

Prospection et première caractérisation moléculaire de l'exocortis (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) dans la région du Gharb

M. OUANTAR¹, I. BIBI², B. CHEBLI¹, A.T. AIT FRIHA³, M. AFECHTAL²

(Reçu le 19/06/2017; Accepté le 26/01/2018)

Résumé

Les viroïdes sont des agents transmissibles mécaniquement et par greffage, et disséminés à longue distance par le matériel végétal. Des prospections ont été menées, durant Juillet 2013, dans la région du Gharb à la recherche des viroïdes des agrumes. Un total de 53 échantillons a été collecté et utilisé pour l'inoculation du cédratier 'Étrog' avant d'être testé par RT-PCR pour la détection de l'exocortis (*Citrus exocortis viroid*, CEVd). Les résultats obtenus ont montré que le CEVd a été très répandu dans la région avec un pourcentage d'infection de 84,9% des échantillons analysés. Après le séquençage génomique, une étude de la diversité génétique a été réalisée sur trois isolats locaux représentatifs du CEVd. La comparaison entre les séquences nucléotidiques marocaines du CEVd a montré une diversité génétique inférieure à 3%.

Mots-clés: Agrumes, *Citrus exocortis viroid*, RT-PCR, séquençage, Gharb.

Molecular characterization of exocortis (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) in the Gharb region

Abstract

Viroids are graft and mechanically transmissible agents, disseminated through budding. A field survey was conducted, during July 2013, for citrus viroids in the Gharb region. A total of 53 samples were collected and used for inoculation of 'Étrog' lemon before being tested by RT-PCR for the detection of exocortis (*Citrus exocortis viroid*, CEVd). The results showed that CEVd was widespread in the region with an infection rate of 84.9% in the analyzed samples. After genomic sequencing, a study of the genetic diversity was conducted on three representative local isolates of CEVd. The comparison between the nucleotide sequences of Moroccan CEVd isolates revealed a genetic diversity of less than 3%.

Keywords: Citrus, *Citrus exocortis viroid*, RT-PCR, sequencing, Gharb.

INTRODUCTION

L'exocortis est une maladie à viroïde causant des écailllements de l'écorce de *Poncirus trifoliata* et de certains de ses hybrides, notamment les citranges (*P. trifoliata* x *Citrus sinensis*), mais aussi le limettier Rangpur. L'écaillage sur un porte-greffe commence généralement par le bas et la partie interne de l'écorce reste vivante. Des enroulements foliaires ainsi que des nécroses des veines sont observés chez le cédratier (*Citrus medica*). Les symptômes peuvent être plus ou moins sévères en fonction de la présence d'autres viroïdes d'espèces différentes. Les variétés greffées sur des porte-greffes sensibles peuvent montrer des pertes considérables de production allant jusqu'à 50% chez les arbres d'environ 10 ans (Roistacher, 1991).

L'agent causal de l'exocortis est un viroïde sous forme d'une séquence circulaire d'ARN simple brin de 370 à 375 nucléotides (*Citrus exocortis viroid*, CEVd). Cet ARN, nu sans capsid protéique, ne code aucune protéine et se retrouve naturellement en mélange avec d'autres viroïdes dans les agrumes infectés (Gross et al., 1982).

Le viroïde de l'exocortis est présent dans le phloème des agrumes infectés et transmis par greffage, principalement à partir de plants infectés d'apparence saine. CEVd est

aussi transmis mécaniquement par les outils de taille ou d'entretien. Le matériel végétal peut être infecté dès sa production en pépinière et être ainsi propagé en vergers commerciaux. Des cas de transmission par greffage naturel des racines d'arbres voisins ont été observés. Cependant, aucune transmission par vecteur ou par la graine n'a été démontrée chez les agrumes (Roistacher, 1991).

La plupart des espèces et variétés d'agrumes (genres *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus*) ainsi que quelques rutacées peuvent être infectées par le viroïde de l'exocortis. D'autres hôtes non rutacées ont également été signalés comme la vigne et quelques plantes maraîchères comme la tomate, l'aubergine, la carotte et le navet (Roistacher, 1991).

