

Analyse moléculaire de la diversité génétique de plantes Xéro/Halophytes du genre *Atriplex* moyennant RAPD-PCR

MÂALEM Souhail^{1,2,3}, KHOUFI Sahari², RAHMOUNE Chaâbane³ et BENNACER M'barek²

¹ Département de Biologie, Université Cheikh Lâarbi-Tbéssi, 12002 Tébessa, Algérie, E-mail: soubenyou@yahoo.fr)

² Laboratoire de physiologie végétale et biotechnologies, INRAT, Tunis, Tunisie

³ Laboratoire d'Ecotoxicologie, Département des sciences de la nature et de la vie Faculté des sciences, Université de Constantine, 25000 Constantine, Algérie

Résumé- Dans les zones arides et semi arides, le genre *Atriplex* représente une ressource fourragère importante. Cependant, on ne dispose à nos jours, que de peu d'information sur leur structure génétique. Les essais visant à caractériser la diversité génétique de ces espèces sont donc très utiles pour leur classification, leur conservation et leur amélioration. Dans ce contexte, nous nous sommes lancés dans l'évaluation du niveau de diversité génétique caractérisant les *Atriplex* poussant actuellement en Algérie. Il est utilisé la technique RAPD sur des génotypes de 3 différentes espèces d'*Atriplex*: *A. halimus*, *A. canescens* et *A. nummularia*. Les résultats obtenus ont mis en évidence l'amplification de 319 bandes, dont la totalité a été polymorphe. L'analyse des résultats à l'aide du logiciel NTSYSpc 2.0 for Windows a permis d'obtenir 4 groupes distincts dans lesquels les génotypes de 2 espèces introduites ont été classés en 2 groupes indépendants; alors que les génotypes de l'espèce autochtone (*A. halimus*) ont été subdivisés en 2 autres groupes indépendants. De façon générale, les résultats ont révélé un seuil élevé de divergence génétique, inter et intra espèces chez les génotypes étudiés d'*Atriplex*.

Mots clés: *Atriplex*, Chenopodiaceae, Diversité génétique, PCR-RAPD, Steppe.

Molecular analysis of genetic diversity of plants Xero / Halophytes of the genus *Atriplex* using RAPD-PCR

Abstract- In the arid and semi arid areas, salt bush (*Atriplex*) represents an important forage resource. However, until now, there is not enough information on their genetic structure. Trials aiming to characterize the genetic diversity of these species are, therefore, useful for their classification, their conservation and improvement. In this context, we tried to estimate the genetic diversity level characterizing the *Atriplex* existing currently in Algeria. PCR-RAPD technic was used to test genotypes of three different species of *Atriplex*: *A. halimus*, *A. canescens* and *A. nummularia*. Obtained results showed 319 amplified bands which were mostly polymorphic. The analysis of the results, by NTSYSpc 2.02 j for windows, generated four different groups where the genotypes of two introduced species (*A. canescens* and *A. nummularia*) have been clustered into two independent groups. However, genotypes of the autochthonous species (*A. halimus*) have been subdivided into two different independent groups. In general, results revealed inter and intra high level of genetic diversity in the *Atriplex* studied species.

Key words: *Atriplex*, Chenopodiaceae, genetic Diversity, PCR-RAPD, Steppe.

Introduction

Le genre *Atriplex* est une dicotylédone qui appartient à la famille des chénopodiacées. Il renferme plusieurs espèces distinguables par leur morphologie, leur cycle de développement et par leur adaptation écologique [1]. Elles sont réparties dans la plupart des régions du globe et leur nombre total est estimé à 400 espèces [2], dont 48 sont propres aux régions du bassin méditerranéen.

Dans les régions arides et semi arides, les espèces d'*Atriplex* constituent un excellent fourrage pour le cheptel, notamment en saison de disette [3]. En raison de leur rusticité,

palatabilité et appétibilité ainsi que leur richesse en protéines brutes. Dotée d'une biomasse aérienne et racinaire assez importante, elles constituent un outil efficace et relativement peu coûteux dans la lutte contre l'érosion et la désertification des sols surtout en zones steppiques [4].

Dans les pays du Maghreb, l'état actuel de la steppe n'est pas satisfaisant, car en plus de l'impact du facteur humain, dont le plus marquant est le surpâturage, des contraintes naturelles, telles que la sécheresse et la salinisation des sols ont abouti à un état de dégradation alarmant qui a touché la quasi-totalité des surfaces de parcours [5].

En Algérie, les problèmes suscités sont les causes directes ou indirectes de la chute de la production fourragère. En effet, le taux de satisfaction des besoins alimentaires du bétail, par la production fourragère locale a diminué de façon continue, en passant de 70% en 1978 à 40% en 1986 et s'est maintenu jusqu'en 1996 [6].

