

التوصيف الجزيئي وتحديد القرابة الوراثية لفيروس الجناح المشوه الذي يصيب نحل العسل المنتشر في سورية

همام شعبان برهوم^{1,2}، هشام أديب الرز¹ وأحمد محمد مهنا¹

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية، البريد الإلكتروني: A.M.Mouhanna@gmail.com

(2) مركز بحوث ودراسات مكافحة الحيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

الملخص

برهوم، همام شعبان، هشام أديب الرز وأحمد محمد مهنا. 2017. التوصيف الجزيئي وتحديد القرابة الوراثية لفيروس الجناح المشوه الذي يصيب نحل العسل المنتشر في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 35(3): 155-163.

شملت الدراسة 240 خلية نحل تنتشر في ثماني محافظات سورية، حيث أظهرت نتائج عملية تفاعل النسخ العكسي أحادي الخطوة إصابة جميع العينات التي أبدت أعراض إصابة بفيروس الجناح المشوه بنسبة 100%، و55% بالنسبة للعينات التي لم يظهر عليها أية أعراض. أظهرت شجرة القرابة الوراثية للقطعتين 195 و 395 زوج قاعدي تقارباً بين العزلات السورية، وكانت نسبة التطابق بينها عالية في حدود 97.9-100% و98.7-100% للقطعتين 195 و 395 زوج قاعدي، على التوالي. كما تبين وجود اختلافات في تتابع القواعد الأزوتية في القطعة المضخمة بحجم 195 زوج قاعدي من مجين العزلات السورية للفيروس أدى إلى اختلاف في الأحماض الأمينية الناتجة منها. أما في القطعة 395 زوج قاعدي فقد شغرت لإنتاج أحماض أمينية متشابهة مع بعضها بالرغم من وجود اختلافات في تتابع القواعد الأزوتية. أظهرت هذه الدراسة الانتشار الواسع لفيروس الجناح المشوه في سورية، إضافة للتقارب الوراثي العالي بين العزلة السورية وبين العزلات العالمية. **كلمات مفتاحية:** فيروس الجناح المشوه، نحل العسل، شجرة القرابة، سورية.

المقدمة

فيروس كاكوجو (*Kakugo virus* (KV) وفيروس الفاروا المدمر 1 (*Varroa destructor virus 1* (VDV-1) (22، 17).

اشير مؤخراً في سورية إلى انتشار فيروسات النحل وأن أكثر الأعراض الفيروسية انتشاراً على حشرات النحل كانت ناتجة عن الإصابة بفيروس DWV (25) الذي يعد أحد أهم وأكثر الفيروسات التي تصيب نحل العسل انتشاراً، حيث تبدي الحشرة المصابة تشوهاً أو ضموراً في الأجنحة وانتفاخاً في البطن. النحل المصاب غالباً ما يموت بعد ظهور الإصابة، والنحل عديم الأعراض من الممكن أن يكون حاملاً للفيروس ولكن بدرجة أقل من النحل ذو الأعراض الواضحة (11، 22، 30).

هدف هذا البحث إلى استكمال دراسات سابقة (1، 2، 3، 4، 5، 25) لمعرفة مدى انتشار فيروسات النحل وبالأخص الأكثر انتشاراً في العالم ومنها فيروس DWV في سورية، إضافة لتحديد مدى التباين الوراثي بين العزلات السورية من DWV عبر دراسة تتابع القواعد الأزوتية لمواقع مختلفة من جينوم الفيروس بهدف تحديد القرابة الوراثية بين العزلات السورية وغيرها من السلالات والعزلات الإقليمية والعالمية.

يتعرض نحل العسل للعديد من الآفات والمسببات المرضية التي تحدث خسائر في المستعمرات، منها أمراض النحل الفيروسية. تم حتى الآن كشف وتوصيف 24 فيروساً يصيب نحل العسل في العالم (7، 15، 27). يعد فيروس الجناح المشوه (*Deformed wing virus* (DWV) من أكثر فيروسات النحل انتشاراً حيث سجل لأول مرة في اليابان في بداية ثمانينات القرن الماضي، إلا أن دراسة كامل جينوم الفيروس تمت في عام 2006 (22). جسيمات الفيروس متناظرة متعددة السطوح بقطر 30 نانومتر تحتوي على الحمض النووي الريبي +ssRNA (7، 22). صنف الفيروس ضمن فيروسات Picorna-like والجنس *Iflavirus* والتي تتميز بجينوم مكون من إطار قراءة مفتوح واحد (23، 24). لهذا الفيروس العديد من السلالات كالايطالية والتي يصل طول مجينها إلى نحو 10 آلاف قاعدة أزوتية (22). يتشابه تتابع القواعد الأزوتية لفيروس DWV مع فيروسين آخرين تابعين للجنس *Iflavirus* هما

جمع العينات

تم فحص عدد من المناطق المنتشرة في محافظات دمشق وريفها، حمص، حماة (الغاب)، السويداء، القنيطرة، طرطوس واللاذقية (جدول 1) خلال الفترة الواقعة بين آذار/مارس وتشرين أول/أكتوبر من أعوام 2014-2016، شملت 240 خلية نحل. جمعت 180 عينة كانت تبدي الأعراض التالية: عدم القدرة على الطيران، تشوه في الأجنحة، ارتجاج الشغالة، الاسوداد، الصلع، عذاري بلون اسود ميتة، حشرات ويرقات عليها إصابة بالفاروا، نحل زاحف أمام الخلية، ونحل ميت أمام الخلية. أما عينات النحل التي لم تبدي أية أعراض فبلغت 60 عينة. وضعت العينات ضمن أنابيب سعة 15 مل محكمة الإغلاق وغمرت مباشرة بالأزوت السائل وبعد وصولها للمخبر حفظت على حرارة -70°س لحين الاستعمال.

