0,87**	0,35	0,01	-,47	-,88**	

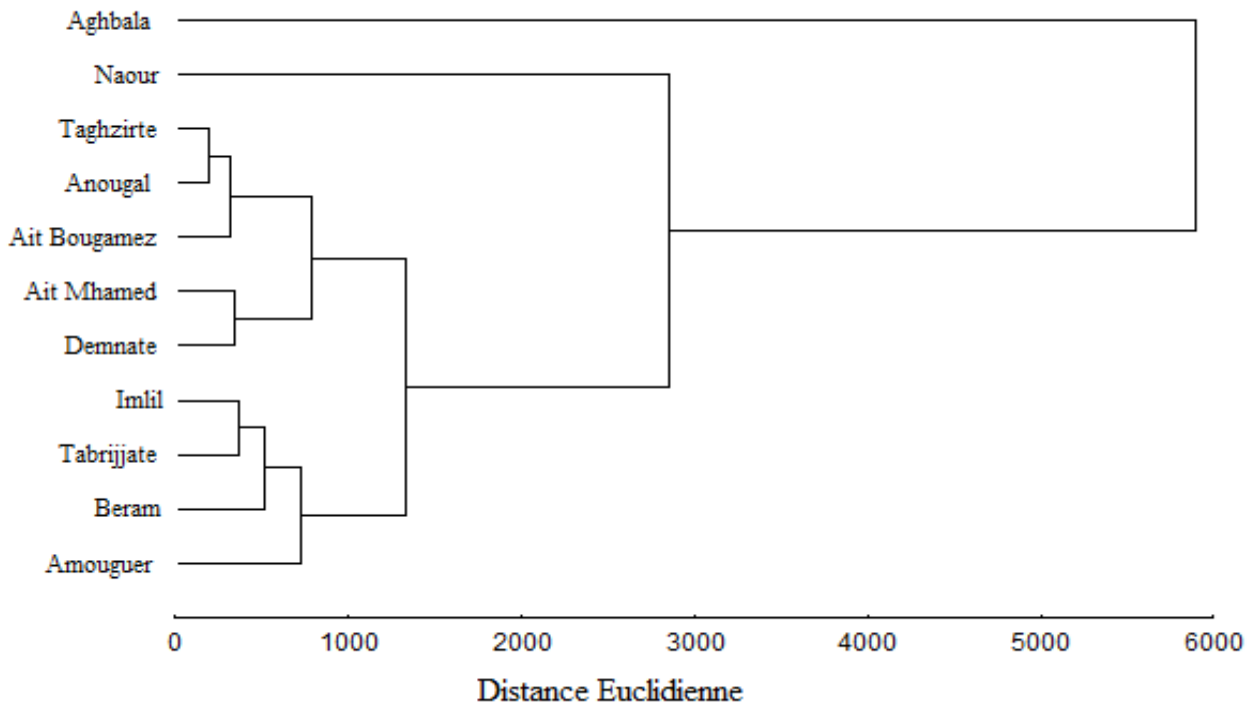
Crhydt : Carbohydrates ; Prot : Protéines ; Niveau de Signification ; RSA : Pourcentage du piégeage du radical DPPH ; Signification : \* P<0.05,

\*\* P< 0.01





**Figure 17.** Dispersion des accessions dans le plan défini par les deux premières composantes principales basée sur des traits biochimiques.



**Figure 18 :** Dendrogramme de 11 accessions du noyer marocain basé sur des traits biochimiques

### III. CONCLUSION

Au cours de cette partie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation biochimique de 11 accessions marocaines du noyer. Les paramètres analysés à savoir l'humidité, les cendres, la teneur en huile, les protéines brutes, les carbohydrates, la valeur énergétique, les fibres brutes, les polyphénols totaux, les flavonoïdes totaux, le pouvoir antioxydant et certains minéraux tels que le P, le K, le Mg, le Na, le Cu, le Zn, le Mn, le Fe, le Cr, le Ni et le B, seront utiles pour déterminer la qualité du fruit. Les résultats obtenus ont permis d'une part, de déterminer la composition biochimique et le potentiel nutritionnel de cette espèce et d'autre part, ils ont permis d'établir la variation de cette composition entre ces accessions. Les résultats obtenus ont montré que le noyer marocain a une teneur élevée en huile (54,50%-65,48%). Ce pourcentage est fortement associé à une valeur énergétique très importante ( $r=0,97^{**}$ ). De plus, les accessions étudiées présentent une bonne source de protéines d'origine végétale (8,17%-19,25%) qui sont bénéfiques pour la santé humaine et aussi des polyphénols qui ont révélé une forte corrélation avec l'activité antioxydante ( $r=0,70^{**}$ ). Par conséquent, le noyer marocain peut être utilisé comme une source potentielle des huiles, des protéines végétales et également un aliment stratégique dans les aliments thérapeutiques. De même, les cerneaux ont révélé une richesse significative en éléments minéraux, essentiellement le P (338,1-675,87 mg /100g MS), le K (210,1-338,93mg/100g MS), le Zn (3,39-18,63mg/100g MS) et le Cu (2,08-6,67mg/100g MS), et une carence en Fe (1,17-2,64 mg/100g MS) et en Mn (0,79-1,67 mg/100g MS) avec l'ordre décroissant suivant : P > K > Mg > Zn > Cu > Na > Fe > Ni > Mn > B > Cr.

En outre, les analyses multivariées ont regroupé les 11 accessions en quatre groupes indépendamment de leur origine géographique et la chaîne montagneuse. Le premier groupe est composé d'Aghbala avec une teneur élevée en flavonoïdes, en Zn et en B. L'accession de Naour a formé le deuxième groupe avec une grande teneur en fibres et en Mg, tandis que le troisième groupe, il est constitué des accessions Taghzirte, Anougal, Ait Bougamez, Ait Mhamed et Demante, qui sont caractérisées par un niveau élevé d'huile, de la valeur énergétique, des composés phénoliques, de Fe, de Cr et de Ni. Le quatrième groupe contient les accessions Imlil, Tabrijjate,

Amouguer et Beram avec des niveaux élevés de protéines, de carbohydrates, des cendres, de l'activité antioxydante, de P, de K, de Cu, de Na et d'une faible humidité. D'autre part, on note que la teneur en huile, la valeur énergétique, les protéines, les carbohydrates, les fibres, les flavonoïdes et certain minéraux tels que le P, le Cu, le Zn et le B se sont révélés les plus discriminants.

La variation de la composition biochimique des cerneaux entre les accessions étudiées du noyer pourrait s'expliquer par l'influence de certains facteurs tels que l'âge des arbres ou encore les conditions environnementales (température, rayonnement, pluviométrie) propres à chacune des régions (Génard et al., 2010 ; Mauget et al., 2011). La variabilité biochimique pourrait permettre, en fonction de la qualité du produit final recherchée, de sélectionner des génotypes performants sans toutefois avoir recours à des composés chimiques, pas toujours inoffensifs pour la santé. Compte tenu de l'importance des paramètres biochimiques analysés, les accessions du noyer du Haut Atlas pourraient être considérées comme les premières accessions à utiliser en tant que sources de la multiplication. Néanmoins, ces accessions doivent, tout d'abord, être conduites sous différentes conditions environnementales pour des essais de comportement. De même, la mise en place des techniques de conservation et valorisation de ce fruit permettra de rendre cette ressource disponible hors saison et d'atteindre un plus large public.

**CHAPITRE IV :**  
**ANALYSE DE LA VARIABILITE**  
**ET DE LA STRUCTURE**  
**GENETIQUES DES ACCESSIONS**  
**DU NOYER PAR LES**  
**MARQUEURS ISSR**

## **I. INTRODUCTION**

L'analyse de la variabilité génétique par les marqueurs phénotypiques est souvent complétée par des caractères neutres vis-à-vis des fluctuations de l'environnement. L'observation morphologique est la base de la description du matériel végétal. Toutefois, elle manque de précision à cause de la variation importante de l'expression des caractères due à une interaction « génotype-environnement ». De même, les marqueurs biochimiques ont été également utilisés pour la description des espèces végétales. Cependant, ces marqueurs présentent quelques inconvénients : faible nombre accessible, faible polymorphisme et influence du stade physiologique (Zhang, 2002). C'est pourquoi, l'usage des nouvelles approches d'ordre moléculaire constitue des outils plus performants pour l'évaluation de la diversité génétique des espèces végétales. En effet, les marqueurs moléculaires ne sont pas influencés par les fluctuations de l'environnement et sont indépendants de l'organe analysé et du stade de développement de la plante.

De nombreuses techniques basées sur les marqueurs moléculaires sont actuellement disponibles et leur utilisation dépend du degré d'information que l'on souhaite obtenir (Siret, 2001). Ces marqueurs peuvent élucider les relations phylogénétiques et analyser la diversité génétique à l'échelle intra et interspécifique. Leur utilisation ouvre également de nombreuses perspectives notamment pour approfondir les connaissances sur l'histoire des espèces, établir des prévisions en gestion des bioressources et engager des programmes en vue de la sauvegarde des espèces (Koffi, 2010 ; Fulton and Stroberk, 2010). Dans ce travail, nous avons utilisé les marqueurs moléculaires ISSR pour l'étude de la diversité génétique du noyer au Maroc.

## **II. MATERIELS ET METHODES**

### **II.1. Matériel végétal**

Pour chaque accession, utilisée antérieurement dans les analyses morphologiques et biochimiques (Tableau 2, Figure 10), des échantillons de jeunes feuilles saines ont été collectés en quantités suffisantes à partir de six arbres. Les

feuilles sont placées dans des sacs en plastique avec des étiquettes illustrant le nom de l'accession et le numéro de l'individu, et transportées par la suite dans des glacières au laboratoire où elles sont congelées à -20 °C.

## **II.2. Extraction d'ADN**

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée selon la méthode CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) (Doyle et Doyle, 1990) avec quelques modifications. Il s'agit notamment de réajustement du volume des tampons, des durées de centrifugation, de précipitation des acides nucléiques et l'ajout d'un tensioactif (Laury sarcosine). Une quantité de 0,2g des jeunes feuilles est broyée à froid avec 2 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl (10 mM ; pH 8,0) ; EDTA dissodique (5 mM) ; sorbitol (350 mM) ; PVP-40 (1%)). Le broyat homogénéisé est centrifugé à 9000g durant 10 min. Par la suite, le culot est récupéré dans 1 ml de tampon de lyse (Tris-HCl (50 mM ; pH 8,0) ; NaCl (1,4 M) ; EDTA (10 mM) ; CTAB (2%) ; Mercaptoéthanol (0,1% v/v) ; sodium lauroyl sarcosinate (5%)). Après une brève agitation manuelle, le mélange est placé dans un bain-marie à 65°C pendant 60 min. Après le refroidissement sous la hotte, 1 ml du mélange chloroforme- alcool isoamylique (24 :1) est ajouté, puis centrifugé à 9000g pendant 10 min. Le surnageant ainsi récupéré est lavé avec le même volume de chloroforme-alcool-isoamylique (24 :1). Après une centrifugation à 9000 g pendant 10 min, le surnageant est récupéré en mesurant son volume pour ajouter un volume égal d'isopropanol refroidi à -20°C suivi d'une centrifugation à 9000 g pendant 10 min. La pelote d'ADN est séchée à 60 °C pendant 20 min dans l'étuve. Finalement, le culot d'ADN est repris dans 100µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 ; 1 mM EDTA).

## **II.3. Test de qualité d'ADN sur gel d'agarose**

La qualité de l'ADN extrait a été d'abord vérifiée sur gel d'agarose à 0,7%. Un total de 5µl de chaque échantillon est disposé dans chaque puit en présence d'un marqueur de taille (1kb). La migration est effectuée dans le tampon tris borate EDTA (TBE) 1x (Tris-borate 45mM, EDTA 0.5mM, PH=8.0 ; acide borique 44 mM ; eau bidistillée) pendant une heure à 100 V. Cette étape nous a permis de s'assurer de toute

contamination (dégradation totale des protéines et des ARNs) et vérifier que l'ADN extrait n'a pas été dégradé (absence de "smear"). Après la migration les bandes d'ADN sont visualisées sous rayonnement émis par un Système de Documentation sur Gel (ENDURO™ GDS) couplé à un ordinateur équipé d'une caméra spéciale (ENDURO™ GDS) et un logiciel de traitement des images.

#### **II.4. Quantification d'ADN**

La quantification de l'ADN est effectuée par la mesure de la densité optique à 260 nm par la spectrophotométrie UV-Vis (JASCO V-630). Dans les conditions standards, 1 unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration de 50 µg/ml d'ADN double brin (Kaplan et Delpech, 1993). Ainsi, la concentration d'ADN en ng/µl est obtenue par la formule suivante :

$$C_{ADN} = DO_{260} \times 50 \times \text{Facteur de dilution}$$

#### **II.5. Estimation de la pureté**

Afin d'évaluer la pureté d'ADN, une autre lecture d'absorption à 280nm est également effectuée pour révéler la contamination des extraits d'acides nucléiques par les protéines. Le degré de la pureté de l'ADN est estimé en calculant le rapport de l'absorbance  $A_{260nm}/A_{280nm}$ . En général, plus cette ration tend vers 2 plus l'extrait d'ADN est qualifié de meilleur et pur et son utilisation dans plusieurs techniques d'amplification sera réussie.

#### **II.6. Amplification des fragments d'ADN**

##### **II.6.1. Préparation des concentrations d'ADN**

Pour réaliser les différentes réactions en chaîne par polymérase (PCR), des concentrations finales d'ADN de 10ng/µl sont préparées pour les 66 individus étudiés.

##### **II.6.2. Amorces ISSR utilisées**

Nous avons testé plusieurs amorces ISSR, afin de sélectionner les amorces compatibles sur les écotypes du noyer (Aiqing et al., 2014 ; Miltiadis et al., 2010 ;

Shamasbi et al., 2018). Par la suite, nous avons retenu 11 amorces qui ont donné des bandes visibles et bien délimitées et un haut degré du polymorphisme (Tableau 10).

### **II.6.3. Optimisation des conditions de la PCR**

Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur (MultiGene) dans un volume total de 12,5 µl, contenant 15ng d'ADN matrice, 1x du tampon de réaction, 3mM du MgCl<sub>2</sub>, 1mM de dNTPs, 0,8µM de chaque amorce, 0,75U d'ADN polymérase et de l'eau distillée.

La qualité et le rendement du produit des réactions PCR-ISSR dépendent de plusieurs paramètres dont la température d'hybridation (Rychlik, 1990). C'est le point le plus critique concernant la spécificité de la réaction de PCR-ISSR. Ainsi, une étape d'optimisation de la température d'hybridation a été réalisée. Ainsi, la température d'hybridation (T<sub>a</sub>) a été déterminée pour chaque amorce en appliquant la technique PCR à gradient de température.

### **II.6.4. Etapes de l'amplification**

L'amplification de l'ADN est réalisée selon le programme suivant : une pré-dénaturation préalable à 94°C pendant 5 min, suivie de 45 cycles d'amplification. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 94 °C pendant 45s, une étape d'hybridation pendant 45s à la température optimale d'hybridation (T<sub>a</sub>) déterminée par PCR à gradient de température pour chaque amorce et une étape d'élongation à 72 °C durant 2 min. Une élongation finale à 72 °C pendant 7 min est toujours programmée à la fin du dernier cycle d'amplification (Figure 19).

