

Nom et Prénom : AHANSAL KHADIJA

Date de soutenance : 19/01/2023

Directeur de Thèse : IBRIZ MOHAMMED

Sujet de Thèse :

Transformation génétique du blé dur (*Triticum durum*) pour la création des variétés tolérantes à la sécheresse par *Agrobacterium*

Résumé :

Au Maroc, les céréales occupent une place primordiale dans le système agricole et sont considérées comme une principale source de la nutrition humaine et animale. Parmi ces céréales, le blé est le plus cultivé, le plus produit et le plus consommé. Cependant son rendement est faible à cause de plusieurs stress biotiques et abiotiques dont la sécheresse qui cause une réduction alarmante du rendement. Ainsi la création de variétés mieux adaptées aux conditions de cultures difficiles, tel que la sécheresse, est un atout essentiel pour l'augmentation des rendements du blé au Maroc. L'intégration des gènes, est une technique permettant de transférer un ou plusieurs gènes, ouvre d'une façon considérable les perspectives d'amélioration des espèces végétales. Toutefois, la transformation génétique exige la maîtrise des techniques de régénération *in vitro* qui constituent la base du génie génétique ; ainsi l'objet du présent travail, est de développer un protocole efficace de la régénération des plantules à partir d'embryons matures et immatures des variétés Marocaine du blé dur, et la réussite de transformation génétiquement par *Agrobacterium* en intégrant le gène HVA1 qui confère la tolérance à la sécheresse. Les effets des auxines 2,4-D et piclorame ainsi que leur combinaison ont été déterminés sur la l'induction des cals et la régénération des plantules de quatre variétés de blé dur (Amria, Chaoui, Marouane et Tomouh) en utilisant les embryons matures et immatures. Les résultats ont montré que l'auxine utilisée a eu un effet significatif sur la régénération des plantules ($p < 0,001$). Ainsi le milieu additionné du piclorame a donné des meilleurs résultats de régénération des plantules pour les embryons matures et immatures (19,8% et 40,86%, respectivement). Ce milieu a été ensuite utilisé lors la transformation génétique des variétés de blé dur par *Agrobacterium tumefaciens* contenant le plasmide pTF101.1. L'effet du génotype, explant et concentration d'acétosyringone a été étudié, pour se faire les explants (cals embryogènes, moitiés d'embryons et morceaux d'embryons) issus d'embryons matures et immatures ont été inoculés par la suspension d'*Agrobacterium* avec différentes concentrations d'acétosyringone (0, 100, 200 et 400 μM). Les résultats ont montré une réussite de transformation génétique avec un taux de 2,33 % pour les embryons matures et un taux de 0,35% pour les embryons immatures. Selon nos résultats les variétés Chaoui et Amria sont les génotypes les plus susceptibles à la transformation génétique par *Agrobacterium*. Ainsi l'utilisation de l'acétosyringone à une concentration de 400 μM et les cals embryogènes issus des deux embryons comme explant sont les plus favorables pour un meilleur taux de transformation génétique. Les analyses moléculaires montrent l'intégration de gène d'intérêt HVA et le gène de sélection bar chez les plantes T0 ainsi leur l'héritabilité chez les plantes T1.

Mots clés : *Agrobacterium tumefaciens* ; blé dur ; embryogenèse somatique ; embryon immature ; embryon mature ; gène HVA1 ; tolérance à la sécheresse ; transformation génétique

Abstract:

In Morocco, cereals are the most important crop, which significantly contributes to the livelihoods of farming communities and the national economy. Among these cereals, wheat is the most produced. Unfortunately, over the years, the yields have been continuously decreasing because of several biotic and abiotic stresses, including drought, which causes an alarming reduction in the yield. Therefore, the creation of varieties with better adaptation to difficult growing conditions, such as drought, is an essential asset for increasing wheat yields in Morocco. Genetic transformation is a technique that allows the transfer of one or more genes and opens up considerable prospects for the improvement of plant species. However, an efficient and reproducible plant regeneration protocol is essential for genetic manipulation. The objective of this work is to develop an effective protocol for plantlet regeneration from mature and immature embryos of different Moroccan durum wheat varieties as well as to achieve genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens* by integrating the HVA1 gene, which is known to confer drought tolerance to plants. The effects of 2,4-D and picloram auxins and their combination were determined on callus induction and plantlets regeneration of four durum wheat varieties (Amria, Chaoui, Marouane and Tomouh) using mature and immature embryos.

The results showed that the auxin used had a significant effect on plantlets regeneration ($p < 0.001$). Accordingly, the medium supplemented with picloram gave better results for plantlet regeneration in mature and immature embryos (19.8% and 40.86%, respectively). This medium was then used during the genetic transformation of durum wheat varieties by *A. tumefaciens*, which contained the plasmid pTF101.1. The effect of the genotype, explant, and concentration of acetosyringone were studied on the transformation. For this, the explants (embryogenic calli, halves of embryos, and pieces of embryos) from mature and immature embryos were inoculated with the suspension of *Agrobacterium* at different concentrations of acetosyringone (0, 100, 200, and 400 μM). The results demonstrated a successful genetic transformation with a rate of 2.33% for mature embryos and 0.35% for immature embryos.

According to our results, Chaoui and Amria varieties are the most susceptible genotypes to genetic transformation by *Agrobacterium*. Therefore, the use of acetosyringone at a concentration of 400 μM and the embryogenic calli from the two embryos as explant are the most favorable conditions for a better rate of genetic transformation. Molecular analysis of T0 plants selected based on bar herbicide resistance showed the presence of HVA1 and bar genes and their inheritance in T1 plants.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*; durum wheat; drought tolerance; genetic transformation; HVA1 gene; immature embryo; mature embryo; somatic embryogenesis