

تحري انتشار السلالة الإسبانية لفيروس تجعد الأوراق الأصفر للبندورة/الطماطم (TYLCSV-ES) ضمن البيوت المحمية في الساحل السوري

اوس علي حسن¹ وأحمد محمد مهنا^{2,3*}

(1) الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، سورية؛ (2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية؛

(3) الجامعة السورية الخاصة (SPU)، سورية. * البريد الإلكتروني للباحث المراسل: A.M.Mouhanna@gmail.com

الملخص

حسن، اوس علي وأحمد محمد مهنا. 2022. تحري انتشار السلالة الإسبانية لفيروس تجعد الأوراق الأصفر للبندورة/الطماطم (TYLCSV-ES) ضمن البيوت المحمية في الساحل السوري. مجلة وقاية النبات العربية، 40(1): 7-14. <https://doi.org/10.22268/AJPP-40.1.007014>

يعدُّ فيروس تجعد الأوراق الأصفر للبندورة/الطماطم (TYLCV) *Tomato yellow leaf curl virus* أحد أهم الفيروسات التابعة لجنس *Begomovirus* والذي يصيب العديد من محاصيل الخضراوات مسبباً خسائر اقتصادية كبيرة. هدف هذا البحث للكشف عن سلالات الفيروس TYLCV على نبات البندورة/الطماطم (*Solanum lycopersicum* L.) في الساحل السوري. أكدت نتائج اختبار التفاعل المتسلسل للبوليمراز (PCR) باستخدام زوج البادئات TYAlmv2516/TYAlmc115 أن 6 عينات من أصل 15 عينة مصابة بفيروس TYLCV هي نباتات مصابة وحاملة للسلالة الإسبانية TYCSV-ES، بينما لم تتفاعل باقي عينات الدراسة مع زوج البادئات المذكور ولم تعط أية حزمة. وتبين لدى دراسة التتابع النيوكليوتيدي ورسم شجرة القرابة الوراثية أن العزلتين To11 و To18 المأخوذتين من موقع بارمايا وكرتو بمحافظة طرطوس متطابقتان بنسبة بلغت 99.1%، وتوضعتا تحت مجموعة واحدة ضمن مجموعة واحدة مع السلالة TYLCSV-ES 5a ذات الرقم LN846598 والمنتشرة في المغرب وكذلك بنسبة تطابق بلغت 97% و 97.4%، على التوالي. بينما توضع العزلة To6 المأخوذة من منطقة الزهيرات بمحافظة اللاذقية ضمن مجموعة واحدة مع السلالة TYLCSV-ES المأخوذة من منطقة الميرا في إسبانيا والموثقة بالرقم L27708 وبنسبة تطابق بلغت 99.5%.

كلمات مفتاحية: السلالة الإسبانية، فيروس تجعد الأوراق الأصفر للبندورة، بيوت محمية، الساحل السوري.

المقدمة

يصيب فيروس TYLCV إضافة للبندورة/الطماطم (*Solanum lycopersicum* L.) عدداً كبيراً من المحاصيل المهمة اقتصادياً بما فيها الفليفلة الحلوة (*Capsicum annuum* L.) والتبغ (*Nicotiana tabacum* L.) والفاصولياء (*Phaseolus vulgaris* L.) فضلاً عن أنواع من الأعشاب الضارة (Díaz-Pendón et al., 2010). ينتقل الفيروس بواسطة ذبابة التبغ البيضاء (*Bemisia tabaci* Genn.) بالطريقة المتأثرة الدوارة (Persistent circulative manner) (Wei et al., 2014).

تشير الاحصائيات إلى إصابة المزروعات بفيروس TYLCV ضمن مساحة تزيد عن 7 مليون هكتار سنوياً (Glick et al., 2009). تتمثل أعراض الإصابة باصفرار عام للنبات المصاب، وتقرم وقصر سلاميات، وتغير لون الأوراق وتشوه شكلها، فشل في عقد الأزهار، تدني حجم ونوعية ثمار النباتات المصابة مسبباً انخفاضاً في الغلة قد يصل حتى 90-100%؛ حيث يعد مرض TYLCD من أهم الأمراض الفيروسية ذات التأثير الاقتصادي المدمر على المحاصيل الزراعية، وذلك بسبب مده العوائل الواسع، بالإضافة لصعوبة السيطرة على انتشار ناقله

يتبع فيروس تجعد الأوراق الأصفر للبندورة/الطماطم (TYLCV) عائلة الفيروسات التوأمية *Geminiviridae* والجنس *Begomovirus*، والذي يعد أكبر أجناس الفيروسات النباتية، إذ يضم حوالي 424 نوعاً فيروسياً (Zerbini et al., 2017). يتكون المجين الوراثي من جزيء واحد من حمض الـ DNA أحادي السلسلة، حلقي مؤلف من 2800 نيوكليوتيد، يحتوي على ستة إطارات قراءة مفتوحة (ORFs)، ومحاط بالغلاف البروتيني المزدوج المميز لعائلة الفيروسات التوأمية (Gronenborn, 2007). سُميت البروتينات التي تشفرها إطارات القراءة المفتوحة الستة بناءً على وظائفها: بروتين الغلاف (CP/V1)، بروتين حركة الفيروس (MP/V2)، بروتين مرافق للتضاعف (Rep/C1)، بروتين تنشيط النسخ (TrAP/C2)، بروتين معزز للتضاعف (Ren/C3)، وبروتين محدد للتعبير عن الأعراض وانتشار الفيروس (C4)، وجميع هذه البروتينات الستة ضرورية لنجاح العدوى الجهازية للنبات العائل (Castillo et al., 2007).