### **II.6.5. Electrophorèse et révélation des produits d'amplification**

Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose ,7%. La migration est effectuée dans le TBE sous une tension de 100 volts. Un marqueur du poids moléculaire (1kb) est utilisé de part et d'autre du gel. Les bandes sont révélés par bromure d'éthidium (BET) (1µg/ml) après exposition aux UV émis

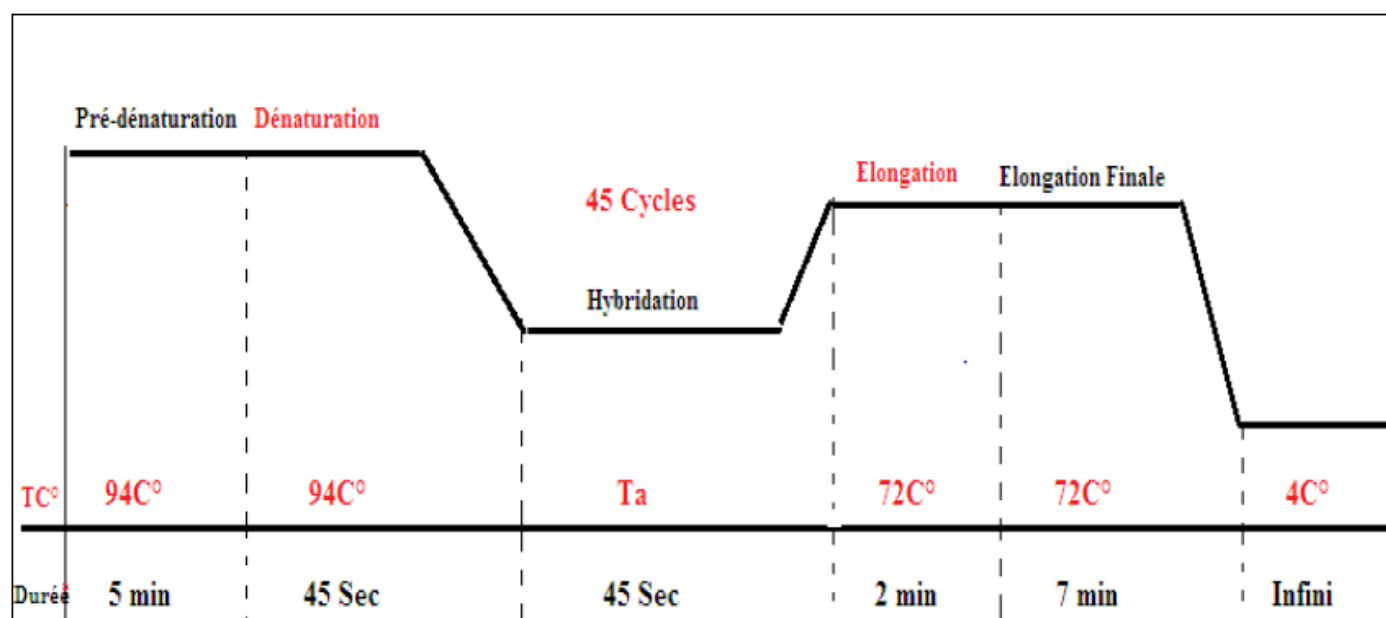


par le Système de Documentation sur Gel. Les gels sont documentés sous forme d'images.

**Tableau 10** : Séquences des amorces des marqueurs ISSRs utilisées pour évaluer la diversité génétique du noyer

Amerces ISSR	Séquence (5'-3')	Tm °C
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	48,1
UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	46,8
UBC 811	GAAGAGAGAGAGAGAGC	49,0
UBC 814	CTCTCTCTCTCTCTA	47,1
UBC 818	CACACACACACACACAG	47,9
UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	51,2
UBC 836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	51,9
UBC 840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	49,1
UBC 841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	49,7
UBC 855	ACACACACACACACACYT	49,1
UBC 889	ACACACACACACAC	38,9

Y = (C,T)



**Figure 19 :** Programme d'amplification d'ADN par PCR.

## **II.7. Méthodes d'analyse statistique des données**

La lecture des profils électrophorétiques des amorces ISSR est réalisée sur la base de la présence ou l'absence des différentes bandes amplifiées chez les 66 individus analysés. Le chiffre « 1 » est attribué pour présence de la bande et le chiffre « 0 » pour son absence. Ainsi, pour l'ensemble des amorces chez toutes les accessions, un tableau de contingence à 135 lignes (fragments amplifiés) et 66 colonnes (individus) a été établi. A partir de cette matrice binaire des données, nous avons calculé et comparé différents paramètres permettant d'analyser le polymorphisme intra et inter-accessions et entre les groupes géographiques et bioclimatiques des accessions.

### **II.7.1. Informativité des marqueurs**

Après la lecture des profils électrophorétiques obtenus pour chaque amorce, le nombre total des bandes amplifiées, le nombre des bandes polymorphes et le pourcentage du polymorphisme sont déterminés. De plus, pour évaluer l'efficacité et la capacité des marqueurs ISSR utilisés à révéler le polymorphisme chez les accessions étudiées, plusieurs paramètres sont calculés :

#### **➤ Contenu informatif du polymorphisme (PIC)**

Le pouvoir discriminant d'un marqueur génétique peut être estimé par le calcul du contenu informatif du polymorphisme (Botstein et al., 1980), selon la formule suivante (Anderson et al., 1993) :

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

Où  $P_i$  est la fréquence de chaque allèle par amorce.

La valeur de PIC s'approche de 0 quand il n'y a aucune variation allélique et de 1 lorsque les fréquences des allèles sont égales.

#### **➤ Rapport de multiplexe efficace (EMR)**

Le EMR, ou le rapport de multiplexe efficace, est estimé pour chaque combinaison d'amorces comme suit :

$$EMR = n_p \left( \frac{n_p}{n} \right)$$

$n_p$  : Nombre des bandes polymorphes

$N$  : Nombre total des bandes.

Où

Plus la valeur de EMR est élevée, plus le système « Amorce-marqueur » est efficace.

#### ➤ **Indice du marqueur (MI)**

Pour chaque combinaison d'amorce le MI ou l'indice du marqueur, est déterminé pour balancer le taux de polymorphisme détecté (PIC). IL est calculé selon la formule de Powell et al. (1996).

$$MI = PIC \times EMR$$

#### ➤ **Pouvoir résolutif (Rp)**

Le pouvoir résolutif (Rp) est calculé pour tester l'efficacité des amorces utilisées pour différencier entre les individus (Gilbert et al., 1999). Le Rp a été estimé selon la formule de Prevost et Wilkinson, (1999) :

$$Rp = \sum IB \quad \text{avec} \quad IB = 1 - 2 * |0,5 - P|$$

$P$  : la proportion des individus possédant la bande I.

Où

### **II.7.2. Analyse de la diversité génétique**

Le but de cette approche est d'évaluer la diversité génétique et l'identification des accessions étudiées. Ainsi, la matrice binaire obtenue a été utilisée par le programme POPGENE version 1.32 (1999) pour calculer les différents paramètres reliés à la variabilité génétique des accessions.

#### ➤ **Nombre moyen d'allèles par locus**

Le nombre moyen d'allèles par locus ( $N_a$ ), appelé également le taux d'allélisme ou la richesse allélique, est défini comme étant le nombre d'allèles présents à un locus donné :

$$Na = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L n_i$$

Où  $n_i$  : Nombre d'allèles au loci

$L$  : Nombre de locus considérés

La richesse allélique qui tient compte du nombre d'allèles par locus est particulièrement intéressante pour les stratégies de conservation. Il était souvent utilisé dans la gestion des collections et des banques de semences.

#### ➤ **Nombre d'allèles efficaces**

Selon Kimura et crow, (1964) le nombre d'allèles efficaces ( $N_e$ ) est calculé pour un locus  $i$  à  $k$  des allèles  $A_1, A_2, \dots, A_k$  et de fréquence  $p_1, p_2, \dots, p_k$ , en utilisant la formule suivante :

$$N_e = 1/\sum p^2 = 1/(p_1^2 + p_2^2 + \dots + p_k^2)$$

Ce paramètre explique la part de chaque allèle dans l'expression de la diversité globale (Siret, 2001).

#### ➤ **Indice de diversité de Shannon (I)**

Ce paramètre renseigne sur la diversité génétique des accessions. En effet, plus sa valeur est élevée plus l'hétérozygotie de la population est importante (Shannon, 1948). Il est calculé selon la formule suivante :

$$I = -\sum (p \times \ln(p) + q \times \ln(q))$$

Où  $q = (1 - \text{fréquence de la bande})^{0.5}$  et  $p = 1 - q$

#### ➤ **Indices de la diversité de Nei**

La variabilité entre les accessions peut être appréhendée par la mesure du coefficient de différenciation génétique ( $G_{ST}$ ) (Nei, 1973). Pour les loci multialléliques, Nei propose les indices de diversité suivants : La diversité génétique totale ( $H_T$ ) qui mesure la diversité génique de l'ensemble des accessions. Ce paramètre

est la somme de la diversité génétique au sein des accessions ( $H_S$ ) et la diversité génétique entre les accessions ( $D_{ST}$ ) (Crossa et al., 1993). Les hétérozygoties  $H_T$  et  $H_S$  sont calculées sous l'hypothèse de Hardy Weinberg et dépendent strictement des fréquences alléliques observées. Le coefficient de différenciation génétique ( $G_{ST}$ ) estime la différenciation entre les sous populations (Nei, 1973).

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T} = 1 - \frac{H_S}{H_T} = \frac{D_{ST}}{H_T}$$

### ➤ **Indice de fixation statistiques de Wright**

L'indice de fixation ( $F_{ST}$ ) traduit le déficit en hétérozygotes dû à la subdivision de la population en sous populations et mesure le niveau de différenciation génétique entre les sous populations. Ce déficit en hétérozygotes est souvent attribué à la dérive génétique et/ou à un flux de gènes limités Wright (1951).

$$F_{ST} = \left( \frac{H_T - H_S}{H_T} \right) = \left( 1 - \frac{H_S}{H_T} \right)$$

Où

$H_S$  : Hétérozygotie moyenne attendue au niveau des sous population

$H_T$  : Hétérozygotie moyenne attendue au niveau de la population totale

Cet indice mesure la réduction relative des hétérozygotes, lié aux différences alléliques entre les sous populations. C'est un indice de diversification des populations. Si les sous populations sont identiques,  $F_{ST}=0$ .

$0 < F_{ST} < 0,05$  : une faible différenciation des populations

$0,05 < F_{ST} < 0,15$  : une moyenne différenciation des populations

$0,15 < F_{ST} < 0,25$  : une large différenciation des populations

$F_{ST} > 0,25$  : une très large différenciation des populations

### ➤ **Analyse de la variance moléculaire**

L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) est utilisée dans ce travail, d'une part pour estimer la diversité génétique entre les accessions ( $F_{ST}$ ) et d'autre part,

pour chercher la variation entre les groupes ( $F_{CT}$ ) géographiques (Beni mellal, Azilal, Merrakech et Errachidia) et entre les groupes bioclimatiques (aride, semi-aride et subhumide) et entre aussi les accessions à l'intérieur des groupes définis ( $F_{SC}$ ). L'AMOVA est basée sur les distances génétiques calculées par le nombre de différences paires entre haplotypes. La signification des F-statistiques par rapport à zéro a été testée après 2000 permutations.

La différenciation génétique ( $F_{ST}$ ) entre paires des 11 accessions est également générée par l'AMOVA, et elle est considérée comme distance génétique. L'indice  $F_{ST}$  spécifique aux accessions a été également produit afin de déterminer l'accession la plus différenciée des autres. Toutes ces analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel ARLEQUIN version 3.01 (Excoffier et al., 2005).

#### ➤ Flux du gène (Nem)

Le terme de "Flux de gènes" ou "Flux génétique" est généralement employé pour désigner le passage efficace des gènes d'une population à une autre et même entre individus au sein d'une même population. Ce paramètre représente le mouvement entre les différents pools génétiques ayant comme objectif d'homogénéiser les fréquences alléliques entre les différentes accessions (Slatkin, 1985). A partir des valeurs de  $F_{ST}$ , le flux de gènes (nombre effectif de migrants par génération = Nem) entre les accessions est estimé suivant la formule  $Nem = \frac{1}{4} \left( \frac{1}{F_{ST}-1} \right)$  (Fischer & Matthies, 1998).

#### ➤ Test de corrélation de Mantel

Le test de Mantel a permis d'évaluer la corrélation entre la distance génétique et la distance géographique des 11 accessions (Mantel, 1967). Il est calculé en utilisant le programme Mx Comp de l'NTSYS-pc software, version 2.02g.

#### ➤ Relation génétique entre accessions

Pour une représentation graphique de la structure génétique des 66 individus, un dendrogramme est construit sur la base de la distance de Nei (Nei, 1987) en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Mean with Arithmetic Average) à l'aide du logiciel MEGA version 3.1 (Kumar et al., 2004).

➤ **Analyse de la structure génétique des accessions par une approche bayésienne**

L'analyse de la structure génétique des accessions consiste à déterminer les groupes génétiques les plus plausibles par une méthode bayésienne. Cette approche est implémentée dans le programme STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Dans cette étude, Nous avons procédé à l'analyse par la méthode STRUCTURE en choisissant les modèles admixture (mélange des populations) avec l'option « fréquences des allèles corrélées (Falush et al., 2003). Le nombre K des populations a été fixé entre 2 et 11, en effectuant 10 simulations par valeur de K. La longueur de la période initiale « burn-in » a été réglée à 70000 pour un nombre total de permutations de 10000. Pour déterminer le nombre optimal K expliquant la structure génétique des populations, la procédure définie par Evanno et al. (2005) est utilisée via le site Web STRUCTURE Harvester (Earl et vonHoldt, 2012).

### **III. RESULTATS ET DISCUSSION**

#### **III.1. Qualité d'ADN extrait**

L'extraction de l'ADN par la méthode CTAB communément utilisées pour extraire l'ADN génomique des plantes (Mongkolporn et al., 2003), s'est révélée très efficace. Du point de vue quantitatif, la quantification spectrophotométrique de l'ADN extrait a permis de donner des concentrations d'ADN très importantes de 1268,57 ng/μl à 2959,29 ng/μl. Du point de vue qualitatif, le rapport  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  est calculé pour tous les échantillons. Les résultats obtenus ont montré que les rapports de nos extraits varient de 1,12 à 1,47. D'après Sambrook et al. (1989) un échantillon d'ADN est qualifié de meilleur ou pur, quand le ratio  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  présente une valeur entre 1,8 et 2. A partir de l'ADN extrait, nous avons réalisé des dilutions dans le but d'obtenir des solutions d'ADN d'une concentration de 10 ng/μl pour les réactions d'amplification (PCR).

### **III.2. Optimisation de la température d'hybridation**

Pour chaque amorce, la PCR à gradient de température a permis de tester 12 températures d'hybridations ( $T_a$ ) simultanément avec le même échantillon. Après la révélation des gels d'agarose, le choix de  $T_a$  est basé sur la clarté et la forme bien délimitée des bandes obtenues. Pour l'amorce UBC818, les résultats présentés par le profil électrophorétique montrent que la meilleure amplification est obtenue avec la température d'hybridation  $43.5^\circ\text{C}$  (Figure 20). Ainsi, nous avons déterminé les températures d'hybridation optimales pour les 11 amorces utilisées. (Tableau 11).

### **III.3. Polymorphisme des marqueurs ISSR**

L'optimisation du mélange réactionnel de la PCR et du programme d'amplification a donné des profils nets et de bonne qualité (Figure 21). L'analyse de cette figure montre que les profils d'amplification diffèrent aussi bien par la position que par le nombre des bandes générées.