Afin de remédier à cette dévastation, une régénération du couvert végétal steppique s'impose. Le choix des espèces à utiliser doit être alors bien étudié pour que la réhabilitation de ces sites dégradés puisse réussir. Le recours à des végétaux, tels que les *Atriplex* qui sont à la fois bien présents dans ces régions et adaptés aux conditions climatiques et édaphiques, est une possibilité intéressante. Ce genre doté de caractère halophile et xérophile, pourrait, en association avec d'autres espèces végétales, réhabiliter les parcours pastoraux sévèrement dégradés [7, 8, 9].

Toutefois, la structure génétique du genre *Atriplex* reste peu connue, comme c'est le cas des espèces méditerranéennes, et encore moins les espèces algériennes dont la plus représentative est *A. halimus*. Contrairement à leur biologie et physiologie, peu d'études ont portées sur l'évaluation de leur diversité génétique dont la connaissance serait nécessaire pour la bonne gestion et la valorisation de cette ressource phylogénétique [10].

A titre d'exemple; les travaux de Bouda *et al.*, [11], qui ont porté sur l'analyse moléculaire de la diversité génétique chez quelques espèces d'*Atriplex*, poussant au Maroc et aux USA. Et les travaux d'Ortiz-Dorda *et al.* [12] qui avaient le même aspect, mais réalisés sur des populations existantes dans tous les pays du bassin méditerranéen. Ces travaux sont parmi les plus rares études ayant traité la diversité génétique moléculaire des populations méditerranéennes d'*Atriplex*. Il est à noter que jusqu'à maintenant, c'est la technique RAPD-PCR qui a été uniquement utilisée. Récemment, suite aux travaux de Byrne *et al.* [13] et Anderson *et al.* [14], des amorces spécifiques pour l'espèce *A. nummularia* ont été découvertes. Mais, on ignore encore leur efficacité pour le reste des espèces du genre *Atriplex*, notamment pour l'espèce qui nous intéresse le plus *A. halimus*.

Ce travail contribue à l'étude de la variabilité génétique de trois espèces du genre *Atriplex* dont l'une est autochtone (*A. halimus*), alors que les deux autres (*A. canescens* et *A. nummularia*) sont originaires, respectivement, d'Amérique du nord et d'Australie. Pour ce faire nous avons opté pour la technique PCR-RAPD. Cette dernière, bien qu'elle ne soit pas un outil de discrimination spécifique, reste néanmoins un outil efficace dans le cas d'absence de méthodes plus spécifiques et /ou, en phase préliminaire dans les études moléculaires de la diversité génétique [12, 15, 16].

2. Matériel et Méthodes

Matériel végétal et site d'essai

Les échantillons des espèces d'*Atriplex* étudiés ont été collectés sur différents sites de la région de Tébessa (Algérie) (Fig. 01). En premier lieu, nous avons prélevé au hasard des

feuilles jeunes, sur des plants adultes existants dans la pépinière pastorale de Thlidjène (situé au Sud-est de la wilaya de Tébessa). Nous avons aléatoirement prélevé 3 échantillons pour chaque espèce. Les échantillons: H₈, H₉ et H₁₀ représentent l'espèce *A. halimus*, C₁, C₂ et C₃ de l'espèce *A. canescens* alors que, N₁, N₂ et N₃, représentent l'espèce *A. nummularia*. Puis nous avons réalisé d'autres prélèvements, hors station, sur d'autres sites, et ce seulement pour le cas de l'espèce autochtone *A. halimus* (échantillons : H1, H2, H3, H4 et H6). Les deux autres espèces n'existent pas à l'état naturel en continent Africain. Les sites d'échantillonnages, le nom des espèces ainsi que les numéros des individus étudiés sont présentés sur la figure 02.