المصابة في طوري الإزهار والعقد ووضعت في الأوت السائل وحفظت في المجمدة عند حرارة -90°س إلى حين إجراء الاختبارات.



شكل 1. عينات بندورة/طماطم تظهر أعراض الإصابة بفيروس TYLCV: التفاف حواف الأوراق نحو الأعلى مع تشوه شكل الأوراق واصفرارها وتقرم النبات.

Figure 1. Tomato plant samples with TYLCV symptoms of upward curling of leaflet margins, chlorosis, leaf deformation and plant stunting.

استخلاص الحمض النووي الريبي المنزوع الأوكسجين (DNA)

استُخلص الحمض النووي من العينات المختبرة باستخدام دوديسيل كبريتات صوديوم (SDS) Sodium dodecyl sulfate وفق الخطوات الموصوفة من قبل Gilbertson *et al.* (1991) مع بعض التعديلات بإضافة بروتيناز K لمحلول الاستخلاص ورفع سرعة التثليل لضمان ترسيب أفضل للحمض النووي (حسن ومهنا، 2016).

اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز Polymerase chain reaction (PCR)

أجري اختبار الـ PCR بحجم كلي 25 ميكروليتر باستخدام طقم الأدوات PromegaGoTaq® Green Master Mix 2X (ثلاثة بادئات (جدول 2). نُفِّذت تفاعلات البلمرة المتسلسلة باستخدام جهاز TC-5000 Thermocyclertechnique Ltd. (UK) على الشكل التالي: 5 دقائق عند حرارة 94°س للفصل الأولي، 40 دورة كل منها 30 ثانية عند حرارة 94°س، 45 ثانية عند حرارة اختلفت تبعاً للبادئ المستخدم (جدول 2)، دقيقة واحدة عند حرارة 72°س، وأخيراً 10 دقائق عند حرارة 72°س. رُحِّلَت نواتج تضخيم الـ PCR في هلامة الأغاروز تركيز 1.5%.

تحديد تتابع نيوكليوتيدات الحمض النووي (DNA) للعزلات الفيروسية المدروسة

أجري اختبار الـ PCR باستخدام زوج البادئات TYAlmv2516/TYAlmc115 المتخصص بالكشف عن السلالة الإسبانية TYCSV-ES، والمصمَّم لتضخيم منطقة بين جينية Intergenic region (IR) والجزء القريب من النهاية 5' للمورثة AC1 (مورثة بروتين التضاعف Rep) عند النيوكليوتيد رقم 2516

والحيوي، ولذلك تعدّ تربية المحاصيل المقاومة للذبابة البيضاء و/أو الفيروس من أهم طرائق وقاية المحاصيل (Shen *et al.*, 2020).

سجّل عدد كبير من السلالات لهذا الفيروس عالمياً والتي تسبب أعراضاً تختلف شدتها على النبات العائل باختلاف السلالة، فسُجِّلَت السلالتان الشرسة TYLCV-IL والمعتدلة TYLCV-Mld في فلسطين المحتلة، وينتشر في المنطقة العربية عدد آخر من سلالات هذا الفيروس مثل السلالة الإسبانية TYLCSV-ES وسلالة صقلية TYLCSV-Sic والسلالة العمانية TYLCV-om (Anfoka *et al.*, 2008). وقد لوحظ بأن الإصابة بهذا الفيروس غالباً ما تكون إصابة مختلطة ناتجة عن معقد فيروسي لعدد من سلالات TYLCV معاً، مما يزيد من حدة الأعراض ويؤدي لمزيد من الخسائر الاقتصادية، وذلك من خلال حدوث عمليات إعادة توليف Recombination بين سلالات مختلفة لهذا الفيروس (Monci *et al.*, 2002).

كُشِفَ في الساحل السوري خلال الأعوام 2014-2016 عن كل من السلالة المعتدلة TYLCV-Mld والشرسة TYLCV-IL (Hasan & Mouhanna, 2016)؛ ولوحظ خلال موسمي الزراعة 2018-2019 ظهور أعراض ظاهرية أكثر حدة وتشابه تلك الأعراض التي يسببها فيروس TYLCV على نباتات البندورة/الطماطم، مما استدعى القيام بمسح حقلي لتحري السلالات المختلفة لفيروس TYLCV المعروفة بانتشارها حالياً في منطقة حوض البحر المتوسط، كالسلالة الإسبانية TYLCV-ES وسلالة صقلية TYLCSV-Sic والسلالة العمانية TYLCV-om والتي تسبب أضراراً كبيرة لنبات البندورة/الطماطم في منطقة حوض البحر المتوسط. وقد بيّنت دراسة سابقة انتشار سلالة صقلية TYLCSV-Sic بشكل محدود في بعض البيوت المحمية في الساحل السوري (حسن ومهنا، 2021). لذا هدف هذا البحث إلى الكشف عن انتشار السلالة الإسبانية TYLCSV-ES في الساحل السوري على الرغم من ندرة المعلومات المتوفرة عن التنوع الحيوي لهذه السلالة (Díaz-Pendón *et al.*, 2019).

مواد البحث وطرائقه

المسح الحقلي وجمع العينات

أُجريت زيارات حقلية إلى عدد من البيوت المحمية في الساحل السوري خلال الفترة الواقعة ما بين كانون أول/ديسمبر 2018 ولغاية تشرين الثاني/نوفمبر 2019، جُمع خلالها عينات من أوراق بعض نباتات البندورة/الطماطم (جدول 1) التي أظهرت أعراضاً شبيهة بالأعراض التي يسببها فيروس TYLCV (شكل 1). جُمعت القمم النامية للنباتات

AB1 PRISM® 310 وحدد تتابع النيوكليوتيدات باستخدام جهاز Genetic Analyzer. ولتحديد السلالة TYCSV-ES المحلية الموجودة ضمن العزلات المدروسة، وموقعها في شجرة العلاقة الوراثية Phylogenetic tree استخدم تتابع النيوكليوتيدي لأربع عشرة سلالة من سلالات TYCSV-ES المنتشرة في دول المنطقة والعالم، والتي تتوفر تتابعاتها النيوكليوتيدية بشكل موثق في البنك الوراثي (Genbank, www.ncbi.nlm.nih.gov) (جدول 3).