Au total 135 bandes ont été générées pour toutes les accessions étudiées en présence des 11 amorces (Tableau 11). Parmi ces bandes, 123 se sont avérées polymorphes ce qui correspond à un pourcentage de bandes polymorphes (PPB) de 91%, suggérant ainsi que les amorces testées sont efficaces en termes de mise en évidence du polymorphisme chez cette espèce. Le pourcentage obtenu est comparable au résultat trouvé chez des génotypes du noyer chinois analysés par le même type de marqueur ISSR (92%) (Aiqing et al., 2014). Néanmoins, il est plus élevé que ceux trouvés chez le noyer italien (73,8%) (Malvolti et al., 2010) et chez le noyer grec (82,8%) (Christopoulos et al., 2010). Tenant compte du PPB, les résultats obtenus montrent que les amorces UBC807, UBC811, UBC836, UBC841 et UBC889 sont plus efficaces pour évaluer la diversité génétique de cette espèce (PPB=100%). Par ailleurs, tenant compte de chacune des amorces, le nombre de bandes polymorphes varie de 6 (UBC818, UBC855) à 19 (UBC841), avec une moyenne de 11,18 bandes par amorce. Le maximum des bandes a été généré en présence des amorces UBC841 et UBC836



suggérant que ces dernières sont très efficaces pour explorer le polymorphisme de l'ADN au sein du noyer.

En outre, l'efficacité des amorces à différencier entre les accessions étudiées a également été abordée en estimant le contenu informatif du polymorphisme (PIC), le Ratio multiplex (EMR), le Marker index (MI) et le pouvoir résolutif (Rp). L'estimation du PIC montre des valeurs qui varient de 0,80 (UBC818) à 0,93 (UBC841) avec une moyenne de 0,88. Ce résultat témoigne de la puissance de ces amorces pour différencier entre les accessions du noyer. Selon Botstein et al. (1980), une valeur du PIC supérieure à 0,50 indique un locus très informatif. La valeur moyenne du PIC obtenue au cours de ce travail est supérieure aux valeurs rapportées chez le noyer originaire d'autres pays par les mêmes marqueurs ISSR : Christopoulos et al. (2010) (0,28) chez le noyer grec et Shamasbi et al. (2018) (0,30) chez le noyer indien. De même, Noor Shah et al. (2016) ont obtenu des valeurs du PIC très faibles (0,16) en utilisant les marqueurs SSR chez le noyer indien. Ces valeurs obtenues au cours de ce travail ont mis en évidence une variation génétique considérable du noyer marocain, qui devrait être considérée pour les futurs programmes de sélection.

Concernant le EMR, la valeur la plus élevée (19,00) et la plus faible (4,00) ont été enregistrées pour les amorces UBC841 et UBC855 respectivement, avec une moyenne de 10,35. En outre, les valeurs de MI varient de 3,45 (UBC855) à 17,63(UBC841), avec une moyenne de 9,21. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues chez le noyer grec avec les marqueurs ISSRs (3.19) (Christopoulos et al., 2010), et chez le noyer indien (0,24) avec les marqueurs SSR (Noor Shah et al., 2016), mais sont inférieures à celles déterminées par Shamasbi et al. (2018) avec les marqueurs AFLP (26.70) et les marqueurs ISSR (28.9) chez le noyer indien. Le Rp, qui est un paramètre utilisé pour déterminer la capacité des amorces à différencier entre les accessions, a enregistré des valeurs qui varient de 0,70 (amorces UBC855) à 9,21 (amorces UBC841), avec une moyenne de 4,91. Le résultat obtenu est comparable à celui obtenu par Christopoulos et al. (2010) (4,52) par les marqueurs ISSR chez le

noyer grec, mais supérieur à celui trouvé par Noor Shah et al. (2016) (2.37) chez le noyer indien par les marqueurs SSR.

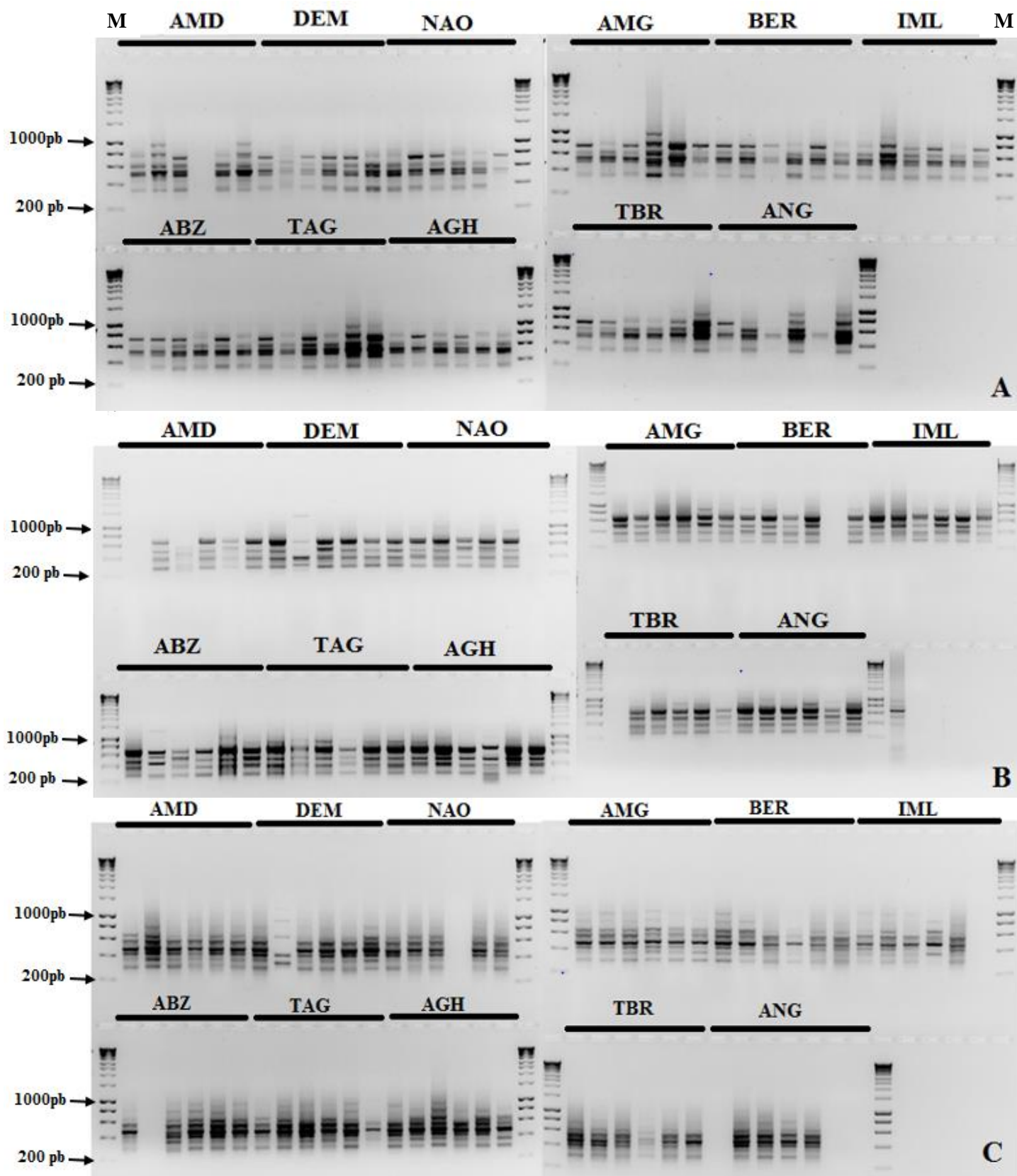
Ainsi, on déduit que les amorces utilisées n'ont pas la même efficacité dans la discrimination entre les accessions. L'amorce UBC841 de motif (GA) et l'amorce UBC836 de motif (AG), ont enregistré une valeur de PPB de 100%. De plus, elles ont montré les valeurs les plus élevées pour les indices PIC, MI et Rp (UBC841 : 0,93, 17,63 et 9,21 respectivement ; UBC836 : 0,91 ; 15,51 ; 8,27 respectivement). Par conséquent, UBC841 et UBC836 sont les amorces les plus informatives, alors que UBC855, de motif (AC), avec les faibles valeurs de PPB, PIC, MI et Rp (66%, 0,86, 3,45 et 0,7 ; respectivement), est considérée comme l'amorce la moins informative. L'ensemble de ces résultats reflète d'une part l'existence d'un important polymorphisme moyennant des marqueurs ISSR et d'autre part la grande capacité de ces marqueurs dans l'estimation de la diversité génétique entre les accessions étudiées.

**Tableau 11** : Caractéristiques des 11 amorces ISSR étudiées.

Locus ISSR	Séquence (5'-3')	Ta °C	Nombre des bandes amplifiées		PPB (%)	PIC	EMR	MI	RP
			Total	Polymorphique					
<b>UBC 807</b>	(AG) 8T	45,1	9	9	100	0,84	9	7,59	3,79
<b>UBC 810</b>	(GA)8T	44,1	10	7	70	0,88	4,9	4,3	2
<b>UBC 811</b>	GA(AG)7C	46,1	10	10	100	0,86	10	8,64	2
<b>UBC 814</b>	(CT) 8A	44,4	10	8	80	0,87	6,4	5,58	4,67
<b>UBC 818</b>	(CA) 8 G	43,5	7	6	85	0,80	5,14	4,12	7,09
<b>UBC 834</b>	(AG) 8YT	47,6	15	14	93	0,87	13,07	11,38	4,06
<b>UBC 836</b>	(AG) 8YA	48,3	17	17	100	0,91	17	15,51	8,27
<b>UBC 840</b>	(GA) 8YT	46,5	14	12	85	0,92	10,29	9,46	7,67
<b>UBC 841</b>	(GA)8YC	47,1	19	19	100	0,93	19	17,63	9,21
<b>UBC 855</b>	(AC) 8YT	45,5	9	6	66	0,86	4	3,45	0,7
<b>UBC 889</b>	(AC) 7	34,3	15	15	100	0,91	15	13,61	4,52
<b>Total</b>			135	123	-	9,65	-	-	53,98
<b>Moyenne</b>			12,27	11,18	91	0,88	10,35	9,21	4,91



**Figure 20** : Optimisation de la température d'hybridation de l'amorce UBC818 par le PCR à gradient de température ; a : Profil du gel d'agarose ; b : Gradient de température.



**Figure 21** : Exemple des profils électrophorétiques obtenus pour les amorces : UBC818 (A), UBC811 (B) et UBC834 (C) ; M : Marqueur moléculaire de 1kb

#### III.4. Diversité génétique des accessions

Les résultats de l'estimation de la diversité génétique des accessions étudiées, sont présentés dans le tableau 12. Le nombre d'allèles par locus ( $N_a$ ) détecté pour les 11 amorces étudiées varie de 1,7 (UBC810) à 2,1 (UBC811) avec une moyenne de 1,90. Pour le nombre d'allèles efficaces ( $N_e$ ), il s'étend de 1,25 pour UBC834 et UBC810 à 1,68 pour UBC855 avec une moyenne de 1,41. L'indice de la diversité de Shannon ( $I$ ) a enregistré une valeur minimale de 0,28 pour UBC834 et UBC810 et une valeur maximale de 0,58 pour UBC855 avec une moyenne de 0,38.

D'autre part, les résultats indiquent une diversité génétique totale ( $H_T = 0,25$ ) et une diversité génétique au sein des accessions ( $H_s=20$ ). La haute valeur de  $H_T$  (0,25) signale la présence d'un niveau élevé du polymorphisme. Cette valeur est supérieure à celle obtenue chez le noyer chinois avec les ISSRs ( $H_T = 0,13$ ) (Aiqing et al., 2014). Ce résultat est en accord avec la tendance générale des espèces ligneuses pérennes ( $H_T = 0,28$  sur 195 entrées) et des angiospermes ( $H_T= 0,28$  de 73 entrées) (Hamrik et al., 1992). En effet, le polymorphisme enregistré est confirmé par la valeur de l'indice de shannon ( $I=0,38$ )

La diversité entre les accessions est évaluée par le calcul du coefficient de différenciation génétique ( $G_{ST}=0,16$ ). Ce résultat montre que 16% de la diversité totale correspond à la différenciation entre les accessions, alors que la majorité de la diversité génétique (84%) est due à la variabilité au sein des accessions. Ce résultat est confirmé par l'analyse de variance moléculaire (AMOVA) ( $F_{ST}=0,286$ ) qui a montré que 28,70% de la variabilité génétique totale se trouve entre les accessions, alors que 71,30% réside au sein des accessions (Tableau 13). En effet, les valeurs de  $G_{ST}$  et  $F_{ST}$  montrent une large différenciation entre les accessions étudiées, mais elle reste inférieure à celle trouvée chez le noyer chinois ( $G_{ST}=0,50$  ;  $F_{ST}=0,51$ ) (Aiqing et al., 2014). En revanche, la différenciation génétique obtenue est supérieure à celle détectée par plusieurs études génétiques chez le noyer ( $F_{ST}=0,12$ , Karimi et al., 2010 ;  $F_{ST}=0,021$ , Vischi et al., 2017,  $F_{ST}=0,18$ , Wang et Pei, 2008).

La grande différenciation enregistrée entre les accessions au cours de ce travail est en accord avec la faible valeur du flux de gènes ( $N_{em}=0,64$ ). En effet, La grande diversité génétique et le niveau de différenciation élevé obtenues chez le noyer marocain est une caractéristique des populations marocaines (Wahid et al., 2010). Le flux de gènes s'est avéré très faible, ce qui laisse présager une limitation du brassage génétique entre les accessions du noyer à l'échelle de ses zones de culture. Ce manque de brassage génétique pourrait être expliqué par des facteurs écologiques reliés à l'éloignement géographique des accessions. En outre, Telles et al. (2003) ont affirmé que, lorsque le flux de gènes est restreint, la population a tendance à avoir une taille effective plus petite et une consanguinité plus importante, ce qui entraîne une plus grande probabilité de différenciation entre les populations.

Parallèlement à la grande différenciation entre les accessions, il existe également une variation très importante au sein des accessions, qui peut être due à la méthode traditionnelle de multiplication par semences utilisée par les agriculteurs. En fait, ce mode de multiplication peut générer une assez importante variabilité génétique qui apparaît au niveau de la période de floraison, des caractères pomologiques des noix, de la vigueur des arbres et du type de fructification (Oukabli et Mamouni, 2010). Selon Hamrick et al. (1993), le mode de dispersion des semences influence la composition et la structure génétique des populations d'une espèce donnée. Chez les plantes qui sont, allogames, on peut observer jusqu'à 90% de la variabilité au niveau intra-population (Hamrick et Godt, 1997). De même, le noyer est une plante monoïque à fleurs unisexuées, qui peut effectuer à la fois la géitonogamie et l'allogamie, mais en raison de la dichogamie, les mêmes pieds, bien qu'ils soient autofertiles, ne peuvent pas se polliniser, ce qui entraîne un flux de gènes fréquent entre les individus et augmente la recombinaison de gènes (Aiqing et al., 2014).

Les résultats de l'AMOVA hiérarchique ont montré que la différenciation génétique des accessions est effectuée indépendamment de l'origine géographique et du type bioclimatique, en raison de la faible variation génétique détectée entre les groupes régionaux (13,24%) et les groupes bioclimatiques des accessions (1,31%), ce

qui indique un manque d'adaptation des accessions du noyer marocain aux conditions écologiques locales (Tableau 13). En plus, le test de Mantel n'a pas montré une corrélation significative entre la matrice des distances génétiques et celle des distances géographiques des accessions étudiées ( $r=0,876$  ;  $p=0,809$ ). Le même résultat est trouvé par Vischi et al. (2017), qui n'ont pas révélé une corrélation significative entre la distance géographique et la distance génétique entre les accessions du noyer des Alpes italiennes orientales. Les valeurs de corrélation non significatives pourraient être dues à l'existence de barrières géographiques (González-Astorga et Núñez-Farfán, 2001 ; Epperson, 2000) qui conduisent à une relation non linéaire entre distances géographiques et génétiques. De plus, Mohsenipoor et Vahdati (2010) ont signalé que la proximité géographique des populations n'est pas corrélée à leur niveau de parenté génétique.