L'indexation de *Poncirus trifoliata* utilisée auparavant pour la détection de l'exocortis ne l'est plus car les symptômes spécifiques apparaissent après plus de trois ans. Actuellement, le cédratier est la plante indicatrice la plus utilisée pour la détection de l'exocortis. Les symptômes s'observent après environ 3 à 4 mois d'incubation à 32°C (Roistacher, 1991). Les symptômes observés sur cédratier ne sont pas typiques du viroïde de l'exocortis et une extraction des ARNs suivie de deux électrophorèses en gel de polyacrylamide sont nécessaires pour visualiser le CEVd. La détection

¹ École Nationale des Sciences Appliquées, B.P 1136, Université Ibn Zohr, Agadir 80000, Maroc.

² Institut National de la Recherche Agronomique INRA, Centre Régional de Kénitra, Laboratoire de Virologie, Route de Sidi Yahya du Gharb, Km 9, Kénitra.

³ Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires, Direction Régionale de Casablanca-Settat, Service de Protection des Plantes d'El Jadida.

Correspondance: mohamedafechtal.inra@gmail.com

de CEVd peut se faire par hybridation moléculaire à l'aide de sondes spécifiques mais des réactions croisées faibles peuvent être observées entre CEVd et Citrus viroid IV (CVd-IV). L'amplification par RT-PCR permet également de détecter le CEVd (Yang *et al.*, 1992). La détection à l'aide de techniques moléculaires est grandement améliorée après une incubation prolongée de la plante à 32°C pour permettre une bonne répllication des viroïdes.

A notre connaissance, à part les rapports de Nhami et Kissi (1978), Nhami et Bourge (1979), Nhami et Zidane, (1984), très peu d'études ont été réalisées sur la maladie de l'exocortis à l'échelle nationale; d'où la présente étude qui a eu comme principal objectif la détection, la caractérisation moléculaire et l'évaluation de l'incidence de l'exocortis dans la région du Gharb.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Durant des prospections qui ont été effectuées en Juillet 2013 dans la région du Gharb, 3 échantillons de feuilles de clémentine commune greffée sur Citrange Carrizo ont été collectés à partir de 3 arbres présentant des symptômes d'écaillage de l'écorce sur le porte-greffe, et ce afin d'être testés pour la présence de l'exocortis. Cinquante autres échantillons ont été prélevés d'une manière aléatoire à partir de 10 vergers de différentes variétés d'agrumes dans la région du Gharb en vue de les analyser au laboratoire (Tableau 1).

Indexage biologique

Étant donné que tous les viroïdes des agrumes s'accumulent à des titres détectables dans le cédratier 'Étrog', cette espèce a été utilisée comme un hôte de bio-amplification secondaire, qui, lorsqu'il est couplé avec l'analyse moléculaire, est une procédure très sensible et spécifique à des fins d'indexation (Palacio *et al.*, 2000; Duran-Vila *et al.*, 1993).

Six greffons ont été utilisés pour inoculer deux plantes indicatrices du cédratier 'Étrog' pour chaque échantillon (Durán-Vila *et al.*, 1991). Ces plantes indicatrices ont été placées par la suite en serre vitrée à une température de 24°C durant deux semaines afin d'assurer la réussite du greffage. Elles ont été ensuite placées à 32 °C pendant au moins 4 semaines pour permettre l'amplification des viroïdes et l'extériorisation d'éventuels symptômes.