(Anfoka *et al.*, 2005). اختيرت العزلات To18، To11، To6، لتتبع النيوكليوتيدات للسلالة الإسبانية TYCSV-ES وذلك بهدف تحقيق أفضل تمثيل للتوزيع الجغرافي من بين العزلات التي أعطت تفاعلاً إيجابياً. ولذلك رُحِلَ 5 ميكروليتر من نواتج الـ PCR في هلامة الأغاروز 1.5% للتأكد من نجاح مضاعفة المنطقة IR وجزء من مورثة بروتين التضاعف Rep تمهيداً لمعرفة تتابع النيوكليوتيدي لكليهما. وبعد التأكد منها، رُحِلَت العينات المختارة في هلامة الأغاروز 1%، ثم اقتطعت الحزم المطلوبة، واستخلصت من الهلامة باستخدام طقم الأدوات QIAquick Gel Extraction Kit No.28704، ثم نقيت العينة من النيوكليوتيدات وجففت

جدول 1. العزلات الفيروسية التي درست، مواقع الجمع والأعراض الرئيسية على النباتات التي جمعت منها.

Table 1. Virus isolates studied, collection locations and major symptoms on plants from which samples were collected.

Symptoms	الأعراض	Location	الموقع	رمز العينة Sample
				Lattakia اللاذقية
Leaf curling	التفاف حواف أوراق	Siano	سيانو	To1
Leaf curling and yellowing	التفاف حواف واصفرار أوراق	Al-Edia	العديدية	To2
Plant stunting	تقزم النبات	Al-Burjan	البرجان	To3
Leaf curling and yellowing	التفاف حواف واصفرار أوراق	Arab Al-Mulk	عرب الملك	To4
Leaf curling	التفاف حواف أوراق	Bsaieen	بسيين	To5
Leaf curling	التفاف حواف أوراق	Al-Zheriat	الزهيريات	To6
Leaf curling	التفاف حواف أوراق	Bustan Al-Jame'	بستان الجامع	To7
Plant stunting	تقزم النبات	Ras Al-Ain	رأس العين	To8
Plant tunting	تقزم النبات	Benjaro	بنجارو	To9
Leaf curling	التفاف حواف أوراق	Acharashir	الشراشير	To10
				Tartous طرطوس
Plant stunting	تقزم النبات	Barmaia	بارمايا	To11
Leaf curling and yellowing	التفاف حواف واصفرار أوراق	Annaza	الغنازة	To12
Plant stunting	تقزم النبات	Al-Rawda	الروضة	To13
Leaf curling and yellowing	التفاف حواف واصفرار أوراق	Al Sisniyeh	السيينية	To14
Plant stunting	تقزم النبات	Maten Al-Sahel	متن الساحل	To15
Leaf curling	التفاف حواف أوراق	Hosain Al Bahir	حصين البحر	To16
Leaf curling	التفاف حواف أوراق	Meaar Shaker	ميعار شاكر	To17
Leaf curling and yellowing	التفاف حواف واصفرار أوراق	Kartu	كرتو	To18
Leaf curling	التفاف حواف أوراق	Al-Jarwiah	الجروية	To19

جدول 2. تسلسل البادئات المستخدمة في اختبارات PCR ودرجات الحرارة النسبية لالتصاقها.

Table 2. The nucleotides sequence of primers used and the annealing temperature used for each.

المرجع Reference	حرارة الإلتحام Ann. temp.	الجين المضخم Amplified Gene	حجم الدنا المضخم Size of amplified DNA	تتالي القواعد من 5' إلى 3'	الفيروس Virus	البادئ * Primer*
Khan <i>et al.</i> , 2007	52°C	CP	550-bp	GCCYATRATAYAGRAAGCCMAG GGRITTDGARGCATGHGTACATG	Begomovirus	AV494 ^a AC1048 ^a
Wyatt & Brown, 1996	53°C	CP	650-bp	ACGCCCGYCTCGAAGGTTTCG GTACAWGCCATATACAATAACAAGGC	TYLCV	TycpV369 ^a TycpC1023 ^a
Anfoka <i>et al.</i> , 2005	62°C	IR-Rep	433-bp	TTTTATTGTTGGTGTGTTGTAGTTGAAG ATATTGATGGTTTTTTTCAAACCTTAGAAG	TYLCSV-ES	TYAlmv2516 ^b TYAlmc115 ^b

* ^a=Degenerate primers, ^b= Specific primers.

**= بادئات غير متخصصة، ^b= بادئات متخصصة.

التحليل الإحصائي

استُخدمت عدة برامج لقراءة وتحليل النتائج النيوكليوتيدي لقطعة الحمض النووي DNA، ومنها: BlastN/Nucleotide blast للموقع ([URL:http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/))، وبرنامج المحاذاة Alingment ورسم الشجرة الوراثية ClustalX الإصدار الثاني بالاعتماد على طريقة Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987)، وبرنامج MegAlign الإصدار السابع (DNASTAR, 2007) لتحديد قيم ال Bootstrap ونسب القرابة الوراثية بين السلالات المحلية وبعض السلالات العالمية.

