

الكشف والتوصيف الجزيئي لفيروس موزاييك البطيخ الأحمر Watermelon mosaic virus (WMV) المنتشر على القرعيات في الساحل السوري

أحمد محمد مهنا¹، اوس علي حسن² وهند نعمان حرحوش العبيدي³

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية وكلية الطب، الجامعة السورية الخاصة (SPU)، سورية،
البريد الإلكتروني: A.M.Mouhanna@gmail.com؛ (2) مركز بحوث ودراسات مكافحة الحيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية؛
(3) المنصور، وزارة التجارة، بغداد العراق.

الملخص

مهنا، أحمد محمد، اوس علي حسن وهند نعمان حرحوش العبيدي. 2021. الكشف والتوصيف الجزيئي لفيروس موزاييك البطيخ الأحمر Watermelon mosaic virus (WMV) المنتشر على القرعيات في الساحل السوري. مجلة وقاية النبات العربية، 39(1): 47-54.

استخدمت طرائق الكشف المصلية والجزيئية لتوصيف العزلات المحلية لفيروس موزاييك البطيخ الأحمر (WMV) المنتشرة في الساحل السوري، حيث طبقت تقانة إليزا بالاحتواء المزدوج بالأجسام المضادة (DAS-ELISA) على 293 عينة لنباتات أظهرت أعراض إصابة فيروسية (البطيخ الأحمر، الكوسا، القرع، الخيار، الفليفلة، الفاصولياء، البطاطا/البطاطس) جمعت من عدد من حقول محافظتي اللاذقية وطرطوس. أظهرت النتائج إصابة هذا الفيروس لنباتات البطيخ الأحمر، الكوسا، القرع والخيار ونسبة 36.95، 26.31، 29.27 و 37.70%، على التوالي، من مجموع العينات المدروسة. كما بينت النتائج إصابة نبات الفليفلة بهذا الفيروس للمرة الأولى في سورية بنسبة 2.94% من النباتات التي فحصت، فيما لم يسجل وجود الفيروس في كل من عينات نباتي البطاطا/البطاطس والفاصولياء. تم تأكيد النتائج السابقة باستخدام تقانة البوليمراز المتسلسل مع النسخ العكسي (RT-PCR) لعدد من العينات. بينت دراسة شجرة القرابة الوراثية اعتماداً على التتابع النيوكليوتيدي لمورثة الأجسام الضمنية في السيتوبلازم (CI). تموضعت العزلة المحلية Cu4 في تحت مجموعة واحدة إلى جانب السلالة الإيرانية [EU660584.1] حيث بلغت نسبة التوافق بينهما 98.9%، وكانت السلالة التركية [EU660579] الأقرب للعزلة المحلية Wa2، وبلغت نسبة التوافق بينهما 98.3%. بينما تموضعت كل من العزلات المحلية Cu8 و Zu6 في تحت مجموعة واحدة بنسبة تطابق 99.3%.

كلمات مفتاحية: فيروس موزاييك البطيخ الأحمر، إليزا، RT-PCR، شجرة القرابة الوراثية.

المقدمة

للفاصولياء (Bean common mosaic virus) مع فيروس الفول السوداني الشريطي (Peanut stripe virus) (Ali & Natsuaki, 2007). تحرض الإصابة بهذا الفيروس على تشكيل أجسام بروتينية ضمنية أسطوانية في سيتوبلازم النبات العائل (Aisan et al., 2012). يتكون مجين الفيروس WMV من قطعة واحدة بطول يصل إلى 10000 نيوكليوتيد من الحمض الريبي النووي أحادي السلسلة موجب القطب (+ssRNA)، والذي يتوضع ضمن غلاف بروتيني خيطي من بطول 760 و قطر 15 نانومتر (Shukla et al., 1998). ينتقل فيروس WMV بالطريقة غير المثابرة بوساطة 29 نوعاً من حشرات المن مثل منّ الدراق الأخضر (*Myzus persicae* Sulzer.) ومنّ البقوليات الأسود (*Aphis craccivora* Koch.) ليصيب معظم نباتات العائلة القرعية (Edwardson & Christie, 1997).

يتبع فيروس موزاييك البطيخ الأحمر Watermelon mosaic virus (WMV) لجنس *Potyvirus* من عائلة *Potyviridae* والذي يعدّ ثاني أكبر جنس في الفيروسات النباتية من حيث عدد الأنواع، بعد جنس *Begomovirus*، إذ أنه يضم 168 نوعاً فيروسياً (Wylie et al., 2017). ينتشر هذا الفيروس غالباً في المناطق المدارية، وقد سجل في جميع مناطق زراعة القرعيات في العالم مسبباً خسائر اقتصادية كبيرة (Kumar et al., 2015). عرّف فيروس WMV للمرة الأولى على نبات الكوسا (*Cucurbita pepo* var. *cylindrical*) في ولاية فلوريدا الأمريكية، وتؤكد الدراسات أن هذا الفيروس تشكل بناءً على إعادة تركيب بين الأنواع (Interspecific recombination) للمادة الوراثية لفيروس موزاييك فول الصويا (*Soybean mosaic virus*) والموزاييك الشائع

محافظات اللاذقية وطرطوس خلال الفترة الواقعة بين أيار/مايو وتشرين الأول/أكتوبر 2016. جُمع حوالي 293 عينة ورقية (جدول 1)، من نباتات أظهرت أعراضاً شبيهة بالأعراض النموذجية التي يسببها فيروس WMV (شكل 1) ووضعت في الأزوت السائل مباشرة ثم نقلت إلى المختبر وحفظت ضمن المجمدة عند درجة حرارة -70 °س لحين إجراء الاختبارات عليها.



شكل 1. أعراض الإصابة في بعض العينات النباتية التي جمعت. (A) أعراض الموزايك على أوراق الكوسا، (B) أعراض الموزايك على أوراق الفاصولياء.

Figure 1. Symptoms observed on some plant samples. (A) Mosaic symptoms on zucchini leaves, (B) Mosaic symptoms on common bean leaves.