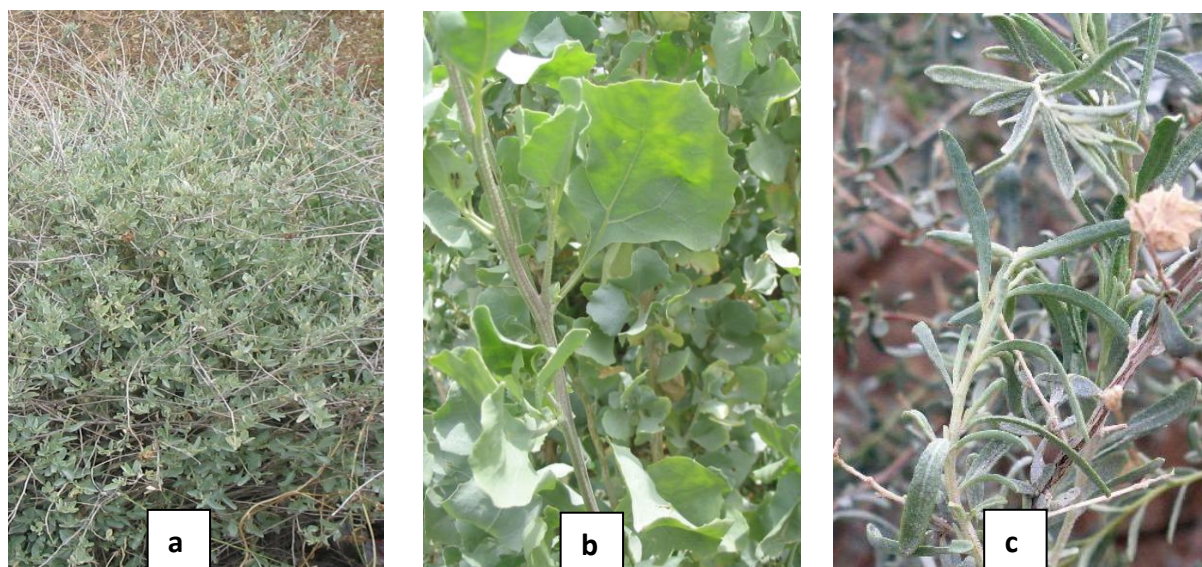


Figure 1. Espèces étudiées d'*Atriplex*: a- *A. halimus*, b- *A. nummularia*, c- *A. canescens*

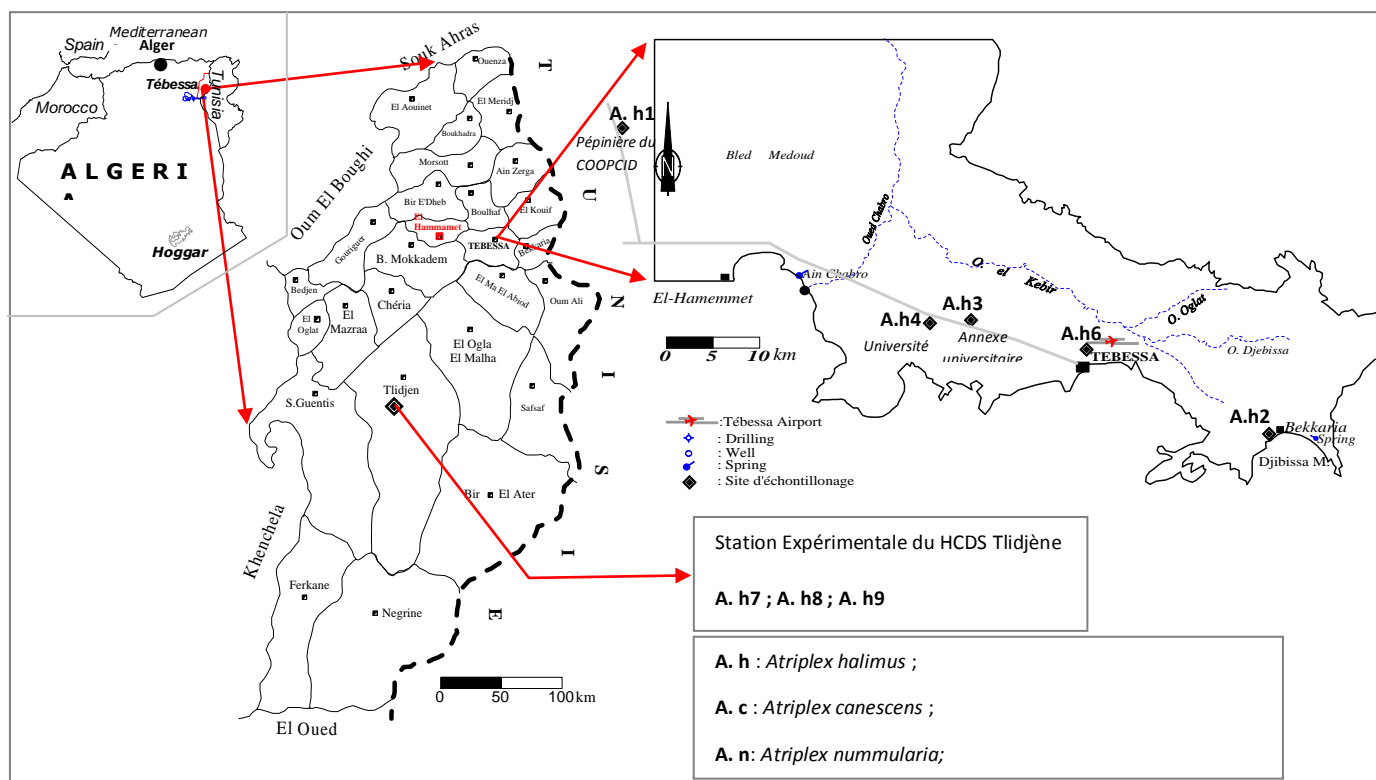


Figure 2. Représentation de la codification et de la répartition des génotypes étudiés sur les sites d'échantillonnage représentés sur la carte de la wilaya de Tébessa

Extraction et quantification de l'ADN

L'ADN génomique est extrait de jeunes feuilles en utilisant le Cetyltriméthylammonium bromure (CTAB), selon la méthode décrite par [17]. L'ADN purifié des différents échantillons a été remis en suspension dans 100µl d'une solution tampon TE. La concentration de ces ADN a été contrôlée par une quantification réalisée sur gel d'agarose à 0.8%.