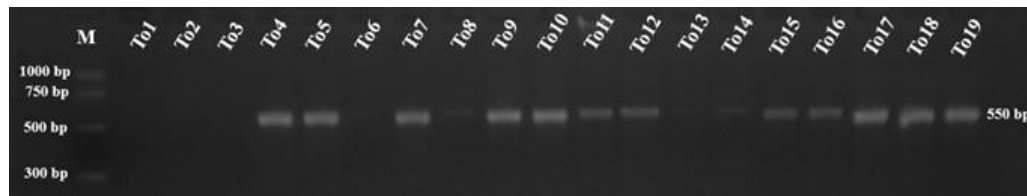
النتائج

نواتج الحمض النووي DNA في اختبار PCR

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي لمنتجات ال Generic PCR باستخدام زوج البادئات المتعددة AV494/AC1048 المتخصص بالكشف عن منطقة محافظة (Conserved region) ضمن مورثة الغلاف البروتيني

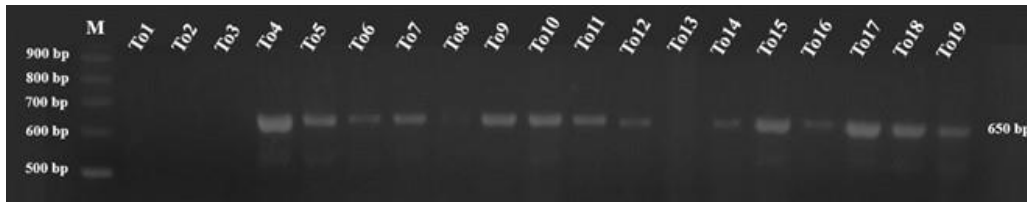
CP في مجين فيروسات جنس *Begomovirus* وجود تفاعل إيجابي وذلك من خلال تضخيم قطعة بوزن جزيئي 550 زوج قاعدي (bp) عند جميع العزلات المدروسة باستثناء To1، To2، To3، والتي لم تبد أي تفاعل (شكل 2).

وعند إجراء الرحلان الكهربائي لنواتج ال Generic PCR باستخدام زوج البادئات المتعددة TycpV369/TycpC1023 المتخصصة بالكشف عن مختلف سلالات فيروس TYLCV ظهر تفاعل إيجابي عند كل العزلات المدروسة باستثناء العزلات To1، To2، To3، To13، وأعطت كل عزلة إيجابية حزمة واحدة بوزن جزيئي 650 زوج قاعدي (شكل 3). كما أظهرت نتائج اختبار التفاعل المتسلسل للبوليمراز باستخدام زوج البادئات TYAlmv2516/TYAlmc115 المتخصص بالكشف عن السلالة الإسبانية TYLCSV-ES وجود تفاعل إيجابي مع العزلات To6، To8، To11، To12، To17، To18، وأعطت كل واحدة منها حزمة واحدة بوزن جزيئي 433 زوج قاعدي، فيما لم تتفاعل باقي العزلات ولم تعط أي حزمة (شكل 4).



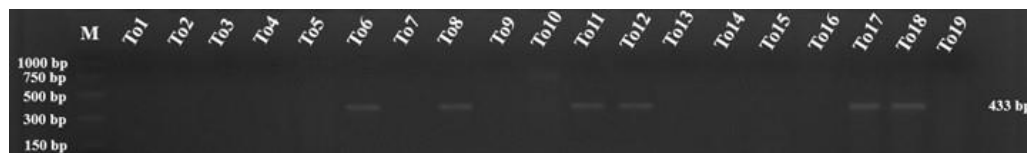
شكل 2. الكشف عن وجود فيروس من الجنس *Begomovirus* في العينات النباتية التي جمعت من سورية باختبار Generic PCR باستخدام زوج البادئات AV494/AC1048.

Figure 2. Detection of the presence of a *Begomovirus* in the tested plant samples collected from Syria by generic PCR using AV494/AC1048 primer pair.



شكل 3. تأكيد وجود فيروس TYLCV في العزلات السورية باختبار Generic PCR باستخدام زوج البادئات المتعددة TycpV369/TycpC1023.

Figure 3. Confirming the presence of TYLCV in the Syrian tomato isolates by generic PCR using TycpV369/TycpC1023 primers pair.



شكل 4. الكشف عن وجود السلالة الإسبانية TYLCSV-ES في العزلات السورية باختبار PCR واستخدام زوج البادئات TYAlmv2516/TYAlmc115.

Figure 4. Identification of TYLCSV-ES strain in the Syrian isolates by PCR using TYAlmv2516/TYAlmc115 primers pair.

جميعها ضمن مجموعة واحدة (جدول 3). بلغت قيمة معامل Bootstrap عند العقدة المشتركة للعزلتين (To18، To11) مع السلالة المغربية 43.7% (شكل 6). أما العزلة To6 المأخوذة من منطقة الزهيرات بمحافظة اللاذقية فتوضعت ضمن مجموعة واحدة مع سلالة TYLCSV-ES المأخوذة من منطقة ألميرا في إسبانيا والموتقة بالرقم L27708 وبنسبة تطابق بلغت 99.5% (جدول 3)، وبلغت قيمة معامل Bootstrap عند العقدة المشتركة لهما 42.5% (شكل 6). كما بلغت نسبة التطابق بين العزلة المحلية To6 لمحافظة اللاذقية وكلٍ من العزلتين المحليتين To11 وTo18 لمحافظة طرطوس 97% و97.4%، على التوالي (جدول 3).

المناقشة

أمكن في هذا البحث وللمرة الأولى في سورية الكشف عن انتشار السلالة الإسبانية لفيروس تجعد الأوراق الأصفر للبنندورة TYLCSV-ES على نبات البنندورة في الساحل السوري باستخدام بادئات متخصصة بطريقة التفاعل المتسلسل للبوليمراز (PCR)، ومن ثم دراسة التتابع النيوكليوتيدي لعينات العزلة المحلية لهذه السلالة.

