

ANALYSE DE LA SIMILARITÉ GÉNÉTIQUE DES ÉCOTYPES D'ALFA (*STIPA TENACISSIMA* L.) EN ALGÉRIE

CHAOUCH KHOUANE Hind^{1*}, BELHAMRA Mohammed², AINOUCHE Abdelkader³ et AIDOUH Ahmed³

1. Université Batna 1 - Institut des sciences vétérinaires et sciences agronomiques - Département des sciences agronomiques. Algérie

2. Université Mohammed Khidher, Biskra - Laboratoire de diversité des écosystèmes et dynamique des systèmes de productions dans les zones arides. Algérie

3. Université Rennes 1-Unité mixte de recherche (UMR-CNRS) Ecobio. France.

Reçu le 28/10/2022, Révisé le 01/12/2022, Accepté le 09/12/2022

Résumé

Description du sujet : La régression irréversible de *Stipa tenacissima* L. et leur écosystème dans la steppe algérienne impose des études approfondies et régulières de cette espèce qui présente une grande importance écologique et socioéconomique, ce qui présente comme élément essentiel et indispensable de toute politique de conservation et gestion des ressources génétiques naturelles.

Objectifs : Evaluer la similitude génétique entre les écotypes de *Stipa tenacissima* L. collectés de 27 sites répartis sur le long de la région steppique algérienne.

Méthodes : Après extraction de l'ADN, la diversité génétique est révélée avec l'utilisation de marqueur moléculaire PCR-ISSR. Les données sont traitées statistiquement par le logiciel R version 4.0.3.

Résultats : Les résultats montrent une grande dissimilarité génétique entre les écotypes analysés et marquent une certaine divergence écogéographique. Une différenciation régionale est révélée, indiquant qu'en plus de facteur génétique, les facteurs naturels et anthropiques contribuent dans l'organisation de la structure génétique de l'espèce dans la steppe algérienne.

Conclusion : Les premiers résultats de présent travail montre une diversité génétique importante de l'espèce mais restent toutefois partiels ce qui impose une évaluation plus approfondie avec des méthodes récentes et à grande échelle, de la diversité et la structure génétique des populations d'alfa.

Mots clés : steppe ; marqueur ; écototype ; alfa ; similarité

GENETIC SIMILARITY ANALYSIS OF ALFA ECOTYPES (*STIPA TENACISSIMA* L.) IN ALGERIA

Abstract

Description of the subject: The irreversible regression of *Stipa tenacissima* L. and their ecosystem in the Algerian steppe requires in-depth and regular studies of this species which has great ecological and socio-economic importance, which presents as an essential and indispensable element of any conservation policy and management of natural genetic resources.

Objectives: To evaluate the genetic similarity between the genotypes of *Stipa tenacissima* L. collected from 27 sites distributed along the Algerian steppe region.

Methods: After DNA extraction, the molecular marker used is PCR-ISSR. The data are statistically processed by the R version 4.0.3 software.

Results: The results show a great genetic dissimilarity between the genotypes analyzed and mark a certain ecogeographical divergence. A regional differentiation is revealed, indicating that in addition to genetic factors, natural and anthropogenic factors contribute in the organization of the genetic structure of the species in the Algerian steppe.

Conclusion: The results of this work show a significant genetic diversity of the species but remain partial, which requires a more in-depth evaluation with recent methods and large-scale, of the diversity and genetic structure of esparto populations.

Key words: steppe; marker; genotype; alfa; dissimilarité

*Auteur correspondant : Chaouch Khouane Hind, E-mail : hind.chaouchkhouane@univ-batna.dz

INTRODUCTION

L'espèce *Stipa tenacissima* (Loefl. ex L.) synonyme de *Macrochloa tenacissima* (Loefl. ex L.) Kunth appartient à la famille des Poacées, sous-famille des Pooideae, tribu des Stipeae composé de 400 à 600 espèces réparties en 21 genres. D'après des données morphologiques, anatomiques et moléculaires, elle se distingue toutefois clairement des autres Stipeae, y compris des autres *Stipa* [1, 2, 3]. L'alfa est endémique de la région Ouest de méditerranée. Elle se développe dans différents habitats en Algérie, Italie, Maroc, Portugal, Espagne, Baléares, Lybie et Tunisie [4, 5, 1]. En Algérie, les steppes dominées par l'alfa occupent de vastes espaces de la région steppique qui comprend les Hautes-Plaines steppiques et une partie de l'Atlas Tellien au Nord et une partie de l'Atlas Saharien au Sud. Cette région couvre une superficie globale de 20 millions d'hectares [6, 7], limitées au Nord par l'isohyète 400 mm qui coïncide avec l'extension des cultures céréalières en sec et au Sud, par l'isohyète 100 mm qui représente la limite méridionale de l'extension de l'alfa [8, 9]. Cette distribution dans différents habitats et conditions écologiques, montre sa grande plasticité, c'est une espèce rustique bien adaptée à l'aridité et la sécheresse, comme elle est résistante au froid ; nous pouvons la trouver à 1800m d'altitude en Algérie et à 2400m au Maroc [10].

C'est une plante herbacée, vivace qui se présente sous l'aspect d'une touffe à peu près circulaire dont le diamètre varie fortement selon l'âge de la touffe et les conditions climatiques et édaphiques. Elle est composée de deux parties ; une souterraine, très importante pour la régénération, formée d'un rhizome et une partie aérienne atteignant parfois un mètre de hauteur comprenant des feuilles longues, tenaces et coriaces. Les inflorescences sont souvent très fournies [11]. La plante se propage principalement par le mode végétatif avec une quasi-absence de reproduction sexuée [12].

Plusieurs éléments sont à l'origine de l'intérêt grandissant pour la compréhension de la diversité génétique de cette espèce en Algérie. Elle est présente sur une immense étendue des steppes et dominante dans de vastes zones des hauts plateaux algériens (environ 70%) où elle participe à plusieurs formations végétales steppiques [13]. Elle présente une grande importance dans la région du point de vue écologique, en hébergeant une diversité floristique et faunistique importante [14, 15, 16,

17] et en jouant un rôle primordiale dans la lutte contre la désertification et la protection du sol [10, 18, 19, 20]. Du point de vue socioéconomique, cette espèce occupe une place importante dans le bilan des ressources naturelles fourragères notamment en période de disette [21] et fournit la matière première pour l'industrie papetière et plusieurs autres produits [21, 22, 23]. Les steppes dominées par cette espèce ont connu une forte régression sous l'effet de plusieurs facteurs d'origine naturelle et anthropique [24, 25]. C'est ainsi que la surface occupée par cette plante, en Algérie, est passée, en un siècle, de 4 millions d'hectares signalé par Boudy en 1950 à deux millions d'hectares selon le dernier recensement du Haut-Commissariat au Développement des Steppes (HCDS) [26]. Devant l'ampleur de ce phénomène, la description et l'évaluation régulière de la biodiversité s'imposent comme un élément essentiel et indispensable de toute politique de conservation des ressources génétiques naturelles et pour leur gestion et utilisation dans le cadre du développement raisonné et durable des écosystèmes steppiques. De nombreux travaux sont disponibles sur la biologie et l'écologie de cet espèce au niveau national [10, 27, 28, 29, 2, 30, 31, 32, 4, 33, 25, 24, 34, 17, 35, 26, 36, 37, 23]. Ces derniers nécessitent non seulement d'être poursuivis et valorisés, mais également d'être largement approfondis et complétés par des études de la diversité génétique des populations qui peuvent fournir des informations capitales pour l'exploitation et la protection rationnelles des espèces dominantes et l'évaluation de l'état de leur écosystème [38]. Pour cela, les marqueurs moléculaires sont d'un grand intérêt. Ils sont très utiles, autant pour l'investigation de la variation génétique au sein du genre ou de l'espèce, ce qui permet leur identification ou classification taxonomique [39], pour la caractérisation et la gestion des ressources génétiques [40], que pour la restauration écologique [41, 42] et la conservation de la faune et de la flore [43]. A notre connaissance, en dehors de quelques études caryosystématiques [44, 45, 46], un seul travail a porté sur l'étude de la diversité génétique de l'alfa en Algérie. Cette dernière a permis d'apporter des informations sur la variation génétique intra et interpopulations, mais reste toutefois limitée à un échantillonnage restreint à des populations du Centre et de l'Ouest de la steppe algérienne [47].

Dans le cadre d'une étude plus globale sur la dynamique évolutive de l'alfa en Algérie, et des causes de sa dégradation, l'objectif de ce travail est d'évaluer la diversité génétique et déduire la similarité entre les écotypes de cette espèce à une grande échelle. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur un échantillonnage de écotypes provenant de vingt-sept localités distribuées tout le long de la steppe algérienne, d'Ouest en Est. Des marqueurs de type PCR-ISSR (*inter-simple sequence repeat*) sont utilisés, permettant de révéler le polymorphisme de séquences amplifiées à l'aide d'amorces microsatellites [48].

