

## دراسة أولية عن فيروسات شلل نحل العسل في بعض المحافظات السورية

أحمد محمد مهنا

قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية، البريد الإلكتروني: a.m.mouhann@gmail.com

### الملخص

مهنا، أحمد محمد. 2016. دراسة أولية عن فيروسات شلل نحل العسل في بعض المحافظات السورية. مجلة وقاية النبات العربية، 34(3): 211-219.

تعرضت تربية النحل في سورية خلال الأعوام السابقة لانخفاض حاد في أعداد مستعمرات النحل بنسبة 13.73%. هدف هذا البحث إلى الكشف عن فيروس شلل النحل الحاد، فيروس شلل النحل الحاد بفلسطين وفيروس كشمير ومعرفة مدى انتشارها في ست محافظات سورية. أظهرت النتائج انتشار فيروس شلل النحل الحاد فقط في ثلاثة مناحل من محافظات دمشق، حمص وحماة. عند دراسة القرابة الوراثية للعزلات السورية مع تلك المعرفة عالمياً، انقسمت الشجرة الوراثية إلى عنقودين رئيسيين، واجتمعت العزلات السورية المدروسة في تحت العنقود الثاني من العنقود الرئيس. الثاني. تراوحت نسبة التطابق في العزلات السورية بين 99 و 100% حيث تطابقت العزلات Syria-H3 و Syria-H5 المجموعتان من حمص وحماة، على التوالي، وبلغت قيمة المؤشر الإحصائي bootstrap 92.2%، أما أعلى نسبة تطابق بين العزلات السورية والعزلات العالمية فكانت مع العزلة الصربية SerbiaA1 حيث تراوحت بين 97.6 و 98.1% وبنسبة تباين 2-2.5%. ويعد هذا أول تقرير يشير لانتشار فيروس شلل النحل الحاد في سورية.

**كلمات مفتاحية:** فيروس شلل النحل الحاد، نحل العسل، النسخ العكسي، سورية.

### المقدمة

وفيروس كشمير (*Kashmir bee virus* (KBV)، وفيروس الشلل الحاد بفلسطين (*Israeli acute paralysis virus* (IAPV) والتي تتبع جميعاً الفصيلة *Dicistroviridae* (2)، واستند في ذلك على أن لها طريقة انتقال متماثلة، وتأثير متماثل في حياة مستعمرات نحل العسل. كما تتميز هذه الفيروسات الثلاثة باختلافات كبيرة فيما بينها بالرغم من وجود عدد من الصفات البيولوجية المشتركة مثل طريقة انتقال العدوى والمراحل الأولى في حياة المضيف وتركيزها المنخفض في العائل في بداية الإصابة وتضاعفها بسرعة لتصبح بتركيز عالية مسببة الموت المفاجئ لمستعمرات النحل (8). أظهرت الدراسات المختلفة ترافق التركيزات العالية لهذه الفيروسات مع الانتشار الكثيف لأكاروس الفاروا، وعدم ظهور أية أعراض على طور اليرقة في مستعمرات النحل وإنما يحدث الموت المفاجئ فقط للعداري والحشرات الكاملة (5، 10، 11).

يتكون المجين/الجينوم الفيروسي للفيروسات الثلاثة من سلسلة مفردة من الحمض النووي الريبي الموجب القطب ssRNA، مقسم إلى إطاري قراءة مفتوحة (ORF) Open reading frame الأول يشفر البروتينات غير الهيكلية والذي يبدأ بموقع دخول الريبوزومات الداخلية (IRES) Internal Ribosome Entry Site والثاني يشفر البروتينات الهيكلية ويفصل بينهم كذلك IRES وينتهي بالذيل المتعدد الأدينين (8، 12). أكدت المراقبة المستمرة لمستعمرات النحل في

تعرضت تربية النحل في سورية خلال الأعوام الأربعة الماضية للكثير من الأزمات منها الانخفاض الحاد في أعداد مستعمرات النحل والتي بلغت نسبة تقدر بـ 13.73%. يُعرفُ الانخفاض الحاد عالمياً بظاهرة الموت المفاجئ لمستعمرات نحل العسل Colony Collapse Disorder CCD (25). أجريت العديد من الأبحاث بهدف التحري والكشف عن أسباب هذه الظاهرة والتي شملت دراسة المسببات المرضية لنحل العسل بما فيها الأمراض الفيروسية. سهلت تقانة المؤشرات الجزيئية عملية تعريف وتشخيص فيروسات النحل التي عانت سابقاً من صعوبات نظراً لعدم تكشف الأعراض الظاهرية عند الإصابة في بعض الأحيان إضافة إلى عدم توافر التجهيزات المخبرية المناسبة. تم عالمياً توصيف حوالي 18 فيروساً يصيب نحل العسل (6، 7، 9، 20). لقد ارتبط انتشار أغلب هذه الفيروسات مع انتشار أكاروس الفاروا *Varroa destructor* الناقل الحيوي لها (16). وأشير مؤخراً إلى أن هناك ثلاثة فيروسات مسببة لشلل النحل وهي فيروس الشلل الحاد (*Acute bee paralysis virus* (APBV)،

أدوات QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Cat. No. 52904) QIAGEN الألمانية وذلك وفق تعليمات الشركة الصانعة. حفظ الحمض النووي الفيروسي المستخلص عند -70°س لحين الاستخدام.