الاختبار المصلي

استخدم اختبار إليزا بالاحتواء المزوج بالأجسام المضادة (DAS-ELISA) للكشف المصلي عن فيروس WMV. استخدم لإجراء هذا الاختبار طقم أدوات إختبار إليزا للكشف عن WMV-2 ذو الرقم 161175 من شركة Bioreba. تمت قراءة الأطباق عند طول موجة 405 نانومتر باستخدام قارئ الإليزا (ELISA Microplate Reader) نوع D.E.E.READ من شركة DiaMedEuroGen. اعتبرت العينة مصابة بالفيروس إذا تجاوز امتصاصها للضوء قيمة المتوسط الحسابي لقراءات امتصاص عينات الشاهد السليم مضافاً له 3 أضعاف قيمة الانحراف المعياري لقراءات الشاهد السليم.

يعدّ الموزايك والتبرقش من أهم الأعراض العامة التي تسببها الإصابة بهذا الفيروس، وتختلف أعراض الإصابة حسب النبات العائل والظروف البيئية حيث تؤدي الإصابة به لحدوث موزايك جهازى وتشوه الأوراق عند نبات الكوسا. بينما تظهر الإصابة على شكل موزايك أوراق وتشوه الثمار عند نبات البطيخ الأحمر (*Citrullus lanatus*) (Ali & Natsuaki, 2007). لهذا الفيروس مدى عوائل واسع من نباتات الفصيلة القرعية (Cucurbitaceae)، البقولية (Leguminosae)، الخبازية (Malvaceae)، الباذنجانية (Solanaceae) والسرمدية (Chenopodiaceae)، ويعد من أوسع فيروسات جنس *Potyvirus* لناحية المدى العائلي، إذ يصيب بالعدوى الميكانيكية ما يزيد على 170 نوعاً نباتياً تنتمي لـ 27 عائلة نباتية مختلفة (Kamberoglu et al., 2015). سُجّل وجود WMV مصلياً في جنوب سورية على نبات الكوسا (Kawas, 2005)، كما تم الكشف مصلياً عن انتشاره على محصولي البطيخ الأحمر والبطيخ الأصفر (*Cucumis melo*) في المنطقة الوسطى في كل من محافظات حمص وحماة وإدلب (الشعبي وآخرون، 2006)، وكشف عنه مصلياً من قبل حاج قاسم وآخرون (2005) في عدد من محاصيل القرعيات في بعض المحافظات في سورية. لا توجد حتى الآن أية دراسات جزيئية حول هذا الفيروس لتحديد السلالات المحلية المنتشرة على محاصيل الخضار في الساحل السوري. لذلك هدف هذا البحث للكشف المصلي والجزيئي عن وجود وانتشار WMV بالإضافة لإجراء توصيف جزيئي بهدف تحديد السلالات المحلية المنتشرة.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات وحفظها

جُمعت العينات من عدد من الحقول المزروعة بنباتات البطيخ الأحمر، الكوسا، القرع، الخيار، الفليفلة، البطاطا/البطاطس والفاصولياء ضمن

جدول 1. نوع العائل النباتي وعدد العينات النباتية التي جمعت. **Table 1.** Host plant species and number of collected plant samples.

عدد العينات Number of Samples	الاسم العلمي Scientific Name	الاسم الشائع Common Name	الاسم الشائع Common Name
46	<i>Citrullus lanatus</i>	Watermelon	البطيخ الأحمر
57	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>cylindrica</i>	Zucchini	الكوسا
41	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i>	Pumpkin	القرع
61	<i>Cucumis sativus</i>	Cucumber	الخيار
34	<i>Capsicum annum</i>	Pepper	الفليفلة
29	<i>Solanum tuberosum</i>	Potato	البطاطا/البطاطس
25	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Common bean	الفاصولياء
293		Total	المجموع

الاختبارات الجزيئية

لتأكيد نتائج الدراسة المصلية اختيرت 10 عينات (جدول 2) من مجموع العينات واستخلص منها RNA باستخدام طقم أدوات Invitrap® spin plant RNA isolation mini kit وفقاً لتعليمات الشركة الصانعة.

اختبار تفاعل البوليمراز المتسلسل مع النسخ العكسي RT-PCR للكشف عن فيروس WMV

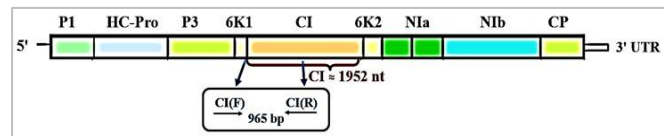
استخدم للكشف عن فيروس WMV زوج البادئات

CI(R): 5'-CCCATCTGCATAGTTCTACC-3'

CI(F): 5'-GGCTTTACTGACCATGTGCA-3'

(Barbosa *et al.*, 2016) والذي يضخم قطعة بطول 965 bp من مورثة

بروتين الضمين السيتوبلازمي الإسطواني (Cylindrical Inclusion) (CI) (شكل 2).



شكل 2. تنظيم المجين لفيروس موزايك البطيخ الأحمر WMV والموقع النسبي لارتباط البادئ CI(F)/CI(R).

Figure 2. Genome organization of Watermelon mosaic virus (WMV) and relative attachment position of CI(F)/CI(R) primers.

تم اختبار الـ RT-PCR بحجم تفاعل كلي 25 ميكروليتر باستخدام نظام Access RT-PCR من شركة Promega. حُضِر المزيج في أنابيب PCR معقمة بسعة 200 ميكروليتر، حسب التراكيز والكميات الموصى بها في بروتوكول الشركة المصنعة، واستخدم لهذا التفاعل جهاز

جدول 2. العينات النباتية المستخدمة في الدراسة الجزيئية.