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Le matériel végétal

Une collection de 60 individus (écotypes) de *Stipa tenacissima* a été analysée dans cette étude. Ces écotypes (1 à 3 par population) proviennent de 27 stations représentatives d'une large partie de l'aire de distribution géographique de la steppe algérienne. Les sites

échantillonnés s'étendent depuis la région Est (Tébessa, Batna, Msila), la région Centre (Djelfa, Laghouat), jusqu'à la région Ouest (Tiaret, Saida, El Bayadh, Naama) (Fig. 1). Les stations les plus éloignées, Mechrya (D24) à l'Ouest et l'Ouenza (A1) à l'Est, sont distantes l'une de l'autre d'environ 845 km. De plus, cet échantillonnage s'est attaché à représenter au mieux la diversité des biotopes de l'alfa : alfa sous couvert (forêt) pour A1 (Ouenza-Tébessa), B10 (Senelba-Djelfa) et D27 (Frenda-Tiaret), alfa des steppes semi-aride et steppes arides (tableau 1). La géolocalisation, les caractéristiques topographiques et climatiques des stations sont mentionnées dans le tableau 1. Les données climatiques sont des moyennes sur 30 ans. Elles proviennent de l'Office Nationale de Météorologie (ONM). Des extrapolations ont été faites pour quelques sites par rapports aux stations météorologiques régionales les plus proches, selon la méthode de Seltzer [49] et Djebaili [9].

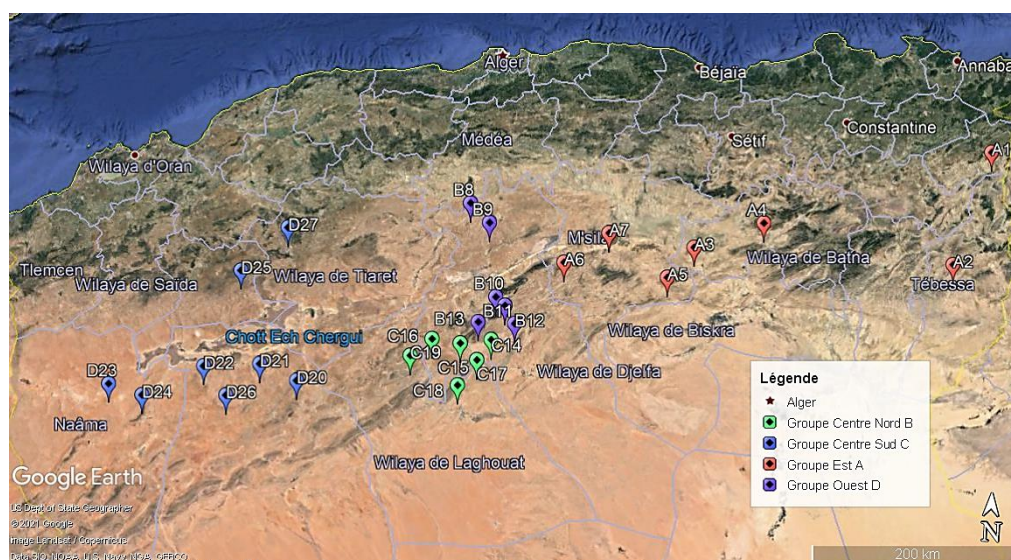


Figure 1 : Distribution géographique des stations sources d'échantillons de *Stipa tenacissima* dans la steppe algérienne

2. Extraction d'ADN

L'ADN génomique a été extrait de feuilles séchées (herbiers), en utilisant le kit NucleoSpin Plant II Mini (Macherey-Nagel, Duren, Allemagne). Environ 25 à 50 mg de matériel végétal sec de chaque échantillon de feuille est finement broyé dans de l'azote liquide avec un mortier et un pilon avant d'extraire l'ADN selon le protocole fourni par le fabricant [50]. La concentration d'ADN de chaque extrait est déterminée avec un spectrophotomètre (Nanodrop 1000). Les extraits d'ADN sont ensuite stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

3. Amplification par PCR des marqueurs ISSR

Sept (7) amorces ISSR de la liste UBC proposée par le Biotechnology Laboratory/University of British Columbia-Canada [51, 47] ont été préalablement testées sur quelques échantillons. Parmi celles-ci, les quatre amorces ayant montré la meilleure résolution et un bon taux de reproductibilité ont été retenues pour l'analyse de nos échantillons (tableau 2).

Tableau 1 : Localisation et caractéristiques des stations sources d'échantillons de *Stipa tenacissima*

Lieu administratif	Population	Code	Nbre d'échantillons	Latitude	Longitude	Altitude (m)	T moy annuelle (°C)	T moy des minima de mois le plus froid (m) (°C)	T moy des maxima de mois le plus chaud (M) (°C)	P (mm)	I	Q3	Etage bioclimatique
TEBESA	OUEENZA	A1	2	35,98764	8,13161	606	17,94	2,73	37,65	391,30	14,01	38,43	semi-aride
	TLIDJEN	A2	2	35,06666	7,73333	993	15,81	1,18	34,94	263,94	10,23	26,82	semi-aride
BATNA	MDOUKAL	A3	3	35,11869	5,08830	502	18,83	2,40	40,45	242,80	8,42	21,89	aride
	AIN TOUTA	A4	3	35,34233	5,77935	895	16,66	0,83	37,70	321,40	12,05	29,90	semi-aride
MSILA	OULED HAMA	A5	3	34,86370	4,83325	564	19,12	3,61	38,94	231,50	7,95	22,47	aride
	SLIM	A6	1	34,94075	3,79684	1053	16,43	1,65	35,52	329,30	12,46	33,35	semi-aride
	BOUSSAADA	A7	1	35,20008	4,22999	596	18,95	3,48	38,71	250,00	8,64	24,34	aride
DJELFA	AIN OUSSARA	B8	3	35,37465	2,83066	690	17,60	2,02	37,88	283,00	10,25	27,07	semi-aride
	ESKIAA	B9	3	35,22595	3,03286	812	16,93	1,53	37,02	246,60	9,16	23,83	semi-aride
	SENELBA	B10	2	34,62655	3,14319	1337	14,04	-0,57	33,35	351,60	14,63	35,55	semi-aride
	MOKTAT ELBEL	B11	2	34,56145	3,23901	1218	14,69	-0,10	34,18	327,80	13,28	32,80	semi-aride
	ZACCAR	B12	3	34,41918	3,34601	1099	15,35	0,38	35,02	304,00	11,99	30,11	semi-aride
	TAADMIT	B13	3	34,41429	2,98557	1082	15,44	0,45	35,13	300,60	11,82	29,73	semi-aride
	AIN ELBEL	C14	3	34,27593	3,12448	976	16,02	0,87	35,88	279,40	10,74	27,38	semi-aride
	MESSAAD	C15	3	34,23206	3,28086	870	16,61	1,30	36,62	258,20	9,70	25,07	aride
	AIN CHOUHADA	C16	2	34,25076	2,54173	1224	14,66	-0,12	34,14	329,00	13,34	32,94	semi-aride
LAGHOUAT	SIDI MAKHLOUF	C17	3	34,10476	2,99628	908	18,61	0,53	38,80	165,30	5,78	14,81	saharien
	LAGHOUAT	C18	2	33,88903	2,86881	808	19,16	0,93	39,50	145,30	4,98	12,92	saharien
	OUED MORRA	C19	3	34,10297	2,33825	1307	16,42	-1,07	36,01	245,10	9,28	22,68	aride
ELBAYADH	STITEN	D20	3	33,82463	1,23811	1363	15,48	0,01	35,25	269,70	10,59	26,26	aride
	ROGASSA	D21	3	33,93388	0,85881	1107	16,89	1,04	37,04	218,50	8,13	20,82	aride
	ALFAVILLE	D22	2	33,87266	0,30095	1190	16,43	0,70	36,46	235,10	8,90	22,55	aride
NAAMA	MEKMEN BEN AMER	D23	1	33,64497	0,64170	1080	17,57	1,54	38,10	206,40	7,49	19,37	aride
	MECHRYA	D24	1	33,58304	0,29371	1686	14,24	-0,88	33,86	327,60	13,51	32,35	semi-aride
SAIDA	MAAMOURA	D25	1	34,68083	0,59082	1114	14,26	1,52	30,19	399,93	16,49	47,85	semi-aride
	TENIRA	D26	1	34,99522	0,54802	906	15,40	2,36	31,65	358,33	14,11	41,96	semi-aride
TIARET	FRENDIA	D27	1	35,06361	1,02611	956	16,34	1,58	37,00	375,40	14,25	36,36	semi-aride

L'origine des stations échantillonnées est indiquée par une lettre : A, B, C ou D selon qu'elle provient de la région Est, Centre-Nord, Centre-Sud, ou Ouest, respectivement

Tableau 2 : Séquences et pouvoir de résolution des amorces PCR-ISSR utilisées

Amorce	Séquence 5'-3'	Température d'appariement T°C	Nombre de Loci amplifiés	Nombre de Loci polymorphes	Proportion de loci polymorphes PPB %	Pouvoir de résolution Rp
ISSR10	(AGC) 6G	63,1	12	10	83.33	5.83
ISSR13	(CTC) 6G	63,1	9	9	100	5.54
ISSR14	(CT) 9G	56,7	9	9	100	3.94
ISSR825	(AC) 8T	50,4	22	22	100	9.67
Total /Moy			52	50	96.15	6.24