استخلاص الحمض النووي الريبوي

اختيرت 15 حشرة من كل عينة بشكل عشوائي، وتم مجانستها باستخدام المطحنة والأزوت السائل، ثم اضيف 1مل من المحلول الفوسفاتي المنظم. أجري التثقيب على سرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة، أخذ بعدها 140 ميكرو لتر من الرائق العلوي واستخدم لاستخلاص الحمض النووي طقم أدوات المنتج من شركة كياجين QiagenQIAamp® Viral RNA Mini Kit (No. 52904) وفقاً لتعليمات الشركة الصانعة. حفظ الحمض النووي المستخلص عند حرارة -70°س لحين الاستخدام.

جدول 1. مواقع جمع عينات نحل العسل في سورية.

Table 1. Locations of collected honey bee samples from Syria.

عدد خلايا النحل No. of hives		Region	المنطقة
دون أعراض asymptomatic infection	أعراض إصابة symptomatic infection		
10	33	Damascus	دمشق
8	22	Rif Dimashq	ريف دمشق
5	10	Quneitra	القنيطرة
7	18	Homs	حمص
7	17	Hama	حماة
5	13	As-Suwayda	السويداء
8	30	Tartous	طرطوس
10	37	Lattakia	اللاذقية
60	180	Total	المجموع

تفاعل النسخ العكسي

نفذ اختبار البوليمراز التسلسلي مع النسخ العكسي المتعدد Multiplex RT-PCR باستخدام طقم أدوات المنتج من شركة

كياجين Qiagen (No. 210210) One-Step RT-PCR kit، وزوجان من البادئات المتخصصة والمصنعة من قبل شركة Alpha هما DWV-F1: 5'TTTGCAAGATGCTGTATGTGG3' و DWV-R1: 5'GTCGTGCAGCTCGATAGGAT3' اللتان تضخمان قطعة من مورثة RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) القريبة من النهاية 3' بحجم 395 زوج قاعدي (31)، و DWV-F2: 5'CTTACTCTGCCGTCGCCCA3' و DWV-R2: 5'CCGTTAGGAAGCTCATTATCGCG3' اللذان يضخمان قطعة من مورثة L protein القريبة من النهاية 5' بحجم 195 زوج قاعدي (13). تم التفاعل بحجم نهائي 50 ميكرو لتر واستخدم المدور الحراري Cleaver CSL Gradient وفق البرنامج الموصى به (جدول 2).

جدول 2. برنامج التفاعل المتسلسل للبوليمراز مع النسخ العكسي المتعدد. Table 2. Program of one-step multiplex RT-PCR.

عدد الدورات No. of cycles	الزمن/الحرارة Time/ Temperature	المرحلة Stage
1	30 دقيقة/50°س 30 min./50°C	النسخ العكسي Reverse transcription
1	15 دقيقة/95°س 15 min./95°C	تحطيم أنزيم النسخ العكسي، تنشيط أنزيم البوليمراز والفصل Destruction of reverse transcriptase, activation of HotStarTaq and denaturation
35	30 ثانية / 94°س 30 sec./94°C	الفصل Denaturation
	45 ثانية / 55°س 45 sec./55°C	الالتحام Annealing
	45 ثانية / 72°س 45 sec./72°C	الاستطالة Extension
∞	7 دقائق / 72°س 7 min./72°C	الاستطالة النهائية Final Ext.

توثيق النتائج ودراسة تتابع القواعد الأزوتية (النيوكليوتيدية)

رحلت 5 ميكرو لترات من تفاعل النسخ العكسي المتعدد على هلامة الأغاروز 1.5% والتي تحتوي على بروميد الإيثيديوم في جهاز الرحلان الكهربائي ومحلول Tris-acetate-EDTA (TAE) IX ووثقت النتائج بتصويرها باستخدام جهاز MicroDOC System. أعيد ترحيل كامل منتج تفاعل النسخ العكسي المتعدد للعينات الإيجابية على هلامة أخرى من الأغاروز 1% بهدف تحليل وتحديد تتابع القواعد الأزوتية لها، حيث

النتائج

المشاهدات الحقلية

أمكن بسهولة ملاحظة أفراد النحل المصاب أمام الخلية بشكل أفراد زاحفة ليس لها القدرة على الطيران بسبب تشوه أجنحتها، أو أنها ذات أجنحة بمظهر طبيعي لكن ليس لها القدرة على الطيران ولدى تحليلها مخبرياً أثبتت إصابتها بفيروس DWV (شكل 1).

تفاعل النسخ العكسي

أظهرت نتائج تفاعل البوليمراز التسلسلي مع النسخ العكسي المتعدد mRT-PCR أن معظم العينات التي ابدت أعراض إصابة كانت ايجابية ومصابة بفيروس DWV بنسبة 100%. كما أن 55% من العينات التي لم تبد أية أعراض إصابة كانت أيضاً موجبة، حيث ظهرت الحزمتين 195 و395 زوج قاعدي بشكل واضح وهذا ما يؤكد وجود فيروس DWV. ويظهر الشكل 2 نتائج ترحيل تفاعل النسخ العكسي المتعدد لـ 18 عينة أبدت أعراض إصابة وثمانية عينات لم تبد أية أعراض، حيث لم تظهر الحزم في إحدى عينات دمشق وطرطوس واللادقية (شكل 2-ب).