TC-5000 Thermocyclertechnique Ltd. (UK) حسب البرنامج التالي: دورة واحدة للنسخ العكسي (Reverse Transcription) لمدة 45 دقيقة عند حرارة 45 °س، أتبعته بدورة واحدة لمدة دقيقتين عند حرارة 94 °س لتخريب أنزيم النسخ العكسي والتخلص من الـ RNA المتبقي. تلى ذلك 40 دورة على الشكل التالي: 30 ثانية عند درجة حرارة 94 °س لفصل سلسلتي الـ DNA (Denaturation)، 45 ثانية لالتحام زوج البادئات (Annealing) عند حرارة 50 °س، 75 ثانية عند حرارة 68 °س للإطالة (Extension). وختم البرنامج بدورة واحدة لمدة 8 دقائق عند حرارة 68 °س للإطالة النهائية (Final Extension). ثم رُجِلت نواتج التضخيم على هلام من الأغاروز تركيز 1.5%.

دراسة التتابع النيوكليوتيدي للعزلات المحلية لفيروس WMV

لدراسة العزلات المحلية لفيروس WMV من حيث قرابتها الوراثية مع غيرها من السلالات المعروفة عالمياً، درس تتابع النيوكليوتيدات للسلسلة المضخمة وقورنت مع التتابع النيوكليوتيدي لـ 22 سلالة عالمية من فيروس WMV.

التحليل الإحصائي

استخدم لقراءة وتحليل التتابع النيوكليوتيدي لقطعة الـ DNA عدة برامج منها: BlastN/Nucleotide blast، وبرنامج المحاذاة Alignment، ورسمت الشجرة الوراثية ClustalX الإصدار الثاني بالاعتماد على طريقة Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987)، وبرنامج MegAlign الإصدار السابع لشركة DNASTAR (2007) لتحديد قيم Bootstrap ونسب القرابة الوراثية بين السلالات المحلية وبعض السلالات العالمية.

Table 2. Plant samples used for molecular assays.

Symptoms	الأعراض	Variety	الصنف	Plant Host	العائل النباتي	رمز العينة/العزلة Isolate code	المحافظة/الموقع Governorate/ Location
طرطوس Tartus							
Mottling	تبرقش	Apolo	أبولو	Cucumber	خيار	Cu1	Bosaireh بصيرة
Severe mosaic	موزايك شديد	Impala	إمبالا	Watermelon	بطيخ أحمر	Wa2	Banias بانياس
Mosaic & crinkling	موزايك وتجدد أوراق	Local	بلدي	Common bean	فاصولياء	Ps3	Safita صافيتا
Mottling	تبرقش	Good	جود	Cucumber	خيار	Cu4	Kartu كرتو
اللاذقية Lattakia							
Mottling	تبرقش	Impala	إمبالا	Watermelon	بطيخ أحمر	Wa5	Siano سيانو
Mosaic & necrosis	موزايك ويقع متموتة	Mabrokeh	مبروكة	Zucchini	كوسا	Zu6	Al-Edia العيدية
Mosaic	موزايك	Local	بلدي	Pumpkin	قرع	Pu7	Zuhairiat الزهريات
Severe mosaic	موزايك شديد	Prince	الأمير	Cucumber	خيار	Cu8	Ras Ain راس العين
Mosaic & crinkling	موزايك وتجدد أوراق	Vicuna	فيكونا	Pepper	فليفلة	Pe9	Siano سيانو
Severe mosaic	موزايك شديد	Fabula	فابولا	Potato	بطاطا/بطاطس	Po10	Siano سيانو

نتائج الدراسة المصلية

بيّنت نتائج فحص 293 عينة لوجود فيروس WMV، حيث أعطى اختبار إليزا تفاعلاً إيجابياً مع العينات المأخوذة من نباتات البطيخ الأحمر، الكوسا، القرع، الخيار والفليفلة وبنسب مختلفة. بلغ مجموع العينات التي تفاعلت إيجابياً 68 عينة بنسبة 23.21%، وكانت أعلى نسبة إصابة في نباتات الخيار التي بلغت 37.7% من مجموع 61 عينة خيار، فيما كانت أقل نسبة إصابة في عينات نبات الفليفلة، وذلك بإصابة عينة واحدة فقط من مجموع 34 عينة فليفلة، أي بنسبة إصابة 2.94%. ولم تتفاعل أي من العينات التي أظهرت أعراض موزاييك لنباتات البطاطا/البطاطس والفاصولياء مع المصل المضاد لفيروس WMV (جدول 3).

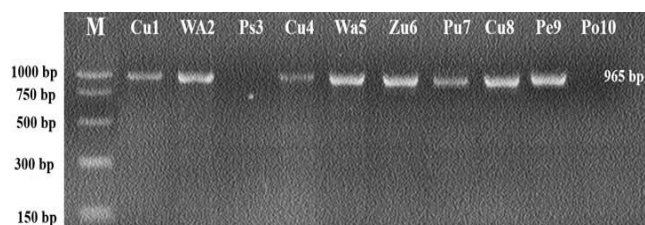
جدول 3. النسبة المئوية للإصابة بفيروس WMV في العينات التي جمعت وظهر عليها أعراض توحى بإصابة فيروسية والتي جمعت من أنواع نباتية مختلفة.

Table 3. Percentage of WMV-infected samples in the total samples with symptoms suggestive of virus infection and collected from different plant species.

النبات العائل	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الإيجابية	النسبة المئوية
Host plant species	No. of tested samples	No. of WMV-infected samples	%
البطيخ الأحمر	46	17	36.95
الكوسا	57	15	26.31
القرع	41	12	29.27
الخيار	61	23	37.70
الفليفلة	34	1	2.94
البطاطا/البطاطس	29	0	0.00
الفاصولياء	25	0	0.00
المجموع	293	68	

نتائج الدراسة الجزيئية

أظهرت نتائج تفاعل البوليمراز المتسلسل مع النسخ العكسي (RT-PCR) أن ثمان عيناتٍ من أصل عشرة وهي العزلات Cu4، Cu1، Cu8 من الخيار و Wa2، Wa5، بطيخ و Zu6 و كوسا و Pu7 و قرع و Pe9 و فليفلة كانت مصابة بفيروس WMV أعطت كل منها حزمة واحدة بطول 965 زوج قاعدي (bp)، بينما لم تتفاعل باقي العينات ولم تعط أي حزمة (شكل 3).