L'amplification par PCR optimisée a été réalisée dans un volume réactionnel de 25µl contenant 6,125µl d'H₂O distillé, 5µl de 5X Green GoTaqFlexi Buffer, 3.75µl de solution MgCl₂ (25mM), 5µl de dNTPs (2mM), 4µl d'Amorce SSR (5pm/µl), 0,125µl de GotaqFlexi DNA Polymerase (5µ/µl) et 1µl de l'échantillon d'ADN. Toutes les amplifications PCR ont été réalisées dans un thermocycleur Eppendorf. Selon le programme de cycles réactionnels suivants : 1 cycle de dénaturation initiale de l'ADN de 2mn à 94°C ; 35 cycles d'amplification de l'ADN cible, comprenant chacun une étape de dénaturation de 45s à 94°C, une étape d'hybridation (appariement) des amorces de 45s à une température de 45 à 58°C (selon l'amorce SSR utilisée ; voir tableau II) et une étape de polymérisation (synthèse de l'ADN cible) de 2 mn à 72° C. Le tout suivi par une extension des fragments polymérisés pendant 7min à 72°C, avant une incubation finale à 10°C. L'opération a été généralisée avec les 4 marqueurs sur les 48 échantillons. Les produits de l'amplification PCR sont immédiatement analysés par électrophorèse ou conservés à -20°C pour analyse ultérieure. Pour chaque échantillon, 8µl de produits d'amplification par PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose de 1,5 % pendant 1,5h à 100V afin d'obtenir le profil des fragments d'ISSR amplifiés par l'amorce utilisée pour chacun des échantillons. Ces profils de fragments d'ADN sont visualisés à l'aide de rayons UV sous forme de bandes fluorescentes marquées par le bromure d'éthidium (un intercalant de l'ADN).

4. Analyse des données

Les marqueurs ISSR sont révélés en masse pour tous les individus analysés sur un même gel et représentés par des bandes de différentes tailles, chacune d'elle étant considérée comme un locus indépendant. Ces bandes sont considérées ici comme des marqueurs mendéliens dominants et sont analysées comme des caractères à 2 états, dont l'exploitation est plus simple que pour les marqueurs microsatellites (SSR). Le

polymorphisme ainsi révélé est essentiellement de type présence/absence de bande à un locus, mais peut correspondre parfois à des différences de longueur de fragments [52].

Les profils obtenus ont été évalués et interprétés visuellement en présence (notée 1) et absence (notée 0) de bandes homologues détectées ayant la même taille, et les matrices binaires obtenues sont utilisées pour les analyses statistiques et de la diversité génétique. Seules les bandes distinctes et bien résolues, reproductibles, dont l'interprétation était non ambiguë pour tous les individus ont été retenues.

Le pouvoir de résolution (Rp) de chaque amorce utilisée a été calculé avec la formule proposée par Prevost et Wilkinson [53]. Rp est la somme des bandes informatives : $Rp = \sum Ib$, où $Ib = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$ et p est la fréquence des écotypes contenant la bande parmi les 48 plantes analysées (tableau 2).

Le nombre d'individus échantillonnés par population locales étant réduit (1 à 3 par station). Nous avons appréhendé la diversité génétique d'alfa de la steppe algérienne en considérant quatre groupes d'individus représentant la diversité de leurs origines géographiques. A savoir : le groupe A, comprenant les individus échantillonnés dans les régions Est (Tébessa, Batna, Msila) ; les groupes B et C, pour les parties Nord et Sud, respectivement, des régions du Centre de la Steppe (Djelfa, Laghouat) ; et le groupe D, pour les individus échantillonnés dans les régions de l'Ouest (Tiaret, Saida, El Bayadh, Naama) (Fig. 1 ; tableau I).

Différents analyses ont été mis en œuvre ; pour évaluer la diversité de notre collection de écotypes d'alfa nous avons calculé l'indice d'information de Shannon (I) défini par $I = -\sum pi \log_2 pi$; où pi est la fréquence d'une bande ISSR [54]. Une analyse par positionnement multidimensionnel non-paramétrique (nMDS : *non-metric multidimensional scaling*) avec R version 4.0.3 des données ISSR a été réalisée afin d'avoir une présentation générale de la distribution des différents échantillons d'alfa étudiés.

L'analyse multivariée est présentée comme une stratégie importante pour la classification du matériel génétique [55]. Celle-ci permet une ordination basée sur une matrice de dissimilarité entre les objets analysés. Cette méthode statistique est efficace en raison de la flexibilité et la généralité accordées par sa dépendance seulement sur une vision biologiquement significative des données et ses propriétés de conservation de distance [56]. C'est une méthode robuste ; elle tolère des distances manquantes, et peut être appliquée à une matrice de similarités (dissimilarités) construite avec n'importe quelle mesure de distance basée sur des variables quantitatives, semi-quantitatives, qualitatives ou mixtes [57]. Dans le cas présent, nous avons utilisé nMDS avec la distance euclidienne [58] et la fonction *isoMDS* du package *MASS* sous R version 4.0.3. Les groupes sont créés en utilisant le *clustering k-means*.

La méthode d'interprétation la plus utilisée est d'intégrer les variables ou vecteurs environnementaux sur l'ordination [59] ; les vecteurs (gradients) sont représentés par des flèches ; la flèche indique la direction des changements les plus rapides dans la variable environnementale (la direction de la pointe) et la longueur de la flèche est proportionnelle à la corrélation entre ordination et le variable (la force du gradient). Cette opération est réalisée par la fonction *envfit* du package *Vegan* sous R version 4.0.3 [59].

Nous avons opté également, pour une analyse des données obtenues par la méthode UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages* ; [60]). Cette méthode, la plus couramment exploitée, est plus robuste que les méthodes à liaison unique [55]. Elle permet de construire un dendrogramme des similitudes (ou arbre phénétique) à partir d'une matrice des distances entre individus et de les regrouper hiérarchiquement sur la base de la moyenne arithmétique des distances non pondérées entre les groupes. C'est une méthode couramment utilisée pour l'analyse de la diversité génétique des espèces végétales [61]. Pour cela, nous avons eu recours à la distance euclidienne [58], et les calculs ont été réalisés avec R version 4.0.3. Le dendrogramme ainsi obtenu permet une visualisation facile et rapide de la hiérarchie et des degrés de similitude entre les individus analysés. De plus, une analyse de la variance moléculaire (AMOVA) avec R version 4.0.3 a été utilisée pour estimer la variation génétique

parmi et au sein des groupes de *Stipa tenacissima* étudiés [62].

RESULTATS

1. Diversité des écotypes analysés de *Stipa tenacissima*

Parmi les sept amorces ISSR testées, quatre ont donné des produits reproductibles. Le nombre total de loci amplifiés est 52 avec un taux de polymorphisme total égal à 96,15%. L'amorce ISSR825 a donné le nombre de locus le plus élevé (22 loci), suivie par les autres amorces (entre 9 et 12 locus) (tableau 2). La moyenne de pouvoir de résolution obtenue est ($R_p=6.24$), l'amorce ISSR825 présente la valeur la plus élevée (9,67), suivie par ISSR10 (5,83) et ISSR13 (5,54), elles sont considérées les plus efficaces pour l'étude de la diversité génétique, alors que le quatrième amorce ISSR14 a présenté une valeur plus faible (3,94) (tableau 2). Une diversification génétique est observable entre les écotypes d'alfa échantillonnés dans des conditions éco-géographiques très diverses couvrant une large étendue de la steppe (Fig. 2). Cela est montré par les valeurs d'indice de Shannon (I) estimées (tableau 3) avec une valeur totale égale à 0,4193. Les groupes A de l'Est et B de Centre-Nord sont les plus diversifiés, suivis par le groupe C de Centre-Sud et le groupe D d'Ouest, ce dernier représente la diversité la plus faible avec I égale à 0,274.

Tableau 3 : Valeurs d'Indice de Shannon

Group e	Indice de Shannon	Nbre de loci polymorphes	%
A	0,3683	40	0,71
B	0,3784	45	0,73
C	0,3085	34	0,59
D	0,274	32	0,53
Total	0,4193	50	0,81

La figure 2 met en évidence une structuration génétique globale des écotypes de *Stipa tenacissima* plus ou moins bien marquée en relation avec leurs origines éco-géographiques. Ainsi, nous pouvons distinguer globalement 4 pools géographiques, regroupant chacun des individus originaires principalement de stations de la région Est de la steppe (A), de la région Centre-Sud (B) et Centre-Nord (C), et de la région Ouest (D).

Ces pools indiquent donc assez clairement une différenciation génétique selon un gradient Est-Ouest, et un gradient Nord-Sud en particulier pour la région centre (mieux échantillonnée). Toutefois, on notera, que si les individus originaires de la région Ouest forment un pool génétique homogène tous regroupés, à l'opposé les individus originaires de la région de l'Est forment un ensemble nettement plus diversifié constitué d'un pool génétique homogène distinct. Plusieurs individus (A1-1, A1-2, A4-1 et A4-2) sont génétiquement plus proches des individus du Centre-Nord. De même, si les individus des régions du centre se différencient bien en 2 pools génétiques principaux, on observe que 2 individus (C16-1 et C16-2) du Centre-Sud sont génétiquement liés au pool de l'Ouest et l'individu (C19-1) est lié au pool de l'Est, tandis que 2 individus (B12-1 et B12-3) du Centre-Nord se rattachent au pool du Centre-Sud et 4 individus (B8-2, B9-1 et B11-1) au pool génétique de l'Est *sensu stricto*, voire de ceux de l'Ouest pour (B13-1 et B13-2).