دراسة تتابع القواعد الآزوتية وتحديد درجات القرابة الوراثية للعزلات

السورية من فيروس DWV

اختيرت عينة واحدة من كل محافظة ثبتت إصابتها بفيروس DWV اي من دمشق، ريف دمشق، السويداء، القنيطرة، حمص، حماه، طرطوس واللادقية. أجري تحليل لمعرفة وتحديد تتابع القواعد الآزوتية في القطعتين المضمختين 195 و395 زوج قاعدي وفقاً لذلك رسمت شجرة القرابة الوراثية وفق طريقة (Maximum Likelihood (ML) (20). أظهرت شجرة القرابة الوراثية المرسومة للقطعة 195 زوج قاعدي (شكل 3) أن العينات السورية كانت متقاربة مع بعضها إلى حد ما، حيث انقسمت شجرة القرابة إلى عنقودين رئيسيين، ضم العنقود الأول C1 العينات المجموعة من السويداء، القنيطرة، حماه، حمص، دمشق وريف دمشق، أما عينتا طرطوس واللادقية فشكلتا العنقود الثاني C2 وتراوحت نسبة التشابه بين العينات السورية 97.9-100%.

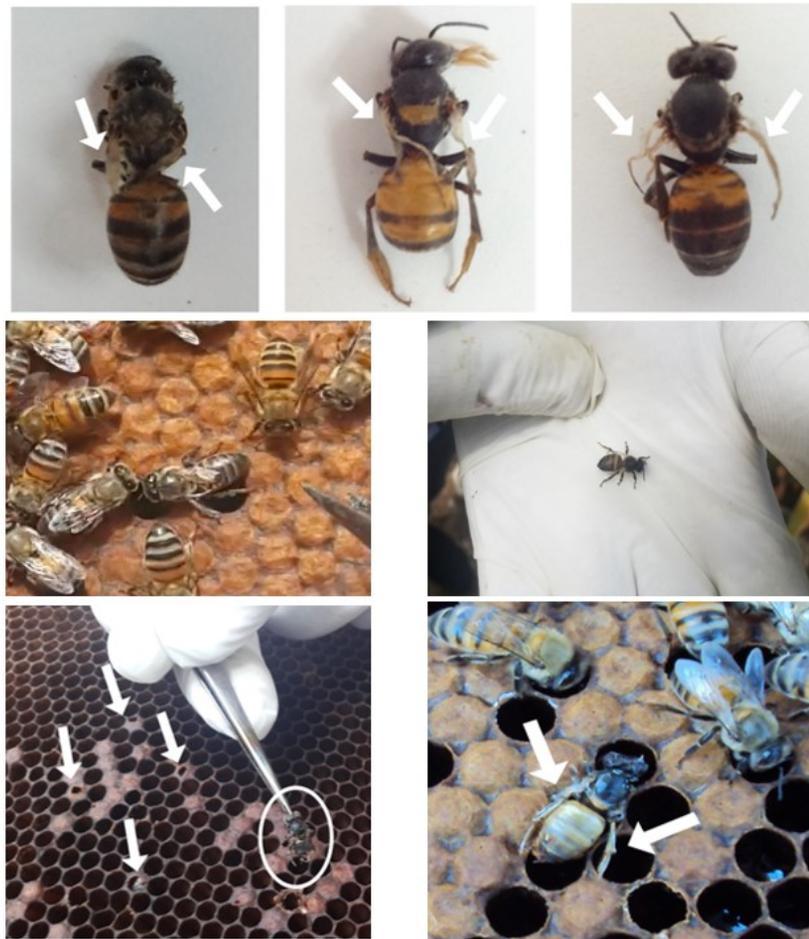
أما بالنسبة لشجرة القرابة الوراثية المبنية على القطعة 395 زوج قاعدي (شكل 4)، فتوزعت العينات ضمن عنقودين رئيسيين ضم العنقود الأول C1 العينات المجموعة من السويداء، القنيطرة، حماه، حمص، دمشق وريف دمشق والعنقود الثاني C2 عينات طرطوس واللادقية وبلغت نسبة التناظر 98.7-100%.

اقتطعت الحزم المطلوبة من هلامة الأغاروز، ونقيت من القواعد الآزوتية الحرة والبادئات لتصبح العينة بعدها جاهزة للتحليل. استخدم لتحليل وقرأة تتابع القواعد الآزوتية عدة برامج وهي BlastN/Nucleotide blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) المستخدم في مطابقة التتابعات للأسس الآزوتية بين العزلات المحلية والعالمية الموجودة في البنك الوراثي (جدول 3)، إضافة لاستخدام التتابع النيوكليوتيدي لفيروس كاكوجو (Kakugo virus (KV) (KC786224) (32)، وفيروس الفاروا المدمر - Varroa destructor virus-1 (VDV-1) (DQ385500) (26) كمجموعة خارجية (Out group) نظراً لقربتهما مع فيروس DWV، وبرنامج MEGA 7 الذي يقوم بمحاذاة التتابعات للعزلات المحلية والعالمية المختارة ورسم شجرة القرابة الوراثية (21) وحساب قيم مؤشر Bootstrap (16).

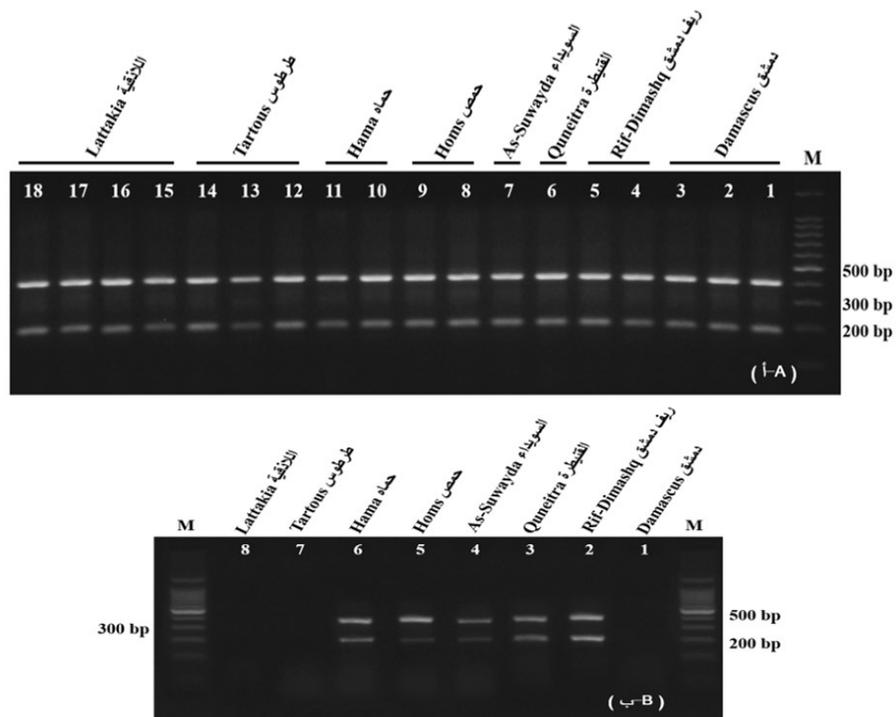
جدول 3. العزلات العالمية المستخدمة من البنك الوراثي في رسم شجرة القرابة الوراثية.