Amorces utilisées

Nous avons testé un total de 40 amorces en raison de la qualité des bandes polymorphes qu'elles ont produit. Seules 20 ont été retenues. Ce sont: OPA2, 5, 7, OPB1, 3, 6, OPC7, 8, 15, OPD8, 11, 15, OPE12, 18, OPG3, OPI16, OPK9, OPL2, OPN7, OPP8. (tab. I).

Tableau I. Amorces RAPD sélectionnées et nombre de fragments amplifiés

Amorces	Séquence 5'...3'	Nombre de fragments amplifiés	Nombre de fragments polymorphes
OPA-02	TGCCGAGCTG	19	19
OPA-05	AGGGGTCTTG	13	13
OPA-07	GTTTCGCTCC	18	18
OPB-01	GTTTCGCTCC	12	12
OPB-03	CATCCCCCTG	16	16
OPB-06	TGCTCTGCCC	16	16
OPC-07	GTCCCGACGA	14	14
OPC-08	TGGACCGGTG	13	13
OPC-15	GACGGATCAG	14	14
OPD-08	GTGTGCCCCA	20	20
OPD-11	AGCGCCATTG	11	11
OPD-15	CATCCGTGCT	15	15
OPE-12	TTATCGCCCC	17	17
OPE-18	GGACTGCAGA	11	11
OPG-03	TCTCCGCCTT	19	19
OPI-16	TCTCCGCCTT	22	22
OPK-09	CCCTACCGAC	19	19
OPL-02	TGGGCGTCAA	17	17
OPN-07	ACATCGCCCA	7	7
OPP-08	TCTGTTCCCC	26	26
Total		319	319

Amplification d'ADN et électrophorèse

L'amplification a été effectuée dans un volume total de 25µl contenant 2µl d'extrait d'ADN (10ng/µl), 5µl de tampon de l'enzyme de polymérisation (5x), 2µl de MgCl₂ (2.5mM), 2.5µl de dNTPs (2mM), 3.8µl d'amorce oligonucléotide (2µM), 0.2µl de Taq DNA polymérase (5U/µl). Le processus de la PCR consiste en une pré-dénaturation initiale (3 min à 95°C), suivie de 45 cycles d'amplification (30sec de dénaturation à 95 °C, 1 min d'hybridation à 37 °C, 2 min d'extension à 72 °C) et en une extension finale (10 min à 72 °C). Les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (p/v TBE) contenant du Bromure d'éthidium pendant 90 min. Les bandes d'ADN sont alors observées à la lumière ultraviolette puis photographiées.

Analyse bioinformatique des données

Pour chacun des individus et pour chaque amorce, la lecture visuelle des gels a permis de noter les bandes polymorphes. Ainsi, nous avons attribué la valeur 1 pour les bandes présentes et 0 pour les bandes absentes. Après saisi des données correspondantes à la matrice binaire obtenues, le programme SIMQUAL (*Similarity for quantitative Data Program*) du logiciel NTSYS-pc (*The numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System For Personnel computer*), Version 2.0 a permis d'élaborer un dendrogramme et une matrice basée sur le coefficient SM (Simple matching) de similarité génétique entre les différents génotypes d'*Atriplex* étudiés.

3. Résultats et discussion

Empreintes génétiques

Cette étude a permis de détecter des empreintes génétiques spécifiques pour les 14 génotypes étudiés. Les 20 amorces de RAPD retenues dans cet essai ont généré un très grand nombre de bandes polymorphes caractérisées par un poids moléculaire compris entre 200 à 1500 pb. La figure 3 présente un exemple des profils générés par l'amorce OPA02 et OPA08.