أظهرت نتائج اختبار Generic PCR باستخدام زوج البادئات المتعددة AV494/AC1048 بأن 16 من أصل 19 عينة مصابة بأحد الفيروسات التابعة لجنس *Begomovirus*، مما يؤشر لوجود انتشار وبائي لهذه الفيروسات على مستوى الأمراض الفيروسية التي تصيب محصول البنندورة في سورية. كما بينت نتائج اختبار Generic PCR باستخدام زوج البادئات المتعددة TycpV369/TycpC1023 بأن 15 عينة من أصل 19 كانت مصابة بفيروس TYLCV.

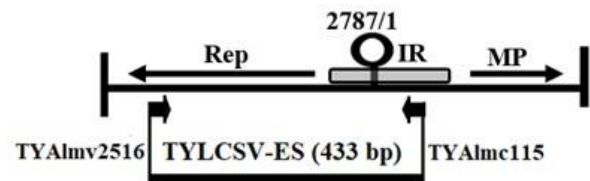
جدول 3. نسب التطابق والاختلاف بين العزلات المحلية To6 وTo11 وTo18 للسلالة TYLCSV-ES لفيروس تجعد الأوراق الأصفر للبنندورة/الطماطم (TYLCV) وبعض السلالات العالمية.

Table 3. Average nucleotide identity (ANI) and divergence among local TYLCSV-ES isolates To6, To11, To18 compared with some global TYLCSV-ES isolates.

		Percent Identity																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
Divergence	1	■	96.7	97.2	98.1	97.4	97.0	98.1	98.8	98.1	98.4	99.1	98.1	97.2	98.6	97.7	86.0	85.2	1	TYLCSV-ES Morocco LN846598.1
	2	3.3	■	98.1	97.4	95.3	94.9	97.4	97.7	96.7	97.2	97.4	96.5	98.4	97.0	96.7	86.2	85.7	2	TYLCSV-ES Morocco LN846596.1
	3	2.8	1.9	■	97.7	95.8	95.4	97.7	98.1	97.2	97.7	97.9	97.0	98.8	97.5	97.2	86.9	86.7	3	TYLCSV-ES Morocco LN846595.1
	4	1.9	2.6	2.4	■	96.8	96.3	100.0	99.1	98.1	98.6	98.8	97.9	97.7	98.4	97.9	86.0	85.7	4	TYLCSV-ES Spain:Malaga KC953603.1
	5	2.6	4.8	4.3	3.3	■	99.1	96.8	97.7	96.5	97.2	97.9	97.0	95.8	97.4	96.5	85.2	84.5	5	TYLCSV-ES Syria:Tartus To18
	6	3.1	5.3	4.8	3.8	0.9	■	96.3	97.2	96.1	96.8	97.4	96.8	95.4	97.0	96.1	85.0	84.2	6	TYLCSV-ES Syria:Tartus To11
	7	1.9	2.6	2.4	0.0	3.3	3.8	■	99.1	98.1	98.6	98.8	97.9	97.7	98.4	97.9	86.0	85.7	7	TYLCSV-ES Spain:Malaga DQ317725.1
	8	1.2	2.4	1.9	0.9	2.4	2.8	0.9	■	98.8	99.5	99.8	98.8	98.1	99.3	98.8	86.7	85.9	8	TYLCSV-ES Spain:Murecia DQ058081.1
	9	1.9	3.3	2.8	1.9	3.6	4.1	1.9	1.2	■	98.4	98.6	97.7	97.2	98.1	97.7	85.7	85.0	9	TYLCSV-ES Spain:Murecia AY702650.1
	10	1.6	2.8	2.4	1.4	2.8	3.3	1.4	0.5	1.6	■	99.3	98.8	97.7	98.8	98.4	86.2	85.4	10	TYLCSV-ES Spain:Canary AJ519675.1
	11	0.9	2.6	2.1	1.2	2.1	2.6	1.2	0.2	1.4	0.7	■	99.1	97.9	99.5	98.6	86.4	85.7	11	TYLCSV-ES Spain:Almeria L27708.1
	12	1.9	3.6	3.1	2.1	3.1	3.3	2.1	1.2	2.4	1.2	0.9	■	97.0	98.6	97.7	85.5	84.7	12	TYLCSV-ES Spain:Murecia Z25751.1
	13	2.8	1.6	1.2	2.4	4.3	4.8	2.4	1.9	2.8	2.4	2.1	3.1	■	97.5	97.2	87.9	87.4	13	TYLCSV-ES Morocco LN846597.1
	14	1.4	3.1	2.6	1.6	2.6	3.1	1.6	0.7	1.9	1.2	0.5	1.4	2.6	■	98.1	86.2	85.4	14	TYLCSV-ES Syria:Lattakia To6
	15	2.4	3.3	2.8	2.1	3.6	4.1	2.1	1.2	2.4	1.6	1.4	2.4	2.8	1.9	■	85.5	85.0	15	TYLCSV-ES Spain:Malaga DQ317726.1
	16	15.5	15.3	14.3	15.5	16.4	16.7	15.5	14.7	15.8	15.2	14.9	16.1	13.2	15.2	16.1	■	98.1	16	TYLCSV-ES Jordan EU307940.1
	17	16.5	15.9	14.7	15.9	17.4	17.7	15.9	15.6	16.8	16.2	15.9	17.1	13.9	16.2	16.8	1.9	■	17	TYLCSV-ES Italia:Sardinia DQ317796.1