Table 3. Global isolates from Genbank used for drawing the phylogenetic tree.

المرجع Reference	حجم القطعة Fragment size (bp)	رقم المدخل Accession number	الدولة Country
19	195	KT591843	الأردن Jordan
19	195	KT591923	لبنان Lebanon
19	195	KT591890	مصر Egypt
19	195	KT591907	تونس Tunisia
14	195	JF346639	ألمانيا Germany
14	195	JF346638	فرنسا France
14	195	JF346622	اليونان Greece
14	195	JF346624	اسبانيا Spain
14	195	JF346628	إيطاليا Italy
14	195	JF346612	هولندا Holland
14	195	JF346616	سويسرا Switzerland
29	395	FJ011106	تركيا Turkey
8	395	DQ434900	بريطانيا UK
		DQ434901	
		DQ434921	
		DQ434925	
		DQ434952	
6	395	DQ364631	أورغواي Uruguay
28	395	KP165136	اليونان Greece
12	395 & 195	KT004425	أمريكا USA
26	395 & 195	NC_006494	فيروس الفاروا المدمر-1 Varroa destructor virus-1
32	395 & 195	KC786224	فيروس كاكوجو Kakugo virus

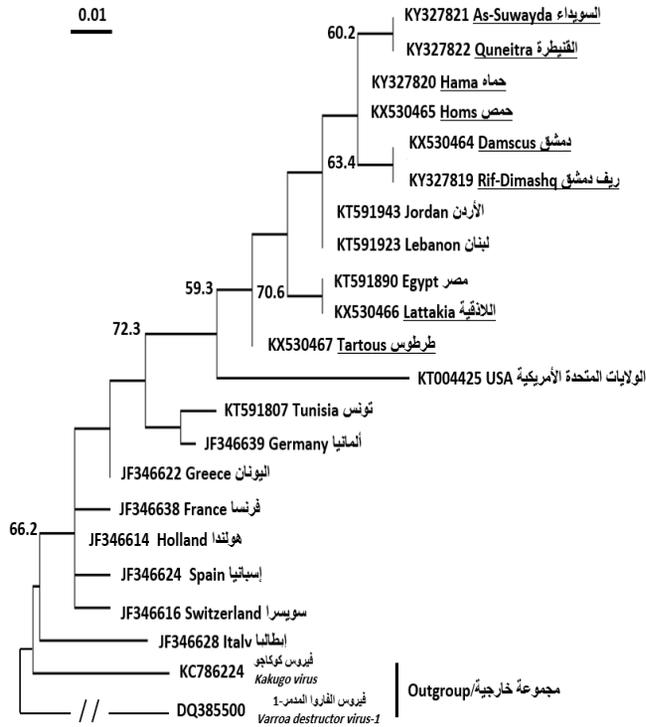


شكل 1. بعض من أعراض الإصابة بفيروس الجناح المشوه. Figure 1. Some symptoms of *Deformed wing virus* infection.

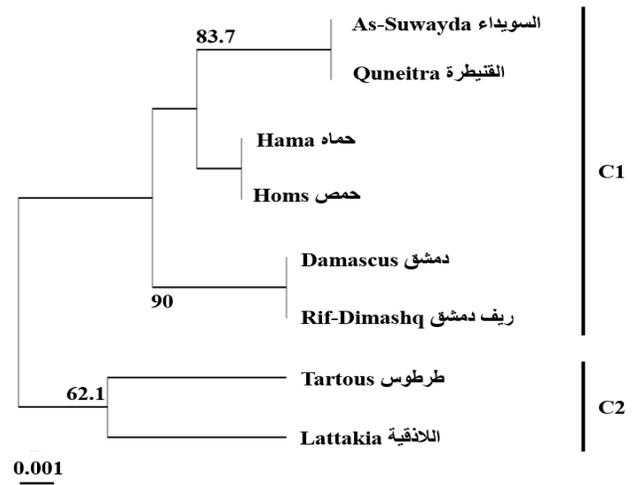


شكل 2. نتائج تفاعل النسخ العكسي المتعدد. (أ) = عينات أبدت أعراض إصابة. (ب) = عينات لم تبد أية أعراض. Figure 2. Results of one-step mRT-PCR. (A)= symptomatic samples, (B)= asymptomatic samples.