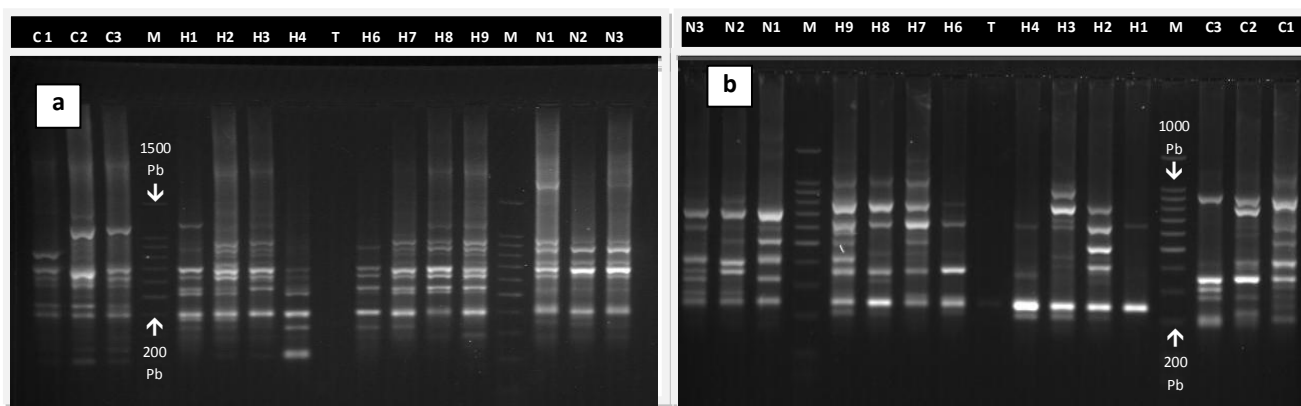


Figure 3. Exemple de gel d'agarose montrant un profil d'ADN amplifié avec la réaction RAPD-PCR, utilisant l'amorce OPA02 (Photo a) et OPC08 (Photo b) et 14 génotypes appartenant à 3 espèces d'*Atriplex* [C, H et N correspondent respectivement aux noms des espèces: *A. canescens*, *A. halimus* et *A. nummularia* ; M : marqueur de taille (100Pb Ladder) ; T : témoin négatif (sans ADN)]

Les 20 amorces retenues ont produit un total de 319 bandes polymorphes. Pour tous les génotypes, le nombre le plus élevé de bandes polymorphes est obtenu par l'amorce OPI 16 avec 26 bandes, alors que le plus faible a marqué l'amorce OPE 18 avec seulement 7 bandes. En moyenne, 17 bandes par amorce ont été produites (Tab. I).

Similarité génétique

La matrice de similarité (Figure 4.), affiche une variation du coefficient de similarité génétique comprise entre 0,533 et 0,831, avec une moyenne de 0,682. Les similarités les plus élevées ont été observées entre les composantes génotypiques suivantes: (H4-H6: 0,831), (H7-H9: 0,796) et (C2-C3: 0,796). Les similarités les plus faibles ont été obtenues avec les combinaisons (H9-N3: 0,533), (N1-C2: 0,533) et (N3-H2: 0,539).

	C1	C2	C3	H1	H2	H3	H4	H6	H7	H8	H9	N1	N2	N3
C1	1													
C2	0.762	1												
C3	0.759	0.796	1											
H1	0.655	0.712	0.727	1										
H2	0.564	0.589	0.599	0.69	1									
H3	0.58	0.63	0.652	0.693	0.771	1								
H4	0.665	0.69	0.73	0.796	0.668	0.727	1							
H6	0.639	0.696	0.737	0.828	0.699	0.708	0.831	1						
H7	0.549	0.592	0.621	0.674	0.734	0.774	0.677	0.69	1					
H8	0.577	0.614	0.655	0.74	0.705	0.74	0.73	0.743	0.777	1				
H9	0.552	0.577	0.599	0.646	0.762	0.759	0.655	0.655	0.796	0.749	1			
N1	0.552	0.533	0.567	0.602	0.586	0.583	0.574	0.586	0.564	0.599	0.592	1		
N2	0.618	0.586	0.627	0.699	0.627	0.618	0.702	0.696	0.611	0.671	0.621	0.69	1	
N3	0.567	0.574	0.596	0.605	0.539	0.542	0.596	0.602	0.561	0.589	0.533	0.727	0.712	1

Figure 4. Matrice des corrélations générées par les marqueurs RAPD et représentant le coefficient de similarité existant entre les génotypes étudiés.

Polymorphisme inter et intra-spécifique

Pour cette étude, nous avons fixé au niveau du dendrogramme (Figure 5.), un point sur l'échelle du coefficient de similarité (pointé par une ligne verticale discontinue), marquant le repère de la détermination du nombre de groupes produits.

D'après ce dendrogramme généré par l'approche RAPD, nous avons séparé les génotypes étudiés en 4 groupes distincts: le premier (G1) renferme tous les individus appartenant seulement à l'espèce d'origine américaine *A. canescens* (C1, C2 et C3), le second groupe (G2) renferme aussi et exclusivement les individus de l'espèce australienne *A. nummularia* (N1, N2 et N3). Cependant, les individus de l'espèce locale (*A. halimus*) ont été partagés entre le groupes 3 (G3) et 4 (G4), contenant respectivement les génotypes (H1, H4 et H6) et (H2, H3, H7, H8 et H9).

Ces résultats montrent que les individus du G3 sont génétiquement les plus proches entre eux par rapport aux autres existant au sein d'un même groupe. Dans cette étude, le couple H4-H6 est exceptionnellement le plus génétiquement convergeant, avec le coefficient de similarité le plus élevé (0.831). Les individus du G4 appartenant aussi à l'espèce locale viennent avec ceux du G1, à la seconde place. Cependant, les individus de l'espèce Australienne paraissent comme les plus distants entre eux. Ceci révèle que le niveau de variabilité génétique intra-spécifique de cette dernière espèce est très élevé. La nature de la reproduction de l'espèce (*A. nummularia*) pourrait, peut être expliqué ce caractère, sachant que les plantes de cette espèce ont un mode de reproduction exclusivement allogame, contrairement aux deux autres [18].