### النسخ العكسي وإنتاج الدنا التكميلي cDNA

أجري النسخ العكسي (Reverse transcription (RT-PCR) لمناطق معينة من الحمض النووي الريبي الفيروسي لإنتاج الحمض النووي التكميلي cDNA باستخدام بادئات متخصصة مصنعة من قبل شركة Alpha DNA (جدول 2). استخدم لهذا العمل طقم أدوات QIAGEN One-Step RT-PCR kit Cat. No. 210210 من شركة QIAGEN الألمانية، بحجم تفاعل نهائي 50 ميكرو لتر، وفق تعليمات الشركة الصانعة. استخدم المدور الحراري Cleaver CSL Gradient وفق البرنامج التالي: 30 دقيقة عند حرارة 50°س (النسخ العكسي)، 15 دقيقة عند 95°س (تخطيم أنزيم النسخ العكسي، تنشيط أنزيم HotStarTaq، ومرحلة Denaturation)، تلى ذلك 40 دورة لمضاعفة القطع المنسوخة عكسياً: 30 ثانية عند 94°س، 45 ثانية عند درجة الحرارة المناسبة لالتحام البادئ (جدول 2)، 60 ثانية عند 72°س، لينتهي التفاعل بسبع دقائق عند 72°س.

وللتأكد من وجود فيروسات شلل النحل عبر ظهور حزم cDNA ذات الوزن الجزيئي المحدد بواسطة البادئات المتخصصة، تم ترحيل 5 ميكروليترات من cDNA على هلامه الأغاروز 1.5% والتي تحوي بروميد الإيثيديوم في محلول 1X Tris-acetate-EDTA (TAE) لمدة ساعة ونصف. وتقت النتائج بتصوير الهلامه باستخدام جهاز التوثيق MicroDOC System بواسطة الأشعة فوق البنفسجية. وقد استخدم سلم المؤشر الجزيئي (Promega) pb 100.

السنوات الماضية أن هناك انخفاضاً واضحاً في أعداد مستعمرات النحل في سورية ترافق في حالات عدة مع انهيار كامل المستعمرات وفي حالات أخرى مع ظهور أفراد مشوهة ليس لها القدرة على الحركة. من هنا جاءت أهمية هذا البحث في الكشف عن فيروسات شلل النحل ومعرفة مدى انتشارها في سورية.

### مواد البحث وطرقه

#### جمع العينات

جمعت 16 عينة من نحل العسل من 16 منحللاً في ست محافظات وهي: دمشق وحمص وحماة (الغاب) والسويداء وطرطوس واللاذقية خلال الفترة بين نهاية آذار/مارس وحتى شهر أيلول/سبتمبر سنة 2014 (جدول 1). أبدت هذه العينات أعراض الإصابة كارتجاج الشغالة، الاسوداد، الصلع، عدم القدرة على الطيران، عذارى بلون اسود مينة، حشرات ويرقات عليها إصابة بالفاروا، نحل زاحف أمام الخلية إضافة لعينات نحل سليمة. تضمنت كل عينة 30 حشرة وضعت معاً ضمن أنبوب 15 مل محكم الإغلاق ووضعت مباشرة في الآزوت السائل، وبعد وصولها إلى المختبر خزنت عند -70°س لحين الاستخدام.

#### استخلاص الحمض النووي الريبي الفيروسي (RNA)

تم اختيار عشرة أفراد من كل عينة بشكل عشوائي، وتم مجانستها باستخدام المطحنة (الهاون) والآزوت السائل، ثم اضيف 1مل من محلول منظم فوسفاتي Phosphate-buffered Saline (PBS) 137 mM NaCl، 2.7 mM KCl، 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>، 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. أجريت عملية التفتيل على سرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة، أخذ بعدها 140 ميكرو لتر من الرائق العلوي واستخدم لاستخلاص الحمض النووي الفيروسي طقم

Table 1. Locations of collected honey bee samples from Syria

جدول 1. مواقع جمع عينات نحل العسل في سورية

عدد العينات No. of samples	عدد المناحل No. of apiaries	الرمز Symbol	الموقع Location	الموقع Region	المنطقة
1	1	D1	Faculty of Agriculture	كلية الزراعة	دمشق
1	1	D2	Al-Mezzeh	المزة	دمشق
2	2	Ho3-Ho4	Al-Mukharram	المخرم	حمص
1	1	H5	Ein Elkorum	عين الكروم	حماة (الغاب)
1	1	S6	Tal Alloz	تل اللوز	السويداء
5	5	T7→T11	Safita	صافيتا	طرطوس
5	5	L12→L16	Wadi Qandil	وادي قنديل	اللاذقية
16	16			Total	المجموع

**جدول 2.** التتابع النيوكليوتيدي للبادئات المستخدمة في الكشف عن فيروسات شلل النحل الحاد (ABPV) شلل النحل الحاد المنتشر بفلسطين (IABPV) ونحل كشمير (KBV).

**Table 2.** Base sequence of primers used to detect *Acute bee paralysis virus* (APBV), *Kashmir bee virus* (KBV) and *Israeli acute paralysis virus* (IAPV).

