

LE SYNDROME DE LA FEUILLE JAUNE 'YLS': ETAT PHYTOSANITAIRE DU *SACCHARUM SP.* AU MAROC ET ELIMINATION DU VIRUS 'SCYLV' PAR CULTURE *IN VITRO*

H. El Yacoubi, N. Chriki, A. Nadif¹ et A. Rochdi

Faculté des Sciences, Université Ibn Tofaïl, B.P. 133, Kénitra, Maroc

¹Centre Technique des Cultures Sucrières, Kénitra, Maroc
elyacoubihouda@gmail.com

(Received 6 July 2009 - Accepted 14 November 2009)

RESUME

L'évaluation de la dissémination du Sugarcane Yellow Leaf Virus (ScYLV), détecté via ELISA sur membrane (TBIA), a révélé que la canne sauvage ainsi que 5/6 cultivars de la culture industrielle de la canne à sucre des périmètres du Gharb et du Loukkos et 6/7 cultivars de la collection nationale du Maroc sont infectées, parfois même en l'absence de symptômes visuels de la maladie YLS. La régénération par microbouturage d'apex a montré que la survie des microboutures est améliorée par l'utilisation d'antioxydants (DIECA en prétraitement) et de substances adsorbantes et détoxifiantes (PVP en adjonction dans le milieu de base) combinée à la préculture en obscurité (pendant une semaine) permettant de retarder la survenue de brunissement et au repiquage fréquent (durant la phase lumineuse) sur milieu frais évitant la concentration de phénols excrétés par les explants. La reprise de croissance des microboutures est stimulée par l'emploi de GA3 combiné à l'AIB. La multiplication des vitropousses est réalisée en présence de cytokinines (Kin + BAP). L'enracinement est favorisé par une concentration élevée d'AIB dans le milieu de culture. D'autre part, la régénération par néoformation sur cals issus de segments de la gaine de jeunes feuilles a montré que le 2,4-D est nécessaire pour induire le cal embryogène et que le milieu de base dépourvu d'auxine est suffisant pour développer les vitroplantules complètes. Par ailleurs, le test ELISA sur membrane a montré que 20 et 100% de vitroplants ont été assainis respectivement par microbouturage d'apex et embryogenèse sur cal.

Mots clés: *Saccharum sp.*, microbouturage d'apex, embryogenèse sur cal, assainissement viral, ELISA sur membrane (TBIA)

ABSTRACT

The phytosanitary status of sugarcane infection by Sugarcane Yellow Leaf Virus (ScYLV) in Morocco was studied using virus detection by tissue blot immunoassay (TBIA). Test results revealed that the wild cane as well as 5/6 variety of the industrial culture of Gharb and Loukkos perimeters and 6/7 variety of Moroccan sugarcane collection are infected by ScYLV, sometimes even in the absence of visual symptoms of disease YLS. Regeneration by

shoot-tip culture showed that the micro-cutting is improved by using the antioxidants DIECA and the adsorbent of phenolic substances PVP combined with (i) pre-culture in darkness and (ii) frequent transplanting on fresh medium. These treatments reduced browning induced by phenols excreted by explants. The growth of micro-cutting was stimulated by the use of GA3 combined with AIB. The vitro-shoots multiplication was best carried out in the presence of cytokinins (Kin + BAP). Rooting was favoured by a high concentration of AIB in the culture medium. On the other hand, regeneration by novo-formation on callus derived from sheath of young leaves showed the necessity of the 2,4-D to induce callus embryogenesis and the use of the basic medium without auxin to develop the complete vitro-plantlets. Moreover, tissue-blot immunoassay (ELISA) showed that 20 and 100 % of vitroplantlets were free from ScYLV respectively, by shoot-tip culture and callus embryogenesis.

Keywords : *Saccharum sp.*, shoot-tip culture, callus culture, virus elimination, tissue blot immunoassay (TBIA)

INTRODUCTION

Au Maroc, la canne à sucre (*Saccharum sp.*) est cultivée sur une superficie moyenne de 16 000 Ha (près de 13 000 Ha au Gharb et 3 000 Ha au Loukkos) (Doukkali *et al.*, 2009).

L'extension de la culture de la canne à sucre est confrontée à plusieurs contraintes notamment d'ordre pathologique. En effet, la présence de divers virus a été confirmée sur la canne à sucre marocaine. Il s'agit de Sugarcane Mosaic Virus (ScMV) (Fisher & Lockhart, 1974), Sugarcane Bacilliforme Virus (ScBV) (Lockhart et Autrey, 1988) et Sugarcane Yellow Leaf Virus (ScYLV) (Nadif *et al.*, 1999).

