توصيف بعض عزلات فيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) من جنوبي سورية ووادي الأردن بوساطة الطرق البيولوجية والجزيئية.

ناصر التميمي، هدى فواص**، عقل منصور***، عبد الله عربيات****، نداء سالم*****

ملخـص

أجريت هذه الدراسة خلال موسمي الزراعة 2005\2006 -2006\2007 من اجل التمييز بالطرق البيولوجية والجزيئية بين 5 عزلات من فيروس (ZYMV)؛ تم جمعها من جنوبي سورية ووادي الأردن وسميت العزلات SYR-N2, JOR-N1, JOR-N3, SYR-N4, SYR-N5. أجريت عدوى ميكانيكية للعزلات على النباتات الدالة وأظهرت العزلات JOR-N1, JOR-N3, SYR-N4 بقعاً موضعية صفراء اللون على النباتات الدالة *Chenopodium amaranticolor* و *C. quinoa*في حين أظهرت العزلات SYR-N2, SYR-N5 بقعاً موضعية بنفسجية إلى حمراء اللون. أظهرت العزلة SYR-N2 أعراض موزاييك على النبات الدال *N. benthemiana*. كما أظهرت العزلات أعراضاً مختلفة ومميزة على نبات الكوسا (*Cucurbita pepo*). تم استخلاص كامل الحمض النووي الرايبوزي (RNA) لجميع العزلات الخمسة تبعه اصطناع الدنا المكملة (cDNA) باستخدام نظام نسخ معكوس (RT-PCR) ثم استخدام تفاعل البلمرة للبوليميريز واستعمل زوج من البادئات: (ZYMVfor, ZYMVrev) لمضاعفة قطعة من الغشاء البروتيني للعزلات. تم تحليل سلسلة النيوكليتيدات، وبينت النتائج تشابه ترتيب سلسلة نيوكليتيدات للعزلة الأردنية JOR-N3 مع عزلة اليابان (AB004641) بنسبة 100% فيما تشابهت هذه العزلة والعزلات الأخرى (JOR-N1, SYR-N2, SYR-N4, SYR-N5) فيما بينها وبين عزلات سلوفاكيا وبرلين 1 وجنوبي أفريقيا بنسبة 97-99% وتشابهت العزلات الخمسة مع عزلة التشيلي (accession no. AF308732) بنسبة تتراوح بين 92-95%، وكانت العزلة السورية (SYR-N2) أقل عزلة تشابهت معها (92%) مقارنة مع باقي العزلات (95%). أظهرت نتائج تحليل سلسلة الأحماض الأمينية تشابه العزلات السورية والأردنية بنسبة 96-100%، وتشابهت بنسبة 94-98% مع عزلة التشيلي وكانت عزلة (SYR-N2) أقل تشابها مع عزلة التشيلي وبنسبة (94%) التي أظهرت أعراض شديدة في الحقل وفي الإعداء الميكانيكي.

الكلمات الدالة: عزلات فيروس الموزاييك الأصفر للكوسا، جنوبي سورية، وادي الأردن، فيروسات الكوسا.

المقدمـة

اكتشف فيروس الموزاييك الأصفر للكوسـا *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV جـنس *Potyvirus*، فصيلة *Potyviridae*) على نبات الكوسا في شمال إيطاليـا عام 1973 (Lisa *et al*., 1981)، وينتقل بوساطة العديـد من أنواع حشرة المن بالطريقة غير المثابرة، ويظهر علـى النباتات المصابة أعراض تقزم شديد واصـفرار وموزاييـك وتشوه الثمار والأوراق، ويسبب خسارة تصل إلى 99% في نبـ ـات الكوسـ ـا (Desbiez & Lecoq, 1997; Albrechtsen, 2006). ويعد فيروس ZYMV من أكثـر الفيروسات انتشارا على نبات الكوسا فـي سـورية والأردن وبنسبة عالية وصلت إلى ما يزيد على 55% (Mansour & Mansour, 1981; Al-Musa 1982; Al-Musa, 1989

* أخصائي فيروسات، مختبرات الثروة النباتية، وزارة الزراعة الأردنية
** أستاذ مساعد في قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق.
***أستاذ في قسم وقاية النبات،كلية الزراعة، الجامعة الأردنية.
****مدرس بجامعة البلقاء، فرع الزرقاء.
*****باحث، الجمعية العلمية الملكية.
تاريخ استلام البحث 2009/5/5 وتاريخ قبوله 2009/12/9.

; التميمي ورفاقه، 2009 ; قـواص، 2005; حـاج قاسـم ورفاقه، 2005).