المرجع Reference	حجم القطعة المضخمة (زوج قاعدي) Size of amplified fragments (bp)	درجة إلتحام البادئ Annealing of Primer	تسلسل البادئ 5'→3' Sequence 5'→3'	الفيروس Virus
4	900 pb	63 °C	<b>F1:</b> AGCCACTATGTGCTATCGTAT <b>R1:</b> GCTCCTATTGCTCGGTTTTTCGGT	ABPV
22	398 pb	55°C	<b>F2:</b> CATATTGGCGAGCCACTATG <b>R2:</b> CCACTTCCACACA ACTATCG	
13	207 pb	55°C	<b>F3:</b> AGCCACTATGTGCTATCGTAT <b>R3:</b> ATGGTGACCTCTGTGTCATTA	
18 ،17	475 pb	65°C	<b>F1:</b> AGACACCAATCACGGACCTCAC <b>R1:</b> AGATTTGTCTGTCTCCCAGTGCACAT	IABPV
18 ،17	588 bp	55 °C	<b>F2:</b> GCGGAGAATATAAGGCTCAG <b>R2:</b> CTTGCAAGATAAGAAAGGGG	
24	414 bp	55°C	<b>F1:</b> GATGAACGTCGACCTATTGA <b>R1:</b> TGTGGGTTGGCTATGAGTCA	KBV
21	290 bp	50°C	<b>F2:</b> ATGACGATGATGAGTTCAAG <b>R2:</b> AATTGCAAGACGGCATC	

العزلات المحلية وبعض العزلات العالمية التي استخدمت تلك البادئات للكشف عن الحزمة ذات الحجم 207 زوج قاعدي وحدد تتابعها النيوكليوتيدي (جدول 3).

## النتائج

### الكشف عن فيروسات شلل النحل

أجري تفاعل النسخ العكسي والبلمرة التسلسلي على 16 عزلة (عينة) من نحل العسل (حشرات كاملة)، للكشف عن وجود فيروسات شلل النحل. أظهرت النتائج إصابة بعض العزلات بفيروس شلل النحل الحاد (APBV) فقط وذلك في ثلاثة مناحل من محافظات دمشق، حمص وحماة. في حين لم يكشف في المناحل الأخرى عن أي إصابة بهذا الفيروس أو غيره، وقد دل على ذلك ظهور الحزم 900، 389 و 207 زوج قاعدي في هلامة الأغاروز باستخدام البادئات ABPV-1، ABPV-2 و ABPV-3، على التوالي، وهي بادئات متخصصة بالكشف عن فيروس شلل النحل الحاد. ويوضح الشكل 1 الحزم الناتجة عن عملية النسخ العكسي وتفاعل البلمرة التسلسلي المطبقة على عزلات نحل العسل.

### تحديد التتابع النيوكليوتيدي للحمض النووي التكميلي cDNA

بعد التأكد من ظهور حزم cDNA المطلوبة، أعيد ترحيل كامل منتج تفاعل البلمرة التسلسلي (cDNA) على هلامة أخرى من الأغاروز 1% تحتوي صبغة بروميد الإيثيديوم في جهاز الرحلان الكهربائي مع استخدام سلم المؤشر الجزيئي 100 bp. اقتطعت الحزم المطلوبة من هلامة الأغاروز، ونقيت من الشوائب باستخدام الطريقة الموصى بها في طقم الأدوات QIAquick Gel Extraction Kit No.28704. خضعت بعدها العينة لعدة مراحل تم خلالها تنقية العينة من النيوكليوتيدات وتجفيفها لتصبح العينة بعدها جاهزة حيث وضعت ضمن الجهاز المخصص لقراءة تتابع النيوكليوتيدات ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer.

### البرامج المستخدمة

استخدم لقراءة وتحليل التسلسل النيوكليوتيدي للـ cDNA عدة برامج منها: BlastN/Nucleotide blast للموقع <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> وبرنامج المحاذاة Alingment ورسم الشجرة الوراثية ClustalX v.2، وبرنامج MegAlign (DNASTAR) لتحديد قيم Bootstrap ونسبة القرابة الوراثية بين

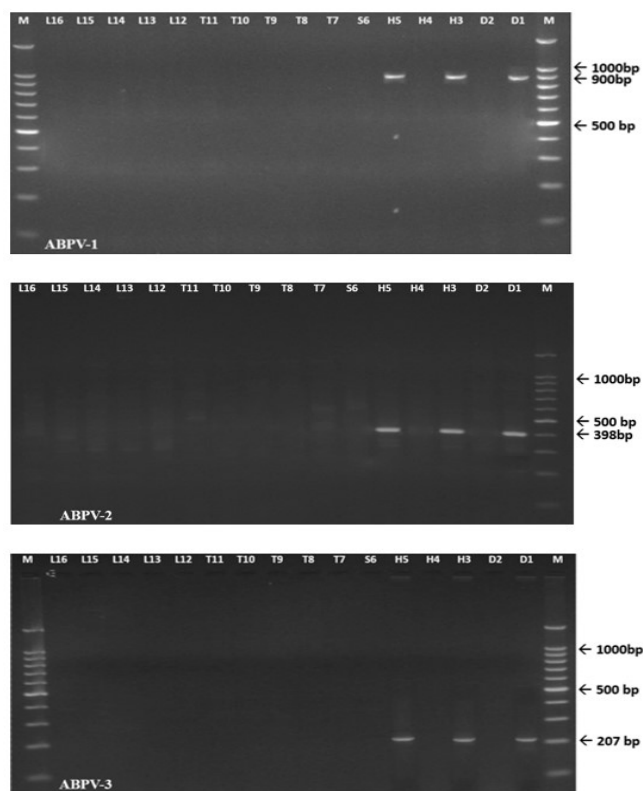
Table 3. Virus isolates used in the phylogenetic tree, their codes and accession numbers in the GenBank.