دراسة وتحليل التتابع النيوكليوتيدي للمنطقة IR وجزء من مورثة بروتين التضاعف Rep وتحديد درجة القرابة الوراثية للعزلات المحلية للسلالة TYLCSV-ES

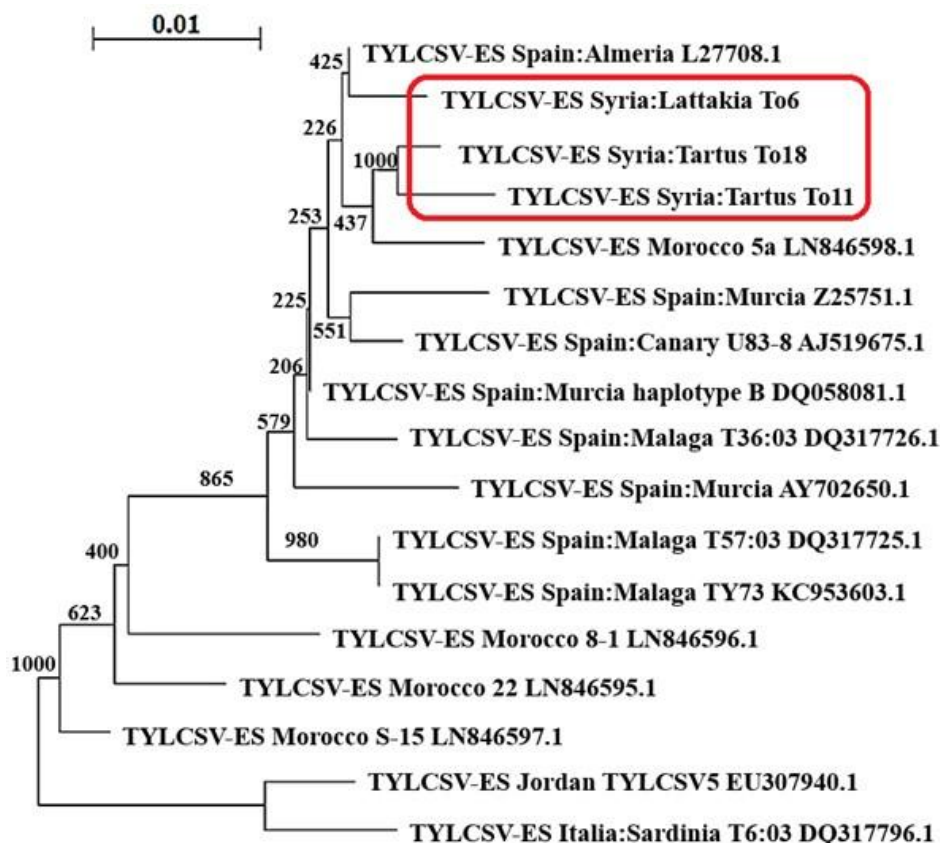
أجريت دراسة التتابع النيوكليوتيدي للحزمة ذات الحجم 433 زوج قاعدي التي كشف عنها بزواج البادئات TYAlmv2516/TYAlmc115. أظهرت النتائج بأن هذه الحزمة تقع في جزء من المنطقة بين الجين IR وحتى النهاية 5' لمورثة بروتين التضاعف Rep (المورثة AC1) في المجال بين النيوكليوتيد 115 وحتى 2516 بطول يقارب 433 نيوكليوتيد (شكل 5). (www.ncbi.nlm.nih.gov)



شكل 5. الموضع التقريبي للقطعة المضخمة باستخدام زوج البادئات TYAlmv2516/TYAlmc115 على مجين الفيروس والتي حددت على نيوكليوتيداتها.

Figure 5. Relative position of the sequenced PCR product using TYAlmv2516/TYAlmc115 primers pair on the viral genome.

رُسمت شجرة القرابة الوراثية (شكل 6) وفق طريقة Neighbor-joining، وحسب المؤشر الإحصائي Bootstrap، وتبين أن العزلتين To11 وTo18 المأخوذتين من منطقتي بارمايا وكرتو بمحافظة طرطوس متطابقتان فيما بينهما بنسبة 99.1%، وبنسبة 97% و 97.4% على التوالي مع السلالة المغربية TYLCSV-ES 5a الموتقة لدى البنك الوراثي الدولي NCBI بالرقم LN846598، كما توضعت



شكل 6. شجرة القرابة الوراثية للمنطقة IR وجزء من مورثة بروتين التضاعف Rep للعزلات المحلية من السلالة الإسبانية TYLCSV-ES بالمقارنة مع بعض السلالات العالمية.

Figure 6. Phylogenetic tree for IR region and part of Rep gene for the local TYLCSV-ES isolates compared with global TYLCSV-ES isolates

الأولى في سورية باعتمادها كمؤشر على سرعة انتشار هذا الفيروس بسلاطاته المختلفة على الرغم من إجراءات الوقاية والمكافحة المتخذة، وخصوصاً في ظل الانتشار الوبائي العابر للقارات لسلاطات الفيروس المختلفة (Mabvakure *et al.*, 2016).