شكل 3. الكشف عن إصابة العينات النباتية بفيروس موزاييك البطيخ الأحمر (WMV) بواسطة اختبار RT-PCR وباستخدام البادئات CI(F)/CI(R) والتي أنتجت قطعة بحجم 965 زوج قاعدي.

Figure 3. Detection of Watermelon mosaic virus (WMV) by RT-PCR test using CI(F)/CI(R) primers, which produced an amplicon of 965 bp.

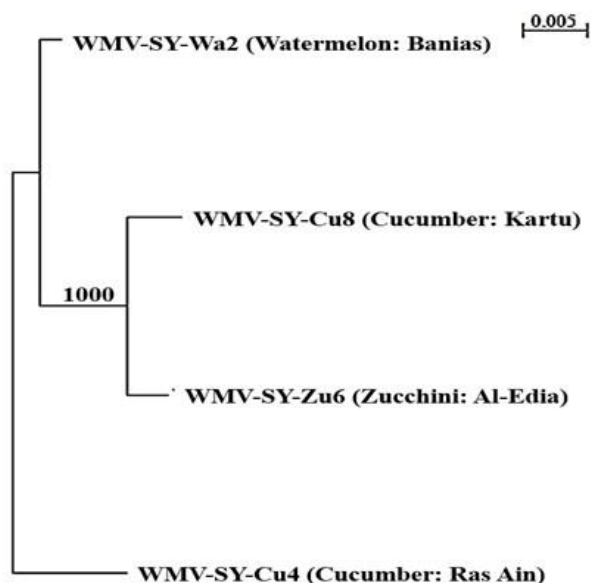
تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلات من فيروس WMV ومعرفة درجة القرابة الوراثية فيما بينها

حدد تتابع النيوكليوتيدات في القطعة المضخمة (965 نيوكليوتيد) من المورثة CI للعزلات المحلية Wa2، Cu4، Cu6 و Cu8 لفيروس WMV. أظهرت شجرة القرابة الوراثية انقسام هذه العزلات إلى تحت مجموعتين (شكل 4). تضم تحت المجموعة الأولى كلاً من العزلات Wa2، Zu6 و Cu8 لنباتات البطيخ والكوسا والخيار، على التوالي، وبلغت أعلى نسبة تطابق بين العزلتين Zu6 و Cu8 لنباتي الكوسا صنف مبروكة والخيار صنف الأمير من منطقتي العيادية ورأس العين في محافظة اللاذقية وبنسبة تطابق 99.3%، بينما انفردت العزلة الفيروسية Cu4 من نبات الخيار صنف جود من منطقة كرتو في محافظة طرطوس بمفردها تحت مجموعة أخرى وبلغت أعلى نسبة تطابق لها مع العزلة Wa2 لنبات البطيخ صنف إنبالا من منطقة بانياس في محافظة طرطوس بنسبة تطابق 96.5% (جدول 4).

جدول 4. نسب التطابق والاختلاف بين العزلات المحلية Wa2، Cu4، Cu6 و Cu8 لفيروس WMV.

Table 4. Average nucleotide identity (ANI) divergence between the local WMV isolates Wa2, Cu4, Zu6 and Cu8.

		Percent Identity				
		1	2	3	4	
Divergence	1	■	96.5	94.1	94.6	1 WMV-SY-Cu4
	2	3.6	■	97.6	96.9	2 WMV-SY-Wa2
	3	6.2	2.4	■	99.3	3 WMV-SY-Zu6
	4	5.6	3.2	0.7	■	4 WMV-SY-Cu8
		1	2	3	4	



شكل 4. شجرة القرابة الوراثية للعزلات المحلية Wa2 و Cu4 و Zu6 و Cu8 و لفيروس موزاييك البطيخ (WMV).

Figure 4. Phylogenetic tree for local WMV isolates Wa2, Cu4, Zu6 and Cu8.

تعد تقانة الـ RT-PCR في الكشف عن الفيروسات النباتية ذات حساسية عالية تفوق الاختبارات المصلية وبخاصة عندما يكون تركيز الفيروس في الأنسجة النباتية ضعيفاً، لذا اعتمد عليها في تأكيد نتائج الدراسة المصلية (Jan et al., 2011). أظهرت نتائج اختبار الـ RT-PCR باستخدام زوج البادئات CI(F)/CI(R) أن ثمان من أصل عشرة عينات من نباتات خيار، بطيخ أحمر، كوسا، يقطين، فليفلة ظهرت عليها أعراض موزاييك كانت مصابة بفيروس موزاييك البطيخ الأحمر (WMV).

أشارت دراسات سابقة إلى أن مورثة الأجسام الضمنية في السيتوبلازم (CI) هي مورثة ذات تتابع نيوكليوتيدي ثابت بشكل كبير ضمن الفيروسات التي تتبع جنس *Potyvirus* (Zheng et al., 2010)، وعليه يمكن الاعتماد على دراسة تتابع النيوكليوتيدات لها في تحديد التنوع الوراثي للسلاسل المختلفة لفيروسات هذا الجنس ومنها فيروس موزاييك البطيخ (WMV) (Barbosa et al., 2016). حدد تتابع النيوكليوتيدات لمورثة CI في القطعة المضخمة (965 نكليوتيد) من العزلات المحلية Wa2 و Cu4 و Zu6 و Cu8 لفيروس موزاييك البطيخ (WMV) بهدف دراسة التنوع الوراثي لهذه العزلات.