Les maladies cryptogamiques dont notamment celle du syndrome de la feuille jaune (Yellow Leaf Syndrome) "YLS", causée aussi bien par le virus ScYLV (Vega *et al.*, 1997) que par le phytoplasme ScYP (Sugarcane Yellow Phytoplasma) (Cronjé *et al.*, 1998), peuvent occasionner une chute importante du rendement et affecter la qualité technologique de la canne à sucre (Lockhart *et al.*, 2000 ; Fontaniella *et al.*, 2003 ; Gonçalves *et al.*, 2005 ; Lehrer *et al.*, 2007).

Les symptômes de la maladie YLS paraissent généralement dans les plantes matures avec un jaunissement intense de la nervure principale sur la surface abaxiale. Parfois une décoloration rouge-rosâtre sur la surface supérieure de la nervure est aussi présente, suivie d'une décoloration symétrique du limbe foliaire parallèlement à la nervure. Cependant, il a été rapporté que les symptômes de YLS peuvent être masqués et leur intensité peut dépendre des variétés et des conditions climatiques (Borth *et al.*, 1994 ; Vega *et al.*, 1997). Ainsi, il s'avère judicieux de recourir à des méthodes sérologiques rapides et fiables afin de procéder à l'évaluation de la dissémination de la maladie YLS. Parallèlement, il est aussi vital de développer des moyens curatifs pour éradiquer cette maladie. Subséquemment, afin d'assainir du matériel végétal précieux pour la diversification variétale mais atteint de la maladie YLS, la culture *in vitro* a été envisagée. La thérapie n'étant pas efficace avec la YLS (Delage *et al.*, 1999). En outre, quelques travaux rapportent l'élimination du virus de la canne à sucre par culture *in vitro* de bourgeons (Wagih *et al.*, 1995), de méristèmes (Chatenet *et al.*, 2001 ; Fitch *et al.*, 2001) et de cal (Rochdi *et al.*, 2002 ; El Yacoubi *et al.*, 2009).

La présente recherche a pour but, d'une part d'utiliser la technique des immuno-empreintes (ELISA sur membrane ou TBIA : Tissue Blot Immuno Assay) comme moyen rapide et fiable pour détecter le Sugarcane Yellow Leaf Virus (ScYLV) afin d'évaluer sa dissémination au niveau de la canne sauvage et de 13 cultivars de la canne à sucre (6 cultivars de la culture industrielle et 7 cultivars de la collection nationale) cultivées au Maroc (Gharb et Loukkos) ainsi que pour montrer la présence de ce virus dans le matériel qui sera destiné à l'assainissement en culture *in vitro*. L'étude a pour but, d'autre part aussi, de tester l'aptitude de la régénération par microbouturage d'apex et par néoformation sur cals comme moyens de lutte curative. Le taux d'assainissement des vitroplants obtenus sera ensuite déterminé par le même test d'indexage sérologique.

MATERIEL ET METHODES

Evaluation de l'état phytosanitaire de la canne

Matériel végétal

L'évaluation de l'état phytosanitaire de la canne dans les périmètres du Gharb (Ouest du Maroc) et du Loukkos (Nord-Ouest du Maroc) a concerné la canne sauvage ainsi que 7 cultivars de la collection nationale (CP 71-1442, CP 72-1210, CP 74-315, CP 74-383, LCP 86-426, SP 71-6163 et L 75-2) et 6 cultivars de la culture industrielle (CP 44-101, CP 61-37, CP 65-357, CP 66-346, CP 70-321 et L 62-96) de canne à sucre originellement importée d'Amérique (CP : Canal Point en Floride et L : Louisiane).

Détection du virus ScYLV par le test ELISA sur membrane (TBIA)

Le test d'indexage est effectué sur des échantillons de tiges (troisième nœud) et de feuilles (nervure médiane de la quatrième feuille) de la canne. Ainsi, pour les tiges, les feuilles de la base sont éliminées totalement et une coupe est effectuée au niveau du troisième nœud, par un sécateur préalablement trempé dans l'alcool à brûler puis flambé au feu. Pour les feuilles, une coupe est réalisée par un ciseau stérilisé, après élimination du limbe au niveau de la nervure de la quatrième feuille.