Extraction des acides nucléiques totaux

Le protocole utilisé pour l'extraction des acides nucléiques totaux (TNAs) a été décrit par Flores *et al.*, (1985). Après l'homogénéisation de 200 mg de tissus végétaux (phloème de plantes indicatrices inoculées) dans 700 µl de tampon d'extraction (0,1 M glycine-NaOH, 2% SDS, 1% sodium de lauroyl sarcosine), l'homogénat a été transféré dans un microtube eppendorf contenant 700 µl de phenol. Après mélange par inversion et vortex, centrifugation à 4 °C pendant 2 min à une vitesse de 14.000 rotations par minute (rpm), la phase aqueuse supérieure a été transférée dans un nouveau eppendorf contenant 200 µl de phenol et 200 µl de chloroforme-alcool isoamyl (24:1). Le surnageant a été transféré dans un nouveau eppendorf contenant 400 µl de chloroforme-alcool isoamyl avant centrifugation (4°C, 2 min, 14.000 rpm). La phase aqueuse supérieure a été récupérée dans un nouveau eppendorf à laquelle 1ml d'ethanol (100%) a été ajouté puis incubée à -20 °C pendant 2 h. Les TNAs ont été précipités par une centrifugation à 4°C pendant 30 min à une vitesse de 14.000 rpm et le surnageant a été éliminé. Le culot a été lavé par une solution d'ethanol 70% par une centrifugation à 4°C pendant 2 min à une vitesse de 14.000 rpm, avant d'être dissous dans 30 µl d'eau RNase free. La concentration des TNAs a été déterminée par analyse spectrophotométrique à 260 nm et la qualité de ces extractions a été vérifiée par le rapport A260/A280 et par électrophorèse sur gel d'agarose. Les TNAs extraits ont été dilués à 10 ng/µl et ont été conservés à -20°C jusqu'au début des analyses.

Tableau 1: Liste des échantillons collectés et analysés pour la présence d'exocortis

Région	Variété	Porte-greffe	Nombre d'échantillons	Présence de symptômes sur le terrain*
Mechraa Belksiri	Clémentine Commune	Citrange Carrizo	3	+
	Clémentine Commune	Bigaradier	5	-
	Clémentine Sidi Aissa	Citrange Carrizo	5	-
	Valencia Late	Bigaradier	5	-
Dar El Gueddari	Clémentine Sidi Aissa	Citrange	5	-
	Valencia Late	Bigaradier	5	-
Dar Belaamri	Washington Navel	Bigaradier	5	-
	Valancia Late	Bigaradier	5	-
	Navel Thompson	Bigaradier	5	-
Sidi Slimane	Valencia Late	Macrophylla	5	-
	Clémentine commune	Bigaradier	5	-

*symptômes d'écaillage de l'écorce sur le porte-greffe.

Reverse Transcriptase - Réaction en Chaîne polymérisée (RT-PCR)

Pour la transcription inverse (RT), l'ADN complémentaire (ADNc) de l'ARN viroïdal a été synthétisé à partir de 0,5 µg d'ARN total dans un volume final de 20 µl du mélange réactionnel contenant 4 µl du tampon RT (5X), 2 µl de dithiothréitol (0,1 M), 3 µl de chaque désoxy-nucleotide-triphosphate (dNTPs) (10 mM), 1 µl d'amorces aléatoires (0,5 µg/µl) et 0,8 µl d'enzyme de la transcription inverse Moloney Murine Leukemia Virus (200 U) (MMLV-RT) (Invitrogen, USA). Le mélange obtenu a été incubé à 37°C pendant 1 h avant d'être stocké à -20 °C.

Un volume de 5 µl de CEVd ADNc a été utilisé dans une solution finale de 25 µl contenant 5 µl du tampon GoTaq (5X), 0,2 µl de dNTPs (10 mM), et 0,1 µl de GoTaq polymérase (5U/µl) et 0,2 µM de chaque amorce sens et anti-sens (Wang *et al.*, 2009) (Tableau 2). Le profil d'amplification PCR a été initié par une dénaturation à 95 °C pendant 5 min, suivi de 40 cycles de dénaturation de l'ADN double brin à 95 °C pendant 30 s, l'hybridation des amorces à 58 °C pendant 30 s et l'extension à 72 °C pendant 45 s. Les amplicons ont été incubés pendant 7 min supplémentaires à 72 °C pour l'extension finale de l'ADN. Les produits PCR ont été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 1,2% dans le tampon TAE (tris, acétate, EDTA), colorés avec du bromure d'éthidium (25 ng/ml) et visualisés sur UV trans-illuminateur. La taille moléculaire attendue des produits de PCR (371 paires de bases, bp) a été déterminée par comparaison de l'échelle 100 bp de l'ADN GeneRuler Plus (Fermentas, Royaume-Uni).