وعند مقارنة النتائج النيوكليوتيدي للعزلات المحلية بغيرها من السلالات العالمية والمسجلة في البنك الوراثي العالمي، بينت شجرة القرابة الوراثية ظهور العزلة المحلية Cu4 المأخوذة من نبات خيار من منطقة كرتو في محافظة طرطوس في تحت مجموعة واحدة إلى جانب السلالة الإيرانية [EU660584.1]، وبلغت نسبة التطابق بينهما 98.9% (جدول 5)، وبلغت قيمة Bootstrap عند العقدة المشتركة 82.5%، وكانت السلالة التركية [EU660579] الأقرب للعزلة المحلية Wa2 المأخوذة من نبات البطيخ الأحمر من منطقة بانياس شمال محافظة طرطوس، وبلغت نسبة التطابق بينهما 98.3% (جدول 5)، وبلغت قيمة Bootstrap عند العقدة المشتركة لهما 82.6% (شكل 5).

بينما تموضعت العزلتان Zu6 و Cu8 المأخوذتان من نباتي الكوسا والخيار من قريتي العديدة والزهريرات، على التوالي، بمنطقة جبلة في تحت مجموعة واحدة وبلغت نسبة التطابق بينهما 99.3% (جدول 5)، كما بلغت قيمة Bootstrap عند العقدة المشتركة لهما 91.8% (شكل 5).

المناقشة

أظهرت نتائج الدراسة المصلية تسجيل انتشار واسع لفيروس موزاييك البطيخ الأحمر (WMV) على النباتات المدروسة للعائلة القرعية (البطيخ الأحمر، الكوسا، القرع، الخيار) وهذا يتوافق مع ما ذكره حاج قاسم وآخرون في عام 2005 عن انتشار فيروس موزاييك البطيخ الأحمر (WMV) في محاصيل القرعيات في محافظات حلب وإدلب وحماة وحمص واللاذقية وطرطوس. كما سُجِّل انتشار فيروس موزاييك البطيخ الأحمر (WMV) على نبات الفليفلة للمرة الأولى في سورية وهذا يتفق مع ما ذكره Hajizadeh & Mohammadi (2016) من أن الفليفلة يمكن أن تصاب بفيروس موزاييك البطيخ الأحمر (WMV)، فيما لم يسجل الفيروس على نباتي الفاصولياء والبطاطا/البطاطس المدروسة، الأمر الذي يتوافق مع مختلف الدراسات العالمية التي تؤكد مناعة نبات الفاصولياء للإصابة بهذا الفيروس (Fisher & Kyle, 1996)، بالرغم من محاولات إجراء العدوى الاصطناعية في كل من إيران (Sharifi et al., 2008) وإسبانيا (Moreno et al., 2004) والصين (Dong & Guan, 2017). فيما قد يعزى عدم تفاعل عينات نبات البطاطا/البطاطس (برغم ظهور أعراض الموزاييك) إلى إصابتها بأحد الفيروسات التي قد تتبع جنس *Potyvirus* والتي تؤدي بمعظمها لأعراض موزاييك تتشابه مع الأعراض التي يسببها فيروس موزاييك البطيخ الأحمر (WMV).

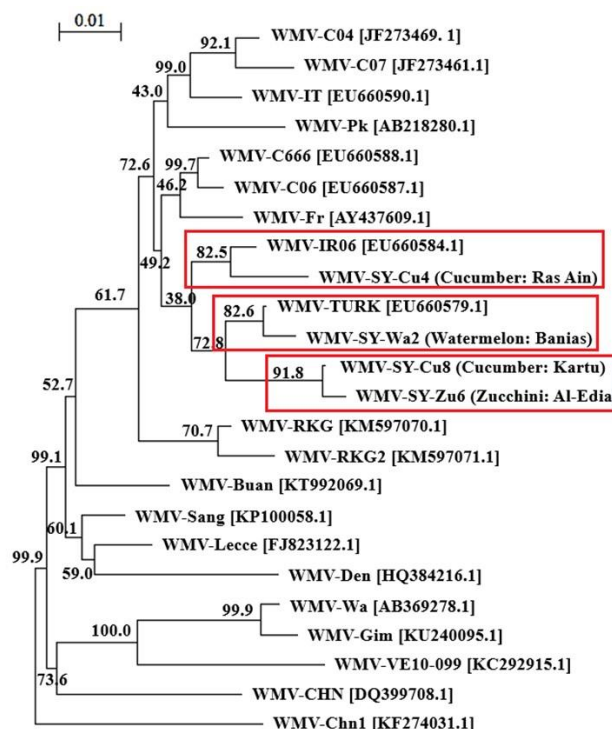
جدول 5. نسب التطابق والاختلاف بين العزلات المحلية Wa2، Cu4، Cu8 و Cu8 و فيروس موزاييك البطيخ (WMV) وبعض العزلات/السلالات العالمية.

Table 5. Average nucleotide identity (ANI) divergence between local WMV isolates Wa2, Cu4, Zu6 and Cu8 compared with some global isolates/strains.