Le dendrogramme nous permet aussi de remarquer que le groupe 4 (G4) est lui-même subdivisé en 2 sous groupes: le premier est composé des génotypes: H2 et H3, et le second est composé des génotypes H7, H8 et H9.

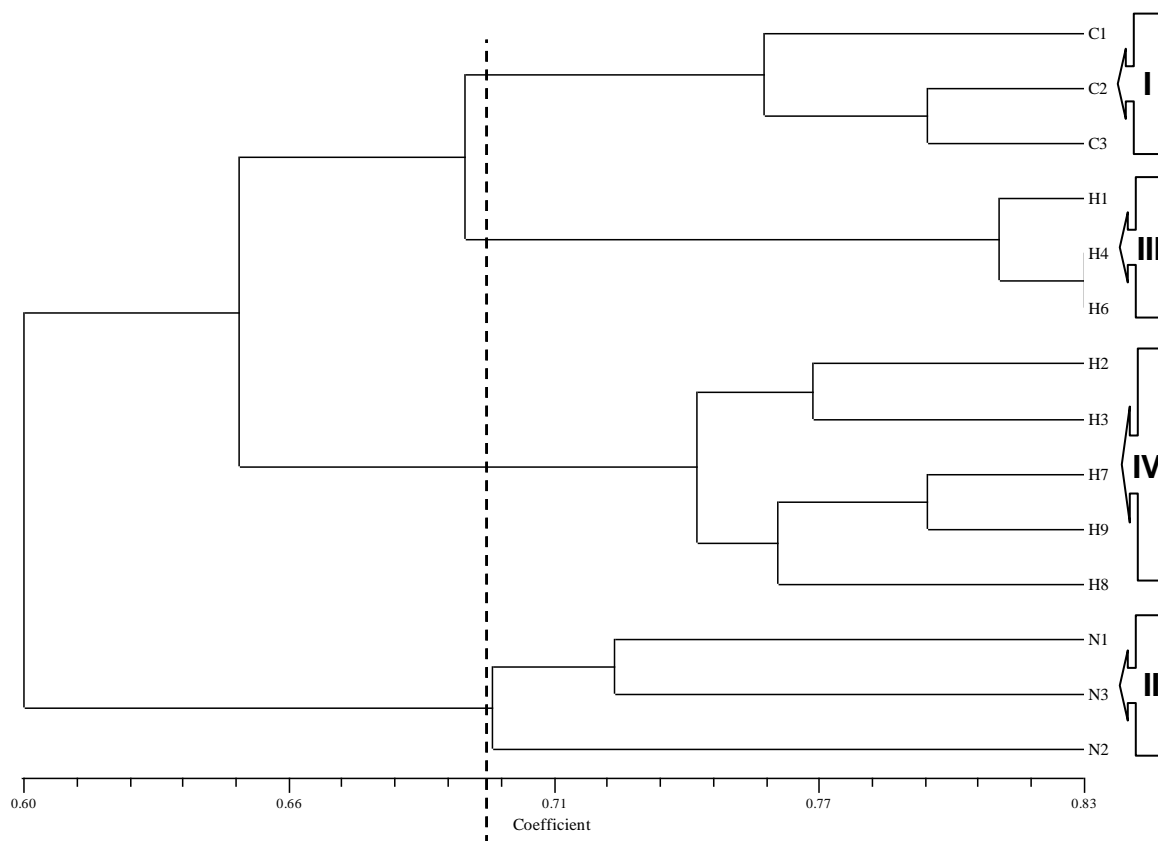


Figure 5. Dendrogramme représentant les distances génétiques existantes entre les génotypes étudiés, générées par les marqueurs RAPD. (Basé sur le coefficient de similarité simple matching (SM)). Les groupes formés (I, II, III et IV) sont indiqués à droite de la figure. La ligne discontinue verticale indique le point repère de la séparation des groupes.

Le rapprochement génétique enregistré entre ces derniers génotypes (G4) est justifié par le fait que tous leurs plants sont reproduits au sein de la même pépinière pastorale. Par conséquent, leurs semences pourraient appartenir à des plants ayant des parents communs, voire même, elles auraient pu être recueillies sur un même pied ou encore être multipliées par bouturage dans cette même pépinière.

Paradoxalement, les génotypes H4 et H6 d'*Atriplex halimus*, existant à l'état spontané (fig. 2) et qui enregistrent la plus grande similarité dans cette étude, sont géographiquement, relativement éloignés l'un de l'autre. Cependant, des études tunisiennes [19] et marocaines [10] menées sur cette espèce en question dévoilent que le polymorphisme y est d'autant plus important lorsqu'elles sont situées dans un climat différent, c'est-à-dire sur un axe d'orientation nord-sud, parallèlement au gradient d'aridité climatique, ce qui n'est pas le cas dans notre étude.