Le dendrogramme basée sur la distance Euclidienne a montré distinctement les regroupements obtenus par Nmds (Fig. 3). Il en résulte que les individus de l'Est et des régions de centre, notamment du Nord, montrent une plus grande diversité génétique avec une

divergence Nord-Sud assez nette au Centre et des affinités (ou "mélange" de écotypes) notables entre d'une part ceux de l'Est et de la région Centre-Nord, et d'autre part entre ceux de la région Centre-Sud et ceux de l'Ouest (dans une moindre mesure).

2. Intégration des variables environnementales et analyse AMOVA

Les variables de position géographique, d'altitude et des paramètres climatiques présentent toutes une corrélation significative avec les scores obtenus de nMDS (tableau 4), ce qui montre leur intervention significative dans l'ordination des écotypes d'alfa étudiés. Les variables les plus significativement corrélées sont (la latitude) et (la longitude), indiquant la présence d'une certaine divergence éco-géographique entre les groupes. Ainsi que (l'altitude) qui s'oriente vers le groupe D d'Ouest où sont trouvés les hauts plateaux, les paramètres (précipitations) et (indice d'aridité) qui s'orientent vers le groupe B (Centre-Nord) et quelques populations de groupe A (Est), à l'opposé du groupe C (Centre-Sud) contenant dans sa majorité des régions caractérisées par des précipitations et des valeurs d'indice d'aridité faibles, indiquant son appartenance à une région aride à Saharien (Fig. 5).

Tableau 4 : Corrélations des variables introduites dans l'analyse nMDS

	r ²	Pr (>r)			r ²	Pr (>r)	
Altitude	0,2828	0,0002	***	Précipitations	0,2223	0,0008	***
Tmoy	0,2216	0,0018	**	Indice d'aridité	0,2199	0,0011	**
Tmin	0,1489	0,0149	*	Latitude	0,5307	0,0001	***
Tmax	0,1939	0,0029	**	Longitude	0,4510	0,0001	***

L'analyse AMOVA indique que la part de diversité génétique intragroupe est la plus importante, avec 24,57 % de variation d'origine intergroupe et 75,43% d'origine intragroupe (tableau 5).

Tableau 5 : Résultats de l'analyse AMOVA

	SCE	MCE	Dl	Composantes de variation	%
	Somme des carrés des écarts	Moyennes des carrés des écarts	Degré de liberté		
Intergroupe	3,020.274	10,067.581	3	0,06578432	24,57
Intragroupe	9,563.239	0,2173463	4	0,21734633	75,43
Total	12,583.513	0,2677343	47		

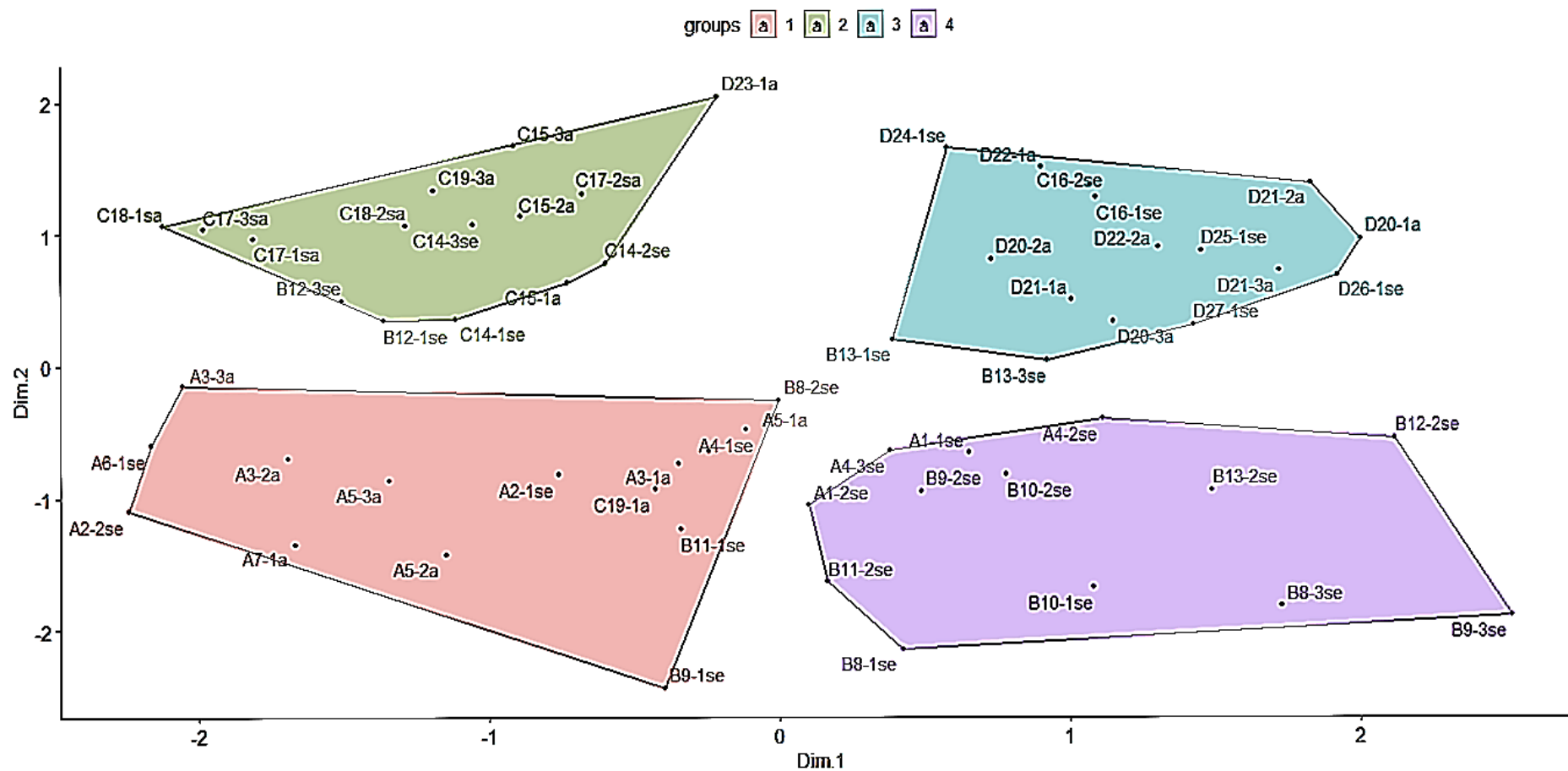


Figure 2 : Diagramme nMDS des données PCR-ISSR des échantillons de *Stipa tenacissima*)