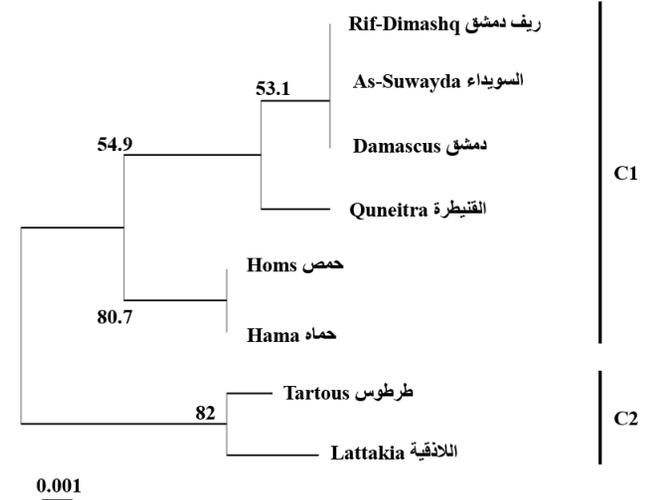
العالمية والمحلية وذلك عبر التطابق العالي لتتابع القواعد الأزوتية لمعظم العزلات الذي انعكس بتقاربها جغرافياً ضمن شجرة القرابة على مستوى البلدان المجاورة لبعضها في معظم الحالات، وفي بعضها الآخر لم يكن هذا التقارب واضحاً. فمثلاً تقاربت العزلات السورية مع العزلة الأمريكية (KT004425) (شكل 4) والعزلة البريطانية (DQ434952) (شكل 5)، وتقاربت العزلة التونسية (KT591807) مع الألمانية (JF346639) (شكل 4). أما بالنسبة للمجموعة الخارجية فقد وضع كلا الفيروسين KV وVDV-1 كمجموعة خارجية عند دراسة تباين القطعة 195 زوج قاعدي (شكل 5)، في حين توضع فيروس (DQ385500) VDV-1 في المجموعة الخارجية فقط عند دراسة القطع 395 زوج قاعدي، وتقارب فيروس KV مع عزلات فيروس DWV (شكل 6). كانت معظم قيم مقياس مؤشر Bootstarp منخفضه (أقل من 50%) وذلك نتيجة لقلّة التباينات بين تتابعات القواعد الأزوتية بين معظم عزلات فيروس DWV المحلية والعالمية وقد أكتفي بعرض القيم الأكبر من 50%.



شكل 5. شجرة القرابة الوراثية المبينة على تتالي القواعد في القطعة 195 زوج قاعدي وفق طريقة Maximum Likelihood (ML). قيم مؤشر Bootstrap $\geq 50\%$.
Figure 5. The phylogenetic tree based on the base sequence of the 195 bp fragment according to Maximum Likelihood (Bootstrap $\geq 50\%$).



شكل 3. شجرة القرابة المبينة على القطعة 195 زوج قاعدي للعزلات السورية من فيروس تشوه الأجنحة DWV.
Figure 3. The phylogenetic tree based on the fragment 195 bp of Syrian DWV isolates.

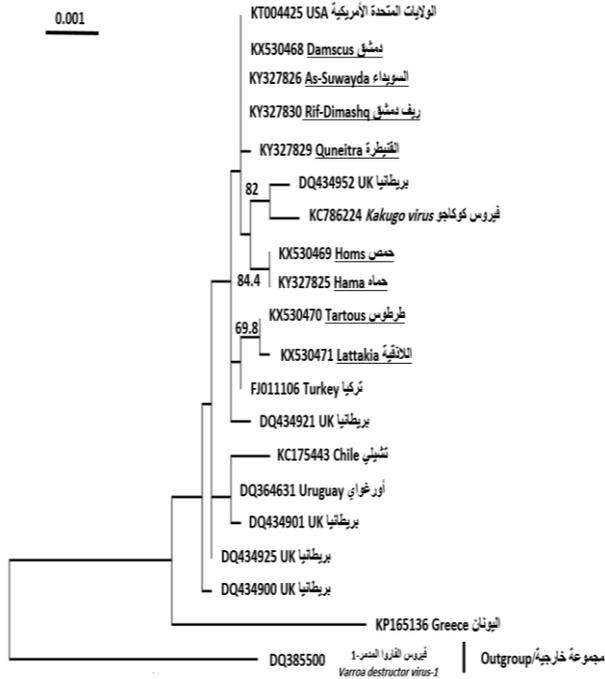


شكل 4. شجرة القرابة الوراثية المبينة على القطعة 395 زوج قاعدي للعزلات السورية من فيروس تشوه الأجنحة.
Figure 4. The phylogenetic tree based on the base sequence of 395 bp fragments of Syrian DWV isolates.

تحديد درجة القرابة بين العزلات السورية لفيروس DWV وغيرها من العزلات العالمية لهذا الفيروس

رسمت شجرة القرابة للعزلات السورية والعالمية لفيروس DWV (جدول 3) بناءً على تتابع القواعد الأزوتية وذلك لتوضيح القرابة الوراثية المحتملة فيما بينها وهذا يساعد على تعريف العزلات الفيروسية بشكل أدق وربما لتحديد مصدر العدوى الفيروسية فيما إذا كانت سلالات جديدة أو مدخلة. أظهرت شجرة القرابة الوراثية للقطعة 195 زوج قاعدي (شكل 5) والقطعة 395 زوج قاعدي (شكل 6) تقارباً وراثياً بين عزلات فيروس DWV

طرطوس واللاذقية، والثاني في موقع 198 للعزلات حمص، حماة واللاذقية، والثالث في الموقع 330 للعزلات طرطوس، اللاذقية والقنيطرة، أما الموقعين 159-160 فقد توضع التايمين T مكان السيتوزين C (شكل 8).



شكل 6. شجرة القرابة الوراثية المبينة على تنال القواعد في القطعة 395 زوج قاعدي وفق طريقة Maximum Likelihood (ML). قيم مؤشر Bootstrap $\geq 50\%$.

Figure 6. The phylogenetic tree for the 395 bp fragment according to Maximum Likelihood (Bootstrap $\geq 50\%$).