يحتوي جينوم (Genome) فيروس ZYMV على سلسلة مفردة (monopartite) من الحمض النووي الرنا الموجـب (+ssRNA) مغلفة (encapsidated) في جزئيات خيطيـة مرنة (Flexuous filamentous)، يحتـوي علـى 9600 نيوكلوتيدات، ويحتوي الفيروس على حمض نـووي بنـسبة 4.5-7% و بروتين بنسبة 93-95.5% (Lisa & Lecoq 1984; Lecoq & Pitrat, 1983; Balint *et al*., 1990; Dougherty & Semler, 1993).

تختلف عـزلات فيـروس الموزاييـك الأصـفر للكوسـا (ZYMV) من حيـث الأعـراض التـي تـسببها (Lisa & Lecoq, 1984; Lecoq, *et al*., 1981; Provvidenti *et al*., 1984a) ومن حيث الاختلاف في النقل الحـشري بـالمن (Lecoq, *et al*., 1991, 1994; Bourdin & Lecoq, 1991; Gal-On *et al*., 1992; Granier *et al*., 1993) وقد وجد ان عزلة ZYMV-MZ الماليزية لا تنتقل بحـشرات المن *Myzus persicae* و*Aphis gossypii* (Sidek *et al*., 1999) ووجد أن حشرات المن هذه تستطيع أن تنقل عـزلات ZYMV-TW وZYMV-FL وZYMV-CT مـن تـايوان وفلوريدا وConnecticut على التوالي لكنها لم تستطيع أن تنقل عزلة ZYMV-WK الفرنسية (Wang *et al*., 1992).

ووجد سلالة من فيروس الموزاييـك الأصـفر للكوسـا (ZYMV) تسبب بقع متماوتة، وكذلك أعراض ذبول لنبات الشمام (melon) الذي يحتوي على جين (Fn) شبه السائد أو المـسيطر (semi-dominant) (Lecoq *et al*., 1981)، واكتشف لاحقا 22 عزلة من فيروس الموزاييـك الأصـفر للكوسا (ZYMV) مقـسمة إلـى ثلاثـة أنمـاط مرضـية (pathotypes) حسب تفاعلها على نبـات الـشمام (line 414723) الذي هو مقاوم لبعض عزلات الفيروس (Lisa & Lecoq, 1984; Risser *et al*., 1981; Lecoq & Pitrat, 1985)، وقد وجد لاحقا ما يزيد على 25 عزلة من الفيروس (ZYMV) (Guner & Wehner, 2008)؛ حيث اكتشفت عزلات مختلفة من فيروس (ZYMV) مثل عزلـة كاليفورنيا ومصر وفلوريـدا وايطاليـا وسـنغفورا وتـايون وغيرهـا (Lisa *et al*., 1981; Provvidenti *et al*., 1984b; Huang *et al*., 1987; De Bon *et al*., 1992; Boyhan *et al*., 1994; Wong *et al*., 1994; Wisler *et al*., 1995)، ويوجد تشابه بين العديد من عزلات فيروس ZYMV من الناحية البيولوجية والجزيئية؛ حيث وجد تشابه في ترتيب النيوكليتيدات للغلاف البروتيني بـين عـدد مـن عزلات فيروس ZYMV من جزر مارتينيجيو وعزلات من دول أخرى بنسبة 93-100% وظهرت اختلافات بيولوجيـة فيما بينها (Desbiez *et al*., 1996)، ووجد تشابه في كامل سلسلة الحمض النووي و تسلسل الأحماض الأمينة لـ 12 عزلة من فيروس ZYMV فـي سـلوفاكيا بنـسبة 90.4-98.8% و78-98.8% على التوالي، كما وجـد أن تسلـسل الحمض النووي لكامل للغشاء البروتيني لـ 50 عزلـة مـن فيروس ZYMV جمعت من مناطق مختلفة أن العزلات التي أخذت من وسط أوروبا كانت قريبة جدا من بعضها بعـضاً والشكلت مجموعة متشابهة جينياً (Glasa & Pittnerová, 2006).

وبمقارنة ترتيب نيوكليوتيـدات عزلـة (ZYMV) مـن التشيلي بعزلات أخرى أخذت معلوماتها من المركز الـدولي لمعلومات التقنيات الحيوية (NCBI) وجد أن عزلة التـشيلي تتشابه بنسبة 95% مع عزلة فلوريدا وعزلة تـايوان (TW-NT1) وبنسبة 94% مع عزلات مـن هنغاريـا واليابـان (Augar *et al*., 2004).