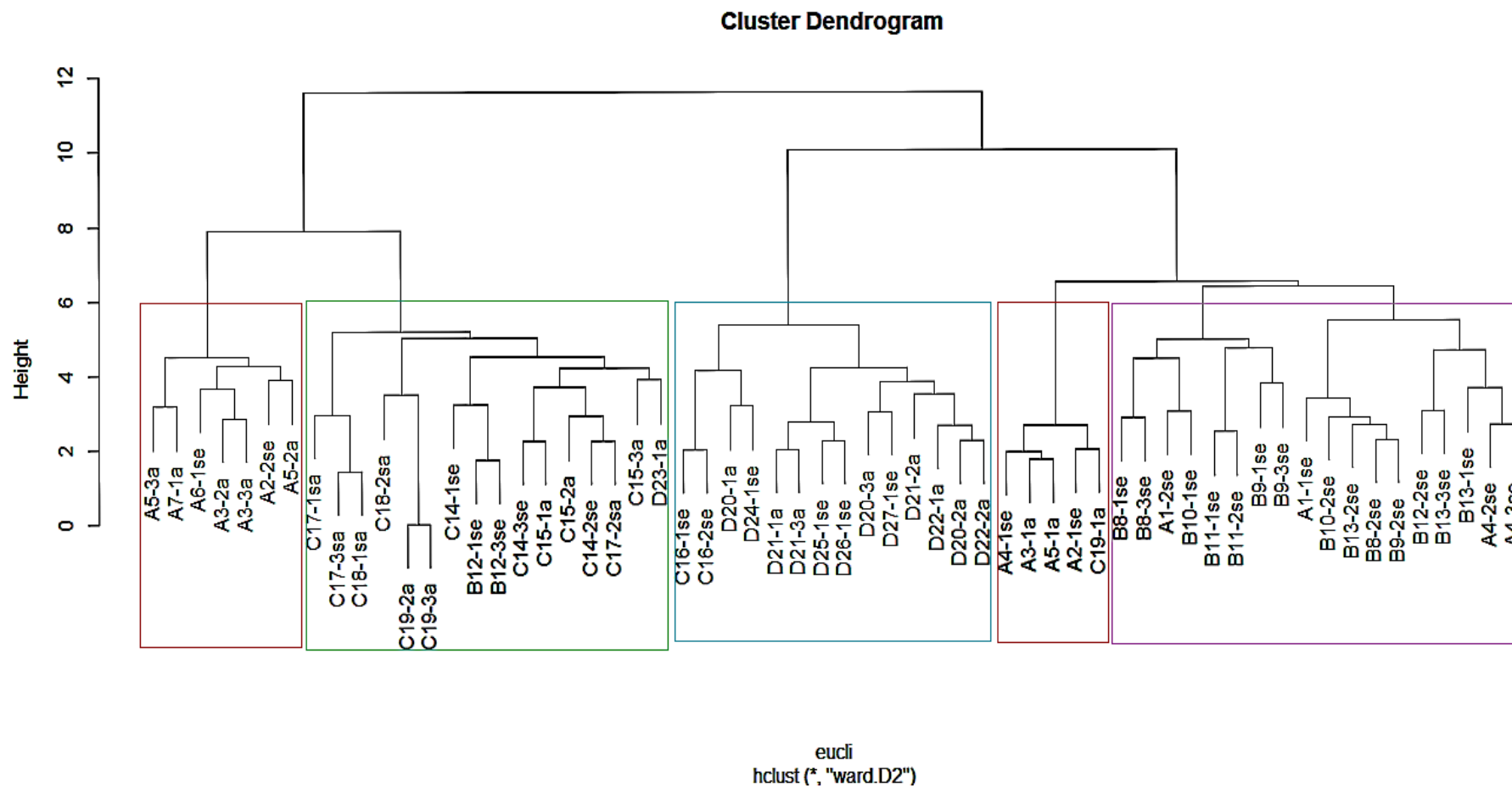


Figure 3 : Dendrogramme obtenu par UPGMA basé sur la distance euclidienne

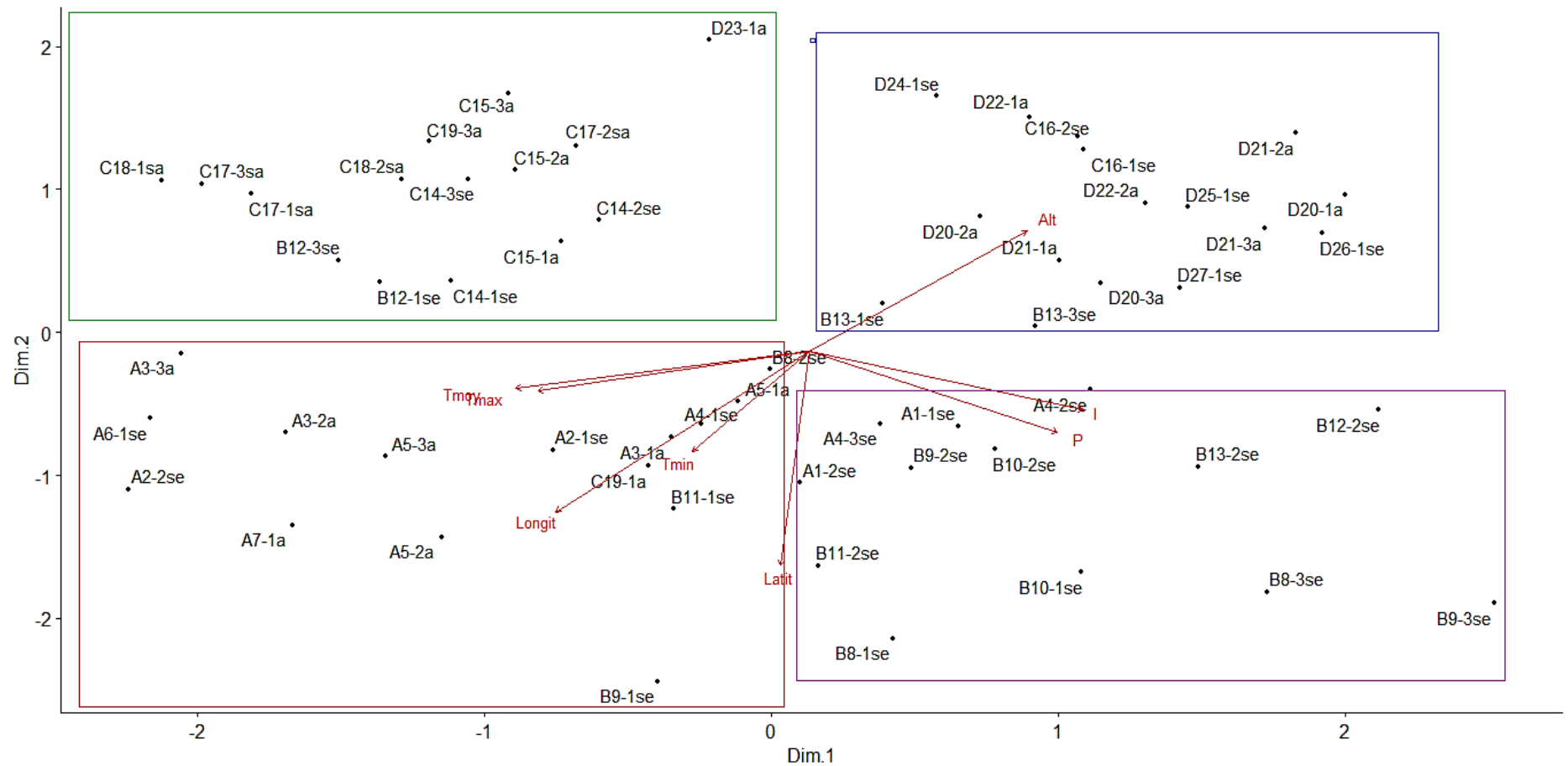


Figure 5 : Plan nMDS des données PCR-ISSR des échantillons de *Stipa tenacissima* avec intégration des variables environnementales
 Alt : altitude, Long : longitude, latit : latitude, P : précipitations, I : indice d'aridité, Tmoy : température moyenne, Tmax : température maximale, Tmin : température minimal

DISCUSSION

La technique ISSR, dans des conditions d'amplification adaptées de l'ADN, permet de fournir rapidement une masse de produits fiables très informative, avec des profils clairs, reproductibles et très polymorphes [53, 63]. Ce type de marqueurs est utilisable pour l'étude de la diversité et la structure génétiques des populations, la recherche de parenté et la détermination des régimes de reproduction, comme il est bien adapté pour le clonage positionnel, la cartographie génétique est très efficace pour l'identification clonale, avec un faible coût d'analyse et une faible difficulté du développement [52]. Il a été utilisé dans une série de travaux ayant comme objet d'étude différentes espèces végétales cultivées [53, 64, 65, 66, 67], médicinales [68], ornementales [69], forestières [70], steppiques [47, 71], bien d'autres comme *Lobelia* [72] et *Spartina* [73]. Généralement les marqueurs dominants (RAPD, AFLP, ISSR) donnent des estimations directement comparables [74], mais le marqueur ISSR a tendance à accentuer les différences entre les populations très proches contrairement à celles ayant de vastes distances géographiques [75] et de distinguer également des variétés génériquement très proche [53]. Il a été démontré qu'il y a une forte corrélation positive entre le pouvoir de résolution d'un marqueur et sa faculté de distinguer les écotypes, en donnant une estimation approximative de nombre de écotypes identifiés [53]. En comparaison avec d'autres travaux qui ont utilisé la même technique ISSR, la valeur moyenne du pouvoir de résolution enregistrée dans cette étude (Rp de 6,24 ; étendue 3,94-9,67) est relativement proche mais plus faible que celle trouvée pour la même espèce (Rp=7,74 ; étendue 4,91-11,36) par Boussaid et al. [47]. Cette différence est probablement dues à la fois à la différence d'échantillonnage (nombre et origine des individus) et de combinaison d'amorces ISSR utilisées. Ces valeurs sont inférieures à celles observées chez d'autres espèces comme la Solanacée *Calibrachoa caesia* (étendu de Rp de 10,29 à 23,20) par Pérez de la Torre et al. [69]. Mais elles sont plus élevées en comparaison avec les résultats de Ganopoulos et al. [76], sur le figuier de Barbarie (Rp=4,80) et de Guasmi et al. [65] sur l'orge (Rp=0,92).