سجلت العزلات السورية لفيروس الجناح المشوه عالمياً في البنك الوراثي وأعطى لها الأرقام التالية للقطعة 195 زوج قاعدي: دمشق KX530464، ريف دمشق KY327819، السويداء KY327821، القنيطرة KY327822، حمص KX530465، حماة KY327820، طرطوس KX530467، اللاذقية KX530466. أما للقطعة 395 زوج قاعدي فقد أعطيت الأرقام التالية: دمشق KX530468، ريف دمشق KY327830، السويداء KY327826، القنيطرة KY327829، حمص KX530469، حماة KY327825، طرطوس KX530470، اللاذقية KX530471.

دراسة الاختلافات على مستوى تتابعات القواعد الأزوتية والأحماض الأمينية

تبين عند دراسة الاختلافات على مستوى تتابعات الأسس الأزوتية للقطعة 195 زوج قاعدي والتي ترمز لإنتاج 64 حمضاً أمينياً، وجود اختلافات في تتابعات الأسس الأزوتية أدى إلى اختلاف في نوع الأحماض الأمينية المشفرة. يبين الشكل 7 اختلاف بنوع الحمض الأميني بالموقعين 12 و 19، فقد توضع الحمض الأميني تيروسين Y (Tyrosine) مكان الهيستيدين H (Histidine) في عزلات السويداء، القنيطرة واللاذقية، والحمض الأميني فالين V (Valine) مكان ايزولوسين I (Isoleucine) في عزلي طرطوس واللاذقية.

أما قطعة المجين الفيروسي بحجم 395 زوج قاعدي فقد شفرت لإنتاج 131 حمضاً أمينياً، وتطابقت هذه الأحماض الأمينية مع بعضها في العزلات السورية بالرغم من وجود اختلافات في تتابع القواعد الأزوتية مقارنة بالقطعة 195 زوج قاعدي، فقد توضع الغوانين G مكان الأدينين A في ثلاثة مواقع؛ الأول في موقع 138 في عزلات حمص، حماة،

				10	20	30	40	50	60		
			1	YSAVAQAPSV	AHAPRTWEVD	EARRRRVIKR	LALEQERMRN	VLDAGVIDQA	TWEQEDARDN	EFLT	64
Damascus	دمشق	KX530464	1		H	I					64
Rif-Dimashq	ريف دمشق	KY327819	1		H	I					64
As-Suwayda	السويداء	KY327821	1		Y	I					64
Quneitra	القنيطرة	KY327822	1		Y	I					64
Homs	حمص	KX530465	1		H	I					64
Hama	حماه	KY327820	1		H	I					64
Tartous	طرطوس	KX530467	1		H	V					64
Lattakia	اللاذقية	KX530466	1		Y	V					64

شكل 7. تتابع الأحماض الأمينية للعزلات السورية لفيروس DWV التي تنتج من القطعة 195 زوج قاعدي.

Figure 7. Amino acids sequence of DWV Syrian isolates coded by the viral genome 195 bp fragment.

1	TTG CAA GAT GCT GTA TGT GGT GTG CCT GGT TTA GAT GGG TTT GAT TCG ATA TCT TGG AAT L Q D A V C G V P G L D G F D S I S W N	60
61	ACT AGT GCT GGT TTT CCT TTG TCT TCA TTA AAG CCA CCT GGA ACA TCA GGT AAG CGA TGG T S A G F P L S S L K P P G T S G K R W	120
	138 G	159 160 T T
121	TTG TTT GAC ATT GAG CTA CAA GAC TCG GGA TGT TAT CTC CTG CGT GGA ATG CGT CCC GAA L F D I E L Q D S G C Y L L R G M R P E	180
	198 G	
181	CTT GAG ATT CAA TTA TCA ACG ACA CAG TTA ATG AGG AAA AAG GGA ATA AAA CCT CAC ACT L E I Q L S T T Q L M R K K G I K P H T	240
241	ATA TTC ACG GAT TGT TTG AAA GAT ACT TGT TTG CCT GTT GAA AAA TGT AGA ATA CCT GGT I F T D C L K D T C L P V E K C R I P G	300
	330 G	
301	AAG ACT AGA ATA TTT AGT ATA AGT CCG GTA CAG TTT ACC ATA CCG TTT CGA CAG TAT TAT K T R I F S I S P V Q F T I P F R Q Y Y	360
361	TTA GAC TTT ATG GCG TCC TAT CGA GCT GCA CGA L D F M A S Y R A A R	393

شكل 8. تتابع القواعد الأزوتية في قطعة المجين الفيروسي 395 زوج قاعدي للعزلات السورية والأحماض الأمينية الناتجة عنها.
Figure 8. Nucleotides sequence of the viral genome fragment 395 bp of the DWV Syrian isolates and the amino acids produced.

المناقشة

أظهرت الدراسة انتشار فيروس DWV في ثمانى محافظات سورية (دمشق وريفها، السويداء، القنيطرة، حمص، حماه، طرطوس واللاذقية) بنسبة إصابة وصلت إلى 100% في العينات التي أبدت أعراض ظاهرية للإصابة و55% في العينات التي لم تبد أية أعراض. ومن خلال المشاهدات الحقلية والتحليل المخبري للعينات المدروسة تبين أن الإصابة بفيروس DWV ترافقت بشكل كبير مع الإصابة بأكاروس الفاروا وهذا قد يدل إلى الارتباط الوثيق بينهما (10، 18). بتحليل تتابع القواعد الأزوتية لثمانى عينات (عينة واحدة من كل محافظة) باستخدام النسخ العكسي المتعدد تبين وجود فيروس DWV عبر الكشف عن القطعتين 195 و395 زوج قاعدي على هلامة الأغاروز. كما أظهرت شجرة القرابة للعزلات السورية تقارباً فيما بينها، فبلغت نسبة التطابق 97.9-100% و 98.7-100% عند دراسة القطعتين 195 و 395 زوج قاعدي، على التوالي. أبدت العزلات السورية والعالمية تقارباً على مستوى البلدان المجاورة لبعضها في معظم الحالات وفي بعضها الآخر لم يكن هذا التقارب واضحاً، وهذا يشير إلى وجود فيروس DWV ضمن مستعمرات