إن الدراسات الجزيئية من خلال تحليـل سلـسلة الرنـا (RNA) والأحمـاض الأمينيـة (Amino acids) لـبعض أجزاء جينوم الفيروس تعطي معلومات كافية حول مـستوى الاختلافات الموجودة بين السلالات الفيروسـية (Ward *et al*., 1992).

أهداف البحث:

تحديد الفروقات البيولوجية والجزيئيـة بـين عـدد مـن عزلات فيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) فـي كل من جنوبي سورية ووادي الأردن لما لهذا الفيروس مـن أهمية كبيرة، ووجود اختلاف من حيث الأضرار التي تسببها العزلات المختلفة عالميا من هذا الفيـروس ولعـدم وجـود دراسات سابقة في سورية والأردن بهذا الخصوص.

مواد البحث وطرائقه:

جمع العينات وحفظها:

خلال موسمي الزراعة 2006/2005-2005/2004 تم جمع (64) عينة من نباتات الكوسا من مختلف المناطق المستهدفة في البحث، التي شملت جنوبي سورية (محافظة دمشق وريف دمشق ودرعا) ووادي الأردن (الأغوار الجنوبيية والوسطى والشمالية)، التي أظهرت أعراض إصابة ظاهرية تشبه الأعراض المتسببة عن الإصابة بفيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) من ثآليل وموزاييك وبقع صفراء وتشوه الأوراق وأعراضا مختلفة أخرى، وحفظت العينات النباتية بعد ترقيمها في أكياس بلاستيكية عند درجة حرارة 4°س في صندوق الثلج، وفي المختبر تمت تجزئة كل عينة إلى ثلاثة أجزاء؛ الجزء الأول لاختباره مصليا والجزء الثاني لاختباره بيولوجيا والجزء الثالث حفظ في المجمدة على درجة حرارة -20°س لاختبارها جزيئيا.

الاختبارات المصلية:

فحصت عينات الكوسا التي تم جمعها بوساطة اختبار الادمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (اليزا) (ELISA) الموصوفة سابقا (Clark & Adams, 1977). استخلصت العصارة النباتية عن طريق الطحن اليدوي في هاون بورسلان بوجود محلول استخلاص فوسفاتي منظم (0.01M) درجة حموضة 7.0 ووضع شاهد موجب وآخر سالب للمقارنة، استخدمت أمصال مضادة للفيروسات الآتية والواردة من شركة Florilab الايطالية وهي: فيروس موزاييك الخيار *Cucumber mosaic virus* (CMV، جنس *Cucumovirus*، فصيلة *Bromoviridae*) وفيروس موزاييك الفصة *Alfalfa mosaic virus* (AMV، جنس *Alfamovirus*، فصيلة *Bromoviridae*) وفيروس موزاييك الكوسا *Squash mosaic virus* (SqMV، جنس *Comovirus*، فصيلة *Comoviridae*) وفيروس البقع المتماوتة للشمام *Melon necrotic spot virus* (MNSV، جنس *Camovirus*، فصيلة *Tombusviridae*) وفيروس التبقع الحلقي للبندورة (ToRSV) *Tomato ring spot virus* (ToRSV، جنس *Nepovirus*، فصيلة *Comoviridae*) وفيروس التبقع الحلقي للتبغ *Tobacco ring spot virus* (TRSV، جنس *Nepovirus*، فصيلة *Comoviridae*) وفيروس موزاييك الخس *Lettuce mosaic virus* (LMV، جنس *Potyvirus*، فصيلة *Potyviridae*) وفيروس موزاييك الأرابس *Arabis mosaic virus* (ArMV، جنس *Nepovirus*، فصيلة *Comoviridae*) وفيروس الحلقة السوداء للبندورة *Tomato black ring virus* (ToBRV، جنس *Nepovirus*، فصيلة *Comoviridae*). بينما تم الحصول على الأمصال المضادة للفيروسات الآتية من شركة Adgen البريطانية وهي: فيروس الموزاييك الأصفر للكوسا *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV، جنس *Potyvirus*، فصيلة *Potyviridae*) وفيروس الموزاييك والتبرقش الأخضر للخيار *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV، جنس *Tobamovirus*، فصيلة *Tobamoviridae*) وفيروس التبقع الحلقي للباباظ *Papaya ring spot virus* (PRSV، جنس *Potyvirus*، فصيلة *Potyviridae*) وفيروس موزاييك البطيخ *Watermelon mosaic virus* (WMV، جنس *Potyvirus*، فصيلة *Potyviridae*) وفيروس التفاف أوراق الكوسا *Squash leaf curl virus* (SLCV، جنس *Bigeminivirus*، فصيلة *Geminiviridae*) كما تم الحصول على الأمصال المضادة للفيروسات الآتية من شركة Agritest الايطالية: فيروس تقزم البندورة *Tomato bushy stunt virus* (TBSV، جنس *Tombusvirus*، فصيلة *Tombusviridae*) وفيروس الذبول البقعي للبندورة *Tomato spotted wilt virus* (TSWV، جنس *Tospovirus*، فصيلة *Bunyaviridae*). جري الاختبار وفق تعليمات الشركات المنتجة للأمصال واستخدم قارئ اليزا (ELISA Reader) عند طول موجة 405 نانومتر في مختبر الفيروسات في كلية الزراعة بجامعة دمشق ومختبر خدمات الوقاية في وزارة الزراعة الأردنية واعتمدت القراءة موجبة عندما تكون ثلاثة أضعاف الشاهد السالب.