		Percent Identity																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
Divergence	1	89.5	95.7	96.7	89.1	93.6	97.6	97.5	98.1	97.8	91.4	98.3	89.4	97.1	82.2	94.7	97.3	94.8	97.7	94.3	96.8	96.2	93.8	94.5	1	WMV-Fr	
	2	11.6	90.2	90.9	93.6	88.8	89.5	89.4	90.0	89.5	91.8	89.6	96.5	88.8	82.4	89.8	89.0	89.6	89.4	89.2	88.8	88.0	88.8	89.5	2	WMV-Gim	
	3	4.5	10.8	98.1	90.5	94.2	95.5	95.9	95.8	95.4	91.6	95.9	90.4	95.2	82.9	93.6	95.0	95.1	95.0	96.3	94.5	93.9	93.4	94.1	3	WMV-RKG2	
	4	3.4	10.0	1.9	90.7	93.3	97.0	97.3	96.8	96.5	91.6	96.9	91.1	96.1	82.6	94.1	96.5	95.0	96.1	94.4	95.5	94.8	94.1	94.8	4	WMV-RKG	
	5	12.0	6.8	10.4	10.2	88.5	89.5	89.1	89.8	88.9	90.4	89.2	93.4	88.8	82.4	89.4	88.9	88.8	89.0	89.3	88.4	87.4	90.1	90.7	5	WMV-VE10-099	
	6	6.8	12.5	6.1	7.1	12.8	93.1	93.0	93.2	93.2	89.8	93.4	88.5	92.8	82.8	92.4	92.8	94.2	93.0	94.5	92.2	91.6	89.9	90.7	6	WMV-Den	
	7	2.4	11.6	4.6	3.1	11.6	7.4	98.9	97.8	97.2	90.7	98.0	89.6	97.2	82.8	94.4	99.3	94.6	97.2	93.6	96.3	95.5	93.3	94.0	7	WMV-C04	
	8	2.5	11.7	4.3	2.8	12.1	7.5	1.2	97.7	97.5	90.6	97.9	90.0	97.3	82.8	94.3	98.8	94.5	97.1	93.5	96.6	95.9	93.7	94.4	8	WMV-IT	
	9	1.9	11.1	4.4	3.3	11.3	7.3	2.2	2.3	97.9	92.0	99.2	89.9	97.3	83.1	94.9	97.5	94.8	98.1	94.1	97.2	96.2	93.9	94.6	9	WMV-C06	
	10	2.2	11.6	4.7	3.6	12.3	7.3	2.9	2.5	2.1	91.3	98.1	89.3	97.2	83.1	94.5	96.9	94.4	97.7	93.9	98.0	98.3	95.6	96.4	10	WMV-TURK	
	11	9.3	8.9	9.1	9.1	10.6	11.3	10.2	10.3	8.6	9.4	91.6	91.9	91.0	82.8	90.5	90.2	91.0	90.8	91.1	90.2	89.8	89.3	89.9	11	WMV-CHN	
	12	1.7	11.5	4.3	3.2	11.9	7.0	2.0	2.1	0.8	1.9	9.1	89.5	97.5	82.9	95.2	97.7	94.9	98.3	94.1	97.4	96.5	93.8	94.5	12	WMV-C666	
	13	11.7	3.6	10.6	9.7	7.1	12.9	11.5	11.1	11.2	11.8	8.7	11.6	89.1	82.5	90.0	89.1	89.9	89.3	89.5	88.9	87.8	88.7	89.4	13	WMV-Wa	
	14	3.0	12.5	5.0	4.1	12.5	7.8	2.9	2.8	2.8	2.9	9.8	2.5	12.1	82.9	94.1	96.9	94.7	97.3	93.7	96.7	95.5	93.3	94.0	14	WMV-Pk	
	15	21.1	20.9	20.1	20.5	20.9	20.2	20.3	20.2	19.8	19.9	20.2	20.1	20.7	20.1	83.3	82.5	84.1	83.7	83.9	83.4	81.8	81.3	81.9	15	WMV-Chn1	
	16	5.5	11.3	6.8	6.2	11.7	8.1	5.9	6.0	5.3	5.8	10.4	5.0	11.1	6.2	19.5	94.2	94.3	94.5	93.2	93.6	93.1	91.0	91.7	16	WMV-Buan	
	17	2.8	12.2	5.2	3.6	12.3	7.7	0.7	1.3	2.5	3.2	10.8	2.3	12.1	3.2	20.7	6.1	94.1	97.0	93.1	96.0	95.2	93.1	93.8	17	WMV-C07	
	18	5.4	11.5	5.1	5.2	12.5	6.1	5.7	5.8	5.4	5.9	9.8	5.3	11.2	5.6	18.5	6.0	6.2	94.1	95.4	93.5	92.9	90.6	91.3	18	WMV-Sang	
	19	2.3	11.7	5.2	4.1	12.2	7.5	2.9	3.0	1.9	2.3	10.1	1.7	11.9	2.8	18.9	5.8	3.1	6.3	93.5	98.9	96.1	93.6	94.3	19	WMV-IR02-54	
	20	6.0	12.0	3.9	5.9	11.8	5.8	6.8	6.9	6.2	6.5	9.7	6.2	11.6	6.7	18.8	7.3	7.4	4.7	6.9	92.9	92.3	90.8	91.5	20	WMV-Lecce	
	21	3.3	12.5	5.7	4.6	12.9	8.3	3.9	3.5	2.9	2.0	10.8	2.6	12.3	3.4	19.3	6.8	4.2	6.9	1.1	7.6	96.6	94.1	94.6	21	WMV-SY-Cu4	
	22	3.9	13.4	6.4	5.4	14.1	9.0	4.6	4.3	3.8	1.7	11.2	3.6	13.6	4.6	21.6	7.3	4.9	7.6	4.0	8.2	3.5	94.2	94.7	22	WMV-SY-Wa2	
	23	6.5	12.4	7.0	6.2	10.9	11.0	7.1	6.7	6.4	4.5	11.7	6.5	12.6	7.1	22.2	9.8	7.4	10.3	6.8	10.0	6.2	6.1	99.3	23	WMV-SY-Zu6	
	24	5.7	11.6	6.2	5.4	10.2	10.1	6.3	5.9	5.6	3.7	11.0	5.8	11.7	6.3	21.6	8.9	6.6	9.5	6.0	9.2	5.6	5.5	0.7	24	WMV-SY-Cu8	

بينت شجرة القرابة الوراثية للعزلات المحلية انقسام هذه العزلات إلى تحت مجموعتين: ضمت تحت المجموعة الأولى العزلات Wa2 و Cu8 و Cu4 المأخوذة من نباتات البطيخ والكوسا والخيار من مناطق بانياس (طرطوس) والعبيدية (اللاذقية) ورأس العين (اللاذقية)، على التوالي. بلغت أعلى نسبة تطابق 99.3% بين العزلتين Cu8 و Zu6 من نباتي الكوسا والخيار من محافظة اللاذقية، بينما تموضعت العزلة Cu4 المأخوذة من نبات خيار من منطقة كرتو (طرطوس) بمفردها في تحت مجموعة متصلة وبلغت أعلى نسبة تطابق لها 96.5% مع العزلة Wa2 المأخوذة من نبات البطيخ، علماً أن كلتا العزلتين Wa2 و Cu4 مأخوذتين من محافظة طرطوس، وهذا يشير لانتشار أكثر من سلالة للفيروس في الساحل السوري الأمر الذي يتطلب دراسة هذه العزلات بطرائق أكثر دقة لتعريف وتحديد هذه السلالات وتوزعها وتحديد قدرتها الإمراضية.