رمز العزلة Isolate code	المرجع Reference	الرقم التسلسلي Accession No.	Country	البلد
Serbia A1	23	KM001899	Serbia	صربيا
Poland 3	4	AY053371	Poland	بولندا
Germany 1	4	AY053367	Germany	ألمانيا
Austria 1	4	AY053366	Austria	أستراليا
Hungary 11	4	AY053383	Hungary	هنغاريا
Hungary 7	4	AY053379		
Hungary 5	4	AY053377		
Hungary 1	3	AF486072		
Slovenia	15	HQ877398	Slovenia	سلوفينيا
Turkey	19	EU779947	Turkey	تركيا

### دراسة وتحليل نتائج التتابع النيوكليوتيدي

تمت دراسة التتابع النيوكليوتيدي للحزمة ذات الوزن الجزيئي 207 زوج قاعدي وهي أصغر القطع المضخمة من مجين/جينوم الفيروس التي كشف عنها وتمثل جزءاً من المورثة المسؤولة عن إنتاج الغلاف البروتيني (26) ويبلغ حجمها الكلي حوالي 2744 زوج قاعدي (Isolate Hungary1 Acc. AF486072) وذلك في مختبرات الهيئة العامة للطاقة الذرية. تم مطابقة التتابع النيوكليوتيدي عبر برنامج BlastN، ولمعرفة مدى التباين في تتابع النيوكليوتيدات في الحزمة المدروسة للعينات الثلاث المصابة بفيروس شلل النحل الحاد وكذلك لتحديد علاقتها مع ما هو معن من تتابعات نيوكليوتيدية في البنك الوراثي. أجريت عملية محاذاة Alignment للتتابعات النيوكليوتيدية للعزلات (للعينات) الثلاث المدروسة بالإضافة إلى عشرة تتابعات نيوكليوتيدية من البنك الوراثي باستخدام برنامج ClustalX كما هو موضح في الشكل 2، والذي يظهر درجة الاختلاف في النيوكليوتيدات بين العينات.

تراوحت نسبة التطابق في العزلات (العينات) السورية المدروسة بين 99 و 100% حيث تطابقت العزلاتان Syria-H3 و Syria-H5 والمجموعتان من حمص وحماة، على التوالي، وبلغت قيمة المؤشر الإحصائي bootstrap 92.2 وابتعدت العينة Syria-D1 المجموعة من دمشق بنسبة تباين Divergence 1% (شكل 4) حيث نتج هذا التباين عن اختلاف في النيوكليوتيدات في موقعين من القطعة المضخمة حيث حل الغوانين Guanine في العزلة Syria-D1 محل الثيامين Thiamine في العزلتين Syria-H3 و Syria-H5 في الموقع الأول، أما الموقع الثاني فلو حظ زيادة الثيامين في العزلة Syria-D1 واختفاؤها في العزلتين Syria-H3 و Syria-H5 (شكل 2).



شكل 1. الكشف عن فيروس شلل النحل الحاد باستخدام النسخ العكسي وتفاعل البوليمراز التسلسلي مع النسخ العكسي في عزلات نحل العسل المجموعة من دمشق (D1, D2)، حمص (H3, H4)، حماة (H5)، السويداء (S6)، طرطوس (T7→11) واللاذقية (L12→16).

Figure 1. Detection of Acute bee paralysis virus (ABPV) using RT-PCR in honey bee isolates collected from Damascus (D1- D2), Homs (H3-H4), Hama (H5), As-Suwayda(S6), Tartous (T7 to T11), and Lattakia (L12 to L16).