العدوى الميكانيكية: اختيرت 5 نباتات كوسا من أصل 64 عينة جمعت من مناطق مختلفة (3 عينات من جنوبي سورية

وعينتين من وادي الأردن) تحتوي على إصابة منفـردة بفيروس الموزاييك الأصفر للكوسـا (ZYMV) وأعـراض إصابة مختلفة لإجراء العدوى الميكانيكية لها على مجموعـة من النباتات الدالة، وهذه العزلات هـي:-(JOR-JS58-05 (SYR-N2)،N1) SS22-06، (JOR-N3) JS32-06، (SYR-N4) SS24-06، (SYR-N5) SS59-05. زرعت بذور النباتات الدالة الـصغيرة الحجـم فـي تـرب معقمـة (Peatmoss) ضمن صواني تشتيل، ثم شتلت بعد نموها إلى أصص (pots) بلاستيكية قطر 10 سم فـي تـرب معقمـة وزرعت بذور النباتات ذات الحجم الكبير مباشرة في أصص (pots) بلاستيكية قطر 10 سم في ترب معقمة، وبعد نمـو النباتات إلى طور الورقة الفلقية لنباتات القرعيات والورقـة الثالثة لباقي الأنواع، تم الإعداء الميكانيكي للعزلات؛ حيث تم اعداء نباتين على الأقل من كل نوع من النباتات الدالة بعزلة واحدة من العزلات الخمسة لفيـروس الموزاييـك الأصـفر للكوسا (ZYMV) والمختبرة مصليا علـى مجموعـة مـن النباتات الدالة الآتية: *Chenopodium amaranticolor, C. quinoa, Nicotiana glutinosa, N. benthemiana, N. rustica, Gomphrena globosa,, Cucurbita pepo.* طحنت نباتات الكوسا المصابة كل على حدة في محلول فوسفاتي منظم (0.01M) درجـة حموضـة pH 7.0، استخدمت مادة كربيد السيليكون Carborundum (200 mesh) كمادة خادشة، تم إعداء 4 نباتات وأبقي نباتان كشاهد (Control) وغسلت النباتات بالماء المقطر بعد إجراء العدوى مباشرة، ووضعت في حاضنة علـى حـرارة 24± 1°س وفترة إضاءة 18 ساعة، وسجلت أعـراض الإصـابة الظاهرية الموضعية والجهازية على نحو دوري واختبـرت النباتات مصليا

الاختبارات المصلية للنباتات الدالة:

فحصت جميع النباتات الدالة المستخدمة في التجربة، التي أظهرت أعراض إصابة موضعية أو جهازيـة أو التـي لـم تظهر أية أعراض بوساطة اختبـار الادمـصاص المنـاعي المرتبط بالإنزيم (اليـزا) (ELISA) واسـتخدمت أمـصال متعددة الكلون مضادة لفيروس الموزاييك الأصـفر للكوسـا (ZYMV) كما في الطريقـة المـذكورة سـابقا فـي بنـد الاختبارات المصلية للنباتات الكوسا.

اسـتخلاص الحـامض النـووي الرايبـوزي (RNA extraction):

تم استخلاص كامل الحمض النووي الرنا (RNA) مـن نباتات الكوسا (الدالة) المعدية بعزلات فيـروس الموزاييـك الأصفر للكوسا (ZYMV) من جنوبي سورية ووادي الأردن باستخدام مجموعة (كـت) EZ-10 Spin Column Total RNA Minipreps Super Kit الموصوف مـن شـركة Biotechnology Department Bio Basic Inc. (Canada) وتـم حفـظ الحمـض النـووي (RNA) بعـد استخلاصه في ماء معقم ومقطر (RNase-free H_2O) على درجة حرارة -70 °س.