La détection est réalisée par le test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) sur membrane (TBIA: Tissue Blot Immuno Assay) suivant la technique des immuno-empreintes (Schenck *et al.*, 1997). Ainsi, la membrane de nitrocellulose est impréintée pendant 5-6 secondes, desséchée à l'air libre puis immergée dans du PBST (phosphate-buffered saline + 0,05% Tween, pH 7,4) contenant 2,5% de lait en poudre écrémé PBSTM (phosphate-buffered saline milk) pendant 1 heure. Après trois rinçages par PBST, la membrane est incubée pendant toute la nuit à 4 °C dans PBSTM contenant les IgG spécifiques dilués à 1/250, puis rincées de nouveau trois fois par PBST. La membrane est alors incubée pendant 3 heures dans PBST contenant l'anti-IgG conjugué à l'enzyme phosphatase alcaline diluée à 1/3000, puis rincée trois fois par PBST. Elle est enfin incubée pendant 5 minutes dans le tampon de substrat de BCIP (bromochloro-indolyl phosphate) (1 mg L⁻¹ d'eau distillée) puis rincée à l'eau distillée et desséchée à l'air libre. La membrane est observée au microscope optique à un grossissement de 50x. Les réactions positives sont indiquées par une coloration violette, alors que les réactions négatives restent transparentes.

Elimination du virus 'ScYLV' par culture *in vitro*

Le milieu nutritif de base utilisé est celui de MS (Murashige & Skoog, 1962) contenant 3% de saccharose et 0,8% d'Agar (Difco Bacto Agar). Le pH est réglé à 5,7 avant autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes. Les cultures sont incubées à une température de 25 °C, en obscurité ou sous une photopériode de 16 heures et une intensité de 2000 Lux.

Matériel végétal

Le cultivar homologué CP 66-346 s'étant avéré être infecté par le ScYLV, a donc fait l'objet d'essais visant l'éradication du virus par culture *in vitro*. Ce cultivar se caractérise par ses qualités agroéconomiques très performantes et son immunité vis-à-vis de la maladie du charbon. Il est en outre utilisé en exploitation commerciale dans près du quart de la superficie totale sous canne au Maroc. Ainsi, après s'être assuré de la positivité de la réaction par le test sérologique pratiqué sur des échantillons de feuilles et de tiges, des cannes âgées de 6 mois, sont alors utilisées.

Régénération par microbouturage d'apex méristématiques

Les tiges de canne sont d'abord segmentées en boutures comportant un bourgeon axillaire puis traitées pendant 1 heure par un bain de fongicide (bénomyl à 0,1 %). Les boutures sont ensuite enroulées dans du papier et placées en obscurité dans un incubateur à 37 °C pendant deux semaines avec humidification quotidienne avec de l'eau de robinet. Les jeunes tiges, d'environ 30 cm, sont alors coupées à la base puis tronçonnées à une longueur de 4 cm et les feuilles superficielles sont éliminées. Ces boutures sont subséquemment manipulées sous hotte à flux laminaire horizontal.

Les gaines qui protègent la zone méristématique sont alors éliminées et la partie apicale est découpée sous forme d'un cube. Ensuite, les ébauches foliaires sont éliminées sous loupe binoculaire et l'apex (microboutures terminales dépassant 1 mm de longueur) est prélevé puis mis en culture.

Etablissement des cultures : Des essais préliminaires ont montré que les explants et le milieu de culture brunissent et les microboutures se nécrosent au bout de quelques jours.

1- Contrôle du brunissement : Afin d'améliorer la viabilité des explants en remédiant au problème de l'oxydation phénolique, on a testé:

i/ la préculture en obscurité (durant 1 semaine) en comparaison avec l'incubation directe sous la photopériode ii/ la fréquence de repiquage durant la phase lumineuse (tous les 2 jours ou 1 fois par semaine) iii/ l'utilisation d'antioxydants [l'acide diéthyl dithiocarbamique (DIECA à 0,25 %) ou une combinaison d'acides citrique (à 0,2 %) et ascorbique (à 0,4 %)] en prétraitement d'immersion, accompagnée par l'adjonction dans le milieu de culture d'une substance adsorbante et détoxifiante (le polyvinyl pyrrolidone (PVP) à 0,05 %) pour des échantillons prétraités et d'autres n'ayant pas été prétraités.

La culture des explants est réalisée en boîte de Pétri contenant 20 ml de milieu. Pour chaque traitement testé, trois répétitions sont réalisées, avec 10 explants par répétition. Le taux de brunissement est évalué visuellement à chaque semaine de culture.

2- Initiation : Afin d'initier les cultures en stimulant la reprise de croissance des microboutures, une combinaison de phytorégulateur (l'acide indolyl butyrique (AIB) à 0 et 0,01 mg L⁻¹ et l'acide gibbérellique (GA₃) à 0 et 0,1 mg L⁻¹) a été testée en incorporation dans le milieu nutritif : Mt (milieu témoin), M1 (0,1 mg L⁻¹ GA₃), M2 (0,01 mg L⁻¹ AIB) et M3 (0,1 mg L⁻¹ GA₃ + 0,01 mg L⁻¹ AIB). Les explants sont cultivés en boîte de Pétri pendant quatre semaines : une semaine en obscurité suivie de transfert des cultures en photopériode avec repiquage tous les deux jours sur milieu frais.