Plus difficile encore à concevoir, est le fait que les génotypes du G3 sont plus proches de ceux du G1 que de ceux du G4, alors que les groupes G3 et G4 correspondent à une même espèce (*A. halimus*), et le groupe G1 caractérise une autre espèce (*A. canescens*).

Cette grande divergence enregistrée entre les génotypes du G3 et G4 pourrait trouver aussi son origine dans la grande diversité génétique caractérisant les populations d'*A. halimus*. En effet, et selon une étude isoenzymatique réalisée au Maroc, une ample convergence génétique a été enregistrée entre des populations d'*A. halimus* et qu'elle est due

paraît-il, aux différences de fréquences des allèles plutôt qu'à leur polymorphisme. [20]

Ortiz-Dorda *et al.* [12] trouvent aussi que la large diversité génétique caractérisant les populations d'*A. halimus* est peut être due, en plus de leur adaptation écologique, à leur mode de reproduction allogame, conduisant à un niveau élevé de flux de gènes. D'après Soltis et Soltis [21], le caractère polyploïde des plantes fait qu'elles incorporent une grande diversité génétique à partir de multiples ancêtres ce qui engendre un niveau d'hétérozygotie plus élevé. En ce qui concerne la relation génétique interspécifique, le dendrogramme (Figure 05) localise l'espèce locale *A. halimus* (originnaire d'Afrique du nord) en position intermédiaire et ce en fonction de la distance génétique qui sépare les trois espèces étudiées. Ceci va de paire avec leurs origines géographiques, sachant que les deux espèces exotiques (*A. nummularia* et *A. canescens*) sont introduites respectivement d'Australie et d'Amérique du nord. Cependant, une étude marocaine comparable à la notre a située l'espèce *A. canescens* en position intermédiaire entre *A. halimus* et *A. nummularia* [11].

4. Conclusion

Les résultats de la présente étude, ont permis de mettre en évidence les points suivants:

- Les marqueurs moléculaires de type RAPD, malgré leurs caractères non spécifiques, ont montré une forte aptitude à la caractérisation génétique chez les espèces d'*Atriplex* et un haut niveau de polymorphisme.
- La technique RAPD-PCR permet, dans les cas d'études préliminaires et/ou de non disponibilité de marqueurs plus spécifiques, de réaliser des discriminations exploitables. Dans notre cas, les différentes espèces étudiées ont été isolées dans des groupes à part. Cependant, l'interprétation de quelques cas de séparation et/ou de rapprochement génétique restent fortement discutée.
- D'une façon générale, nous remarquons qu'au sein d'un même groupe, que les génotypes étudiés de l'espèce locale (*A. halimus*) se sont montrés les plus proches génétiquement, de même pour les génotypes de l'espèce américaine (*A. canescens*). Cependant, les individus de l'espèce australienne (*A. nummularia*) se sont caractérisés par une importante dissemblance entre eux, due peut être à leur mode de reproduction exclusivement allogame.
- Le rapprochement surprenant observé entre le G3 de l'espèce *A. halimus* et le G1 de l'espèce *A. canescens*, pourrait être expliqué par la théorie de flux de gène lié au mode de reproduction allogame de ces espèces.
- Nous pensons aussi que la grande divergence existante entre les génotypes de l'espèce *A. halimus*, appartenant aux deux groupes G3 et G4, trouverait son origine dans le caractère hétérozygote et polyploïde caractérisant cette dernière espèce.
- Il est aussi à retenir que les résultats de l'analyse de la variabilité génétique interspécifique casent l'espèce locale en position intermédiaire, ce qui corrobore avec sa situation géographique.

En guise de perspective, et grâce aux progrès du génie génétique, les *Atriplex* pourront avoir, sans doute, une meilleure caractérisation de leur structure génétique. C'est pourquoi, il est impératif de recourir à des méthodes d'investigation génétiques plus pointues, allant de l'utilisation de marqueurs plus spécifiques, jusqu'à l'identification, le séquençage et le transfert de gènes d'intérêt.

Ainsi, et en impliquant des effectifs de génotypes plus représentatifs, on arrivera, à terme, à obtenir le maximum d'informations génétiques, aboutissant à une meilleur gestion et une plus grande valorisation de cette ressource phyto-génétique que sont les plantes du genre *Atriplex* dont l'importance est déterminée dans les régions du Maghreb.