La valeur enregistrée d'indice de Shannon I égale à 0,4193 (0,274-0,3784) est voisine à celle trouvée par Boussaid et al. [47], qui ont travaillé sur la même espèce dans des populations naturelles du Centre et de l'Ouest algérien, avec I égale à 0,3834 (0,2171-0,3038). En comparaison avec d'autres espèces herbacées pérennes, en particulier des Stipeae allogames présentant un mode de reproduction sexué et/ou végétatif, dominantes et ayant une importance fourragère et écologique dans leurs milieux : sur le plateau de Xilin Gol en Mongolie intérieure (la Chine) ; *Stipa grandis* a montré des valeurs plus élevées de l'indice de Shannon I= 0,4894 (0,2171-0,3038) [77], alors que *Stipa krylovii* a présenté des valeurs plus faibles I=0,3818 (0,1954-0,2968) [78]. Dans le Plateau tibétain de Qinghai (la Chine) des valeurs encore plus faibles I=0,3517 (0,1466-0,3447) ont été enregistrées pour *Stipa purpurea* [71]. La valeur enregistrée de PPB total égale à 96,15 % (61,54-86,54%) est comparable aux valeurs trouvées pour d'autre Stipae ; *Stipa krylovii* (PPB total=97,47% ; 41,35-61,18%) [78], *Stipa purpurea* (PPB total=96,70% ; 68,15-90,58%) [71] et *Stipa neesiana* (PPB total=97,20% ; 18,3%-46,5%) [79]. Mais elle est supérieure à la valeur trouvée pour *Stipa capillata* (PPB total=83% ; 02-42,09%) [80] et inférieure à celle trouvée pour *Stipa grandis* (PPB total=100% ; 71,61-83,55%) [81]. Boussaid et al. [47] ont également noté une valeur plus élevée de la proportion de loci polymorphes (PPB total=99,07% ; 82,3-92,2%) sur 17 populations de l'Ouest et du centre de l'Algérie en utilisant les résultats combinés issus de 12 amorces ISSRs. Tout en restant dans un ordre de grandeur moyen similaire (> à 95%), L'extension géographique plus large de notre échantillonnage vers l'Est de la steppe algérienne pourrait être à l'origine de la différence avec nos résultats.

Suite à la comparaison de plusieurs études, Ronfort et al. [81] ont déduit que les populations d'espèces allogames, qui sont en général moins différenciées les unes des autres, présentent une diversité intrapopulation plus élevée par rapports aux populations des espèces autogames qui à l'inverse sont généralement plus fortement différenciées. Les écotypes de *Stipa tenacissima* étudiés dans ce travail ont présenté une diversité intragroupe élevée (75,43%),

engendrant ainsi une structure génétique en mosaïque : certaines populations géographiquement éloignées se sont montrées génétiquement proches, tandis que des populations plus proches montrent une divergence significative, ce qui suggère une adaptation locale. Bauert et al. [82], note que la capacité d'adaptation des espèces végétales aux changements environnementaux à long terme dépend du niveau de leur diversité génétique intrapopulation.

Les différentes études attribuent la structure génétique des plantes aux effets combinés du flux génétique, de la dérive génétique, de mutation (avec une faible incidence), et également la sélection naturelle [83]. Cette dernière, principalement due aux variations des températures et des précipitations, a des effets sur le processus d'adaptation locale, au même niveau que le flux de gènes [84]. En effet, il a été démontré que des gradients climatiques peuvent façonner la structure génétique des populations végétales ; selon le travail réalisé en Jordanie par Hamasha et al. [85], il a été trouvé que la diversité génétique de trois *Stipeae* (*S. parviflora*, *S. arabica* et *S. lagascae*) diminue fortement avec les précipitations, tandis qu'elle augmente avec la température dans le cas de *S. capensis*. Il a été également confirmé que les variations de température jouent un rôle important dans la différenciation génétique entre des populations de *S. breviflora* au Mongolie intérieure (Chine) [86], et de *Stipa grandis* du Plateau de Xilin Gol (Chine) [83]. Ceci suggère que la dissimilarité génétique des groupes de *Stipa tenacissima* en Algérie peut être due à l'effet de l'hétérogénéité climatique, édaphique et géographique caractéristique de la steppe algérienne qui s'étale sur une énorme étendue [7, 9, 14, 87], en plus des grandes distances géographiques séparant les populations. Hamrick et al. [88] ont conclu via une étude synthétique sur plusieurs espèces végétales que la variation génétique entre les populations est influencée par la distribution géographique de l'espèce. Comme elle peut résulter de la fragmentation des habitats sous l'effet des changements globaux conduisant à des processus d'isolement et d'adaptation différentiels des populations sur des périodes évolutives plus ou moins longues. A une échelle de temps plus courte, il existe de plus en plus d'exemples montrant les effets des activités anthropiques sur la fragmentation des habitats et leurs impacts sur la diversité et la structure

génétique des espèces végétales dans différents milieux, y compris dans les milieux steppiques [89, 90, 91, 92, 93]. Cela est particulièrement bien illustré chez quelques espèces steppiques dominantes, qui subissent les effets directs d'un habitat dégradé ; *S. grandis* [77], *S. krylovii* [78] et *Stipa purpurea* [71]. Dans le cas des milieux steppiques d'Algérie, qui ont souffert d'importantes destructions et dégradations au cours du siècle dernier du fait principalement du surpâturage et de l'exploitation irrationnelle des ressources [25, 36, 94], les résultats de cette étude, même restreinte, permettent déjà de relever une contribution élevée de la diversité intragroupe à la diversité génétique totale de l'alfa (75,43 %). Ceci suggère l'existence d'une grande diversité de populations adaptées à des conditions variées qu'il faudrait donc inventorier et protéger en vue de conserver et valoriser le plus largement possible le potentiel des ressources en alfa.

CONCLUSION

Les résultats obtenus montrent l'apport des marqueurs moléculaires, tels que les ISSRs par exemple, dans l'évaluation de la diversité et la structure génétique des espèces végétales. Les informations ainsi apportées sont déterminantes pour mieux orienter les actions de préservation et de restauration de l'alfa et d'amélioration de l'écosystème steppique fragile où cette ressource naturelle domine. En effet, la stratégie à mettre en œuvre pour le ciblage des populations à préserver (et leurs habitats), les plus représentatives de la diversité génétique de l'espèce, sera différente selon l'importance relative de la diversité génétique intra- et interpopulations :

- Lorsque la contribution de la diversité intrapopulation à la diversité génétique totale est élevée, la différenciation des populations est généralement moins marquées, ce qui implique la préservation *in situ* d'un large éventail de populations pour couvrir aussi largement que possible la diversité naturelle.

- Lorsque la contribution de la diversité intrapopulation est au contraire faible, la différenciation des populations (ou groupes de populations) est plus marquées (en unités plutôt homogènes distinctes les unes des autres), ce qui oriente plus directement le choix de populations représentatives à conserver *in situ* en ciblant les unités génétiques différenciées par l'analyse de la structure génétique des populations.

Le croisement des informations génétiques avec les données d'autres paramètres (biologiques et écologiques) devrait permettre d'affiner ces stratégies de préservation et de conservation des populations et des habitats.

Dans ce cadre, et à la suite des premiers résultats intéressants apportés par des études précédentes et par le présent travail, qui restent toutefois encore très partiels (en termes de nombre d'individus et de populations). Une évaluation approfondie, plus précise et à grande échelle de la diversité et la structure génétique des populations d'alfa s'impose comme un volet indispensable (complémentaire des autres approches écologiques et socio-économiques) à intégrer dans les programmes de recherches pour la conservation, la gestion rationnelle et durable des steppes à alfa d'Algérie. Pour cela, il s'agira de s'appuyer sur :

- Un large échantillonnage (en nombres d'individus et de sites échantillonnés), représentatif de la diversité biologique des populations (morphologique, phénologique, données cytogénétiques et sur la reproduction...) et des habitats occupés (communautés, conditions édaphiques et climatiques...) dans toute l'aire de distribution de l'alfa.

- L'utilisation de marqueurs génétiques beaucoup plus performant et informatifs, tels que les microsatellites, ou les marqueurs dérivés des données en masse (SNPs = *Single Nucleotide Polymorphism*) générés par les nouvelles technologies de séquençage des génomes (NGS), aujourd'hui beaucoup plus accessibles.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements s'adressent aux Conservateurs des forêts de Djelfa et de Laghouat qui nous ont aidés pour la collecte des échantillons, également au laboratoire de l'UMR-CNRS Ecobio de l'université de Rennes1 où ont été effectuées les analyses génétiques, ainsi qu'aux lecteurs anonymes de ce manuscrit pour leurs corrections, remarques et conseils pertinents.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Vázquez FM, Barkworth M, 2004. Resurrection and emendation of *Macrochloa* (Gramineae: Stipeae). Botanical Journal of the Linnean Society, 144 (4): 483-495.

[2] Romaschenko K, Peterson PM, Soreng RJ, Garcia-Jacas N, Susanna A, 2010. Phylogenetics of Stipeae (Poaceae: Pooideae) Based on Plastid and Nuclear DNA Sequences. In: Diversity, phylogeny, and evolution in the monocotyledons, edited by Seberg, Petersen, Barfod & Davis, Aarhus University press, Denmark.

[3] Jacobs S, Bayer R, Everett J, Arriaga M, Barkworth M, Sabin-Badereau A, Torres A, Vázquez F, Bagnall N, 2007. Systematics of the Tribe Stipeae (Gramineae) Using Molecular Data. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 23 (1): 349-361.

[4] Djebaili S, 1988. Connaissances actuelles sur l'alfa (*Stipa tenacissima* L.) : autoécologie, phénologie, productivité et valeur nutritive. *Biocénoses*, 3: 43-52.

[5] Le Houérou HN, 2001. Biogeography of the arid steppe land north of the Sahara. *Journal of Arid Environment*, 48 (2) : 103-128.