Séquençage et étude de la variabilité génétique

Après purification de l'ADN, les amplicons ont été envoyés au séquençage génomique (Primm, Italie). Les séquences obtenues à partir des ADN représentatifs ont été alignées en utilisant la version du logiciel de BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999) et la version du logiciel MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Ces séquences ont été ensuite confrontées à la séquence australienne de référence disponible dans la base de données NCBI sous le numéro d'accès K00964.1.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'indexage biologique a permis de visualiser des symptômes de courbures de feuilles vers le bas (epinasty) sur 37 échantillons y compris ceux qui ont été prélevés sur des arbres dont le porte-greffe présentait des symptômes d'écaillage de l'écorce sur le terrain (Tableau 3).

Les analyses par RT-PCR ont montré par contre que 45 échantillons ont été positifs au CEVd (Figure 1). Tous les échantillons qui ont donné des symptômes de courbures de feuilles sur le cédratier 'Étrog' ont été testés positifs au CEVd montrant un pourcentage d'infection de 84,9% (Tableau 3). La bio-amplification de l'exocortis sur 'Étrog' couplée à la RT-PCR, est une procédure très sensible et spécifique pour la détection de l'exocortis (Palacio *et al.*, 2000; Duran-Vila *et al.*, 1993).

Tableau 2: Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la RT-PCR de CEVd (Wang *et al.*, 2009)

Amorce	Séquence 5'-3'	Produit bp	Accession	Référence
CEV-R	CCGGGGATCCCTGAAGGACTT	371	NC-001464	Gross <i>et al.</i> (1982)
CEV-F	GGAAACCTGGAGGAAGTCGAG			

Tableau 3: Résultats de détection du viroïde de l'exocortis par indexage biologique et RT-PCR

Région	Variété	Porte-greffe	Nombre d'échantillons	Présence de symptômes au champ*	Courbure de feuilles à l'indexage biologique	Résultats du test RT-PCR
Mechraa Belksiri	Clém. Commune	C. Carrizo	3	+	3/3	3/3
	Clém. Commune	Bigaradier	5	-	5/5	5/5
	Clém. Sidi Aissa	C. Carrizo	5	-	3/5	4/5
	Valencia Late	Bigaradier	5	-	3/5	5/5
Dar El Gueddari	Clém. Sidi Aissa	Citrangle	5	-	3/5	3/5
	Valencia Late	Bigaradier	5	-	3/5	5/5
Dar Belaamri	Washington Navel	Bigaradier	5	-	4/5	5/5
	Valencia Late	Bigaradier	5	-	0/5	2/5
	Navel Thompson	Bigaradier	5	-	4/5	4/5
Sidi Slimane	Valencia Late	Macrophylla	5	-	5/5	5/5
	Clém. Commune	Bigaradier	5	-	4/5	4/5

*Symptômes d'écaillage de l'écorce sur le porte-greffe.

Deux variantes locales de CEVd obtenues à partir de deux arbres de clémentinier greffés sur Citrange Carrizo présentant des écailllements sur l'écorce, en plus d'une variante obtenue à partir d'un arbre de Valencia Late/bigaradier qui n'a pas montré de symptômes de courbure de feuilles sur 'Etrog', ont été sélectionnées pour l'étude de la diversité génétique en comparaison avec la souche australienne de référence K00964.1 (souche de 25) (Visvader et Symons, 1985). Le séquençage génomique a révélé la présence d'une teneur élevée en G + C, une caractéristique de la structure du viroïde. Le génome du viroïde étudié était de 371 nucléotides (nt), similaire à la taille du génome (370-375 nt) de la plupart des variantes du CEVd (Visvader et Symons, 1985). L'alignement multiple des séquences par Bio-Edit a démontré une similarité nucléotidique oscillant entre 94,0% et 98,5% (Tableau 4). La comparaison entre les séquences marocaines a montré une diversité génétique inférieure à 3% alors que cette diversité a été de 6% quand on les compare à la souche australienne avec 25 nouvelles positions polymorphiques (Tableau 4 et Figure 2).