Multiplication : Les vitropousses sont ensuite transférées en multiplication dans des erlens contenant 100 ml de milieu supplémenté de Benzylaminopurine (0,2 mg L⁻¹ BAP) et de Kinétine (0,1 mg L⁻¹ Kin), comme cela a été préconisé par Lee (1986). Un repiquage sur milieu frais est effectué 1 fois par semaine.

Enracinement : L'initiation rhizogène dépend très souvent d'un faible niveau de cytokinine avec une forte concentration auxinique mais les vitropousses ont suffisamment de cytokinine résiduelle à partir de l'étape de multiplication que la cytokinine n'est pas requise pour la régénération racinaire (Murashige, 1974). Ainsi, les tigelles obtenues sont individualisées et transférées pour induction rhizogène sur le milieu de base MS avec 6% de saccharose et 0,8% d'Agar et supplémenté d'auxine AIB ou ANA (acide naphthalène acétique) à 1 mg L⁻¹. Les cultures sont réalisées en tubes à essai.

Néof ormation sur cals de jeunes feuilles (Induction callogène et régénération)

Les feuilles âgées entourant les pousses sont éliminées jusqu'à avoir des cylindres de feuille fournis par le rouleau de la gaine des plus jeunes feuilles. Les explants sont désinfectés par l'eau de Javel à 30% pendant 10 min puis rincés trois fois par une solution stérilisée d'acide citrique à 1%. Quatre disques foliaires de 5 mm d'épaisseur sont excisés de chaque rouleau.

Le milieu de base est supplémenté de 3 mg L⁻¹ de 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) et les explants sont cultivés en boîtes de Pétri placées à l'obscurité. Après quatre semaines d'initiation, le pourcentage d'induction et l'aspect des amas callogènes sont notés avant de transférer les cals sur le milieu nutritif sans phytorégulateurs exogènes.

Détermination du taux d'assainissement

Le taux de guérison a été déterminé par la technique TBIA à partir d'échantillons pris de chaque vitroplant obtenu.

Acclimatation et sevrage

Après développement d'un bon système racinaire ramifié, les vitroplants complets sont sortis de leur conteneurs et transplantés, après lavage des racines sous eau courante, en pots remplis de substrat (sable et tourbe : 2/1 V) stérilisé. Ils sont acclimatés en premier lieu en chambre de culture pendant deux semaines, avec irrigation quotidienne par la solution minérale MS/2 (MS dont les macroéléments sont dilués de moitié). Ils sont ensuite transférés à l'extérieur, sous un ombrage partiel et irrigués quotidiennement avec de l'eau de robinet. Le taux de sevrage a été déterminé.

Analyse statistique

Le dispositif expérimental a été bâti sur un modèle aléatoire. Les données quantitatives ont été traitées par un logiciel de statistique pour l'analyse de variance et par le test de Duncan pour la comparaison des moyennes significativement différentes.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Etat phytosanitaire de la canne

La présence du virus chez la canne sauvage ainsi que chez 5/6 cultivars en exploitation commerciale et 6/7 cultivars de la collection nationale (Tableau 1) est une indication de l'étendue de la maladie au Maroc.

Le virus a été détecté chez tous les cultivars CP cultivées sur de large superficie au Maroc (51% au Gharb et 93% au Loukkos). Or, il a été signalé que les cultivars CP (de la station américaine Canal Point en Floride) seraient tous infectés par le ScYLV (Comstock *et al.*, 1998). Il est donc très probable que la canne à sucre marocaine a été infectée à partir des approvisionnements de la Floride. Cependant, seuls les cultivars L 75-2 et la L 62-96 originaires de la Louisiane sont indemnes.

En outre, même en l'absence de symptômes de la maladie YLS, la présence du virus ScYLV a été détectée par le test sérologique. En effet, la concordance de la présence des symptômes visuels avec la détection du virus par le test sérologique n'a été positive qu'à 63,6% (sur les 11 cultivars infectés, seules 7 ont développé des symptômes visuels). Ainsi, il ressort que le diagnostic visuel à lui seul ne permet pas d'affirmer l'absence de cette maladie puisque l'indexation a révélé la présence du virus à l'état latent dans 36,4% des cultivars testés.