D'autre part, les indices de  $F_{ST}$  spécifiques aux accessions ont été déterminés (Tableau 14). Les résultats ont révélé que Imlil (IML) possède la valeur la plus élevée de cet indice ( $F_{ST} = 0,341$ ), alors que l'accession de Ait Mhamed (AMD) a obtenu la valeur la plus faible ( $F_{ST} = 0,218$ ), ce qui indique que l'accession Ait Mhamed est la moins divergente, tandis que l'accession Imlil est la plus divergente du reste des accessions. D'autres part, les valeurs de la distance génétique  $F_{ST}$  entre paires d'accessions et leurs distances géographiques correspondantes sont présentées dans le tableau 15. Parmi les 55 valeurs de  $F_{ST}$  par paire, 50 valeurs sont significatives, ce qui signifie que les 11 accessions sont génétiquement distantes les unes des autres. Ces distances varient de 0,006 (DEM / AGH ; 153km) à 0,564 (TAG / AMG ; 120km), ceci montre bien que les accessions Demnate (DEM) et Aghbala (AGH) sont génétiquement les plus similaires et les accessions Taghzirte (TAG) et Amouguer (AMG) sont les plus **divergentes** génétiquement. En effet, Ce résultat est confirmé par les relations génétiques révélées entre ces accessions par l'analyse morphopomologique (Kabiri et al., 2019)



**Tableau 12 :** Diversité génétique de 11 accessions marocaines du noyer révélée par les marqueurs ISSR

<b>Locus ISSR</b>	<b>Taille de l'échantillon</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>I</b>	<b>H<sub>T</sub></b>	<b>H<sub>S</sub></b>	<b>G<sub>ST</sub></b>
<b>UBC 807</b>	66	2,00	1,46	0,45	0,29	0,25	0,13
<b>UBC 810</b>	66	1,7	1,25	0,28	0,32	0,16	0,13
<b>UBC 811</b>	66	2,1	1,36	0,37	0,24	0,22	0,07
<b>UBC 814</b>	66	1,8	1,46	0,34	0,26	0,22	0,13
<b>UBC 818</b>	66	1,86	1,56	0,43	0,3	0,17	0,31
<b>UBC 834</b>	66	1,93	1,25	0,28	0,18	0,14	0,11
<b>UBC 836</b>	66	2	1,48	0,44	0,28	0,22	0,18
<b>UBC 840</b>	66	2	1,48	0,44	0,29	0,25	0,10
<b>UBC 841</b>	66	1,79	1,31	0,31	0,2	0,17	0,11
<b>UBC 855</b>	66	2	1,68	0,58	0,4	0,33	0,19
<b>UBC 889</b>	66	1,8	1,39	0,35	0,22	0,21	0,07
<b>Moyenne</b>		1,9	1,41	0,38	0,25	0,20	0,16

**Tableau 13 :** Analyse de la variance moléculaire et F-statistique entre accessions et groupes géographiques et bioclimatiques du noyer.

Source de variation	d.l	Somme des carrées	Composante de la variance	Pourcentage de la variation	F-Statistique
<b>Globale</b>					
Entre les accessions	10	153.667	1.811	28.70	FST=0.286***
Au sein des accessions	55	247.500	4.500	71.30	
<b>Hiérarchique</b>					
Entre les groupes géographiques	3	75.528	0.856	13.24	FCT=0.132
Entre les accessions au sien du groupe	7	78.139	1.110	17.17	FSC=0.197***
Au sein des accessions	55	247.500	4.500	69.59	FST=0.304***
Entre les groupes bioclimatiques	2	33.492	0.083	1.31	FCT=0.013
Entre les accessions au sien du groupe	8	120.175	1.753	27.67	FSC=0.280***
Au sein des accessions	55	247.500	4.500	71.01	FST=0.289***
<b>Total</b>	65	401.167	6.336		

Signification ( $p < 0.05$ ), \*\*\* très hautement significatif.

**Tableau 14** : Indices FST spécifiques aux accessions étudiées.

Accession	F <sub>ST</sub>
AMD	<b>0.218</b>
DEM	0.255
NAO	0.297
ABZ	0.255
TAG	0.327
AGH	0.226
AMG	0.328
BER	0.291
IML	<b>0.341</b>
TBR	0.330
ANG	0.284

**Tableau 15 :** Matrice des distances génétiques (FST, au-dessous de la diagonale) et géographiques (au-dessus de la diagonale en km) entre les 11 accessions.

	AMD	DEM	NAO	ABZ	TAG	AGH	AMG	BER	IML	TBR	ANG
AMD		51	84	26	63	101	152	184	158	133	186
DEM	0.009 NS		132	53	107	153	204	237	105	187	131
NAO	0.314**	0.310**		98	84	113	97	114	238	84	263
ABZ	0.103*	0.177**	0.376**		91	122	160	196	148	140	178
TAG	0.283***	0.365**	0.497**	0.195**		51	120	137	218	103	240
AGH	0.035 NS	<b>0.006</b> NS	0.212**	0.054 NS	0.264**		71	86	265	56	286
AMG	0.293**	0.251**	0.513**	0.373**	<b>0.564**</b>	0.279***		49	309	20	337
BER	0.188**	0.229***	0.409**	0.286***	0.470**	0.214**	0.197**		345	62	369
IML	0.272***	0.340***	0.523***	0.368**	0.560**	0.313**	0.208***	0.110*		293	30
TBR	0.240***	0.245**	0.492**	0.373**	0.530**	0.272***	0.131**	0.040 NS	0.138*		316
ANG	0.159**	0.185*	0.438**	0.310***	0.497**	0.245**	0.168**	0.149*	0.203*	0.125NS	

Signification (p<0.05) : \*: Significatif, \*\* hautement significatif, \*\*\* très hautement significatif, NS : pas de signification.

### III.5. Relations génétiques entre accessions

Dans le but de visualiser les relations génétiques entre les 11 accessions étudiées, la matrice des distances génétiques a été soumise au programme MEGA version 3.1 pour générer le dendrogramme basé sur la méthode d'algorithme "UPGMA". Trois groupes peuvent être distingués (Figure 22). Le premier groupe (I) est composé de six arbres : Anougal 1 (ANG1), Anougal 6 (ANG6), Anougal 5 (ANG5), Demnate 2 (DEM2), Tabrijjate 2 (TBR2) et Ait Bougamez 2 (ABZ2), tous originaires du Haut Atlas. Concernant le deuxième groupe (II), il est divisé en deux sous-groupes. Le premier sous-groupe est constitué de cinq arbres : Tabrijjate1 (TBR1), Tabrijjate 3 (TBR3), Tabrijjate 5 (TBR5) et Beram 5 (BER5) provenant du Haut Atlas et Naour 6 (NAO6) du Moyen Atlas, tandis que le deuxième sous-groupe est formé de six arbres : Ait Bougamez 4 (ABZ4), Demnate 3 (DEM3), Demnate 1 (DEM1), Amouguer 2 (AMG2) et Ait Mhamed 3 (AMD3) appartenant au Haut Atlas et Aghbala 2 (AGH2) originaire du Moyen Atlas. Quant au troisième groupe (III), il est formé du reste des arbres analysés et dans lequel de nombreux sous-groupes peuvent être identifiés. En général, le dendrogramme montre que le regroupement des individus se fait indépendamment de l'origine géographique et du type de la chaîne montagneuse. D'autre part, on note que les 66 arbres analysés appartiennent à 66 haplotypes différents, ce qui reflète la grande variabilité intra-accession.

Pour approfondir l'étude de la structure des 11 accessions étudiées, une approche basée sur un modèle bayésien a été utilisée afin d'attribuer les génotypes en groupes génétiquement structurés. La procédure d'Evanno (2005), qui permet d'évaluer le nombre probable K des groupes en se basant sur le  $\Delta K$ , montre que la structure génétique la plus représentative est obtenue pour  $K=3$  ( $\Delta k = 4$ ) (Figure 23).

Pour une analyse fine de STRUCTURE, il y a un pic évident dans le  $\Delta k=4$  à  $K=3$ . Par conséquent,  $K = 3$  constitue le meilleur regroupement des accessions étudiées. Avec ce modèle, les groupes obtenus sont les suivants (Figure 24) :

- Le premier groupe (en rouge) est composé des individus originaires du Haut Atlas : Beram (BER), Imlil (IML), Amouguer (AMG), Tabrijjate (TBR) et Anougal (ANG)

avec un coefficient d'appartenance compris entre 0,80 et 0,99, sauf les individus 2 et 4 d'accession Anougal qui peuvent être considérés comme admixture (avec un coefficient de 0,75 et 0,78, respectivement).

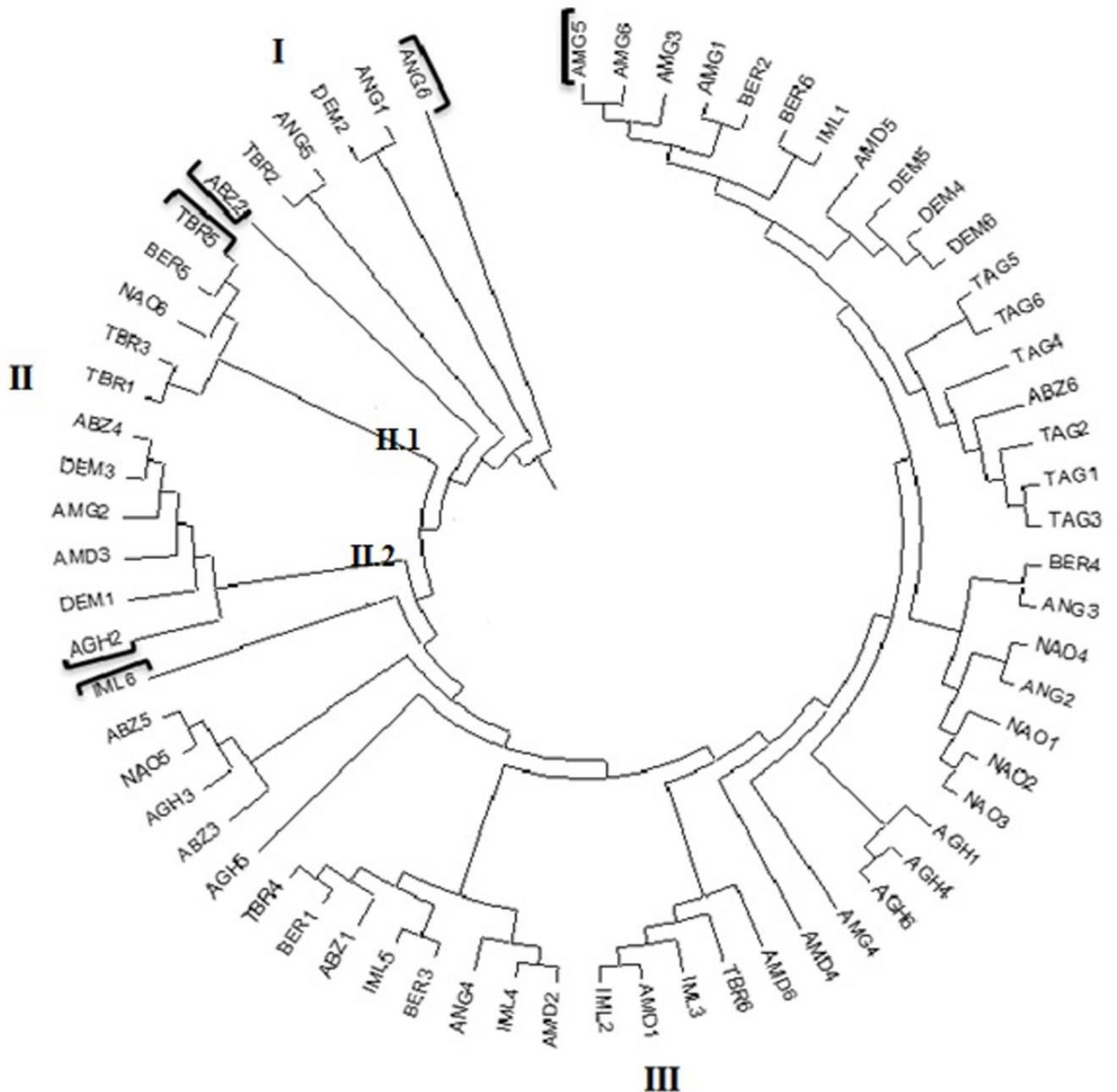
-Le deuxième groupe (en vert) est formé des individus qui appartiennent à 4 accessions du Haut Atlas (Demnate (DEM), Aït Bougamez (ABZ), Aït Mhamed (AMD) et Anougal (ANG)) et deux accessions du Moyen Atlas (Naour (NAO) et Aghbala (AGH)) ayant tous des coefficients d'appartenance supérieurs à 0,80, à l'exception de l'individu 1, issu respectivement des accessions Ait Bougamez et Aghbala, qui peuvent être considérées comme admixture (avec un coefficient de 0,71 et 0,67 respectivement).

-Le troisième groupe (en bleu) est constitué uniquement de 11 individus, avec plus de 80% de probabilité d'assignation, provenant des accessions du Moyen Atlas (Taghzirte (TAG) et Aghbala (AGH)), et du Haut Atlas (Ait Bougamez (ABZ)). Bien que l'individu 3 d'Aghbala, avec une probabilité d'attribution de 56%, peut être considéré comme admixture.

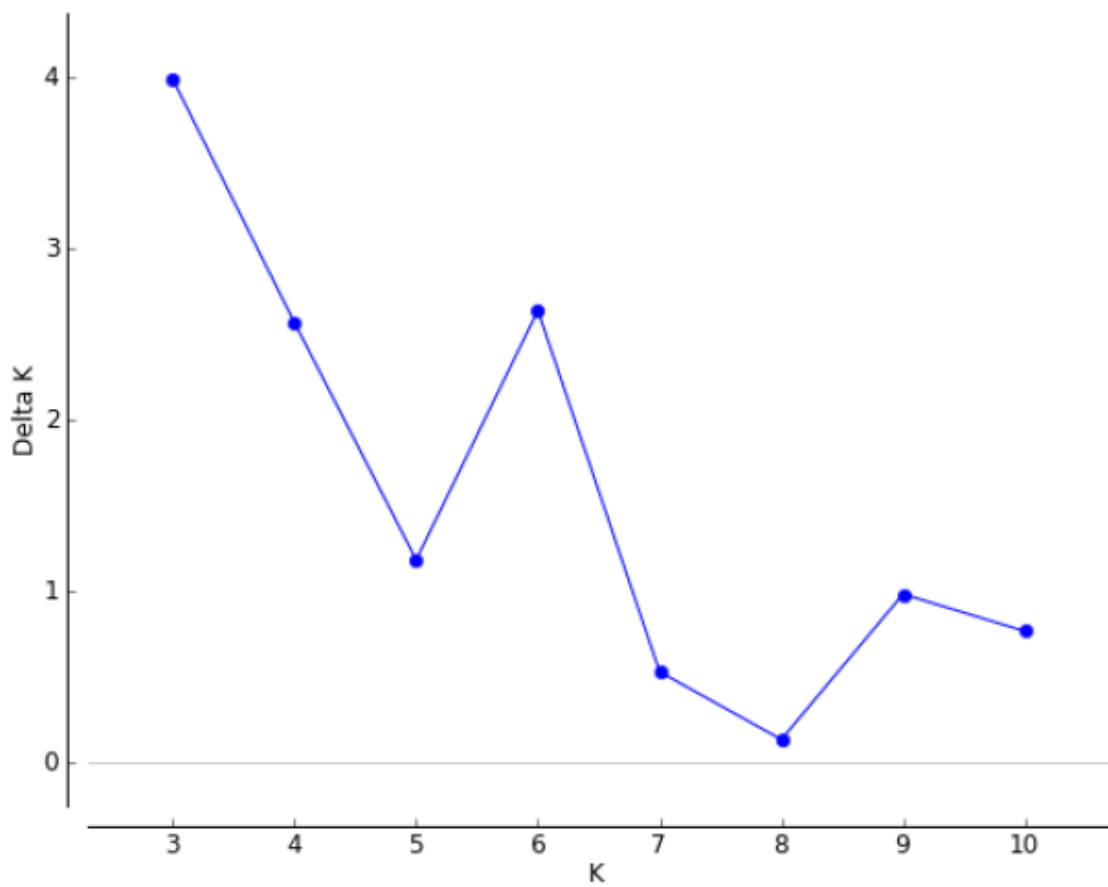
La distribution des 66 arbres, des 11 accessions en trois principaux groupes, reflète que la structure génétique des accessions étudiées ne s'opère pas en fonction du type de la chaîne montagneuse.