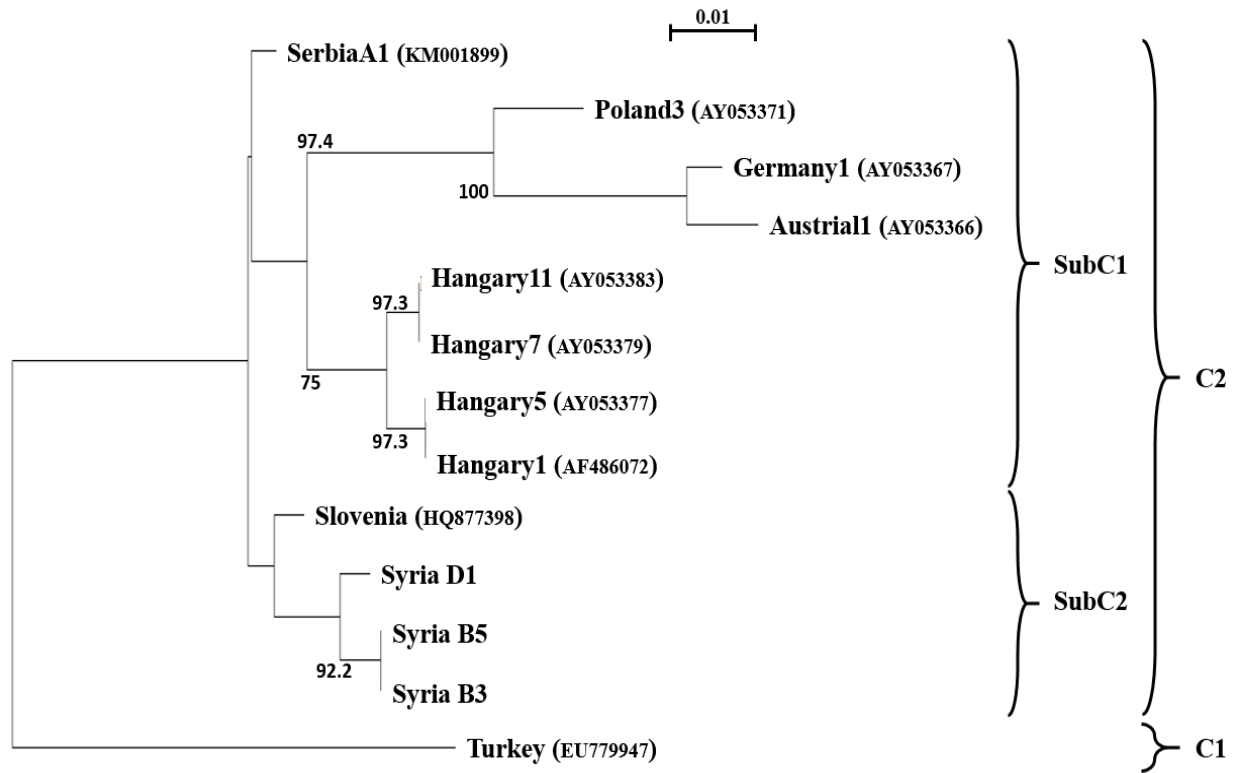
تراوحت نسبة التطابق بين العزلات السورية المدروسة والعزلة المجموعة من سلوفينيا بين 93.3 و 93.8% وبلغت نسبة التباين حوالي 1.5-2.5%، أما أعلى نسبة تطابق بين العزلات السورية والعزلات العالمية المختارة من البنك الوراثي فكانت مع العزلة الصربية SerbiaA1 حيث تراوحت بين 97.6 و 98.1% وبنسبة تباين 2-2.5% (شكل 4).

رسمت الشجرة الوراثية Phylogenetic tree وفق طريقة Neighbor-joining وحسب المؤشر الإحصائي Bootstrap (15). تبين انقسام الشجرة الوراثية إلى عنقودين رئيسيين C1 و C2، ضم العنقود الأول الرئيس C1 العزلة التركية فقط، أما العنقود الثاني الرئيس C2 فانقسم إلى تحت عنقودين، ضم تحت العنقود الأول SubC1 العزلات العالمية المجموعة من صربيا، بولندا، ألمانيا، استراليا وهنغاريا، في حين ضم تحت العنقود الثاني العزلات السورية المدروسة والعزلة المجموعة من سلوفينيا (شكل 3).

Turkey	1	AGAAATTTTCTCTTAACCTGGTATGATTCCAAAAATGACAACGAAAGACAACATTTCCCC
Hungary1	1	.....T.G.....G.....G.T.....G.....T.....
Hungary5	1	.....T.G.....G.....G.T.....G.....T.....
Hungary7	1	.....T.G.....G.....T.....G.....T.....
Hungary11	1	.....T.G.....G.....T.....G.....T.....
Syria-D1	1	.....T.G.....G.....G.T.....G.....
Syria-H3	1	.....T.G.....G.....T.T.....G.....
Syria-H5	1	.....T.G.....G.....T.T.....G.....
Slovenia	1	.....T.G.....G.....T.....G.....
SerbiaA1	1	.....T.G.....G.....T.....G.....
Poland3	1	.....T.G.....G.....T.....G.....T.....
Austrial	1	.....TCG.....A.....GA.....T.....G.....T.....
Germany1	1	.....TCG.....A.....GA.....T.C.....G.....T.....
Turkey	61	GGACTTGACTCAACTAGATGGAATTAAGCGCCCTCTGACAACAATTATAAATACATCTT
Hungary1	61	.....T.....CC.....C.....
Hungary5	61	.....T.....CC.....C.....
Hungary7	61	.....T.....CC.....C.....
Hungary11	61	.....T.....CC.....C.....
Syria-D1	61	...T.....T.....CC.....C.....
Syria-H3	61	...T.....CC.....C.....
Syria-H5	61	...T.....CC.....C.....
Slovenia	61	...T.....C.....
SerbiaA1	61	.....T.....C.....
Poland3	61	A.....T.....T.....
Austrial	61	A.....T.....C.....G.....
Germany1	61	A.....T.....C.....
Turkey	121	AGATTTGACTAATGATACAGAGGTCACCAT
Hungary1	121	.....G..A.....
Hungary5	121	.....G..A.....
Hungary7	121	.....G..A.....
Hungary11	121	.....G..A.....
Syria-D1	121	.....
Syria-H3	121	.....
Syria-H5	121	.....
Slovenia	121	.....
SerbiaA1	121	.....
Poland3	121	...C.A.....G..A.....
Austrial	121	G...C.A.....G..AA...T..
Germany1	121	G...C.A.....G..AA.....