[6] Djebaili S, 1978. Recherches phytosociologiques et phytécologiques sur la végétation des hautes plaines steppiques de l'Atlas Saharien. Thèse. Doct. Univ. Sci. Tech. Languedoc, Montpellier, 229 p.

[7] Pouget M, 1980. Les relations sol-végétation dans les steppes Sud-algéroises. *Travaux et documents d'Orstom*. Orstom édition, Paris, 569 p.

[8] Le Houérou HN, Claudin J, Pouget M, 1977. Etude bioclimatique des steppes Algériennes. *Bull. Soc. Hist. nat. Afr. Nord Alger*, t. 68, fasc. J et 4 : 33-74.

[9] Djebaili S, 1984. Steppe algérienne, phytosociologie et écologie. Office des publications universitaires (OPU), Alger, 182 p.

[10] Trabut L, 1889. Étude sur l'Halfa. Ed. Jourdan, Alger, 90 p.

[11] Ozenda P, 1977. Flore de Sahara. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 630p.

[12] Cosson E, 1879. Le Règne Végétal En Algérie : Considérations Générales Sur L'Algérie. Ed. Hachette Livre, Paris, 90 p.

[13] Mathieu A, 1891. Les hauts-plateaux oranais, rapport de mission. Ed. Hachette Livre, Paris, 106 p.

[14] Le Houérou HN, 1995. Bioclimatologie et biogéographie des steppes aride du Nord de l'Afrique : Diversité biologique, développement durable et désertification. Ed. CIHEAM, Montpellier (Options méditerranéennes, sér. B : recherches et études) : 1-396.

[15] Khelil MA, 1995. Le peuplement entomologique des steppes à alfa (*Stipa tenacissima* L.). Office des Publications Universitaires, Alger, 42 p.

[16] Benchrik M, Lakhdari S, 2002. Contribution à l'étude de l'entomofaune de la nappe alfatière de la région de Zaafrane (W. Djelfa). Mémoire Magist. Univ. Djelfa, 89 p.

[17] Kadi Hanifi H, 1998. L'alfa en Algérie syntaxonomie, relation milieu : végétation, dynamique et perspectives d'avenir. Thèse Doct. Univ. Houari Boumediene, Alger, 265 p.

[18] Le Houérou HN, 1969. La végétation de la Tunisie steppique. *Ann. Inst. Natl. Rech. Agron. Tunis*. 42 (5), 624p.

[19] Cerdà A, 1997. The effect of patchy distribution of *Stipa tenacissima* on runoff and erosion. *Journal of arid environments*, 36: 37-51.

[20] Jeddi K, Chaib M, 2009. The effect of *Stipa tenacissima* tussocks on some soil surface properties under arid bioclimate in the southern Tunisia. *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*, 156 (2): 173-181.

- [21] Harche M, 1978. Contribution à l'étude de l'alfa (*Stipa tenacissima* L.) en Algérie : Germination, croissance des feuilles et différenciation des fibres. Thèse Doct. Univ. de Lille, 131 p.
- [22] Akkiche O, Messaoud BKh, 2007. Esparto grass (*Stipa tenacissima* L.), raw material of papermaking. First part. Chemistry of vegetable raw materials, 4: 25-30.
- [23] Dallel M, 2012. Evaluation du potentiel textile des fibres d'Alfa (*Stipa Tenacissima* L.): Caractérisation physico-chimique de la fibre au fil. Thèse Doct. Univ. Haute Alsace, Mulhouse. 153p. [24] Nedjraoui D. et Bedrani S., 2008. La désertification dans les steppes algériennes : causes, impacts et actions de lutte. Vertigo, 8(1). <https://doi.org/10.4000/vertigo.5375>
- [25] Aidoud A, Touffet J, 1996. La régression de l'alfa (*Stipa tenacissima* L.), graminée pérenne, un indicateur de désertification des steppes algériennes. Sécheresse, 7 : 187-93.
- [26] Moulay A, Benabdeli K, Morsli A, 2011. Contribution à l'identification des principaux facteurs de dégradation des steppes à *Stipa tenacissima* du sud-ouest Algérien. Mediterranean, II (22) : 149-188.
- [27] Achour H, 1983. Etude phytoécologique des formations à alfa (*Stipa tenacissima* L.) de sud Oranais, Wilaya de Saïda. Thèse de 3^{ème} cycle, Univ. Houari Boumediène, Alger, 216p.
- [28] Abdelkrim H, 1984. Approche phytoécologique et phytosociologique de quelques nappes alfatières de la région de Djelfa et Tébessa. Mémoire de Magister. Inst. Nat. Agr. El-Harrech, Alger, 120p.
- [29] Abdelkrim H, Benstiti F, 1988. Contribution à la connaissance autoécologique, caryologique, et syntaxonomique de l'alfa (*Stipa tenacissima* L.). Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach. 12 (1.T.2) : 405-418.
- [30] Aidoud A, 1989. Les steppes à alfa : ressource en perdition. Ann. Inst. Natio. Agro. El-Harrach. 13 (1) : 80-90.
- [31] Nedjraoui D, 1990. Adaptation de l'alfa (*Stipa tenacissima* L.) aux conditions situationnelles : contribution à l'étude du fonctionnement de l'écosystème steppique. Thèse Doct. Univ. Houari Boumediene, Alger, 133 p.
- [32] Bouazza M, 1991. Etude phytoécologique de la steppe à *Stipa tenacissima* L., au Sud de Sebdo (Oranie - Algérie). Thèse de Doct. Univ. Aix-Marseille III, 117 p.
- [33] Aidoud A, 1992. Les parcours à alfa (*Stipa tenacissima* L.) des Hautes Plaines algériennes : Variations interannuelles et productivité. In : Actes de l'IV^{ème} Congrès International des Terres de parcours (Montpellier, France) : 198-199.
- [34] Aidoud-Lounis F, 1997. Le complexe alfa-armoise-sparte (*Stipa tenacissima* L., *Artemisia herba-alba* Asso. *Lygeum spartum* L.) des steppes arides d'Algérie : structure et dynamique des communautés végétales. Thèse de Doct., Univ. Aix-Marseille, France, 198 p.
- [35] Mehdadi Z, Benaouda Z, Belbraouet S, Benhassaini H, Hamel A Benali M, 2006. Évolution saisonnière de la composition foliaire de *Stipa tenacissima* L. en lipides totaux et en acides gras. Sécheresse, 17 (4) : 493-498.
- [36] Aidoud A, Slimani H et Roze F, 2011. La surveillance à long terme des écosystèmes arides méditerranéens : quels enseignements pour la restauration ? Cas d'une steppe d'Alfa (*Stipa tenacissima* L.) en Algérie. Ecologia Mediterranea, 37 : 17-32.
- [37] Slimani H, 2012. Mécanismes de désertification de la steppe des Hautes Plaines d'Algérie : Cas de la steppe d'alfa (*Stipa tenacissima* L.). Thèse Doct. Univ. Houari Boumediene, Alger, 126p.
- [38] Gustafson DJ, Gibson DJ, Nickrent, DL, 1999. Random Amplified Polymorphic DNA Variation among Remnant Big Bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman) Populations from Arkansas' Grand Prairie. Mol. Ecol. 8 (10):1693-1701.
- [39] Henry RJ, 2012. Molecular Markers in Plants. Ed. John Wiley & Sons, Hoboken NJ, United States, 196 p.
- [40] Lefort-Buson M, Hebert Y, Damerval C, 1988. Les outils d'évaluation de la diversité génétique et phénotypique. Agronomie, EDP Sciences, 8 (3) : 173-178.
- [41] Reynolds LK, McGlathery KJ, Waycott M, 2012. La diversité génétique améliore le succès de la restauration en augmentant les services écosystémiques. PLoS ONE, 7 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038397>
- [42] Mijangos JL, Pacioni C, Spencer PBS et Craig MD, 2015. Contribution de la génétique à la restauration écologique. Écologie moléculaire, 24 (1) : 22-37.
- [43] Arif IA, Khan HA, Bahkali AH, Al Homaidan AA, Al Farhan AH, Al Sadoon M, Shobrak M, 2011. DNA marker technology for wildlife conservation. Saudi Journal of Biological Sciences, 18: 219-225.
- [44] Bensettiti F, 1985. Etude caryosystématique de *Stipa tenacissima* L. dans les régions de Djelfa, Bou-Saada et Batna. Ann. I.N.A, 10 (2) : 20 - 29.
- [45] Labadie L, 1979. Etude caryosystématique de la flore de l'Algérie. Nat. Monspel. Bot., 32 : 1-11.
- [46] Tazairt K, 1992. Etude de la variabilité morphologique caryologie et électrophorétique de l'alfa (*Stipa tenacissima* L.) Dans trois régions d'Algérie selon un gradient longitudinal, Résultats préliminaires d'un essai de révision de la systématique de l'Alfa. Mémoire Magist. Univ. Houari Boumediene, Alger, 130p.
- [47] Boussaid M, Beneto C, Kaid-Harche M, Naranjo T, Zedek M, 2010. Genetic Variation in Natural Populations of *Stipa tenacissima* from Algeria. Biochem. Genet., 48 : 857-872.
- [48] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20 : 176-183.
- [49] Seltzer P, 1946. Le climat de l'Algérie. Alger : Carbonel, 219 p.
- [50] Macherey-Nagel, 2014. Genomic DNA from plant. User manual NucleoSpin® Plant II NucleoSpin® Plant II Midi NucleoSpin® Plant II Maxi. Ed. Clontech Laboratories. Rev, 09, 36 p.
- [51] Pharmawati M, Yan G, Finnegan PM, 2005. Molecular Variation and Fingerprinting of Leucadendron Cultivars (Proteaceae) by ISSR Markers. Ann. Bot., 95(7): 1163-1170.
- [52] Santoni S, Faivre-Rampant P, Prado E, Prat D, 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. Ressources génétiques. Cahiers Agricultures, 9 : 311-327.