Elimination du virus 'ScYLV' par culture *in vitro*

Micropropagation par microbouturage d'apex

Etablissement des cultures

Contrôle du brunissement : le contrôle du brunissement des explants a été recherché en premier lieu par la comparaison de l'effet de la préculture en obscurité et de l'incubation directe en lumière (Tableau 2). Ainsi, il s'est avéré qu'à la fin de la deuxième semaine, l'oxydation a atteint 100% pour les explants ayant été incubés directement en lumière et 47% pour ceux ayant été en préculture en obscurité. Ces traitements ont en outre montré des différences hautement significatives. Cependant, les 53% explants restés viables ont fini aussi par s'oxyder au cours de la troisième semaine.

Les résultats relatifs à l'effet du repiquage fréquent sur milieu frais (durant la phase lumineuse) ont montré une certaine réduction du taux d'oxydation (Tableau 2) de 73% en fin de la troisième semaine. En outre, l'analyse de la variance a montré des différences très hautement significatives pour la deuxième semaine et hautement significatives pour la

troisième semaine. Cependant les explants restant finissent aussi par brunir au cours de la quatrième semaine.

TABLEAU 1

Détection du Virus (ScYLV) chez des Cultivars de Canne à Sucre de la Grande Culture et de la Collection Nationale

Canne à sucre :		Intensité visuelle des symptômes	Détection du virus par TIBIA
grande culture	CP 44-101	+	+
	CP 61-37	+	+
	CP 65-357	+	+
	CP 66-346	-	+
	CP 70-321	+	+
	L 62-96	+	-
collection nationale	SP 71-6163	++	+
	CP 71-1442	++	+
	CP 72-1210	++	+
	CP 74-315	-	+
	CP 74-383	-	+
	LCP 86-426	-	+
	L 75-2	-	-
Canne sauvage		-	+

- : absence de symptômes

+ : jaunissement de la nervure principale

++ : jaunissement de la nervure principale et décoloration du limbe

Avec l'utilisation en adjonction dans le milieu de culture, de PVP, le taux de brunissement des microboutures a été encore diminué (Tableau 2), notamment quand les explants ont été auparavant immergés dans des antioxydants (DIECA ou Acide citrique + Acide ascorbique) pouvant inactiver les enzymes phénolases. Ainsi, l'oxydation phénolique a été relativement atténuée particulièrement avec le DIECA (taux d'oxydation de 65% correspondant à 35% de viabilité en fin de la phase d'établissement sans phytorégulateurs exogènes) mais pas totalement surmontée.

L'analyse de la variance a montré des différences significatives entre les traitements. Le classement par Duncan a différencié deux groupes : {(DIECA + PVP)} > {(acide citrique + acide ascorbique) + PVP} = PVP}.

Le brunissement rapide des microboutures et sa diffusion sur le pourtour des explants qui dégénèrent est dû aux composés phénoliques et aux produits de leur oxydation qui sont reconnus depuis très longtemps comme étant des inhibiteurs de l'activité enzymatique (Maier & Metzler, 1965 ; Loomis & Battaile, 1966). Le brunissement des explants résulte de l'action des enzymes oxydases contenant du cuivre (exemple polyphénoloxydase), lesquels sont synthétisés et libérés par les tissus à cause de l'excision et

de la stérilisation des explants (Lerch, 1981). L'Agar est considéré comme une riche source d'impuretés dont le cuivre qui est l'un des constituants du complexe enzymatique phénolase impliqué dans l'oxydation des phénols endogènes (Debergh, 1983).

TABLEAU 2

Taux de Brunissement des Microboutures en Phase d'Établissement

Traitements		Durée en semaines			
		1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}
Incubation directe en lumière		40	100	-	-
Préculture en obscurité (1 semaine)		0	47	100	-
Repiquage	chaque semaine	0	47	100	-
	tous les 2 jours	0	27	73	100
PVP en adjonction		-			95
acide citrique + acide ascorbique + PVP en adjonction		-			85
DIECA + PVP en adjonction		-			65

La préculture en obscurité permet de retarder la survenue du brunissement, probablement en diminuant l'activité de l'enzyme phénylalanine-amino-lyase qui catalyse la synthèse des phénols et donc réduisant ainsi la disponibilité de ce substrat (Torres, 1989). Le repiquage fréquent, assurant le renouvellement du milieu frais, améliore les échanges entre l'explant et le milieu nutritif tout en évitant la concentration rapide de polyphénols excrétés par les explants lesquels survivent plus longtemps à l'intoxication par les phénols et les produits de leur oxydation. La prévention ou la réduction du brunissement des tissus peut aussi être recherchée par abaissement du potentiel redox avec des agents réducteurs ou antioxydants. En effet, la combinaison des effets de la préculture en obscurité (pendant une semaine) et du repiquage fréquent (tous les 2 jours) et leur association à l'utilisation d'antioxydants en prétraitement (DIECA à 0,2%) accompagnée par l'adjonction dans le milieu de culture d'une substance adsorbante et détoxifiante (PVP à 0,05%), a permis de surmonter partiellement l'handicap du brunissement en inactivant vraisemblablement les enzymes phénolases par l'antioxydant et aussi en liant le substrat phénolique par le composé adsorbant et minimisant ainsi le taux de l'oxydation phénolique.