Selon le dendrogramme et l'analyse bayésienne, la structure génétique du noyer marocain est faite selon trois groupes. Pour ces derniers, les 11 accessions sont réparties indépendamment de leur type de chaîne montagneuse. En revanche, la structure génétique des populations naturelles de pin maritime marocain (*Pinus pinaster Aiton*), analysées par les isoenzymes, s'est révélée dépendante au type de leur chaîne montagneuse (Wahid et al., 2004). En outre, le regroupement de nos accessions est effectué indépendamment aussi de leur origine géographique et de leurs zones bioclimatiques. Ce résultat est confirmé par le très faible coefficient de différenciation génétique, révélée par l'AMOVA, entre les groupes géographiques et bioclimatiques des 11 accessions. Ce résultat est en accord avec celui trouvé par Arzani et al. (2008), qui ont montré que la structuration des géotypes du noyer iranien n'est pas corrélée à leur origine géographique.

D'autre part, l'analyse des 66 arbres a permis d'obtenir 66 haplotypes, traduisant l'existence d'une importante variabilité intra-accessions.



**Figure 22 :** Dendrogramme illustrant les relations génétiques entre les 66 arbres des 11 accessions étudiées du noyer à partir des données ISSR.



**Figure 23** : Représentation graphique permettant de déterminer le nombre optimal  $K$  de clusters selon les paramètres d'Evanno *et al.* (2005). Le nombre optimal de clusters étant atteint pour  $K=3$



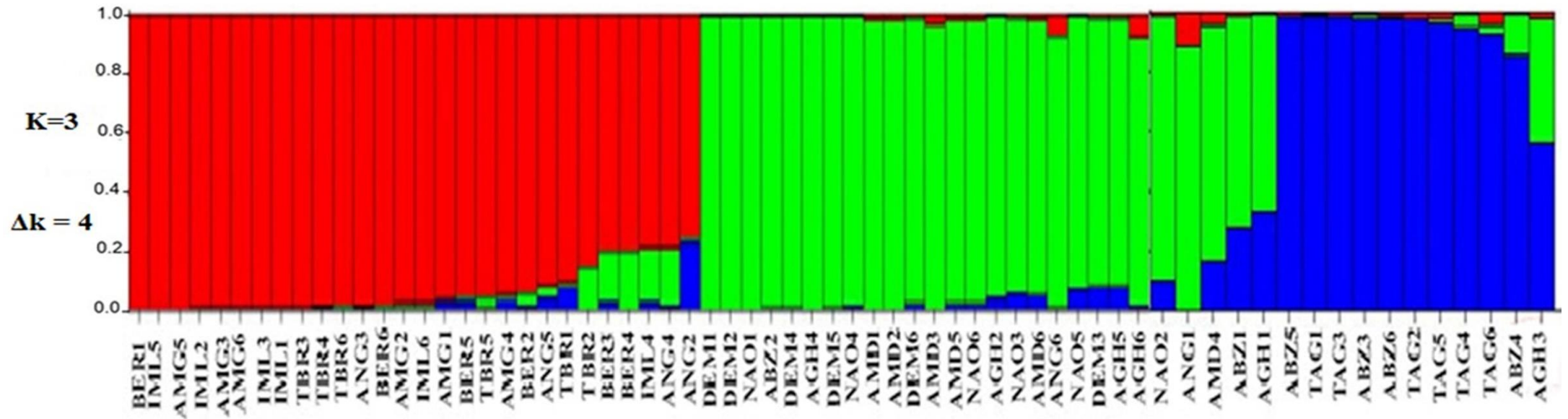


Figure.24 : Regroupement génétique des accessions obtenu à partir de l'analyse STRUCTURE (N = 66).

#### IV. CONCLUSION

La compréhension du niveau de la diversité génétique et la structuration des accessions marocaines du noyer est primordiale pour la gestion des ressources génétiques et la réussite des programmes de sélection. Plusieurs travaux ont souligné la divergence génétique pour la sélection des parents désirables. Au cours de ce travail, nous avons tenté de mettre à profit les possibilités offertes par la technique d'amplification de l'ADN pour examiner la diversité génétique du noyer marocain. Les résultats obtenus ont montré clairement que les marqueurs ISSR constituent une méthode pratique et efficace pour l'estimation de la diversité génétique de cette espèce, ainsi que pour l'exploration des relations génétiques entre les accessions étudiées.

L'optimisation de la température d'hybridation des amorces utilisées, a permis d'améliorer la technique ISSR, ce qui nous permis d'enregistrer un pourcentage de polymorphisme moyen très important (91%), reflétant ainsi la grande diversité génétique du noyer marocain. En effet, les amorces UBC841 de motif (GA)8YC et UBC836 de motif (AG)8YA ont généré 19 et 17 bandes polymorphe respectivement, avec un taux de polymorphisme de 100% pour les deux amorces. Ainsi, les amorces qui présentent une séquence de répétition (GA)8Y contribuent efficacement dans la différenciation des accessions du noyer étudiées.

La valeur de la diversité totale ( $H_T= 0,25$ ) et l'indice de shannon ( $I=0,38$ ) ont montré l'existence d'une génétique importante au sein du noyer marocain, ce qui ouvre la voie vers la sélection du génotypes performants. D'autre part, les indices de différenciation calculés ont montré une large différenciation entre les accessions ( $G_{ST}=0,16$  ;  $F_{ST}=0,28$ ). Ce résultat peut être expliqué par le flux de gènes restreint ( $Nem=0,64$ ) due probablement à l'isolement géographique des accessions ou à l'adaptation aux conditions environnementales des régions. D'après ces indices on peut déduire que noyer marocain présent un pool de la diversité génétique très important.

En plus, l'analyse hiérarchique a révélé que la position géographique et le type de bioclimat n'interviennent pas dans cette différenciation. Ce résultat est confirmé par le test de Mantel qui indique que les distances génétiques entre les accessions ne sont pas corrélées avec leurs correspondantes distances géographiques. D'autre part, les valeurs de la distance génétique  $F_{ST}$  entre paires des accessions ont montré que Aghbala et Demnate se sont révélées les plus similaires génétiquement, alors que Taghzirte et Amouguer sont les plus divergentes. Ce résultat est consolidé par le résultat trouvé antérieurement par l'analyse phénotypique.

La structure génétique du noyer marocain est présentée par le dendrogramme et l'analyse bayésienne sous forme de trois groupes indépendants de leur type de la chaîne montagneuse et l'origine géographique. Effectivement, l'ensemble des résultats obtenus par l'analyse bayésienne ont montré l'existence de trois groupes. Le premier groupe est composé des individus qui appartiennent aux accessions du Haut Atlas (Beram, Imlil, Amouguer, Tabrijjate et Anougal). Concernant Anougal, elle est dispersée entre le premier et le deuxième groupe qui est formé par un mixte des individus qui appartiennent au Haut et au Moyen Atlas (Demnate, Aït Mhamed, Aït Bougamez, Naour et Aghbala). Aït Bougamez et Aghbala ont montré un chevauchement entre le deuxième et le troisième groupe. Elles ont formé à côté des individus de Taghzirte le troisième groupe dominé par les accessions du Moyen Atlas.

Quoi qu'il en soit, nos résultats montrent clairement que les marqueurs moléculaires ISSR, se sont avérés très efficaces en terme de mise en évidence du polymorphisme moléculaire chez le noyer ainsi que pour l'exploration des relations génétiques entre les accessions étudiées. L'ensemble des résultats recueillis à partir de ces analyses devrait être pris en considération par tout programme de conservation des ressources génétiques et d'amélioration de cette espèce.

# **CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES**

A l'instar des pays du bassin méditerranéen, le Maroc est connu par sa richesse considérable en ressources génétiques végétales. Cependant, l'érosion génétique des espèces végétales constitue l'une des caractéristiques de la situation actuelle de ces ressources locales. Cette situation est bien illustrée dans le cas des arbres fruitiers notamment le noyer. Le présent travail est consacré à la caractérisation phénotypique, biochimique et moléculaire des accessions de cette espèce provenant de principales zones de culture du noyer au Maroc.

Dans une première étape, nous avons évalué la variabilité morpho-pomologique de 11 accessions marocaines du noyer en nous basant sur l'analyse de 31 descripteurs morpho-pomologiques liés aux feuilles, aux noix et aux cerneaux. En second lieu, nous avons analysé la composition biochimique via 22 paramètres biochimiques et en fin nous avons étudié le polymorphisme moléculaire et la structuration génétique de ces accessions en fonction de leurs origines géographiques et bioclimatiques.

L'évaluation de la variabilité morpho-pomologique a révélé une grande diversité pour la majorité des caractères analysés, reflétant ainsi l'existence d'une variabilité phénotypique très importante chez le noyer marocain. De l'ensemble des caractères analysés, le poids de noix, le pourcentage du cerneau, l'épaisseur de la coque et la taille de la feuille se sont avérés les plus efficaces pour la discrimination des accessions. En outre, les analyses multivariées ont permis d'identifier trois groupes. Le premier groupe est composé des accessions Naour et Taghzirte, Ait Bougamez et Amouguer, qui sont caractérisées par un poids et un pourcentage du cerneau élevés et une faible épaisseur de la coque. Le deuxième groupe est constitué des accessions Imlil, Ait Mhamed, Tabrejate, Beram et Anougal, qui ont montré des feuilles et des noix de grande taille. En fin, le troisième groupe qui est formé seulement de deux accessions : Aghbala et Demnate caractérisées par des feuilles de petite taille et des noix de petit calibre.

Selon l'importance économique de certains caractères du fruit tels que le poids, le pourcentage du cerneau très élevé et la faible épaisseur de la coque, on peut déduire, que les accessions Amouguer, Imlil et Ait Bougamez du Haut Atlas, sont les plus performantes et peuvent être utilisées pour la sélection de nouvelles variétés de cette espèce au Maroc. D'autre part, le noyer marocain se caractérise par des feuilles vertes, entières et de grande taille avec des folioles latérales d'une forme elliptique ou elliptique large et un nombre de folioles variant de cinq à neuf par feuille. En outre, les noix sont apparues avec une couleur, une taille et une rigidité moyenne avec une épaisseur de la coque très faible. Concernant le cerneau qui présente la partie comestible, il a montré un pourcentage très important avec une couleur ambrée et une facilité d'extraction moyenne.

De même, l'analyse de 22 paramètres biochimiques a permis d'observer une variation très importante entre les 11 accessions étudiées, surtout pour l'huile, les carbohydrates, les protéines brutes, la valeur énergétique, les fibres brutes, les flavonoïdes et certains minéraux tels que le P, le Cu, le Zn et le B. L'ensemble des résultats obtenus ont montré que le noyer marocain est très riche en huile qui peut fournir une très grande valeur énergétique et présente aussi une activité antioxydante très importante expliquée par une haute teneur en composés phénoliques. En effet, les résultats obtenus ont montré une forte positive corrélation entre la teneur en polyphénols et le RSA ( $r=0,70^{**}$ ). Ainsi, le noyer marocain peut être utilisé comme une source d'huiles, de protéines végétales et également un aliment stratégique dans les aliments thérapeutiques. En plus, les cerneaux ont révélé une richesse significative en éléments minéraux, essentiellement le P, le K, le Zn et le Cu et une carence en Fe et Mn. D'autre part, les analyses multivariées ont divisé les 11 accessions en quatre groupes indépendamment de leur origine géographique et la chaîne montagneuse. Le premier groupe est composé d'une seule accession Aghbala avec une teneur élevée en flavonoïdes, en Zn et en B. L'accession de Naour constitue toute seule le deuxième groupe avec une grande teneur en fibres et en Mg, tandis que le troisième groupe est constitué de Taghzirte, Anougal, Ait Bougamez, Ait Mhamed et Demante, qui sont

caractérisées par un niveau élevé d'huile, de la valeur énergétique, des composés phénoliques, de Fe, de Cr et de Ni. Le quatrième groupe a englobé les accessions Imlil, Tabrijjate, Amouguer et Beram avec des niveaux élevés de protéines, de carbohydrates, de cendres, de l'activité antioxydante, de P, de K, de Cu, de Na et d'une faible humidité. Compte tenu de l'importance des paramètres biochimiques analysés, les accessions du noyer qui proviennent du Haut Atlas pourraient être utilisées pour la sélection des nouvelles variétés. D'autre part, on note que se sont la teneur en huile, la valeur énergétique, les protéines, les carbohydrates, les fibres, les flavonoïdes et certains minéraux tels que le P, le Cu, le Zn et le B se sont révélés les plus discriminants.

La troisième partie de notre travail a été consacré à une analyse de la diversité génétique basée sur les marqueurs moléculaires ISSR. Cette étude nous a permis d'approfondir nos connaissances sur le statut génétique des accessions marocaines du noyer. Les résultats obtenus ont montré que ces marqueurs constituent une méthode pratique et efficace pour l'estimation de la diversité génétique de cette espèce. D'autre part, on note que se sont les amorces qui ont une séquence à motif répétitif (GA) qui contribuent efficacement dans la différenciation des accessions. L'analyse des différents paramètres statistiques a permis de révéler un grand polymorphisme chez cette espèce. Les indices de la diversité génétique ont révélé une large différenciation des accessions étudiées. De même les résultats obtenus montrent que les accessions étudiées sont structurées en trois groupes, indépendamment de l'origine géographique et du type bioclimatique. En plus, on note qu'il n'y a pas de corrélation entre les distances génétiques et les distances géographiques des accessions. En outre, les résultats de l'analyse bayésienne ont montré l'existence de trois groupes. Le premier groupe est composé des individus de Beram, Imlil, Amouguer, Tabrijjate et Anougal qui sont apparus dispersés entre le premier et le deuxième groupe. Ce dernier est formé par Demnate, Aït Mhamed, Aït Bougamez, Naour et Aghbala. Les accessions Ait Bougamez et Aghbala ont montré un chevauchement entre le deuxième et le troisième groupe et elles ont formé avec les individus de Taghzirte le troisième groupe.

Vu la diversité génétique observée chez cette espèce, l'ouverture de nouvelles perspectives, dans le but de rentabiliser nos investigations, reste judicieuse :

1. Elargir la zone d'échantillonnage du noyer en y incluant de nouvelles accessions surtout de la région du Rif.
2. Chercher des marqueurs moléculaires liés à des traits agronomiques.
3. Réaliser une étude biochimique des feuilles des différentes accessions.
4. Approfondir l'analyse de la diversité génétique du noyer par d'autres marqueurs moléculaires plus puissants tels que les SSR, SNP...