- [53] 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.
- [54] Shannon CE, 1948. A Mathematical Theory of Communication. Reprinted with corrections from The Bell System Technical Journal, 27: 379-423.
- [55] Mohammadi SA, Prasanna BM, 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants—Salient Statistical Tools and Considerations. *Crop Science*, 43 (4): 1235-1248.
- [56] Clarke KR, 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral ecology*, 18 (1): 117-143.
- [57] Buttigieg PL, Ramette A, 2014. A guide to statistical analysis in microbial ecology : a community-focused, living review of multivariate data analyses. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 90: 543-550.
- [58] Chessell D, 2008. Dissemblance et diversité. Notes de cours, M2 Ecologie, Evolution, Biométrie. UE Description Statistique des Structures Biologiques, 36p.
- [59] Oksanen J, 2013. Multivariate Analysis of Ecological Communities in R: vegan tutorial. 43p.
- [60] Sokal RR, Michener CD, 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.*, 28: 1409-1438
- [61] Carvalho MF, Albuquerque junior CL, Guidolin AF, Farias FL, 2009. Application of multivariate analysis and assessments of dominant genetic divergence using molecular markers in medicinal plants. *Rev. Bras. Plantas med.*, 11(3) : 339-346
- [62] Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM, 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes, Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, 131: 479- 491.
- [63] Haouari A, Ferchichi A, 2004. Utilisation des marqueurs ISSR pour l'étude du polymorphisme génétique d'*Artemisia Herba-Alba* in Ferchichi A. et Ferchichi A. Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. Zaragoza : CIHEAM. Cahiers Options Méditerranéennes, 62 : 115- 119.
- [64] Konate I, 2007. Diversité Phénotypique et Moléculaire du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) et des Bactéries Endophytes qui lui sont Associées. Thèse de Doct. Univ. Mohamed V-Agdal, faculté des sciences Rabat, 196 p.
- [65] Guasmi F, Elfalleh W, Hannachi H, Fères KH, Touil L, Marzougui N, Triki T, Ferchichi A, 2012. The Use of ISSR and RAPD Markers for Genetic Diversity among South Tunisian Barley. *International Scholarly Research Network ISRN Agronomy*, 2012, 10p.
- [66] Handaji N, Benyahia H, Gaboun F, Ibriz M, 2012. Caractérisation de la diversité génétique du germoplasme de mandarines par les ISSR. *Journal of Applied Biosciences*, 57 : 4186 - 4197.
- [67] Al-Turki TA, Basahi MA, 2015. Assessment of ISSR based molecular genetic diversity of Hassawi rice in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22: 591-599.
- [68] Wu YG, Guo QS, He JC, Lin YF, Luo LJ, Liu GD, 2010. Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 63-72.
- [69] Pérez de la Torre M, García M, Heinz R, Escandón A, 2012. Analysis of genetic variability by ISSR markers in *Calibrachoa caesia*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15 (5). <http://dx.doi.org/10.2225/vol15-issue5-fulltext-8>.
- [70] Kremer A, 1994. Diversité génétique et variabilité des caractères phénotypiques chez les arbres forestiers. *Genet. Sel. Evol.*, 26 (Suppl. 1): 105-123.
- [71] Liu WS, Dong M, Song ZP, Wei W, 2009. Genetic diversity pattern of *Stipa purpurea* populations in the hinterland of Qinghai-Tibet Plateau. *Ann. Appl. Biol.*, 154:57-65.
- [72] Geleta M, Bryngelsson T, 2009. Inter simple sequence repeat (ISSR) based analysis of genetic diversity of *Lobelia rhynchopetalum* (Campanulaceae). *Hereditas*, 146: 122-130.
- [73] Ayres DR, Strong DR, 2001. Origin and genetic diversity of *Spartina anglica* (poaceae) using nuclear DNA markers. *American Journal of Botany*, 88 (10): 1863-1867.
- [74] Nybom H, 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13:1143-1155.
- [75] Qian W, Ge S, Hong DY, 2001. Genetic Variation within and among Populations of a Wild Rice *Oryza granulata* from China Detected by RAPD and ISSR Markers. *Theor. Appl. Genet.*, 102:440-449.
- [76] Ganopoulos I, Kalivas A, Kavroulakis N, Xanthopoulou A, Mastrogianni A, Koubouris G, Madesis P, 2015. Genetic diversity of Barbary fig (*Opuntia ficus-indica*) collection in Greece with ISSR molecular markers. *Plant Gene*, 2: 29-33.
- [77] Zhao NX, Gao YB, Wang JL, Ren AZ, 2008. Population structure and genetic diversity of *Stipa grandis* P. Smirn, a dominant species in the typical steppe of northern China. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 1-10.
- [78] Wang JL, Zhao NX, Gao YB, Lin F, 2006. RAPD analysis of genetic diversity and population genetic structure of *Stipa krylovii* Reshov. in Inner Mongolia steppe. *Genetika*, 42: 587-594.
- [79] Vidal R, González A, Gutiérrez L, Umaña R, Speranza P, 2011. Distribución de la diversidad genética y sistema reproductivo de *Stipa neesiana* Trin. et Rupr. *Agrociencia Uruguay – Volumen*, 151: 1-12.
- [80] Hensen I, Kilian C, Wagner V, Durka W, Pusch J, Wesche K, 2009. Low genetic variability and strong differentiation among isolated populations of the rare steppe grass *Stipa capillata* L. in Central Europe. *Plant biology*, 12 (3): 526-536.
- [81] Ronfort J, Jenczewski E, Muller MH, 2005. Les flux de gènes et leur impact sur la structure de la diversité génétique. Le cas des prairies. *Fourrages*, 182 : 275-286.
- [82] Bauert MR, Ka LM, Baltisberger M, Edwards PJ, 1998. No genetic variation within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers. *Mol. Ecol.*, 7(11): 1519-1527.
- [83] Zhao NX, Gao YB, Wang JL, Ren AZ, Xu H, 2006. RAPD diversity of *Stipa grandis* populations and its association with some ecological factors. *Acta Ecol. Sin.*, 26 (5):1312-1319.

- [84] Liu W, Zhao Y, You J, Qi D, Zhou Y, Chen J, Song Z, 2016. Morphological and Genetic Variation along a North-to-South Transect in *Stipa purpurea*, a Dominant Grass on the Qinghai-Tibetan Plateau: Implications for Response to Climate Change. PLoS One, 11(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0161972>
- [85] Hamasha HR, Schmidt-Lebuhn AN, Durka W, Schleuning M, Hensen I, 2012. Bioclimatic regions influence genetic structure of four Jordanian *Stipa* species. Plant biology, 15(5): 882-891.
- [86] Zhang Q, Niu JM, Wu SB, Buyantuyev A, Dong JJ, 2012. Impact of climatic factors on genetic diversity of *Stipa breviflora* populations in Inner Mongoli. Genetics and Molecular Research, 11(3): 2081-2093.
- [87] Aidoud A, Le Floch E, Le Houerou HN, 2006. Les steppes arides du nord de l'Afrique. Sécheresse, 17 (1): 19-30.
- [88] Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL, 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New forests, 6: 95-124.
- [89] Shan D, Zhao ML, Han B, Han GD, 2006. Genetic diversity of *Stipa grandis* under different grazing pressures. Acta Ecologica Sinica, 26 (10) : 3175-3183.
- [90] Leimu R, Mutikainen P, Koricheva J, Fischer M, 2006. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? Journal of ecology, 94 (5):942-952.
- [91] Wagner V, Treiber J, Danihelka J, Ruprecht E, Wesche K, Hensen I, 2012. Declining Genetic Diversity and Increasing Genetic Isolation toward the Range Periphery of *Stipa pennata* a Eurasian Feather Grass. International Journal of Plant Sciences, 173 (7): 802-811.
- [92] Peng J, Liang C, Niu Y, Jiang W, Wang W, Wang L, 2015. Moderate grazing promotes genetic diversity of *Stipa* species in the Inner Mongolian steppe. Landscape Ecology, 30 (9) : 1783-1794.
- [93] Zhai XY, Guo XY, Hou FG, Liu Y, Ma DT, Wang Y, Yan XB, 2015. Genetic structure of the population and conservation of germplasm of *Stipa purpurea* on the Qinghai-Tibetan plateau under pasture. Biochemical systematics and ecology, 62 : 51-57.
- [94] Slimani H, Aidoud A, Rosé F, 2010. 30 years of protection and monitoring of a steppic rangeland undergoing desertification. Journal of Arid Environment, 74(6): 685-691.