يصيب فيروس DWV جميع الأطوار الحياتية لنحل العسل ولكن بدون ظهور أعراض واضحة، ويعد من أكثر فيروسات النحل انتشاراً على مستوى العالم (14، 15). المعلومات المتوفرة عن فيروسات نحل العسل والمنتشرة في سورية قليلة نسبياً، حيث أشير مؤخراً إلى انتشار لفيروس DWV (25) وفيروس شلل النحل الحاد *Acute bee paralysis virus* (ABPV) (4). هدفت هذه الدراسة إلى معرفة مدى انتشار فيروس DWV في سورية، وتحديد مدى التباين الوراثي بين العزلات السورية وغيرها من العزلات العالمية والإقليمية المتوافرة في البنك الوراثي. حيث يعد استخدام شجرة القرابة Phylogenetic tree الناتجة عن تحليل تتابع القواعد الأزوتية ذا كفاءة في دراسة التباينات الوراثية لعزلات مختلفة من فيروس واحد، كما يمكنها تحديد أصل هذه العزلات ومراقبة انتشارها (9، 10)، مما يساعد في تفسير بعض المعوقات التي تواجه الباحثين والمختصين في تربية النحل.

المعروف في الفيروسات أن البروتينات التركيبية هي المستخدمة في توليد الأجسام المضادة وهي المناطق التي تطراً عليها تغيرات بشكل متواصل، في حين أن قطع المجين التي ترمز إلى البروتينات الوظيفية تعد مناطق محفوظة لأن أي تغير فيها سوف يؤدي إلى تغيرات وحتى خلل في عملية تضاعف الفيروس ووظائف المورثات الأخرى (10).

بناءً على النتائج التي حصلنا عليها فإن التعمق في دراسة مجين فيروسات DWV المنتشرة في سورية يعد أمراً لا بد منه وذلك من حيث القيام بتحليل ودراسة أوسع تشمل كامل جينوم الفيروس حيث يساعد ذلك في التزود بمعلومات أكثر دقة ودلالة حول هذه التغيرات الأمر الذي يساعد الباحثين على زيادة معرفتهم بأمراض النحل الفيروسية التي تهدد صناعة النحل محلياً وعالمياً.

النحل منذ فترة طويلة، وبأن تطوره جرى بشكل مستقل دون أن يكون عملية انتقاله بين المستعمرات (وعبر البلدان) ذلك التأثير (10).

عند دراسة شجرة القرابة الوراثية، وضعت المجموعة الخارجية كلا الفيروسين KV و VDV-1 كمجموعة خارجية عند دراسة القطعة 195 زوج قاعدي، في حين توضع فيروس VDV-1 فقط عند دراسة القطع 395 زوج قاعدي وتقارب فيروس KV مع عزلات فيروس DWV. نتج عن التغييرات في تتابع القواعد الأزوتية تغيير في الأحماض الأمينية المشفرة بوساطة القطعة 195 زوج قاعدي والتي تعد جزءاً من مورثة البروتين L وهو من البروتينات التركيبية (البنوية) للفيروس في الموقعين 12 و 19. كما أن ثبات الأحماض الأمينية الناتجة عن تشفير القطعة 395 زوج قاعدي رغم الاختلاف في تتابع القواعد الأزوتية والتي تعد جزءاً من مورثة أنزيم RdRp وهو بروتين وظيفي (غير تركيبية)، ومن

Abstract

Barhoum, H.S., H. Adib Al-Roz and A.M. Mouhanna. 2017. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Deformed wing virus that infects honey bees in Syria. Arab Journal of Plant Protection, 35(3): 155-163.

This study was based on the evaluation of 240 beehives distributed in eight Syrian provinces. Multiplex one-step RT-PCR confirmed the presence of *Deformed wing virus* in 100% of symptomatic hives and in 55% of asymptomatic hives. Phylogenetic analysis showed high homology among Syrian isolates that reached 97.9-100%, and 98.7-100% for both amplified fragments 195 and 395 bp, respectively. The variability of nucleotides sequence of the 195 bp fragment led to some variability in the amino acids sequences produced, whereas, the 395 bp fragment coded for identical amino acid sequences in spite of the variability in the nucleotide sequences among virus isolates. This study revealed that the *Deformed wing virus* is widespread in Syria, with high genomic homology between Syrian and global isolates.

Keywords: *Deformed wing virus*, honeybee, phylogenetic tree, Syria.

Corresponding author: Ahmed Mouhanna, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Damascus, Syria, Email: A.M.Mouhanna@gmail.com

References

6. Antunez, K., B. D'Alessandro, E. Corbella, G. Ramallo and P. Zunino. 2006. Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93: 67-70.
7. Bailey, L. and B.V. Ball. 1991. Honey bee pathology (2nd Ed.). Academic Press; London, UK. 193 pp.
8. Baker, A. and D. Schroeder. 2008. Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 239-242.
9. Bakonyi, T., E. Grabensteiner, J. Kolodziejek, M. Rusvai, G. Topolska, W. Ritter and N. Nowotny. 2002. Phylogenetic analysis of acute bee paralysis virus stains. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 6446-6450.
10. Berenyi, O., T. Bakonyi, I. Derakhshifar, H. Köglberger, G. Topolska, W. Ritter, H. Pechhacker and N. Nowotny. 2007. Phylogenetic analysis of deformed wing virus genotypes from diverse geographic origins indicates recent global distribution of the virus. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3605-3611.
11. Bowen-Walker, P.L., S.J. Martin and A. Gunn. 1999. The transmission of deformed wing virus