أظهرت شجرة القرابة الوراثية للعزلات المحلية لفيروس موزاييك البطيخ (WMV)، مقارنة مع سلالات عالمية مسجلة في البنك الوراثي، بأن العزلة المحلية Cu4 المأخوذة من نبات خيار من منطقة كرتو(طرطوس) تموضعت في تحت مجموعة واحدة إلى جانب السلالة الإيرانية [EU660584.1]، وبلغت نسبة التطابق بينهما 98.9%، بينما كانت السلالة التركية [EU660579] الأقرب للعزلة المحلية Wa2



شكل 5. شجرة القرابة الوراثية للعزلات المحلية Wa2، Cu4، Cu8 و Cu8 و فيروس موزاييك البطيخ (WMV) مقارنة مع سلالات عالمية.

امتداد جغرافي واحد (سهل جبلة وبانياس) والتي تقاربت مع العزلة التركية، ما يؤشر لوجود تنوع وراثي للعزلات المحلية لهذا الفيروس في سورية يمكن تعليقه بالمعدل العالي لتطفر فيروس WMV نتيجة عمليات إعادة التركيب المتعددة Multiple recombination لمادته الوراثة (Desbiez & Lecoq, 2008)، بالإضافة لأخذ العينات من مصادر نباتية مختلفة الأمر الذي قد يؤثر في نوع العزلة الفيروسيه لفيروس WMV (Hajizadeh et al., 2017)، وبالتالي لا بد من تحديد التتابع النيكلوتيدي لكامل المجين لمعرفة السلالات المحلية لفيروس موزاييك البطيخ (WMV) والمنتشرة على عدد كبير من العوائل النباتية مسببة خسائر اقتصادية فادحة في مختلف مناطق القطر ولمقارنة هذه السلالات المحلية مع السلالات المنتشرة في الدول المجاورة بهدف تحديد درجة القرابة ونشوء وتطور هذا الفيروس في سورية.

المأخوذة من نبات بطيخ من منطقة بانياس (طرطوس)، حيث بلغت نسبة التطابق بينهما 98.3%، وبلغت قيمة Bootstrap عند العقدة المشتركة لهما 82.6%. بينما توضعت كل من العزلات المحلية Cu8 و Zu6 للمأخوذة من نباتي الكوسا والخيار من منطقتي العيضية ورأس العين بمحافظة اللاذقية في تحت مجموعة واحدة وبلغت نسبة التطابق بينهما 99.3%، كما بلغت قيمة Bootstrap عند العقدة المشتركة لهما 91.8%. وقد يعود ارتفاع نسبة الاختلاف بين السلالتين إلى المعدل العالي للتطفر عند الفيروسات ذات الحمض النووي RNA ما يؤدي لاختلافات كبيرة في تسلسل النيكلوتيدات (Malpica et al., 2002). أشارت النتائج أن العزلات المحلية انقسمت إلى قسمين حيث تقاربت العزلة Cu4 مع العزلة الإيرانية التي تعتبر نسبياً معزولة جغرافياً عن باقي العزلات المحلية Wa2، Cu8 و Zu6، Cu8 و Zu6 للمأخوذة من مناطق ذات

Abstract

Mouhanna, A.M., A.A. Ali Hasan and H.N.H. Alobaidi. 2021. Detection and Molecular Characterization of Watermelon Mosaic Virus (WMV) Spread Along the Syrian Coast. Arab Journal of Plant Protection, 39(1): 47-54.

Identification of local isolates of Watermelon mosaic virus (WMV) was investigated using serological and molecular methods. A total of 293 leaf samples from watermelon, zucchini, pumpkin, cucumber, pepper, beans and potato, with symptoms suggestive of virus infection, were collected from fields in two Syrian governorates (Latakia, Tartus) along the Syrian coast. DAS-ELISA tests revealed the presence of WMV in watermelon, zucchini, pumpkin and cucumber samples, with an average relative incidence of 36.95, 26.31, 29.27 and 37.70%, respectively. The infection of pepper with Watermelon mosaic virus was reported for the first time in Syria, with an average relative incidence of 2.94%. WMV was not detected in potato and beans, and these results were confirmed by RT-PCR. The local WMV isolate Cu4 was grouped with an Iranian isolate [EU660584.1] with 98.9% sequence identity. A Turkish isolate [EU660579] was grouped with local WMV isolate Wa2 with 98.3% sequence identity. Furthermore, two local isolates Zu6 and Cu8 represented one sub-group with 99.3% sequence identity.

Keywords: Watermelon mosaic virus, DAS-ELISA, RT-PCR, CI, Phylogenetic Tree.

Affiliation of authors: Ahmad M. Mouhanna¹, A.A. Ali Hasan² and H.N.H. Alobaidi³. (1) Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Damascus University & Faculty of Medicine, Syrian Private University (SPU), Syria, Email: A.M.Mouhanna@gmail.com; (2) Biological Control Studies and Research Center (BCSRC), Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria; (3) Al-Mansour, Ministry of Trade, Baghdad, Iraq.