أظهرت نتائج دراسة شجرة القرابة الوراثية بأن العزلتين المحليتين To18 و To11 من منطقتي بارمايا وكرتو بمحافظة طرطوس تندرجان ضمن تحت مجموعة واحدة وبنسبة تطابق بينهما بلغت 99.1%، وكذلك ضمن مجموعة واحدة مع السلالة TYLCSV-ES 5a ذات الرقم LN846598 والمنتشرة في المغرب وبنسبة تطابق بلغت 97% و97.4%، على التوالي، بينما توّضعت العزلة المحلية To6 المأخوذة من منطقة الزهريبات بمحافظة اللاذقية ضمن مجموعة واحدة مع السلالة TYLCSV-ES المأخوذة من منطقة ألميرا في إسبانيا والموتقة بالرقم L27708 وبنسبة تطابق بلغت 99.5%؛ ويمكن أن يعزى التباعد النسبي على شجرة القرابة الوراثية بين العزلات المحلية لمحافظة اللاذقية مع العزلات المحلية لمحافظة طرطوس بسبب الانعزال الجغرافي (Hosseinzadeh *et al.*, 2013)، أو إلى اختلاف أصولها، أو

أكدت نتائج اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز PCR باستخدام زوج البادئات TYAlmv2516/TYAImc115 أن كل من العينتين To6 وTo8 المأخوذتين من منطقتي الزهريبات ورأس العين بمحافظة اللاذقية، على التوالي، والعينات To11، To12، To17، To18 المأخوذة من مناطق بارمايا والعنزة وميعار شاكر وكرتو بمحافظة طرطوس، على التوالي، هي نباتات مصابة بالسلالة الإسبانية TYCSV-ES. بينما لم تتفاعل باقي العينات المدروسة مع هذا الزوج من البادئات ولم تعط أي حزمة، مما يدل على أنها عينات حاملة لسلاطات أخرى قد تكون سلالات جديدة لفيروس TYLCV الأمر الذي يستوجب مزيداً من الدراسة على المستوى الجزيئي، وخصوصاً أن دراسات سابقة قام بها Hasan & Mouhanna (2016) قد بينت انتشار كل من السلالتين المعتدلة TYLCV-Mld والشرسة TYLCV-IL لهذا الفيروس في الساحل السوري، ولم يُسجل حينها وجود أي من السلالات الأخرى بما فيها السلالة الإسبانية TYCSV-ES، إلا أنه جرى تسجيل السلالة صقلية لهذا الفيروس في مناطق الساحل السوري خلال عام 2021 (حسن ومهنا، 2021)؛ وبالتالي تكمن خطورة الكشف عن تواجد هذه السلالة للمرة

من حيث تحديد التتابع النيوكليوتيدي لكامل مجين الفيروسات المدروسة ليتسنى مقارنتها مع السلالات المنتشرة في الدول المجاورة كلبنان والأردن وفلسطين وغيرها. كما لا بدّ من إجراء دراسات مستقبلية بهدف الكشف عن جميع سلالات فيروس TYLCV والتي تصيب عدداً كبيراً من العوائل النباتية سواءً في البيوت المحمية أو الحقول المكشوفة مسببةً خسائر اقتصادية فادحة في سورية.

إلى حدوث عمليات توليف/تأشيب مع سلالات أخرى للفيروس (Moriones *et al.*, 2007)، مما يحتاج للمزيد من الدراسة على المستوى الجزيئي لتحديد مصادر انتقال العدوى في كل من المحافظتين. تُعدّ هذه الدراسة الأولى التي يتم فيها تسجيل الإصابة بالسلالة الإسبانية لفيروس تجعد الأوراق الأصفر للبندورة TYLCSV-ES على نبات البندورة/الطماطم في سورية. إلا أنه لا بدّ من متابعة هذه الدراسة

Abstract

Hasan, A.A. and A.M. Mouhanna. 2022. Investigation on the Spread of the Spanish Strain of Tomato yellow leaf curl virus TYLCSV-ES in Greenhouses Along the Syrian Coast. Arab Journal of Plant Protection, 40(1): 7-14. <https://doi.org/10.22268/AJPP-40.1.007014>

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) is one of the most destructive plant viruses which infect a large number of vegetable crops in greenhouses causing significant economic losses. A survey was conducted to identify TYLCV strains which infect tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) in greenhouses along the Syrian coast. PCR results using specific primer pair TYAlmv2516/TYAlmc115 confirmed the presence of Spanish strain (TYLCSV-ES) in 6 out of the 19 tested samples, whereas other samples didn't react with this primer pair. Phylogenetic tree showed that the isolates To11 and To18 collected from Tartous province clustered in the same subgroup with 99.1% nucleotide identity, and this subgroup clustered in one group with TYLCSV-ES 5a [LN846598] from Morocco with 97% and 97.4% nucleotide identities, respectively. Local isolate To6 collected from Lattakia province clustered in the same subgroup with TYLCSV-ES [L27708] from Almeria (Spain) with 99.5% nucleotides identity.

Keywords: Spanish strain, Tomato yellow leaf curl virus, tomato, greenhouses, Syrian coast.

Affiliation of authors: A.A. Hasan¹ and M.A. Mouhanna^{2,3*}. (1) National Commission for Biotechnology- Damascus- Syria; (2) Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria; (3) Syria Private University (SPU), Syria.
*Email of corresponding author: A.M.Mouhanna@gmail.com

References

- Castillo, A.G., G. Morilla, R. Lozano, D. Collinet, A. Perez-Luna and A. Kashoggi. 2007. Identification of plant genes involved in TYLCV replication. Pages 207-221. In: *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*. H. Czosnek (ed.). Springer, Dordrecht, The Netherlands. 447 pp.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4769-5_12
- Díaz-Pendón, J.A., M.C. Cañizares, E. Moriones, E. R. Bejarano, H. Czosnek and J. Navas-Castillo. 2010. Tomato yellow leaf curl viruses: meñ age à trois between the virus complex, the plant and the whitefly vector. *Molecular Plant Pathology*, 11: 441-450.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00618.x>
- Díaz-Pendón, J.A., S. Sánchez-Campos, I. M. Fortes and E. Moriones. 2019. *Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus*, a *Begomovirus* species evolving by mutation and recombination: a challenge for virus control. *Viruses*, 11(45): 1-25.
<https://doi.org/10.3390/v11010045>
- Gilbertson, R., M. Rojas, D. Russell and D. Maxwell. 1991. Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic *Geminivirus* in the Dominican Republic. *Journal of General Virology*, 72: 2843-2848.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-11-2843>
- Glick, M., Y. Levy and Y. Gafni. 2009. The viral etiology of Tomato yellow leaf curl disease - a review. *Plant Protection Sciences*, 3: 81-97.
<https://doi.org/10.17221/26/2009-PPS>