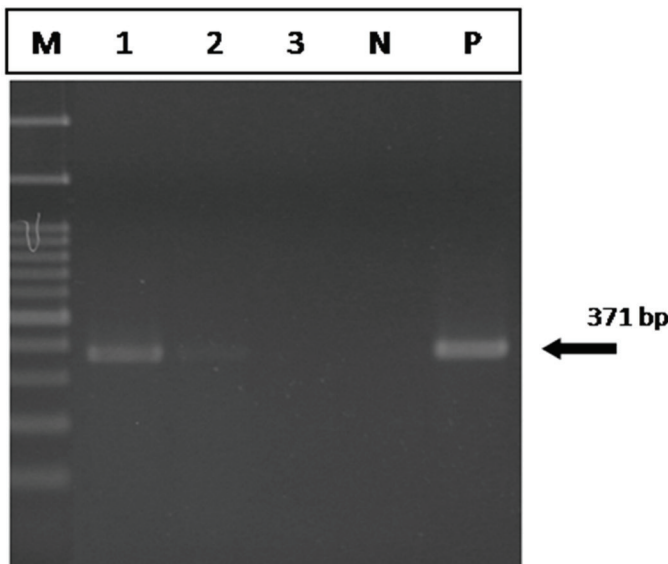


Figure 1: Détection du viroïde de l'exocortis par RT-PCR: (M) Marqueur moléculaire 100 bp, (1-3) échantillons provenant de la région du Gharb, (N) contrôle négatif, (P) contrôle positif.

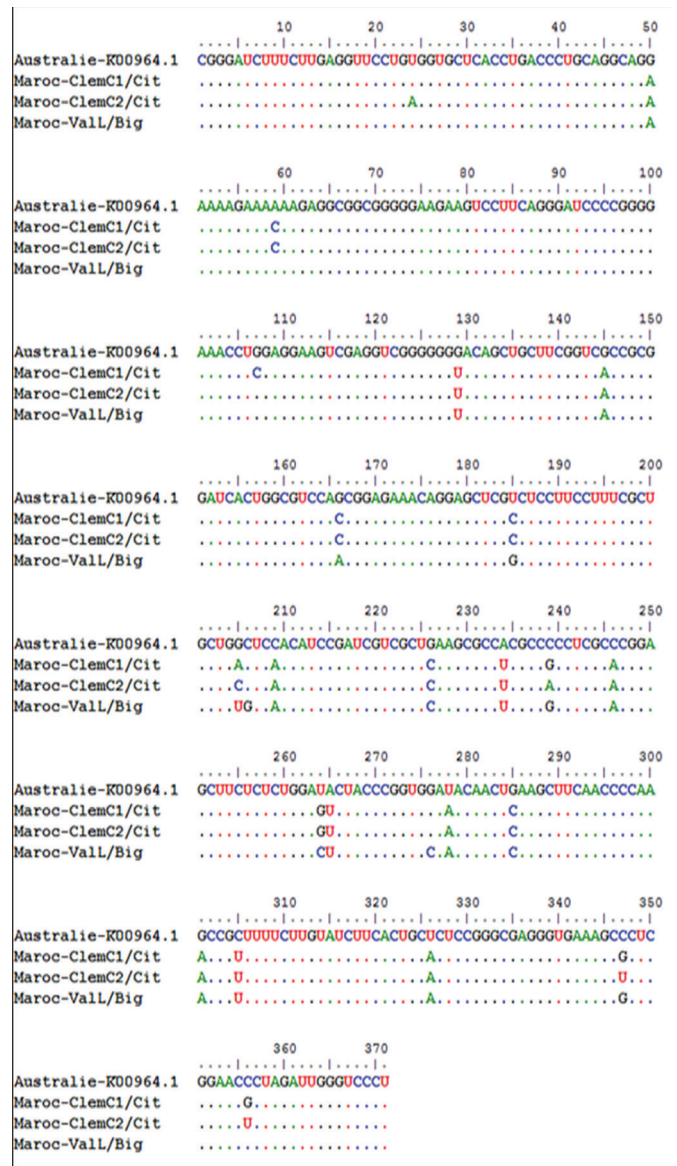


Figure 2: L'alignement multiple des séquences marocaines de l'exocortis avec la souche australienne de 25 (K00964.1) (Visvader et Symons, 1985)