شكل 2. مقارنة التسلسل النيوكليوتيدي لـ cDNA للحزمة المدروسة (207 bp) من جينوم فيروس شلل النحل الحاد المنتشر في سورية (عزلات الدراسة) مع بعض العزلات العالمية من تركيا، صربيا، هنغاريا، بولونيا، النمسا و ألمانيا.

Figure2. cDNA sequence comparison of the studied segment (207 bp) from the genome of the Acute bee paralysis virus (APBV) spread in Syria with international isolates from Turkey, Hungary, Slovenia, Poland, Austria and Germany.



شكل 3. الشجرة الوراثية للعزلات السورية والعالمية وفق طريقة Neighbor-joining والمؤشر الإحصائي Bootstrap  $\geq 50$  (عدد التكرارات 1000).  
**Figure 3.** Phylogenetic tree for Syrian and global isolates using the neighbor-joining method and bootstrap  $\geq 50$  (number of replications 1000).

		نسبة التطابق / Percent Identity														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
نسبة التباعد / Divergence	1	█	99.0	99.0	87.1	98.1	97.1	98.1	97.1	91.4	93.3	91.9	93.3	98.1	1	Syria-D1
	2	1.0	█	100.0	87.6	97.1	96.7	97.1	96.7	91.0	92.9	91.4	93.8	97.6	2	Syria-H3
	3	1.0	0.0	█	87.6	97.1	96.7	97.1	96.7	91.0	92.9	91.4	93.8	97.6	3	Syria-H5
	4	12.7	12.1	12.1	█	86.2	87.1	86.2	87.1	82.4	86.2	82.9	84.8	89.0	4	Turkey
	5	2.0	3.0	3.0	13.8	█	99.0	100.0	99.0	92.4	94.3	92.9	91.4	97.1	5	Hungary1
	6	3.0	3.5	3.5	12.7	1.0	█	99.0	100.0	92.4	95.2	92.9	91.9	97.1	6	Hungary7
	7	2.0	3.0	3.0	13.8	0.0	1.0	█	99.0	92.4	94.3	92.9	91.4	97.1	7	Hungary5
	8	3.0	3.5	3.5	12.7	1.0	0.0	1.0	█	92.4	95.2	92.9	91.9	97.1	8	Hungary11
	9	9.5	10.0	10.0	18.9	8.4	8.4	8.4	8.4	█	95.2	98.6	87.6	93.3	9	Austrial
	10	7.3	7.8	7.8	13.8	6.2	5.1	6.2	5.1	5.1	█	95.7	90.0	95.2	10	Poland3
	11	8.9	9.5	9.5	18.2	7.8	7.8	7.8	7.8	1.5	4.5	█	88.1	93.8	11	Germany1
	12	2.1	1.5	1.5	10.3	4.2	3.7	4.2	3.7	8.8	5.9	8.2	█	94.3	12	Slovenia
	13	2.0	2.5	2.5	10.4	3.0	3.0	3.0	3.0	7.2	5.1	6.7	1.0	█	13	SerbiaA1
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		

شكل 4. نسبة التطابق والاختلاف بين العزلات المحلية وبعض العزلات من البنك الوراثي.  
**Figure 4.** Percentage of congruence and differences between local isolates and those from the GenBank.

إضافة إلى أن عمليات نقل المناحل تتم بكثرة بين هاتين المحافظتين لانتشار عدة محاصيل مهمة بالنسبة لمربي النحل كاليانسون وعباد الشمس وغيرها، كما أن المسافة بين المناحل المدروسة ليست كبيرة نسبياً، فالانتشار المحلي لهذا الفيروس يعود للانتشار الأفقي (انتقال الفيروس بين أفراد النوع الواحد) بين النحل المصاب وغير المصاب. بلغت قيمة مؤشر Bootstrap 92.2 وهذا يدل على أن المناحل مصابة بسلاسل متقاربة جداً من فيروس شلل النحل الحاد. وعند مقارنة التتابعات النيوكليوتيدية للعزلات المحلية مع بعض العزلات العالمية المنشورة في البنك الوراثي، لوحظ قرب العزلات المحلية من العزلة السلوفانية (شكل 3)، إلا أن نسبة التطابق كانت أكبر مع العينة الصربية والتي بلغت 97.5-98.1% (شكل 4). وهذا يشير إلى أن الحزمة المضخمة المدروسة تعد من المناطق المحافظة نسبياً من جينوم الفيروس، وقد أكد Bakonyi وآخرون (4) أن منطقة إطار القراءة المفتوح الثاني ORF2 هو مؤشر مناسب لدراسة الاختلافات في التتابعات النيوكليوتيدية وكذلك لتصنيف عزلات فيروس شلل النحل الحاد المجموعة من مناطق جغرافية مختلفة.