المراجع

1. برهوم، همام شعبان، هشام أديب الرز وأحمد محمد مهنا. 2016. دراسة مرجعية لفيروسات نحل العسل الأكثر انتشاراً في العالم: الجزء الثاني. مجلة وقاية النبات العربية، 34: 156-166.
2. برهوم، همام شعبان وأحمد محمد مهنا. 2016. تشخيص بعض الأمراض الفيروسية لنحل العسل المنتشرة في سورية. الصفحة 2. في: دور النحالين العرب في تنمية المجتمع. أبحاث أقيمت في المؤتمر التاسع لاتحاد النحالين العرب. الأمانة الفرعية لاتحاد النحالين العرب في الجمهورية العربية السورية، دمشق، تشرين الثاني/نوفمبر، 2016.
3. مهنا، أحمد محمد وميسر الحاج عمر. 2013. دراسة مرجعية لأكثر فيروسات نحل العسل انتشاراً في العالم. مجلة وقاية النبات العربية، 31: 1-9.
4. مهنا، أحمد محمد. 2016. دراسة أولية عن فيروسات شلل نحل العسل في بعض المحافظات السورية. مجلة وقاية النبات العربية، 34: 211-219.
5. مهنا، أحمد مهنا وهمام شعبان برهوم. 2016. لمحة عن الفيروسات والأمراض الفيروسية لنحل العسل. الصفحة 4. في: دور النحالين العرب في تنمية المجتمع. أبحاث أقيمت في المؤتمر التاسع لاتحاد النحالين العرب. الأمانة الفرعية لاتحاد النحالين العرب في الجمهورية العربية السورية، دمشق، تشرين الثاني/نوفمبر، 2016.

- and C. Rossi. 2006. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Virology*, 80: 4998-5009.
23. Moore, N.F. and S. M. Eley. 1991. Picornaviridae: picornaviruses of invertebrates. Pages 371-386. In: Atlas of invertebrate viruses. J.R. Adams and J.R. Bonami (eds.). CRC Press, Boca Raton, Fla.
 24. Moore, N.F., B. Reavy and L.A. King. 1985. General characteristics, gene organization and expression of small RNA viruses of insects. *Journal of General Virology*, 66: 647-659.
 25. Mouhanna, A.M. and H.S. Barhoum. 2016. Detection of deformed wing virus of honeybees in some apiaries in Syria. *Annals of Biological Sciences*, 4: 9-12.
 26. Ongus, J.R., D. Peters, J.M. Bonmatin, E. Bengsch, J.M. Vlask, and M.M. vanOers. 2004. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *Journal of General Virology*, 85: 3747-3755.
 27. Ribière, M., B.V. Ball and M.F.A. Aubert. 2008. Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. Pages 15-84. In: *Virology and the honey bee*. M. F.A. Aubert, B.V. Ball, I. Fries, R.F.A. Morritz, N. Milani and I. Bernardinelli (eds.). EEC Publications, Brussels, Belgium.
 28. Ruether, I.G.A. and G. Goras. 2014. DWV in honeybees. GenBank KP165136-44.
 29. Tekin, S., Y. Gulmez and A. Bursali. 2008. Molecular detection and characterization of Deformed wing virus (DWV) in honeybee (*Apis mellifera* L.) and *Varroa destructor* in Ordu. GenBank FJ011106
 30. Tentcheva, D., L. Gauthier, L. Bagny, J. Fievet, B. Dainat, F. Cousserans, M. E. Colin and M. Bergoin. 2006. Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie*, 37: 41-50.
 31. Tentcheva, D., L. Gauthier, S. Jouve, L. Canabady-Rochelle, B. Dainat, F. Cousserans, B.V. Colin and M. Ball. 2004. Polymerase Chain Reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35: 431-439.
 32. Wang, H., J. Xie, T.G. Shreeve, J. Ma, D.W. Pallett, L.A. King and R.D. Possee. 2013. Sequence recombination and conservation of *Varroa destructor virus-1* and *Deformed wing virus* in field collected honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 8 (9): E74508.
 12. Carrillo-Tripp, J., A.G. Dolezal, M.J. Goblirsch, W.A. Miller, A.L. Toth and B.C. Bonning. 2016. In vivo and in vitro infection dynamics of honey bee viruses. *Scientific Reports*, 6: 22265.
 13. Chen, Y.P., J.A. Higgins and M.F. Feldlaufer. 2005. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 436-441.
 14. De Miranda, J.R. and E. Genersch. 2010. Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 (SUPPL 1): S48-S61.
 15. De Miranda, J.R., L. Bailey, B.V. Ball, P. Blanchard, G.E. Budge, N. Chejanovsky, Y.P. Chen, L. Gauthier, E. Genersch, D.C de Graaf, M. Ribière, E. Ryabov, L. De Smet and J.J.M. van der Steen. 2013. Standard methods for virus research in *Apismellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52: 56.
 16. Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
 17. 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 honeybees. *Journal of Virology*, 78: 1093-1100.
 18. Genersch, E. and M. Aubert. 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research*, 41: 54.
 19. Haddad, N.J., A. Noureddine, B. Al-Shagour, W. Loucif-Ayad, M.A.A. El-Niweiri, E. Anaswah, W. Abu Hammour, D. El-Obeid, A. Imad, M.A. Shebl, A.S. Almaleky, A. Nasher, N. Walid, M.F. Bergigui, O. Ya'nez and J.R. de Miranda. 2015. Distribution and variability of deformed wing virus of honeybees (*Apismellifera*) in the Middle East and North Africa. *Insect Science*, 00: 1-11.
 20. Jukes, T.H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. Pages 21-132. In: *Mammalian protein metabolism*. H.N. Munro (ed.), Academic Press, New York.
 21. Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
 22. Lanzi, G., J.R. De Miranda, M.B. Boniotti, C.E. Cameron, A. Lavazza, L. Capucci, S.M. Camazine

Received: March 6, 2017; Accepted: October 4, 2017

تاريخ الاستلام: 2017/3/6؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2017/10/4