Tableau 4: Matrice d'identité entre les séquences utilisées dans cette étude

Seq->	Australie-K00964.1	Maroc-ClemC1/Cit	Maroc-ClemC2/Cit	Maroc-ValL/Big
Australie-K00964.1	ID	94,0 %	94,0 %	94,3 %
Maroc-ClemC1/Cit		ID	98,3 %	97,5 %
Maroc-ClemC2/Cit			ID	97,0 %
Maroc-ValL/Big				ID

CONCLUSION

Les citranges sont particulièrement sensibles vis-à-vis de l'exocortis, mais sont souvent employés comme un porte-greffe de substitution au bigaradier qui est, à son tour, extrêmement sensible vis-à-vis de la tristeza; d'où l'importance d'utiliser un matériel végétal de propagation certifié indemne de virus et viroïdes. Les résultats obtenus à travers cette étude ont montré que le CEVd est très répandu dans la région du Gharb avec un pourcentage d'infection de 84,9%. Le CEVd a été détecté dans 84% des échantillons qui ne présentaient pas de symptômes au champ, ce qui confirme le caractère latent du viroïde. En plus de sa transmission par les outils de taille, l'exocortis est plus souvent non reconnu par les agriculteurs, ce qui expliquerait ce taux élevé d'infection par le viroïde. La comparaison des séquences marocaines a montré une diversité génétique inférieure à 3% alors que cette diversité a été de 6% quand on les compare à la souche australienne de référence. Les symptômes de courbure de feuilles sur le cédratier 'Etrog' sont un bon indicateur de la présence du CEVd mais ne sont pas spécifiques, d'où l'importance de coupler l'inoculation de 'Etrog' pour la bioamplification des viroïdes est une technique moléculaire comme la RT-PCR pour une détection très sensible et spécifique au niveau des pépinières. L'indexage biologique par inculcation sur le cédratier 'Etrog', couplé à la RT-PCR, devraient être employés et étendus pour évaluer l'incidence et la distribution de l'exocortis dans les principales régions agrumicoles du Maroc.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Durán-Vila N., Pina J. A., Molins M.I., Navarro L. (1991). A new indexing method for cachexia. In: *Proceeding of the 11th Conference of the International Organization for Citrus Virologists (IOCV)*, Riverside, CA, pp. 224-229.
- Durán-Vila N., Pina J. A., Navarro L. (1993). Improved indexing of citrus viroids. In: *Proc. 12th Conf. Int. Org. Citrus Virologists (IOCV)*, Riverside, CA, pp. 202-211.
- Flores R., Durán-Vila N., Pallas V. et Semanick J.S. (1985). Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevine. *Journal of General Virology*, 66: 2095-2102.
- Gross, H. J., Krupp, G., Domdey, H., Rara, M., Jank, P., Lossow, C., Alberty, H., Kamm, K., Sanger, H. L. (1982). Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. *European Journal of Biochemistry*, 121: 249-257.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Nhami A., Kissi A. (1978). Inventaires des viroses et des maladies similaires affectant le verger agrumicole marocain. *Maroc Fruits*, 529: 5-12.
- Nhami A., Bourge, J. J. (1979). Sélection sanitaire en agrumiculture au Maroc. *Al-Awamia*, 57: 29-39.
- Nhami A., Zidane, A. (1984). Une contribution de la SODEA: amélioration sanitaire des agrumes. *Maroc Fruits*, 616: 2-3.
- Palacio A., Foissac X., Duran-villa N. (2000). Indexing of citrus viroids by imprint hybridization: comparison with other detection methods: da Graça J. V., Lee R. F et Yokomi R. H. (eds). In: *Proc. 14th Conf. Int. Org. Citrus Virologists (IOCV)*, Riverside, CA, pp. 284-301.
- Roistacher C.N. (1991). Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. *FAO Eds*, Rome, 286 pp.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. <http://www.kumarlab.net/publications>
- Visvader J. E., Symons R. H. (1985): Eleven new sequence variants of *Citrus exocortis viroid* and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Research*, 13: 2907-2920.
- Wang X. F., Zhou C. Y., Tang K. Z., Zhou Y., Li Z. A. (2009). A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. *European Journal of Plant Pathology*, 124:175-180.
- Yang X., Hadidi A., Garnsey S. M. (1992). Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology*, 82: 279-285.