تعد هذه الدراسة أول تسجيل لفيروس شلل النحل الحاد APBV في سورية. إلا أنه لا بد من متابعة هذه الدراسة من حيث تحديد التتابع النيوكليوتيدي لمناطق أخرى من جينوم الفيروس ليتسنى مقارنته مع عزلات أخرى منتشرة في الدول المجاورة كالأردن وفلسطين وغيرها (1، 14). وفي حال وجود اختلافات واضحة يفضل دراسة التتابع النيوكليوتيدي لكامل الجين. كما لا بد من إجراء دراسات مستقبلاً تهدف للكشف عن وجود فيروسات شلل النحل ضمن أكاروس الفاروا ومراقبة نشاط مستعمرات النحل، حيث أن ذلك يمكن من معرفة ما إذا كان لفيروسات شلل النحل ومنها فيروس شلل النحل الحاد سبباً في موت مستعمرات النحل في سورية، بالإضافة إلى وجود ارتباط بين الفيروسات وعوامل مرضية أخرى.

أظهرت النتائج انتشار فيروس شلل النحل الحاد APBV في ثلاثة مناحل فقط في كل من محافظتي حمص ودمشق بنسبة إصابة 18.75%. في حين لم يكشف عن أي فيروس من فيروسات شلل النحل في المناحل الموزعة بباقي المحافظات بالرغم من أن مربي النحل يقومون بنقل خلاياهم خلال مواسم نشاط النحل في جمع العسل. ترافق الكشف عن فيروس APBV مع انتشار أكاروس الفاروا في مناحل حمص ودمشق. إلا أن ذلك لم يكن في بقية المناحل في بقية المحافظات، إذ كان هناك انتشار لأكاروس الفاروا ولكن لم تسجل هناك أي إصابة بإحدى فيروسات شلل النحل.

تعطي معرفة التتابع النيوكليوتيدي للعزلات الفيروسية المدروسة ومقارنتها مع ما هو متوافر في البنك الوراثي دقة وموثوقية أكبر من حيث تحديد ماهية الفيروس بدقة وربطه بالأعراض الظاهرية التي لوحظت على حشرات النحل قبل جمعها، وكذلك من حيث معرفة مدى تباينه الوراثي عن الفيروسات الأخرى المنتشرة محلياً أو عالمياً بغرض تحديد مصدر الإصابة الفيروسية وتحديد فيما إذا كانت هناك سلالات جديدة من الفيروس أو أن هذه الإصابة مدخلة من بلدان أخرى عبر عمليات التجارة بملكات نحل العسل.

اختيرت القطعة المضخمة ذات الوزن الجزيئي 207 زوج قاعدي دراسة التنوع الوراثي للعزلات المحلية السورية التي تبين إصابتها بفيروس شلل النحل الحاد. وقد وجد أن هذه القطعة تقع ضمن منطقة إطار القراءة المفتوح الثاني ORF2 والمسؤول عن تشكيل الغلاف البروتيني للفيروس (26). أظهرت الشجرة الوراثية تقارباً كبيراً بين عزلتي حمص وحماة حيث بلغت نسبة تطابقهما 100% وختلفت عزلة دمشق عنهما بنسبة تباين 1%، وقد يعود ذلك لعدة أسباب منها قرب محافظتي حمص وحماة لبعضهما البعض

## Abstract

Mouhanna, A.M. 2016. A preliminary study of honey bee paralysis virus in some provinces of Syria. Arab Journal of Plant Protection, 34(3): 211-219.

Beekeeping suffered from a sharp decrease in the number of bee colonies in Syria during the past few years that reached 13.73%. The objective of this research was to detect the presence of honey bee paralysis viruses which include *Acute bee paralysis virus*, *Israeli acute bee paralysis virus* and *Kashmir bee virus*, and to investigate their spread in six provinces in Syria. The results showed that only *Acute bee paralysis virus* was detected in three apiaries from the provinces of Damascus, Homs and Hama. The established phylogenetic tree was divided into two main clusters, and the second sub-cluster from the second main cluster included the Syrian isolates. The homology between Syrian isolates was 99-100%. Syria-H3 and Syria-H5 isolates collected from Homs and Hama were identical with bootstrap index of 92.2%, whereas the homology between Serbia isolate and Syrian isolates was 79.6-98.1%, and the divergence was 2-2.5%. This is the first report on the spread of *Acute bee paralysis virus* (ABPV) in Syria.

**Keywords:** Virus, honeybee, reverse transcription, Syria.

**Corresponding author:** A.M. Mouhanna, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Damascus, Syria, email: a.m.mouhann@gmail.com