References

- Aisan, G., S.B. Nemat and M. Nahid. 2012. Sequencing part of *Watermelon mosaic virus* genome and phylogenetical comparison of 5 isolates with other isolates from world. *Journal of Agriculture and Food Technology*, 2: 93-101.
- Ali, A. and T. Natsuaki. 2007. *Watermelon Mosaic virus*. Plant Viruses. Global Science Books, 1(1): 80-84.
- Barbosa, G.S., J.A.A. Lima, M.A. Queiróz, R.C.S. Dias and C.S. Lima. 2016. Identification and effects of mixed infection of potyvirus isolates with *Cucumber mosaic virus* in cucurbits. *Revista Caatinga*, Mossoró, 29: 1028-1035.
<https://doi.org/10.1590/1983-21252016v29n429rc>
- Desbiez, C. and H. Lecoq. 2008. Evidence for multiple intraspecific recombinants in natural populations of *Watermelon mosaic virus* (WMV Potyvirus). *Archives of Virology*, 153: 1749-1754.
<https://doi.org/10.1007/s00705-008-0170-2>
- DNASTAR. 2007. MegAlign. Version7.
<http://www.dnastar.com/t-megalign.aspx>

المراجع

- الشعبي، صلاح محمود، فايز إسماعيل، محمد جمال مندو ووليد غزالة. 2006. فيروسات محصولي البطيخ الأحمر الحبيب والبطيخ الأصفر الشام في سورية: انتشارها، وتأثير التطعيم على أصول مختلفة في الإصابة الفيروسيه، وإمكانية انتقال فيروس الموزايك الأصفر للكوسا في البذور. مجلة وقاية النبات العربية، 24(2): 83-75.
- [El-Shaabi, S.M., F. Ismail. M.J. Mendo and W. Ghazaleh. 2006. Viruses that affect watermelon and melon crops in Syria: virus spread and effect of grafting on different root stocks on virus infection and the possibility of Zucchini yellow mosaic virus transmission through seeds. *Arab Journal of Plant Protection*, 24(2):75-83. (In Arabic).]
- حاج قاسم، أمين عامر، خليل عبد الحليم وأم التقى غفران الرفاعي. 2005. الفيروسات التي تصيب القرعيات في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 23: 6-1.
- [Haj Kasem, A.A., K. Abdel-Halim and O.T.G. El-Refae. 2005. Viruses affecting cucurbits in Syria. *Arab Journal of Plant Protection*, 23:1-6. (In Arabic).]

- Kumar, A., P. Thakur and A. Handa.** 2015. Serological detection of *Watermelon mosaic virus-2* (WMV-2) infecting cucumber in Himachal Pradesh. *International Journal of Farm Sciences*, 5(1): 104-109.
- Malpica, J.M., A. Fraile, I. Moreno, C.I. Obies, J.W. Drake and F. Garcia-Arenal.** 2002. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. *Genetics*, 162: 1505-1511.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1462378/>
- Moreno, I.M., J.M. Malpica, J.A. Díaz-Pendón, E. Moriones, A. Fraile and F. García-Arenal.** 2004. Variability and genetic structure of the population of *Watermelon mosaic virus* infecting melon in Spain. *Virology*, 318: 451-460.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.10.002>
- Saitou, N. and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sharifi, M., H. Massumi, J. Heydarnejad, A. Hosseini Pour, M. Shaabanian and H. Rahimian.** 2008. Analysis of the biological and molecular variability of *Watermelon mosaic virus* isolates from Iran. *Virus Genes*, 37: 304-313.
<https://doi.org/10.1007/s11262-008-0271-8>
- Shukla, D.D., C.W. Ward, A.A. Brunt and P.H. Berger.** 1998. *Potyviridae* family. In: *Description of Plant Viruses*. Association of Applied Biologists, 336: 12.
<https://doi.org/10.1007/BF01311310>
- Wylie, S.J., M. Adams, C. Chalam, J. Kreuze, J.J. López-Moya, K. Ohshima, S. Praveen, F. Rabenstein, D. Stenger, A. Wang and F.M. Zerbini.** 2017. ICTV Report Consortium, ICTV Virus Taxonomy Profile: *Potyviridae*, *Journal of General Virology*, 98: 352-354.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000740>
- Zheng, L., B.C. Rodoni, M.J. Gibbs and A.J. Gibbs.** 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathology*, 59: 211-220.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x>
- Dong, W. and L. Guan.** 2017. Host reaction of *Watermelon mosaic virus* isolates infecting melon from different geographical origins in Xinjiang of China. *Horticultural Plant Journal*, 3(1): 23-28.
<https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.01.010>
- Edwardson, J.R. and R.G. Christie.** 1997. *Cucumoviruses* (genus *Cucumovirus*), family *Bromoviridae*. Chapter 7. Pages 133-159. In: *Viruses Infecting Peppers and Other Solanaceous Crops*. University of Florida. USA. 770 pp.
- Fisher, M.L. and M.M. Kyle.** 1996. Inheritance of resistance to potyviruses in *Phaseolus vulgaris* L. IV. Inheritance, linkage relations, and environmental effects on systemic resistance to four potyviruses. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 204-212.
<https://doi.org/10.1007/BF00223377>
- Hajizadeh, M. and K. Mohammadi.** 2016. *Capsicum annum*, a new host of *Watermelon mosaic virus*. *Virus Disease*, 27(1): 107-109.
<https://doi.org/10.1007/s13337-016-0302-3>
- Hajizadeh, M., H. Bahrampour and J. Abdollahzadeh.** 2017. Genetic diversity and population structure of *Watermelon mosaic virus*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124: 601-610.
<https://doi.org/10.1007/s41348-017-0114-8>
- Jan, A.T., M. Azam, M.K. Warsi, A. Ali and Q.M.R. Haq.** 2011. Technical advancement in plant virus diagnosis – an appraisal. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(8): 909-921.
<https://doi.org/10.1080/03235408.2011.599156>
- Kamberoglu, M.A., C. Desbiez and A.F. Caliskan.** 2015. Characterization of an emerging isolate of *Watermelon mosaic virus* in Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*, 17: 211-215.
http://www.fspublishers.org/published_papers/73262_..pdf
- Kawas, H.** 2005. Studies on the most important viral diseases on cucurbits in southern Syria: Survey of viral diseases of cucurbits, Screening of cucurbits cultivar for resistance to natural infection with viruses and Seed transmission of some cucurbit species. *Journal of Biotechnology Research*, 7(2):84-115.

Received: June 23, 2020; Accepted: March 12, 2021

تاريخ الاستلام: 2020/6/23؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2021/3/12