**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Abu Taha N, Al-wadaan MA, 2011. Review Utility and importance of walnut, *Juglans regia* Linn: A review, African Journal of Microbiology Research, 5(32):5796-5805
2. Achim G, et Botu I, 2001. Results in walnut propagation by using different methods. Acta Hort. 544, 503-509.
3. Aganga A.A., Mosase K.W. (2001). Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. ANIM FEED SCI TECH, 91 : 107-113.
4. Ahandani EA, Ramandi H, Sarmad J, samani M, Yavari A et Ahandani RA, 2014. Evaluation of Morphological Diversity among Some Persian Walnut Accessions (*Juglans regia* L.) In Guilan, Northern Iran, Int J Biol Technology, 5(2):21-30.
5. Aiqing J, Yina W, Guoliang W, Wenjiang W, Hongyan Y, Qihai W, 2014. Genetic diversity and population structure of North China Mountain walnut revealed by ISSR. Am J Plant Sci. 5: 3194-3202.
6. Akbari V, Heidari R, et Jamei R, 2014. Fatty acid compositions and nutritional value of six walnut (*Juglans regia*L.) cultivars grown in Iran. Advanced Herbal Medicine, 1 (1): 36-41.
7. Akbari V, Jamei R, Heidari R, et Jahanban-Esfahlan A, 2012. Antiradical activity of different parts of Walnut (*Juglans regia* L.) fruit as a function of genotype. Food Chem, 135:2404-10.
8. Akca Y, Bilgen Y et Ercisli S, 2015. Selection of Superior Persian Walnut (*Juglans Regia* L.) from Seedling Origin in Turkey. Acta Sci Pol Hortorum Cultus. 14(3):103-114
9. Akça Y, Ozongun Y, 2004. Selection of late leafing, late flowering, laterally fruitful walnut (*Juglans regia*) types in Turkey. New Zealand J. Crop Hortic. 32, 337–342.
10. Amaral JS, Casal S, Pereira J, Seabra R, Oliveira B, 2003. Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. J. Agric. Food Chem, Issue 51, pp: 7698-7702.
11. Anderson JA, Churchill GA, Autrique EJ, Tanksley SD, Sorrells ME, 1993. Optimising parental selection for genetic linkage maps. Genome, 36: 81–6.
12. Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille AP, Cremin P, Waterhouse AL, et Steinberg FM, 2001. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation, J Nutr, 131:2837–2842.

13. Angmo S, Diengngan S, Hasan MA, 2015. Characterization of Walnut (*Juglans Regia* L.) Genotypes in Ladakh Region of India. *Int j agric environ biotechnol*, 8:265.
14. AOAC, 1990. Official methods of analysis. Association Official Analytical Chemists, Washington.
15. AOAC, 1995. Official Methods of Analysis, sixteenth ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
16. Aryapak S, et Ziarati P, 2014. Nutritive value of persian walnut (*juglans regia* l.) orchards. *American-Eurasian J Agric et Environ Sci*, 14(11) :1228-1235.
17. Arzani K, Mansouri Ardakan H, Vezvaei A, 2008. Morphological variation among Persian walnut (*Juglans regia* L.) genotype from central Iran. *New Zeal J Crop Hort*, 36:159-168.
18. Asma BM, 2012. Pomological and phenological characterization of promising walnut (*juglans regia* l.) genotypes from malatya, Turkey, *Acta Sci Pol, Hortorum Cultus* 11(4): 169-178
19. Avanzato D, 2009. Training on hot callusing technique applied to walnut grafting. Walnut propagation training short course, COST Action 873, Spain, 10 p.
20. Avanzato D, et TAMPONI G, 1988. The effect of heating of walnut graft unions on graft success. *Acta Hort.* 277:79-83.
21. Bai WN, Zeng YF, Liao WJ, et Zhang DY, 2006. Flowering phenology and wind-pollination efficiency of heterodichogamous *Juglans mandshurica* (*Juglandaceae*). *Ann Bot* 98: 397 – 402.
22. Bamouh A, 2006. Transfert de technologie en agriculture, Bulletin mensuel d'information et de liaison PNTTA N139.
23. Barengo N, 2001. Le noyer commun, Chaire de sylviculture EPFZ, Direction fédérale des forêts OFEFP, © EPFZ/OFEFP
24. Barut E. 2001. Different whip grafting methods on walnut. *ACTA HORT.* 544: 511-51
25. Barut, E., 1996. Overview of walnut culture in Turkey. *Chron. Hortic.* 36(1), 13-14.
26. Baytop T, 1999. Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present), 2nd Ed., Nobel Medicine Publisher, Turkey
27. Becquey J, 1997. Les Noyers à bois. 3<sup>ème</sup> éd. Paris : G.-B. Baillyer et fils.
28. Ben Ayed R, 2017. Applications et limites des marqueurs moléculaires pour l'identification des variétés d'olivier Applications and limits of molecular markers for the identification of olive tree varieties, *Revue Agriculture* vol. 8 n°1 : 49 – 54.

29. Ben Baaziz K, 2012. Modulation de la conductivité hydraulique foliaire par la lumière chez le Noyer (*Juglans regia* L.) : approches écophysiological et moléculaire. Thèse de doctorat, Ecole doctorale sciences de la vie, sante, agronomie, environnement, 168p.
30. Bernard A, 2018. La collection de noyers de l'INRA, un réservoir de diversité essentiel pour l'avenir de la filière nucicole. *Hommes et Plantes* ,106 : 38-45
31. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics* 32 :314-331
32. Bujdosó G, Marianna TM, Hussein D, Nóra A, Szentiványi, P, 2010. Fruit quality and composition of Hungarian bred walnut cultivars. *Acta Alimentaria - Acta Aliment.* 39: 35-47.
33. Çağlarırnak N, 2003. Biochemical and physical properties of some walnut genotypes (*Juglans regia* L.), *Nahrung/Food*, 47(1): 28-32.
34. Campbell GE, Lottes GJ et Dawson JO, 1991. Design and development of agroforestry systems for Illinois, USA: silvicultural and economic considerations. *Agroforestry Systems*13: 203-224.
35. Carpenter SB, 1975. Rooting black walnut cuttings with ethephon. *Tree planter's notes*, 26 (3): 3-29.
36. Carvalho M, Ferreira PJ, Mendes VS, Silva R, Pereira JA, Jerónimo C, Silva BM, 2010. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food Chem Toxicol*, 48:441-447.
37. Chalmers KJ, Waugh R, Sprent JI, Simons AJ, Powell W, 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculate* using RAPD markers, *Heredity*, 69:465.
38. Charrier G, Améglio Th, Bonhomme M, Lacoïnte A, 2009. Etude de la dormance et de la résistance au froid chez des Noyers aux dates de débournement contrastées.
39. Chevalier A, 1941. Variabilité et hybridité chez les noyers. Notes sur des *Juglans* peu connus, sur l'*Annamocarya* et un *Carya*. *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale d'Indochine*. In : *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, 21<sup>é</sup> année, bulletin n°241-242, Septembre-octobre pp. 477-509.
40. Chevalier A, 2016. Variabilité et Hybridité chez les Noyers. Notes sur des *Juglans* peu connus, sur l'*Annamocarya* et un *Carya* d'Indochine. In : *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, 21<sup>e</sup> année, bulletin n°241-242, Septembre-octobre 1941. pp. 477-509
41. Christopoulos VM, Rouskasb D, Tsantili E, Bebeli PJ, 2010. Germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) cultivars and

- Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Sci Hortic*, 125: 584–592.
42. Ciarmiello LF, Piccirillo P, Pontecorvo G, De Luca A, Kafantaris I, Woodrow PA, 2011. PCR based SNPs marker for specific characterization of English walnut (*Juglans regia* L.) cultivars, *Mol Biol Rep*, 38:1237–1249.
  43. Cosmulescu S, Adrian BACIU A, Gheorghe ACHIM GH, Mihai BOTU Met Ion TRANDAFIR I, 2009. Mineral Composition of Fruits in Different Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars, *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca*, 37 (2):156-160.
  44. Cosmulescu S, Trandafir I, 2011. Variation of phenols content in walnut (*Juglans regia* L.). *South West J Hortic Biol Environ*, 2(1):25-33.
  45. Cosmulescu S, Trandafir I, Achim G, Botu M, Baciuc A, et Gruia M, 2010. Phenolics of Green Husk in Mature Walnut Fruits, *Not Bot Hort Agrobot Cluj*, 38(1): pp. 53-56.
  46. Crossa J, Hernandez CM, Bretting P, Eberhart SA, Taba S, 1993. Statistical genetic considerations for maintaining germplasm collections. *Theor Appl Genet*, 86: 673–678.
  47. Cunnane SC, Ganguli S, Menard C, Liede AC, Hamadeh MJ, Chen Z, Wolever TMS, Jerkins DJA, 1993. High  $\alpha$ -linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *Br J Nut*, 62: 433–453.
  48. Davis L, Stonehouse W, Loots DT, Mukuddem-Petersen J, Van Der Westhuizen F, Hanekom SJ, Jerling JC, 2007. The effects of high walnut and cashew nut diets on the antioxidant status of subjects with metabolic syndrome, *Eur J Nutr*, 46: 155-164.
  49. De Corcelle JJ, Catherin JY et Mazin R, 1995. *Le Noyer et la noix*" Edition: Edisud.
  50. De Vienne D, Santoni S, 1998. Les principales sources de marqueurs moléculaires. In : De Vienne D, ed. *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. 2e éd. Paris: INRA Éditions.
  51. Delbos R, Bonnet A, et Dunez J, 1984. Le virus de l'enroulement des feuilles du cerisier, largement répandu en France sur le noyer, est-il à l'origine de l'incompatibilité de greffage du noyer *Juglans regia* sur *Juglans nigra* ? *Agronomie*, 4(4) : 333-339
  52. Doyle J et Doyle J, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
  53. Dubé MP, 2009. Étude de la diversité génétique au sein des génomes nucléaire et chloroplastique chez les cinq races connues du *STRIGA GESNERIOIDES*, une plante parasite d'importance mondiale. Thèse de doctorat, la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, 144p.

54. Earl DA et vonHoldt BM, 2012. Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method, *Conserv Genet Resour*, 4: 359-361.
55. Ebrahimi A, Zarei A, Lawson S, Woeste K, et Smulders MJM, 2016. Genetic diversity and genetic structure of Persian walnut (*Juglans regia*) accessions from 14 European, African, and Asian countries using SSR markers. *Tree Genet Genomes* 12:114.
56. Eganathan P, Subramanian HMSR, Latha R, Srinivasa Rao, C, 2006. Oil Analysis in Seeds of *Salicornia Brachiata*, *Ind Crops Prod*, 23:177.
57. Epperson BK, 2000. Spatial genetic structure and non-equilibrium demographics within plant populations, *Plant Species Biol*,15: 269–279.
58. Erdogan V, 2006. Use of callusing cable in walnut propagation. *Acta Hort.* 705 :313-317.
59. Erturk U, Dalkilic Z, 2011. Determination of genetic relationship among some walnut (*Juglans regia* L.) genotypes and their early-bearing progenies using RAPD markers. *Rom Biotech Lett*, 16: 5944–5952
60. ET-Touil R, 1998. Structure génétique des populations du *cronflrtium ribicola* canadiennes, Faculté des études supérieures de l'Université Laval, Canada, p :76
61. Evanno G, Regnaut S et Goudet J, 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol.* 14: 2611-2620.
62. Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin ver 30: An integrated software for population genetics data analysis. *Evo Bioinf Onl*, 1: 47-50.
63. Excoffier L, Smouse PE, Quatro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genet.* 131: 479-491.
64. Excoffier L, Smouse PE, Quatro JM, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genet*, 131: 479-491.
65. Falush D, T .Wirth,B. Linz,J.K. Pritchard,M. Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Mégraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S, 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations, *Science*, 299:1582–1585.
66. FAO, 2001. Walnut propagation: India. Sharing innovative experiences, 5, 63 73.<http://tcdc.undp.org/sie/experiences/vol5/Walnut.pdf> (Accessed 04/04/2007)
67. FAO. 2010. Le Deuxième Rapport sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture dans le monde. Rome
68. FAOSTAT, 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Statistics Division. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor..>

69. Fennane, M. 2004. Propositions de Zones Importantes pour les Plantes au Maroc (ZIP Maroc), Rabat.
70. Fiorucci S. (2006). Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Nice, 211p.
71. Fjellstrom RG, Parfitt DE, McGranahan GH, 1994. Genetic relationships and characterization of Persian walnut (*Juglans regia* L.) cultivars using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). J Am Soc Hortic Sci, 119:833–839
72. Forde HI, 1970. Pollen date brought up to date. Diamand walnut news (2).
73. Fourcy A, Lantelme J, 1965. Essais sur l'enracinement des boutures de noyer. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie d'agriculture de France, t. 51, n° 18, pp : 1183-1190.
74. Franchimont J, Saadaoui EM, 2001. Etude nationale sur la biodiversité rapport de synthèse. Ministère de l'aménagement du territoire, de l'urbanisme, de l'habitat et de l'environnement département de l'environnement, Maroc.
75. Fu M, Qu Q, Yang X, Zhang X, 2016. Effect of intermittent oven drying on lipid oxidation, fatty acids composition and antioxidant activities of walnut. LWT - Food Sci Technol, 65:1126- 1132.
76. Fukuda T, Ito H, Yoshida T, 2003. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). Phytochem, 63 :795-801.
77. Fulton TL, STROBECK C, 2010. Multiple fossil calibrations, nuclear loci and mitochondrial genomes provide new insight into biogeography and divergence timing for true seals (Phocidae, Pinnipedia). J. Biogeogr, 37 : 814- 829.
78. Gandev S, 2007. Budding and grafting of the walnut (*Juglans regia* L.) and their effectiveness in Bulgaria (Review). Bulgarian J. Agricul. SCI, 13: 683-689.
79. Ganie AH, Tali Bilal A, Butt Tariq A, Wani S, Nawchoo Irshad A, 2013. Economic and ethno-medicinal uses of *juglans regia* l. in kashmir himalaya, unique journal of ayurvedic and herbal medicines, 01 (03): 64-67
80. Garavel L, 1961. Revue forestière française, Anomalies florales chez les noyers. In : Environnement ; Forestry ; Environment, Edition : Agro Paris Tech, Nancy, France.
81. Garavel L., 1959. La culture du Noyer. J.B. Baillièrre et fils, Paris, 285 p.
82. Gellini, R et Grossoni P, 1997. Botanica forestale.cedam, padova.
83. Génard M, Robin C, Gautier H, Massot C, Bénard C, Larbat R, Bertin N, Le Bot J, Adamowicz S, Bourgaud F, 2010. Elaboration de la qualité du fruit : composition en métabolites primaires et secondaires. Innovations Agronomiques 9, 47-57.