5. Références bibliographiques

- [1] BARROW J. R. and OSUNA P., 2002. Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *Journal of Arid Environments*, 51: 449-459.
- [2] KAOCHKEKI A., 1996. The use of halophytes of forage production and combating desertification in Iran. In *halophytes and biosaline agriculture*. Ed. Marcel Dekker, 219 p.
- [3] RAHMOUNE C., MAALEM S. et BENNACEUR M., 2004. Etude comparative du rendement en matière sèche (MS) et en matière azotée totale (MAT) de trois espèces de plantes steppiques du genre *Atriplex*. *Options Méditerranéennes*, 60: 219-221.
- [4] ESSAFI N E., MOUNSIF M., ABOUSALIM A. H., BENDAOU M., BRHADDA N., 2007. Effets du stress hydrique sur la valeur nutritive d'*Atriplex halimus* L. *Sécheresse*, 18 (2): 123-128.
- [5] RAHMOUNE C., MAALEM S., KADRI K. et BENNACEUR M., 2006. Etude de l'utilisation des eaux fortement salées pour l'irrigation des plantes du genre *Atriplex* en zones semi arides. *Revue des Régions Arides*, Numéro spécial, Actes du séminaire international: Gestion des ressources et applications biotechnologiques en aridoculture et cultures oasiennes: Perspectives pour la valorisation des potentialités du Sahara : 924-929.
- [6] HOUMANI M., 1997. Évolution des terres de parcours et bilan fourrager dans les zones arides algériennes. In *Actualité scientifique. Biotechnologies, amélioration des plantes et sécurité alimentaire*. Universités francophones, ESTEM, Paris, 399 p.
- [7] VALDERRABANO J., MUNOZ F., DELGADO I. BROWSING K., 1997. Ability and utilization by sheep and goats of *Atriplex halimus* L. shrubs. *Small Ruminant Research*, 19: 131-136.
- [8] Le HOUÉROU H. N., GRAZING J., 1989. Lands of Mediterranean basin. *Journal of arid environments*, 5 (1): 321-334.
- [9] DUTUIT P., POURRAT Y. et DODEMAN V. L., 1991. Stratégie d'implantation d'un système d'espèces adaptées aux conditions d'aridité du pourtour méditerranéen. In: *L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides*. John Libbey Eurotext, 491 p.
- [10] ABBAD A., CHERKAOUI M., WAHID N., El HADRAMI A. B. and BENCHAAABANE A. R., 2004. Variabilités phénotypique et génétique de trois populations naturelles d'*Atriplex halimus*. *C R Biologies*, 327: 371-380.
- [11] BOUDA S., DEL CAMPO F. F., HADDIOUI A., BAAZIZ M., and HERNÁNDEZ L. E., 2008. RAPD and ITS-based variability revealed in *Atriplex* species introduced to semi-arid zones of Morocco. *Scientia Horticulturae*, 118: 172-179.
- [12] ORTIZ-DORDA J., MARTINEZ-MORA C., CORREAL E., SIMON B. and CENIS L., 2005. Genetic structure of *Atriplex halimus* populations in the Mediterranean basin. *Annals of Botany*, 95: 827-834.
- [13] BYRNE M., HANKINSON M., SAMPSON J. F. and STANKOWSKI S., 2008. Microsatellite markers isolated from a polyploid saltbush, *Atriplex nummularia* Lindl. (Chenopodiaceae). *Molecular Ecology Resources*, 8: 1426-1428.
- [14] ANDERSON A., BRUNO B, CARSON C., 2008. Primer development consortium. Permanent Genetic Resources Notes added to Molecular Ecology Resources Database 31 March 2008–31 May 2008.
- [15] ABDELHAMID S, KÜPFER P., 2004. Identification moléculaire des variétés de Châtaignier en Suisse. *Revue Suisse Vitic Arboric Hortic*, 36 (6): 349-354.
- [16] KADRI K, SNOUSSI H, BENNACEUR M, Ben ABDALLAH A., 2006. Application de marqueurs moléculaires pour l'analyse de la diversité génétique chez l'amandier (*Prunus Dulcis* Mill.). *Cahier Agriculture*, 15 (2) :195-202.

- [15] POREBSKI S, BAILEY G. and BAUM R. B., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant molecular Biology Reporter*, 15: 8-15.
- [16] RUSSELL J. R., FULLER J. D. and MACAULAY M., 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RLFPs, AFPLs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet*, 95: 714-722.
- [17] SAGHI-MAROOF M. A., BIYASHEV R. M., YANG G. P., ZHANG Q. and ALLARD R. W., 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite R. W. DNA in barley: Species diversity chromosomal locations, and population dynamics. *Proc Nalt Acad Sci*, 91: 5466-5470.
- [18] FRANCIET A. et Le HOUEROU H. N., 1971. *Les Atriplex en Afrique du nord*. FAO, Rome, 931 p.
- [19] CHALBI N., BEZZAOUIA M. A. et El GAZZAH M., 1997. Résultats préliminaires sur le polymorphisme morphogénétique et la répartition des populations naturelles de l'espèce *Atriplex halimus* en Tunisie. In : *Étude de la diversité biologique de l'Atriplex halimus pour le repérage in vitro et in vivo d'individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitution de clones*. Rapport annuel du projet STD3 no TS 3 CT 940264, Paris, 497.
- [20] HADDIOUI A. et BAAZIZ M., 2001. Genetic diversity of natural populations of *Atriplex halimus* L. in Morocco: an isoenzyme-based overview. *Euphytica*, 121: 99-106.
- [21] SOLTIS P. S., SOLTIS DE., 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 343 p.