## References

1. **Al-Abbadi, A.A., I. Ghabeish and D.S. Hassawi.** 2014. Molecular detection of three viral diseases in honey bees (*Apis mellifera* L.) colonies infested with mite (*Varroa destructor*) in Jordan. *Journal of Biological Sciences*, 14: 446-451.
2. **Bailey, L. and B.V. Ball.** 1991. *Honey bee pathology* (2<sup>nd</sup>Ed.). Academic Press; London, UK. 193 pp.
3. **Bakonyi, T., A. Szendroi, G. Topolska and M. Rusvai.** 2003. Nucleotide sequence analysis of the non-structural protein gene region of ABPV strains. (unpublished).
4. **Bakonyi, T., E. Grabensteiner, E. Kolodziejek, M. Rusvai, G. Topolska, W. Ritter and N. Nowotny.** 2002. Phylogenetic analysis of acute bee paralysis virus strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 6446-6450.
5. **Ball, B.V.** 1989. *Varroa jacobsoni* as a virus vector. In *Present Status of Varroa in Europe and Progress in the Varroa Mite Control*. Pages 241-244. In: *Proceedings of a meeting*, Udine, Italy, 1988. E. Cavalloro (ed.) EC-Experts Group, Luxembourg.
6. **Cornman, S.R., M.C. Schatz, S.J. Johnston, Y.P. Chen, J. Pettis, G. Hunt, L. Bourgeois, C. Elsik, D. Anderson, C.M. Grozinger and J. D. Evans.** 2010. Genomic Survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. *Bmc Genomics*, 11: 602.
7. **Cox-Foster, D.L., S. Conlan, E. Holmes, G. Palacios, J.D. Evans, N.A. Moran, P.L. Quan, T. Briese, M. Hornig, D.M. Geiser, V. Martinson, D. Vanengelsdorp, A.L. Kalkstein, A. Drysdale, J. Hui, J. Shai, L. Cui, S.K. Hutchison, J.F. Simons, M. Egholm, J.S. Pettis and W.I. Lipkin.** 2007. A Metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318: 283-287.
8. **de Miranda, J.R., G. Cordoni and G. Budge.** 2010. The Acute bee paralysis virus, Kashmir bee virus, Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: S30-S47.
9. **Fujiyuki, T., H. Takeuchi, M. Ono, S. Ohka, T. Sasaki, A. Nomoto and T. Kubo.** 2004. Novel insect picorna-like virus identified in the brains of aggressive worker honey bees. *Journal of Virology*, 78: 1093-1100.
10. **Genersch, E.** 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and bee keeping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 87-97.
11. **Genersch, E., W. von der Ohe, H. Kaatz, A. Schroeder, C. Otten, R. Buehler and P. Rosenkranz.** 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41: 332-352.
12. **Govan, V.A., N. Leat, M. Allsopp and S. Davison.** 2000. Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect infecting RNA Viruses. *Virology*, 277: 457-463.
13. **Grabensteiner, E., W. Ritter, T. Bakonyi, H. Pechhacker and N. Nowotny.** 2007. Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.): Acute bee paralysis virus, Black queen cell virus and Sac brood virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94: 222-225.
14. **Haddad, N., M. Brake, H. Migdadi and J.R. de Miranda.** 2008. First detection of honey bee viruses in Jordan by RT-PCR. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4: 242-247.
15. **Jamnjar-Ciglenceki, U. and I. Toplak.** 2011. Genetic diversity of Acute bee paralysis virus detected in ORF1 and ORF2 of positive field samples in Slovenia. GenBank HQ877398 (unpublished).
16. **Kevan, P.G., M.A. Hannan, N. Ostiguy and E. Guzman-Novoa.** 2006. A summary of the Varroa-virus disease complex in honey bees. *American Bee Journal*, 146: 694-697.
17. **Maori, E., E. Tanne and I. Sela.** 2007b. Reciprocal sequence exchange between non-retro viruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. *Virology* 362: 342-349.
18. **Maori, E., S. Lavi, R. Mozes-Koch, Y. Gantman, Y. Peretz, O. Edelbaum, E. Tanne and I. Sela.** 2007. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistro virus affecting honey bees in Israel: evidence for diversity due to intra and inter-species recombination. *Journal of General Virology*, 88: 3428-3438.
19. **Muz, D. and M.N. Muz.** 2008. First detection of DWV (Deformed wing virus), ABPV (Acute bee paralysis virus) and VDV-1 (Varroa destructor virus 1) in the Turkish apiaries with reverse transcription-PCR. GenBank EU779947 (unpublished).
20. **Runckel, C., M.L. Flenniken, J.C. Engel, J.G. Ruby, D. Ganem, R. Andino and J.L. Derisi.** 2011. Temporal Analysis of the Honey Bee Microbiome Reveals Four Novel Viruses and Seasonal Prevalence of Known Viruses. *Nosema and Crithidia. Plosone* 6 (6): E20656
21. **Shen, M., L. Cui, N. Ostiguy and D. Cox-Foster.** 2005. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and Sac brood virus) with the honey bee host and the parasitic varroa mite. *Journal of General Virology*, 86: 2281-2289.
22. **Siede, R. and R. Buchler.** 2004. Erstbefund des Kaschmir-Bienen-Virus in Hessen. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 117: 12-15.
23. **Simeunovic, P., D. Vidanovic, B. Gajic, J. Stevanovic, U. Glavinic, I. Radovic and Z. Stanimirovic.** 2014. Nucleotide sequence analysis of ABPV strains in Serbia. GenBank KM001899 (unpublished).
24. **Tentcheva, D., L. Gauthier, N. Zappulla, B. Dainat, F. Cousserans, M.E. Colin and M. Bergoin.** 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee



viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 7185-7191.

25. **Van Engelsdorp, D., J.J. Hayes, R.M. Underwood and J. Petits.** 2008. A survey of honey bee colony losses in the U.S., from Fall 2007 to spring 2008. *PLoSone*, 3: e401-e401.

26. **Welch, A., F. Drummond, S. Tewari, A. Averill and J.P. Burand.** 2009. Presence and prevalence of viruses in local and migratory honey bees (*Apis mellifera*) in Massachusetts. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 7862-7865.

Received: March 13, 2016; Accepted: August 21, 2016

تاريخ الاستلام: 2016/3/13؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2016/8/21