Initiation des cultures

Les milieux de cultures comportant les phytorégulateurs exogènes ont permis d'améliorer aussi bien le taux de viabilité que la reprise de croissance des microboutures.

Cependant, le taux de régénération (Tableau 3) dépend de la composition hormonale testée. En effet, l'emploi concomitant d'AIB et de GA₃ a donné le meilleur résultat (33% de régénération) et a même parfois induit le développement du système racinaire.

Multiplication

La présence de cytokinines (BAP + Kin) a induit le débourrement de bourgeons axillaires qui s'allongent en tiges. Ainsi, 3 à 6 tiges sont obtenues pour chacune des vitropousses initiales. Les tiges allongées ont été ensuite individualisées et passées en milieu d'enracinement.

TABLEAU 3

Effet des Phytorégulateurs sur le Taux de Régénération

combinaison hormonale	M ₁ : témoin	M ₁ : GA ₃	M ₂ : AIB	M ₃ : GA ₃ + AIB
% de régénération	13	16	20	33

Enracinement

Les deux auxines testées ont occasionné le développement de racines. Cependant l'AIB a permis 100% d'enracinement après seulement quatre semaines de culture, contre 50% pour l'ANA.

Ainsi, il ressort que l'AIB est favorable à l'enracinement de la canne à sucre. Cependant, dans d'autres travaux, il a été noté que l'ANA est plus efficace que l'AIB pour l'induction rhizogène des pousses d'une variété indienne (Shukla *et al.*, 1994).

Micropropagation par embryogenèse somatique indirecte

100% d'explants de segments de jeunes feuilles ont produit des amas callogènes dont la majorité est de couleur jaunâtre avec une structure plutôt compacte et globuleuse. La suppression d'auxine du milieu de culture a induit, à partir de la deuxième semaine, la différenciation de néoformations, vraisemblablement embryoïdes, lesquelles ont rapidement régénéré des vitroplantules complètes.

En effet, durant l'embryogenèse somatique, les structures bipolarisées développent tige et racine simultanément sur le même milieu de culture (Evans *et al.*, 1984). Dans d'autres études effectuées sur la canne à sucre, il a été également rapporté que les cals de couleur jaune et de structure compact, globulaire ont un haut potentiel embryogène contrairement aux cals de couleur brunâtre ayant un aspect humide (Gandonou *et al.*, 2005). Ainsi, il apparaît qu'en

plus de son effet fortement mitogène, le 2,4-D joue aussi un rôle de déterminant de l'état embryogène, en cas d'embryogenèse indirecte. Cependant, il a été souligné (Ammirato, 1989) que l'élimination de l'auxine ou la réduction de sa concentration sont souvent nécessaires pour un développement normal des embryons.

Acclimatation et sevrage

Après adaptation au changement de l'environnement, le taux de sevrage des plants a été de 60%. La multiplication sous serre est ensuite réalisée par bouturage des plants avérés assainis.

Détermination du taux d'assainissement par ELISA sur membrane

Le microbouturage d'apex a permis d'avoir 20% de vitroplants exemptés du virus. Cependant, l'éradication de ScYLV a été totale (100% des vitroplants testés se sont avérés indemnes) par néoformation embryogène sur cal.

Il a été possible d'assainir les cultivars CP 66-346 par culture d'apex. Le faible taux d'assainissement (20%) obtenu, est expliqué par la difficulté pratique de réussir la culture du seul dôme méristématique dont la très faible taille, garant de l'assainissement, compromet sa viabilité et donc la régénération. En effet, la culture du méristème apical est pratiquée dans un but phytosanitaire, du fait que les virus sont incapables de se multiplier dans cette zone (Faccioli & Marani, 1998). Chez d'autres cultivars de canne à sucre, le taux d'éradication du ScYLV a varié d'un minimum de 6%, en cas d'utilisation de bourgeons, à un maximum de 64% (Parmessur *et al.*, 2002) et même 92% (Chatenet *et al.*, 2001), en cas de régénération à partir de méristèmes apicaux.