84. Germain E, 1992. Le noyer. In : Gallais A, Bannerot H (ed) Amélioration des espèces végétales cultivées, objectifs et critères de sélection, INRA Editions, Paris, pp. 620-632.
85. Germain E, Prunet JP, Garcin A, 1999. Le noyer, monographie, Ctifl.
86. Gharibzahedi SMT, Ghasemlou M, Razavi SH, Jafarii, SM, et Faraji K, 2011b. Moisture-dependent physical properties and biochemical composition of red lentil seeds. *Int Agrophys*, 25: 343-347.
87. Ghasemi M, Arzani K et Hassani D, 2012. Evaluation and Identification of Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes in Markazi Province of Iran. *C B Journal*, 2(2) : 119-124.
88. Gilbert JE, Lewis RV, Wilkinson MJ, Langride P, 1999. Developing and appropriate strategy to asses genetic variability in plant germplasm collections. *Theor Appl Genets*, 98:1125-1131.
89. Girzu M, Carnat A, Privat AM, Fialip J, Carnat AP, Lamaison JL, 1998. Sedative effect of walnut leaf extract and juglone, an isolated constituent. *Pharm Biol*, 36: 280-286.
90. Global Forest Resources Assessment 2001. FAO Forestry Paper No. 140.
91. González-Astorga J, Núñez-Farfán J, 2001. Effect of habitat fragmentation on the genetic structure of the narrow endemic *Brongniartia vazquezii*, *Evol Ecol Res*, 3: 861–872.
92. Govindaraj M, Vetriventhan M, Srinivasan M, 2015. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genet Res Intl*, 1–14.
93. Grosso N, Nepote V et Guzmán C, 2000. Chemical composition of some wild peanut species (*Arachis* L.) seeds. *J Agric Food Chem*, 48(3): 806-809.
94. Gursk AV, 1932. The nuts of west Kopet-Dag. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii* 8(1). (in Russian).
95. Hamrick JL et Godt JW, 1997. Allozyme diversity in cultivated crops. *Crop Sci* 37: 26-30.
96. Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL, 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New EW Forest*, 6: 95-125.
97. Hamrick JL, MJW Godt, Murawski DA et Loveless MD, 1991. Correlations Between Species Traits and Allozyme Diversity: Implications for Conservation Biology. In: *Genetic & Conservation of Rare Plant*, K.E. Holsinger (éd). Oxford University Press, 1991, 230 pp.
98. Hamrick JL, Murawski DA et Nason JD, 1993. The influence of seed dispersal mechanisms on the gene-tic structure of tropical tree populations. *Vegetal*, 107-108, 281-297



99. Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T et Okuda T,1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and scavenging effects. *Chem Pharm Bull*, 36: 2090–2097.
100. Helentjaris T, Slocum M, Wrigth S, Schaefer A et Nienhuis J, 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragments length polymorphism. *Theor Appl Genet*, 72 :761-769.
101. Hemery GE et Popov SI, 1998. The walnut (*juglans regia* L.) Forests of kyrgyzstan and their importance as a genetic resource. *Commonwealth forestry review* 77 (4): 272–276.
102. Hosamani KM, Sattigeri RM, 2000. Industrial utilization of *Rivea Ornata* seed oil: A moderate source of vernolic acid. *Ind. Crops Prod.*, 12: 93.
103. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm EB, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE, Hennekens CH, Willett WC, 1998. Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study. *Br. Med. J*, 317:1341-1345.
104. Hussain I, Sulatan A, Shinwari ZK, Raza G, Ahmed K, 2016. Genetic diversity based on morphological traits in walnut (*Juglans regia* L.) Landraces from Karakoram region-I. *Pak. J. Bot*, 48(2): 653-659.
105. Ibrar MFH, Sultan A, 2007. Ethnobotanical studies on plant resources of Ranyal Hill, District Shangla, Pakistan. *Pak J Bot*, 39:329-337.
106. Impiumi G, Ramina A,1967. Ricerche sulla biologia fiorale edi fruttificazione del noce (*Juglans regia* L.) I Osservazioni sullamorfologia fiorale e sul trasporto del polline. *Rivista dell’Ortofrutticoltura italiana*, 51:538–543.
107. IPGRI,1994. Descriptors for walnut (*Juglan* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
108. Ito H, Okuda T, Fukuda T, Hatano T et Yoshida T, 2007. Two novel dicarboxylic acid derivatives and new dimeric hydrolysable tannin from walnuts, *J. Agric. Food Chem*, 55: 672–679.
109. Jørgensen, H. and Ferná´ndez, J. A,Chemical composition and energy value of different fat sources for growing pigs.*Acta Agric. Scand., Sect. A, Animal Sci.* 50: 129–136, 2000
110. Kabiri G, Bouda S, Elhansali M, Haddioui A, 2018. Morphological and Pomological Variability Analysis of Walnut (*Juglans regia* L.) Genetic Resources from the Middle and High Atlas of Morocco, *Atlas J. Biol* 575–582
111. Kahl G, 2001.The dictionary of gene technology. Wiley-VCH, Weinheim.
112. Kaplan, J., Delpech, M., 1993.La cartographie du génome humain. *Biologie moléculaire et médecine*, Paris, Flammarion, 234-269.

113. Karadağ H et Akça Y, 2011. Phenological and Pomological Properties of Promising Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes from Selected Native Population in Amasya Province. *Afr J Biotechnol*, 10(74): 16763-16768.
114. Karadeniz T, 2005. Relationship between graft success and climatic values in walnut (*Juglans regia* L.). *J Centr Eur Agr*, 6(4): 631-634.
115. Karimi R, Ershadi A, Vahdati KK, Woeste K, 2010. Molecular characterization of Persian walnut populations in Iran with microsatellite markers. *Hort Sci*, 45: 1403–1406.
116. Karimi R, Ershadi A, Vahdati KK, Woeste K, 2010. Molecular characterization of Persian walnut populations in Iran with microsatellite markers. *Hort Sci*, 45: 1403–1406.
117. Kimura M, Seiwa K, Suyama Y, Ueno N, 2003. Flowering system of heterodichogamous *Juglans ailanthifolia*. *Plant Species Biol*, 18: 75–84.
118. Kimura, M. et Crow, J.F. (1964) *Genetics* 49, 725-738.
119. Kodad O, Socias I, Company R, Sindic M (2014) Kernel quality in a local walnut (*juglans regia* L.) population grown under different ecological conditions in Morocco. *FAO-CIHEAM Nucis-Newsl.* 335 (16): 27-31.
120. Kodada O, Estopañánb G, Juanb T, Sociasi Companync R et Sindic M, 2016. Genotype and year variability of the chemical composition of walnut oil of Moroccan seedlings from the high Atlas Mountains. *Grasas y aceites*, 67 (1)
121. Koffi KG, 2010. Etude de la variabilité génétique et de la phylogéographie de *Santiria trimera* (Burseraceae) implications pour une conservation durable des forêts humides d’Afrique. Thèse en génétique des populations, Ecole doctorale : Biodiversité Ecologie Evolution. Université Libre de Bruxelles. Pp-169
122. Korac M, Cerovic S, Golosin B, Miletic R, 1997. Collecting, evaluation and utilization of walnut (*Juglans regia* L.) in Yugoslavia. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 111: 72-74.
123. Krueger W, 2000. Pollination of English Walnuts: Practices and Problems. *Hort Technology*, 10 (1) : 127-130.
124. Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief in Bioinf.* 5:150-163.
125. Kunwar RM, Adhikari N, 2005. Ethnomedicine of Dolpa district, Nepal: the plants, their vernacular names and uses, *J Ecol App*, 8:43-49.
126. Lamara M, 2010. Analyse comparative de la diversité génétique et de la structure des populations chez l'orge (*hordeum vulgare* L.) À l'aide de marqueurs SSR, d'ADN et du pedigree, Faculté des études supérieures de l'Université Laval, QUÉBEC, p : 71

127. Lansari A, Hassani E, Nabil D et Germain E, 2001. Preliminary Results on Walnut Germplasm Evaluation in Morocco. *Acta Hort*, 544: 27–35.
128. Lavedrine F, A Ravel, A Villet, V Ducros et Alary J, 2000. Mineral composition of two walnut cultivars originating in France and California. *Food Chem*, 68(3):347-351.
129. Leahu A, Cristina D, Mircea O et Cristina - Elena H, 2013. Estimation of biochemical properties of walnuts from the region of Suceava - Romania. *Journal of Faculty of Food Engineering Stefan cel Mare University of Suceava, Romania*, 12(2): 169 - 175.
130. Leslie CA et McGranahan GH, 1998. The origin of the walnut, in: Ramos, DE (ed) walnut production manual, university of California. Division of agriculture and natural resources. Publication 3373, pp3-7.
131. Li Z et Nelson RL, 2001. Genetic diversity among soybean accession from three countries measured by RADPs. *Crop Sci*, 41:1337-1347.
132. Liu L, Li W, Koike K, Zhang S, Nikaido T, 2004. New alpha-tetralonyl glucosides from the fruit of *Juglans mandshurica*. *Chem Pharm Bull Tokyo*, 52:566-569.
133. MADRPM/DERD, 2006. Le Noyer et le Pacanier pur une diversification fruitière rentable. Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du PNTTA-Transfert de Technologie en Agriculture, du Ministère de l'agriculture et de la pêche maritime Maroc.
134. Mahmoodi R, Hassani D, Amiri ME, Jaffaraghaei M, 2016. Phenological and Pomological Characteristics of Five Promised Walnut Genotypes in Karaj, Iran. *Journal of Nuts*, 7(1):1-8.
135. Maire R, 1961. Flore De L'Afrique Du Nord. 7e éd. Paris : PAUL LECHEVALIER.
136. Makwana A, 2015. Energy content of nuts, *Environmental Societies and Sciences*
137. Malvolti ME, Pollegioni P, Bertani A, Mapelli S, Cannata F, 2010. *Juglans regia* provenance research by molecular, morphological and biochemical markers: A case study in Italy. *Bioremed Biodiv and Bioavailable*, 4 (1):84-92.
138. Mann J, Cummings JH, Englyst HN, Key T, Liu S, Riccardi G, Summerbell C, Uauy R, van Dam RM, Venn B, Vorster HH et Wiseman M. (2008). FAO/WHO Scientific Update on carbohydrates in human nutrition: Conclusions. *European journal of clinical nutrition*. 61 Suppl 1. S132-7. 10.1038/sj.ejcn.1602943.
139. Manning WE, 1978. The classification within the Juglandaceae. *Ann Mo Bot Gard*, 65(4):1058–1087.
140. Mantel NA, 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res*, 27:209–220.

141. Mao X, Hua Y et Chen G, 2014. Amino acid composition, molecular weight distribution and gel electrophoresis of Walnut (*Juglans regia* L.) Proteins and protein fractionation. International Journal of Molecular Sciences, Volume 15, pp. 2003-2014.
142. Mariotti F, Tomé D, Mirand PP, 2008. Converting Nitrogen into Protein Beyond 6.25 and Jones' Factors. Crit Rev Food Sci Nutr, 48:177- 84.
143. Martinez ML, Labuckas DO, Lamarque AL et Maestri, DM, 2010. Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. J Sci Food Agric, 90: 1959–1967.
144. Mauget JC, Causse M, 2011. Qualités nutritionnelles des fruits et légumes et itinéraires techniques. Pratiques agricoles innovantes et qualités nutritionnelles des produits alimentaires. Séminaire INRADGAL, 1-16.
145. Mauget JC, Guinard J, Frizot N, Mege R, 1983. Etude de la levée de dormance et du débourrement des bourgeons du noyer (*Juglans regia* L., cv. " Franquette ") soumis à des températures supérieures à 15 °C au cours de leur période de repos apparent. Agronomie, EDP Sciences, 3(8) :745-750.
146. McGranahan G, Leslie CA, 1991. Walnuts (*Juglans*). In: Moore JN, Ballington JR Jr, editors. Genetic resources of temperate fruit and nut crops. Wageningen: International Society for Horticultural Science, pp. 907–951.
147. McGranahan GH, Forde HI 1985. Relationship between clone age and selection trait expression in mature walnuts. Journal of the American Society for Horticultural Science 110: 692-696.
148. Mexis S, Badeka A, Riganakos, K, Karakostas, KX, Kontominas M, 2009. Effect of packaging and storage conditions on quality of shelled walnut. Food Control, 20: 743-751.
149. Milind P, Deepa K, 2011. Walnut: Not a Hard Nut to Crack. Int. Res. J. Pharm, 2(5) : 8-17.
150. Miltiadis VC, Dimos R, Eleni T, Penelope JB, 2010. Germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) cultivars and Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Sc Hort, 125: 584–592
151. Mohni C, Pelleri F, Hemery GE, 2009. The modern silviculture of *Juglans regia* L.: A literature review, Die Bodenkultur, 60: 21-34.
152. Mohsenipoor S, Vahdati K, Amiri R, Mozaffari MR, 2010. Study of the genetic structure and gene flow in Persian walnut (*Juglans regia* L.) using SSR markers. In: McNeil DL (Ed): VI<sup>th</sup> Intl. Walnut Symposium Proc, Acta Hort, 861.
153. Molnar Th, 2011. Persian Walnuts (*Juglans regia* L.) in Central Asia. Annual Report of the Northern Nut Growers Association, 101: 56-69.

154. Mongkolporn O, Kadkol GP, Pang ECK, Taylor PWJ, 2003. Identification of RAPD markers linked to recessive genes conferring siliqua shatter resistance in *Brassica rapa*. *Plant Breed.* 122: 479–484.
155. Mouhajir F, Hudson JB, Rejdali M, Towers GHN, 2001. Multiple antiviral activities of endemic medicinal plants used by Berber people of Morocco. *Pharm Biol*, 39: 364-374.
156. Muradoglu F, Oguz HI, Yildiz K, Yilmaz H, 2010. Some chemical composition of walnut (*Juglans regia* L.) selections from Eastern Turkey. *African Journal of Agricultural Research*, 5(17): 2379-2385.
157. Muradolu F, 2005. Selection of promising genotypes in native walnut (*Juglans regia* L.) populations of Hakkari central and Ahlat (Bitlis) district, and genetic diversity. PhD Thesis, Yüzüncü Yil University, Turkey.
158. Najimi B, El Jaafari S, Jlibène M, Jacquemin JM, 2003. Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes, *Biotechnol Agron Soc Environ* 7 (1) :17–35.
159. Napoli R, Mercurio, R, 2008. Common Walnut (*Juglans regia* L.) and Sweet/Wild Cherry (*Prunus avium* L.). 10.1201/b10197-25.
160. Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 70:3321–3.
161. Nei M, 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
162. Ohba H, Amirouche R, 2003. Observation of the Flora of Tadmait and Tidikelt, Central Sahara, Algeria. *J. Jap. Bot*, 78: 104-11.
163. Oukabli A, 2006. Les porte-greffes des arbres fruitiers adaptés aux conditions marocaines. *Transfert de technologie en agriculture*, 143 : 1-4.
164. Oukabli A, Mamouni A, 2006. Le Noyer et le Pacanier pour une diversification fruitière rentable, *Transfert de technologie en agriculture*, 139 : 1-4.
165. Oukabli A, Mamouni A, Laghezali M, Chahbar A, 2005. Création variétale à l'INRA METHODOLOGIE, ACQUIS ET perspectives, In : amélioration et sélection variétale chez les arbres fruitiers, *NRA*, Rabat (Maroc)
166. Özkan G, Koyuncu M, 2005. Physical and chemical composition of some walnut (*Juglans regia* L) genotypes grown in Turkey. *Grasas Aceites*, 56: 141–146.
167. Parcerisa, J., Rafecas, M., Castellote, A., Codony, R., Farran, A., Garcia, J., Gonzalez, C., Lopez, A., Romero, A., & Boatella, J. (1995). Influence of variety and geographical origin on the lipid fraction of hazelnut (*Corylus avellana* L.) from Spain: (III) oil stability, tocopherol content and some mineral contents (Mn, Fe, Cu). *Food Chem*, 53:71–74.
168. Pedneault K., Leonharts., Angenol., Gosselin A., Ramputh A., Arnason J. T., 2001. Influence de la culture hydroponique de quelques plantes médicinales sur

- la croissance et la concentration en composés secondaires des organes végétaux. Texte de conférence. Canada, 1-5.
169. Pereira J, Oliveira I, Sousa A, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L, 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food Chem Toxicol*, 46: 2103-2111.
  170. Pesson P, Louveaux J, 1984. Pollinisation et productions végétales. Paris : Inra. p 663.
  171. Polat M, Okatan V, Güçlü SF, 2015. Determination of some physical and chemical properties of walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes grown in the central district of Bitlis/Turkey. *Scientific Papers. Series B. Horticulture*, 59:81-6.
  172. Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A, 1996. The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breed*, 2: 225-238.
  173. Prasad R, 2003. Walnuts and pecans, in *Encyclopedia of Food and Science*. p.6071–6079. éd. London: Caballero B, Trugo L and Finglas P. Academic Press.
  174. Prevost A, Wilkinson MJ, 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet*, 98:107–112.
  175. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genet*, 155: 945-959.
  176. Rabrenovich B, Etelka D, Milan M, 2011. Determination of fatty acid and tocopherol compositions and the oxidative stability of Walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Serbia. *Czech J. Food Sci*, 29(1): 74–78.
  177. Rampant PF, Prado E, Prat, D, 2006. Analyse du génome et gestion des ressources génétiques forestières, Inra, Savoir-faire, Paris, p :484
  178. Ranganna S, 1977. *Handbook of Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products, Jams, Jellies, Marmalade and Preserve* 29 925.
  179. Reil, WO, Leslie, CA, Forde, HI, McKenna JR, 1998. Propagation. In: D.E. Ramos (ed.). *Walnut production manual*. University of California, Division of Agricultural and Natural Resources, Publication 3373.
  180. Rolf FJ, 1998). *NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system Version 2.02*. Applied Biostatistics, New York.
  181. Rorabaugh JM, Singh AP, Sherrell IM, Freeman MR, Vorsa N, Fitschen P, Malone Ch, Maher MA, Wilson Ted, 2011, English and Black Walnut Phenolic Antioxidant Activity in Vitro and Following Human Nut Consumption. *Food and Nutrition Sciences*, 2:193-200
  182. Ruggeri S, Cappelloni M, Gambelli L, Nicoli S, Carnovale ES, 1998. Chemical composition and nutritive value of nuts grown in Italy. *Ital. J. Food Sci*, 10: 243–252.

183. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE, 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*. 18(21):6409-6412.
184. Sabatier S, 2006. Variabilité morphologique et architecture de deux espèces du noyer : *Juglans regia* L. et de deux noyers hybrides interspécifiques. Thèse de doctorat, Université Montpellier II- Sciences et Techniques du Languedoc, 142p.
185. Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
186. Savage G, 2001. Chemical composition of walnuts (*Juglans regia* L.) grown in New Zealand. *Plant Foods Hum Nutr*, 56: 75-82.
187. Savage GP, 2000. Chemical composition of walnuts (*Juglans regia* L.) grown in New Zealand. *Plant Foods for Human Nutrition*, 56:75-82.
188. Sen SM, 2013. *Walnut Diet, Eating Walnut Living Healthy* (in Turkish). Alper Publishing, Ankara, Turkey, pp. 216S.
189. Serrar M, 2007. Le noyer, arbre fruitier et forestier, *Arboriculture du Maghreb*.
190. Shahidi F, 2006). *Nutraceutical and Specialty Lipids and their Co-Products*. *Nutraceutical and Specialty Lipids*. 1-25. 10.1201/9781420015911.
191. Shalit MS, 1951. Wild useful plants of Turkmen S.S.R. *Turkmen Botany-Plant Industry Institute of the Academy of Science of USSR*. *Moskovskoe obshestvo ispitately prirodi*. Moscow 40.
192. Shamasbi FV, Nasiri N, Shokri E, 2018. Genetic diversity of Persian ecotypes of Indian Walnut (*Aeluropus littoralis* (Gouan) Pari.) by AFLP and ISSR Markers. *Cytol Genet*. 52(3): 222–230.
193. Shannon CE, 1948. A mathematical theory of communication. *Mathematical Reviews*, 27:379-423 and 623-656.
194. Sharafati-Chaleshtori R, Sharafati-Chaleshtori F, Rafieian M, 2011. Biological characterization of Iranian walnut (*Juglans regia*) Leaves. *Turk J Biol*, 35: 635-639p.
195. Sharma RM, Kour K, Singh B, Yadav S, Kotwal N, Rana JC, Anand R, 2014. Selection and Characterization of Elite Walnut (*Juglans regia* L.) Clone from Seedling Origin Trees in North Western Himalayan Region of India. *Aust J Crop Sci*, 8(2): 257-262.
196. Simsek M, 2010. Determination of Walnut genotypes with high fruit bearing and quality in Dicle, Hani, Egil and Kocaköy Townships. *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27(1) :85-93.
197. Singleton VL et Rossi JA, 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16,144–158.

198. Siret R, 2001. Etude du polymorphisme génétique de la vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.) à l'aide des marqueurs microsatellites : Application à la caractérisation des cépages dans le vin. Thèse de doctorat en sciences des aliments, université de Montpellier I, Montpellier.
199. Slatkin M, 1985. Gene flow in natural population. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 16:393-430
200. Slatkin M, Barton NH, 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evo*, 43: 1349 –1368.
201. Somma M, 2006 : Organisation Mondiale de la Santé. Bureau Régional de l'Europe. Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. « Module 4 : Extraction et purification de l'ADN », p :3-17.
202. Sousa A, Ferreira ICFR, Calhella R, Andrade P, Valentao P, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA, 2006. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives “Alcaparras”. *Bioorg Med Chem*, 14: 8533–8538.
203. Stockwell CA, Hendry AP, Kinnison MT (2003) Contemporary evolution meets conservation biology. *Trend Ecol Evol* 18:94–101
204. Sze-Tao KW C, Sathe SK, 2000. Walnut (*Juglans regia* L.). Proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein in vitro digestibility. *J Sci Food Agric*, 80:1393–1401.
205. Tabasum F, Umbreen Sh, Syed Zameer H, 2008. Nutritional and health benefits of walnuts, *J Pharmacogn Phytochem*, 7(2): 1269-1271.
206. Tagarelli G, Tagarelli A, Piro A, 2010. Folk medicine used to heal malaria in Calabria (southern Italy). *J Ethnobiol Ethnomed*, 6:27
207. Tajamul IS, Sharma E, Gowhar A, 2014. *Juglans regia* Linn: A Phytopharmacological Review, *World J Pharm Sci*, 2(4) :364-373
208. Tapia MI, Sanchez-Morgado JR, Garcia-Parra J, Ramirez R, Hernandez T, Gonzalez-Gomez D, 2013. Comparative study of the nutritional and bioactive compounds content of four walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *J of Food Compo and Analy*, 31: 232-237.
209. Tapsell L, Batterham M, Tan SY, Warensjö E, 2009. The effect of a calorie-controlled diet containing walnuts on substrate oxidation during 8-hours in a room calorimeter. *J Am Coll Nutr*, 28 (5): 611-617.
210. Tautz D, 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Ac. Res.* 16: 6463-6471. technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants [Review]. *Curr Sci*, 80 (4):524–535.
211. Telles MPC, Coelho ASG, Chaves LJ, Diniz-Filho JAF, D'ayala VF, 2003. Genetic diversity and population structure of *Eugenia dysenterica* DC.

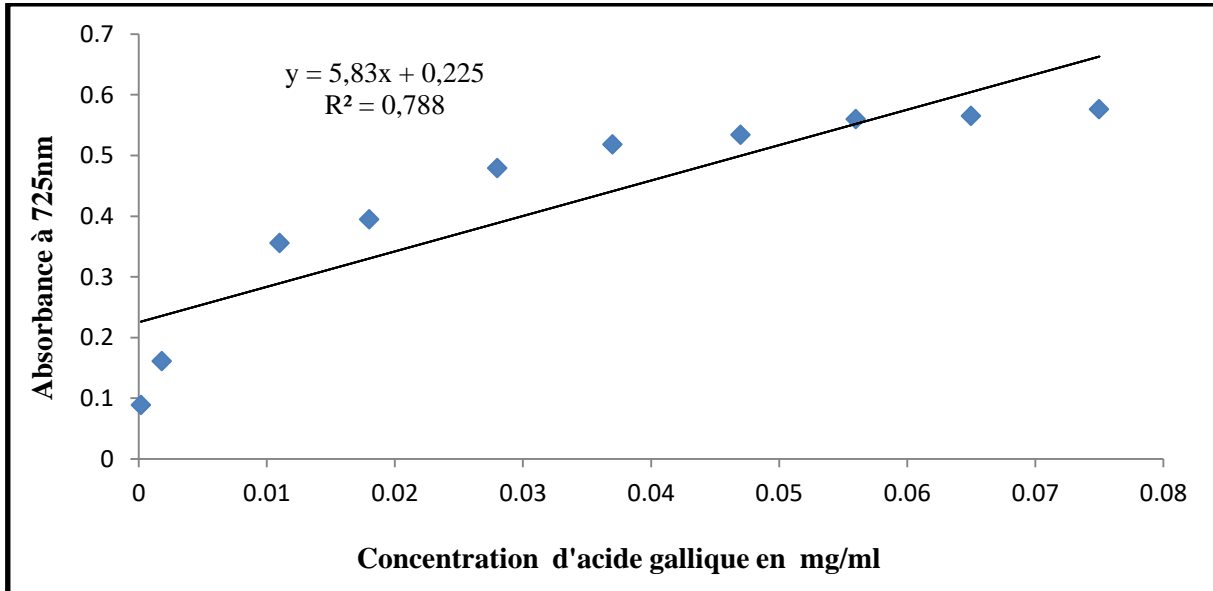


- (*Cagaiteira-Myrtaceae*) in Central Brazil: spatial analysis and implications for conservation and management. *Conserv Genet*, 4: 685–695.
212. UPOV, 1999. Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, uniformity and stability. Walnut (*Juglans regia* L.), Geneva: International Union for the Protection of New Varieties of Plants.
  213. USDA Oxygen Radical Absorbance capacity (ORAC) of Selected Foods, 2007. 2007/11 [cited 2009/12/15];
  214. Vahdati, K, Zareie N, 2006. Evaluation of side-stub and hypocotyle grafting efficiency for walnut propagation in Iran. *Acta Hort.* 705:347-350.
  215. Vaidyaratnam PSV, 2005. Indian Medicinal Plants a Compendium of 500 species. Orient Longman Private Limited, Chennai, 3: 264-65.
  216. Verma MK, 2014, Training manual on teaching of post-graduate courses in horticulture (Fruit Science), In: Walnut Production Technology, Publisher: Post Graduate School, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi-110012, SK Singh, AD Munshi, KV Prasad, AK Sureja, pp.281-287
  217. Verma, MK, Sofi AA, Ahmed N, Singh DB, 2009. Walnut Germplasm Collection at CITH: Central Institute of Temperate Horticulture, Srinagar, J&K.
  218. Vischi M, Chiabà C, Raranciuc S, Poggetti L, Messina R, Ermacora P, Cipriani G, Paffetti D, Vettori C, Testolin R, 2017. Genetic Diversity of Walnut (*Juglans Regia* L.) in the Eastern Italian Alps. *Forests*, 8 (81): 2-14.
  219. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res*, 23: 4407–4414.
  220. Vyas D, Sharma SK, Sharma DR, 2003. Genetic structure of walnut genotype using leaf isozymes as variability measure. *Sci Hortic*, 97: 141–152.
  221. Wahid N, González-Martínez Santiago C, Hadrami IEl, Boulli A, 2004. -Genetic structure and variability of the Moroccan natural populations of maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). *Silvae Genet*, 53(3):93-99.
  222. Wahid N, Joudre H, Lamhamedi MS, Zine ElAbidine A, Boulli A, 2010. Évaluation de la structure et de la variabilité génétique des populations naturelles du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) au Maroc à l'aide de marqueurs isoenzymatiques. *Acta Bot Gallica*, 157(3) :419-43.
  223. Wang H, Pei D, Gu R, Wang B, 2008. Genetic diversity and structure of walnut populations in central and southwestern China Revealed by microsatellite markers. *J ASoc Hortic Sci*, 133:197–203.
  224. Wani S, Kumar V, Shriram V, Sah, SK, 2016. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop J*, 4:162–176.

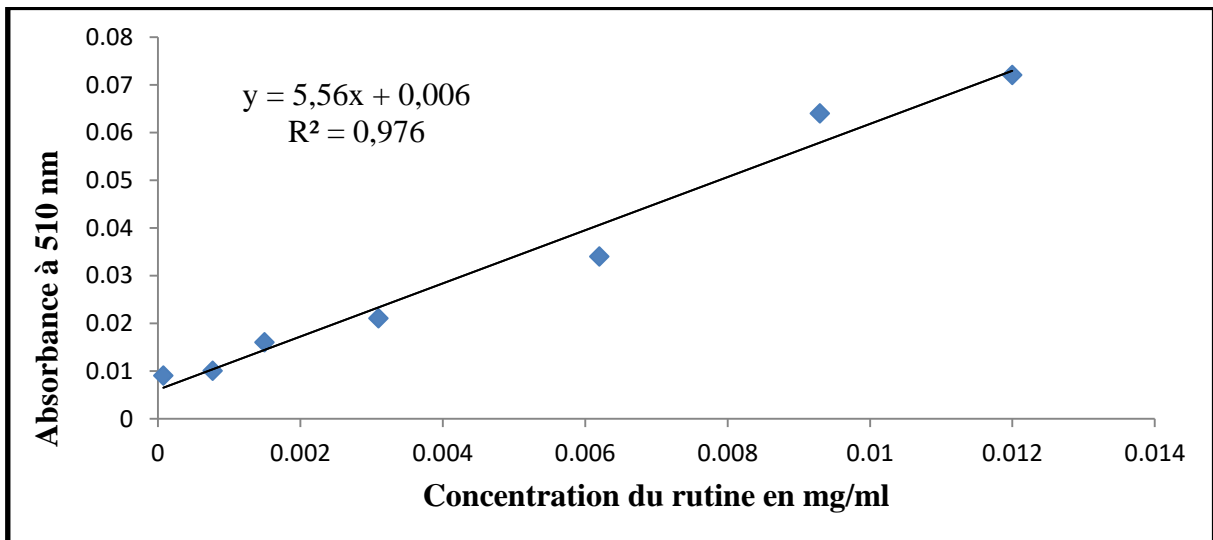
225. Watts PC, KEMP SJ, SACCHERI IJ, THOMPSON DJ, 2005. Conservation implications of genetic variation between spatially and temporally distinct colonies of the endangered damselfly *Coenagrion mercuriale*. *Ecol. Entomol*, 30 : 541-547.
226. Wiesner I, Wiesnerová D, 2003. Effect of resolving medium and staining procedure on inter-simple-sequence-repeat (ISSR) patterns in cultivated flax germplasm. *Genet Resour Crop Evol*, 50: 849–853.
227. Williams J, Anne G, Kubelik K, Kenneth R, Livak J, Antoni R, Scott J, Tingey V, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18(22): 6531-6535.
228. Wright S, 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugen (Lond.)* 15:323-354.
229. Yang J, Liu RH, Halim L, 2009. Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT -Food Sci Technol*, 42: 1573–1580.
230. Yerlikaya C, Yucel S, Erturk Ü, Korukluoğlu M, 2012. Proximate Composition, Minerals and Fatty Acid Composition of *Juglans Regia* L. Genotypes and Cultivars Grown in Turkey. *Braz Arch Biol Technol*, 55 (5), 677-683.
231. Zhadan VM, Strukov MV, 1977. Breeding walnut for fruitsize. *Pl Br Abstr*, 47(11): 10805.
232. Zhang Y, Wang X, Ryder OA, Li H, Zhang H, Yong Y, Wang P, 2002. Genetic diversity and conservation of endangered animal species. *Pure Applied Chem*, 74: 575-584.
233. Zhang Z, Liao L, Moore J, Wu T, Wang Zh, 2009. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chem*, 113: 160-165.
234. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics*, 20: 176-183.

# **ANNEXES**

## Annexe 1 : Courbe d'étalonnage



Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux



Courbe d'étalonnage de la rutine pour le dosage des flavonoïdes

## **Annexe 2 : Matrice binaire des marqueurs ISSRs**





Amorce	Amouguer						Beram						Imlil						Tabrijjate						Anougal								
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6			
UBC807	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0		
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
UBC810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	
	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0		
UBC811	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0		
	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
UBC814	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	
	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
UBC818	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	
	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
UBC834	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
UBC836	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0