المراجع

- حسن، اوس علي وأحمد محمد مهنا. 2016. تقييم عدة طرائق لاستخلاص الـ DNA من نبات الفليفلة *Capsicum annuum* L. للكشف عن فيروسات تابعة لجنس *Begomovirus*. مجلة جامعة البعث، 38(12): 169-196.
- [Hasan, A.A. and A.M. Mouhanna. 2016. Evaluating of several methods to DNA extract from pepper plants *Capsicum annuum* L to detect viruses belonging to the genus *Begomovirus*. *Baath University Journal*, 38(12): 169-196. (In Arabic)].
- حسن، اوس علي وأحمد محمد مهنا. 2021. التحري عن سلالة صقلية لفيروس تجعد الأوراق الأصفر للبندورة TYLCSV-Sic ضمن البيوت المحمية في الساحل السوري. مجلة جامعة حماة، 4(14): 68-59.
- [Hasan, A.A. and A.M. Mouhanna. 2021. Detection of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus-Sicily (TYLCSV-Sic) on tomato in greenhouses in the Syrian Coast. *Hama University Journal*, 4(14): 59-68. (In Arabic)].
- Anfoka, G., M. Abhary and F. Haj Ahmad. 2008. Survey of tomato yellow leaf curl disease-associated viruses in the Eastern Mediterranean Basin. *Journal of Plant Pathology*, 90: 311-320.
<https://doi.org/10.4454/jpp.v90i2.667>
- Anfoka, G.H., M. Abhary and M.K. Nakhla. 2005. Molecular identification of species of the *Tomato yellow leaf curl virus* complex in Jordan. *Journal of Plant Pathology*, 87: 65-70.
<https://doi.org/10.4454/jpp.v87i1.898>

- Moriones, E., S. García-Andrés and J. Navas-Castillo.** 2007. Recombination in the TYLCV complex: a mechanism to increase genetic diversity- implications for plant resistance development. Pages 119-138. In: *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology and Breeding for Resistance*. H. Czosnek (ed.). Springer, Dordrecht, The Netherlands. 447 pp.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4769-5_7
- 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>
- Shen, X., Z. Yan, X. Wang, Y. Wang, M. Arens, Y. Du, R.G.F. Visser, R. Kormelink, Y. Bai and A.-MA. Wolters.** 2020. The NLR protein encoded by the resistance gene Ty-2 is triggered by the replication-associated protein Rep/C1 of Tomato yellow leaf curl virus. *Frontiers in Plant Science*, 11: 545306.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.545306>
- Wei, J., J.J. Zhao, T. Zhang, F.F. Li, M. Ghanim, X.P. Zhou, G.Y. Ye and S.S. Liu.** 2014. Specific cells in the primary salivary glands of the whitefly *Bemisia tabaci* control retention and transmission of Begomoviruses. *Journal of Virology*, 88(22): 13460–13468.
<https://doi.org/10.1128%2FJVI.02179-14>
- Wyatt, S.D. and J.K. Brown.** 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 86: 1288-1293.
<https://doi.org/10.1094%2FPhyto-86-1288>
- Zerbini, F.M., R.W. Briddon, A. Idris, D.P. Martin, E. Moriones, J. Navas-Castillo, R. Rivera-Bustamante, P. Roumagnac and A. Varsani.** 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae*. *Journal of General Virology*, 98: 131-133.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000738>
- Gronenborn, B.** 2007. *Tomato yellow leaf curl virus*, genome and function of its proteins. Pages 329-342. In: *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*. H. Czosnek (ed.). Springer, Dordrecht, The Netherlands. 447 pp.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4769-5_5
- Hasan, A.A. and A.M. Mouhanna.** 2016. Detection of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in some vegetable crops in greenhouses and identification of its strains in the Syrian Coast. *International Journal of ChemTech Research*, 9(11): 278-286.
- Hosseinzadeh, M.R., M. Shams-Bakhsh, S.K. Osaloo and J.K. Brown.** 2013. Phylogenetic relationships, recombination analysis, and genetic variability among diverse variants of *Tomato yellow leaf curl virus* in Iran and the Arabian Peninsula: further support for a TYLCV center of diversity. *Archives of Virology*, 159(3): 485–497.
<https://doi.org/10.1007/s00705-013-1851-z>
- Khan, A.J., N.A. Al-Saady, S. Al-Mahraki, M. Al-Oufi and A.M. Al-Subhi.** 2007. Molecular characterization of *Begomovirus* infecting sweet pepper in Oman. *Indian Journal of Biotechnology*, 6: 45-51.
- Mabvakure, B., D.P. Martin, S. Kraberger, L. Cloete, S. Brunshot, A.D.W. Geering, J.E. Thomas, K. Bananej, J. Lett, P. Lefeuvre, A. Varsani and G. W. Harkins.** 2016. Ongoing geographical spread of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology*, 498: 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.08.033>
- Monci, F., S. Sanchez-Campos, J. Navas-Castillo and E. Moriones.** 2002. A natural recombinant between the Geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, 303: 317–326.
<https://doi.org/10.1006/viro.2002.1633>

Received: April 29, 2021; Accepted: November 10, 2021

تاريخ الاستلام: 2021/4/29؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2021/11/10