Cependant, l'élimination à 100% de l'infection virale a été possible par culture de cal obtenus à partir de rouleaux de la gaine de très jeunes feuilles. D'autres études ont également montré que dans le cal ou la culture de cellules en suspension, le virus peut être complètement éliminé par subculture (Wang & Hu, 1980).

L'existence d'un gradient de concentration en virus, depuis les organes les plus jeunes vers ceux plus âgés a depuis longtemps été rapportée (Margara, 1982). Par ailleurs, le ScYLV est un *Luteovirus* (Maia *et al.*, 2000) qui réside au niveau du phloème de cannes infectées (Scagliusi & Lockhart, 2000). Ainsi, pour le cas des apex, considérant leur âge très jeune et le manque de différenciation vasculaire dans le méristème, il y'aurait affaiblissement du mouvement intercellulaire des virus (échec d'envahissement de la région méristématique), outre le métabolisme actif des cellules en mitose qui empêcherait l'infection virale. Pour le cas des explants de la gaine de feuilles également très jeunes, l'élimination du virus pourrait s'expliquer par la distribution irrégulière du virus dans les différents tissus (localisation du ScYLV dans le phloème) de la feuille. En effet, il a été montré (Guiderdoni & Demarly, 1988) que chez la canne à sucre, les embryons somatiques proviennent principalement de tissus non vasculaires. Par conséquent, les vitroplantules obtenues de culture de cal seraient vraisemblablement dérivées de cellules non infectées par ScYLV, et donc devraient-elles aussi être libres du virus.

REMERCIEMENTS

Cette recherche a été effectuée dans le cadre de collaboration entre la Faculté des Sciences de Kénitra (Université Ibn Tofail) et le Centre Technique des Cultures Sucrières (ORMVAG).

REFERENCES

- Ammirato, P.V. 1989. Recent progress in somatic embryogenesis. Newsletter, *Int. Assoc. Plant Tissue Cult.*, 57 : 15-23.
- Borth, W., Hu, J.S., Schenk, S. 1994. Double stranded RNA associated with sugarcane yellow leaf syndrome. *Sugarcane*, 3 : 5-8.
- Chatenet, M., Delage, C., Ripolles, M., Irely, M., Lockhart, B., Rott, P. 2001. Detection of Sugarcane Yellow Leaf Virus in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Disease*, 85 : 1177-1180.
- Comstock, J.C., Irely, M.S., Lockhart, B.E., Wang, Z.K. 1998. Incidence of yellow leaf syndrome in CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques. *Sugarcane*, 4 : 21-24.
- Cronjé, C.P.R., Tymon, A.M., Jones, P., Bailey, R.A. 1998. Association of a phytoplasma with a yellow leaf syndrome in sugarcane in Africa. *Annals of Applied Biology*, 133: 177-186.
- Debergh, P.C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.*, 59 : 270-276.
- Delage, C., Ripolles, M., Chatenet, M., Irely, M.S., Rott, P. 1999. Elimination of sugarcane yellow leaf virus from sugarcane by meristem culture. In : Singh V. (ed.), Kumar Vinay (ed.). *Proceedings of the XXIII ISSCT Congress, 22-26 February 1999*, New Delhi, India.
- Doukkali, M.R., Redani, L., Lebailly, P. 2009. Filière sucrière et valorisation des ressources. In : Actes du symposium international AGDUMED, "durabilité des systèmes de culture en zone méditerranéenne : gestion des ressources en eau et en sol", Rabat, mai 2009, 15 p.
- El Yacoubi, H., Chriki, N., Rochdi, A. 2009. Lutte curative contre le virus ScYLV de la canne à sucre : embryogenèse somatique indirecte et microbouturage d'apex. In : Biotechnologie microbienne au service du développement, (MICROBIOD-2009), Marrakech, Faculté des Sciences Semlalia, 2-5 Novembre 2009, pp. 126.
- Evans, D.A., Sharp, W.R., Bravo, J.E. 1984. Cell culture methods for crop improvement. In: *Handbook of Plant Cell Culture, Crop Species*, 2: 47-68. Macmillan Publishing co., New York.
- Faccioli, G., Marani, F. 1998. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In : Hadiddi A, Kfetaral RK, Koganezawa H, eds., *Plant virus disease control*, St Paul MN, USA, American Phytopathological Society, pp. 346-373.
- Fisher, H.V., Lockhart, B.E. 1974. Identity of a strain of sugarcane mosaic virus occurring in Morocco. *Plant Disease Report*, 58 : 1121-1123.
- Fitch, M.M., Lehrer, A.T., Komor, E., Moore, P.H. 2001. Elimination of Sugarcane Yellow Leaf Virus from infected sugarcane plants by meristem tip culture visualized by tissue blot immunoassay. *Plant Pathology*, 50 : 676-680.
- Fontaniella, B., Vicente, C., Legaz, M.E., DeArmas, R., Rodriguez, C.W., Martinez, M., Pinon, D., Acevedo, R., Solas, M.T. 2003. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. *Plant Physiol. Biochem.*, 41 : 1027-1036.

- Gandonou, C.H., Abrini, J., Idaomar, M., SkaliSenhaji, N. 2005. Response of sugarcane (*Saccharum sp.*) varieties to embryogenic callus induction and *in vitro* salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 4(4) : 350-354.
- Gonçalves, M.C., Vega, J., Oliveira, J.G., Gomes, M.M.A. 2005. Sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. *Fitopatologia Brasileira*, 30(1) : 10-16.
- Guideroni, E., Demarly, Y. 1988. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14 : 71-88.
- Lee, T.S.G. 1986. Multiplication of sugarcane (*Saccharum sp.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 10 : 47-55.
- Lehrer, A.T., Moore, P.H., Komor, E. 2007. Impact of *Sugarcane Yellow Leaf Virus* (ScYLV) on the carbohydrate status of sugarcane: comparison of virus-free plants with symptomatic and asymptomatic virus-infected plants. *Physiological and Mol. Plant Pathol.*, 70 : 180-188.
- Lerch, K. 1981. Copper monooxygenases : tyrosinase and dopamine β -monooxygenase. In: Sigel H, ed., *Metal ions in biological systems*. New York, Marcel Decker, p. 143-186.
- Lockhart, B.E.L., Autrey, L.J.C. 1988. Occurrence in sugarcane of a bacilliform virus related serologically to banana streak virus. *Plant Disease*, 72 : 230-233.
- Lockhart, B.E.L., Pieter, C., Cronjé, P.J. 2000. Yellow leaf syndrome. In : Rott P, Bailey RA, Comstock JV, Croft BR, Saumtally AS. eds., *A guide to sugarcane diseases*. CIRAD Publication Service and ISSCT, Montpellier, p. 291-295.
- Loomis, W.D., Battaile, J. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochem.*, 5 : 423-438.
- Maia, I.G., Gonçalves, M.C., Arruda, P. Vega, J. 2000. Molecular evidence that sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) is a member of the *Luteoviridae* family. *Arch. Virol.*, 145 : 1009-1019.
- Maier, V., Metzlier, D.M. 1965. Quantitative changes in date polyphenols and their relation to browning. *J. Food Sci.*, 30 : 80-84.
- Margara, J. 1982. *Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse*. Paris, France, INRA, pp. 262.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation tissue cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 25 : 135-166.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15 : 473-479.
- Nadif, A., Akalach, M., Pieter, C., Phil, J. 1999. First report of Yellow Leaf Syndrome of sugarcane in Morocco. *Plant Disease*, 83 : 398.
- Parmessur, Y., Aljanabi, S., Saumtally, S., DooKun-Saumtally, A. 2002. Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellow phytoplasma - elimination by tissue culture. *Plant Pathology*, 51 : 531-566.
- Rochdi, A., Nadif, A., Chriki, N., Rachidai, A. 2002. *Assainissement par culture in vitro de méristèmes et par néoformation sur cals de la canne à sucre*. In : Les Biotechnologies - Quelles opportunités pour le Maroc, Rabat, Faculté des Sciences, 3-5 juin 2002, p. 14.
- Scagliusi, S.M., Lockhart, B.E.L. 2000. Transmission, characterization and serology of a luteovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane. *Phytopathology*, 90 : 120-124.
- Schenck, S., Hu, J.S., Lockhart, B.E. 1997. Use of a tissue-blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane yellow virus in Hawaii. *Sugarcane*, 4 : 5-8.

- Shukla, R., Khan, A.Q., Garg, G.K. 1994. *In vitro* clonal propagation of sugarcane: optimisation of media hardening of plants. *Sugarcane*, 4 : 21-23.
- Torres, K.C. 1989. *Tissue culture techniques for horticultural crops*. An Avi Book, Van Nostrand Reinhold, New York, 285 pp.
- Vega, J., Scagliusi, S.M., Ulian, E.C. 1997. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil : evidence of association with a luteovirus. *Plant Disease*, 81 : 21-26.
- Wagih, M.E., Gordon, G.H., Ryan, C.C., Adkins, S.W. 1995. Development of an axillary bud culture technique for Fiji disease virus elimination in sugarcane. *Australian Journal of Botany*, 43 : 135-143.
- Wang, P.J., Hu, C.Y. 1980. Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture. In : Fiechter A, ed., *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 18, Plant Cell Cultures II, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 61-99.