وتم تقدير كمية الرنا (RNA) المستخلص باستخدام جهاز الطيف الضوئي (Spectrophotometer S2100 Diode Array Biowave WPA).

اصطناع سلسلة الدنا (DNA) المكملة (cDNA)

تم تكوين سلسلة الدنا المكملة (cDNA) لعـزلات الـ (RNA) لفيروس الموزاييك الأصـفر للكوسـا (ZYMV) باستخدام نظام نسخ معكـوس (Reverse Transcription System) بوجـود إنـزيم النـسخ المعكـوس (Reverse Transcriptase AMV) وبـادئ عـشوائي (Random primer) و2 ميكرولتر من الرنا (RNA) المستخلص مـن كل عزلة، إضافة إلى المواد والمحاليل الكيماوية الداخلة فـي التفاعل وبالتراكيز الآتية: (5mM MgCl2, 1x Reverse Transcription buffer (10mM Tris-HCl pH 9.0 at 25° C), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1mM each DNTP, 1U/µl Recombinant RNasin Ribnucclease Inhibitor, 15u/µg AMV (Avian myeloblastosis virus) Reverse Transcriptase (high conc., 0.5 µg Oligo(dT)15 Primer or Random Primers per microgram RNA, 50ng/µl1.2kb Kanamycin Positive Control (RNA, total RNA). وبالطريقـة المبينـة فـي كتيـب تعليمات المنتج رقم (Cat. No. A3500 kit) الموصوفة من شركة بروميجا (Promega)، أبقيت أنابيب التفاعـل علـى

درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق ثم ادخلت الانابيب بجهاز الدوران الحراري (Thermo-cycular) لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 42°س و5 دقائق على درجة حرارة 95 °س وثم على درجة حرارة 0-5 °س لمدة 5 دقائق، وحفظت الأنابيب، التي أصبحت تحتوي (cDNA) في المجمدة على درجة حرارة -20 °س ؛ حيث تم تحويل سلسلة الحمض النووي الرنا (RNA) لفيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) إلى سلسلة الدنا المكملة (cDNA) وتم قياس كمية وتركيز الحمض النووي (cDNA) بوساطة جهاز الطيف الضوئي.

تفاعل البلمرة التسلسلي للبوليميراز PCR:

اختير زوج من البادئات (Primers) هما:

5'-GCTTCCGACAGGACTACGGCA-3'

ZYMVrev و

5'-GCCGAGGTATGGTTTGCTTCG-3'

ZYMVfor (Prieto, *et al*., 2001) المنتجين من شركة The Midland Certified Reagent Company (Inc.)، والمنطقة المضاعفة بوساطة هذه البادئات هي مطابقة لتسلسل القواعد النووية للموقع 9118-9508 من مورثة الغلاف البروتيني (3' region of coat protein gene) لعزلة التشيلي لفيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) (accession no. AF308732)، بحيث يضاعف قطعة الدنا (DNA) من مورثة الغلاف البروتيني بحجم 395bp تقريبا. اجري التفاعل بحجم 100ميكرولتر، باستخدام 10-20 مايكرولتر من السلسلة المكملة (cDNA) المخففة (في محلول TE المنظم) و25 dNTP mixture 10 mM وMgCl2 25 mM و25 وحدة إنزيمية من إنزيم التكثيف (*Taq* DNA Polymerase) و50 بيكومول من كل بادئة في وسط (Reverse Transcription buffer) مكون من (100 mM Tris-HCl pH 9.0 at 25º C, 500 mM KCl, 1% Triton X-100) إضافة إلى ماء مقطر ومعقم (Nuclease-Free water) ليصبح الحجم 100 ميكرولتر، تم تفاعل التضاعف في جهاز الدوران الحراري (PCR) (PTC-100 Programmable Thermal controller) في برنامج حراري يتكون من 35 دورة تتألف كل دورة من ثلاث مراحل تختلف عن بعضها بعضاً بدرجة الحرارة والفترة الزمنية المخصصة لكل مرحلة حيث تتضمن: تحطيماً حرارياً (Thermal Denaturation) وتكون على درجة حرارة 94ºس لمدة دقيقة واحدة ثم يتم ارتباط الـ DNA القالب مع البادئة (Annealing) على درجة حرارة 60ºس لمدة دقيقة واحدة، ثم الاستطالة (Extension) على درجة حرارة 72ºس لمدة دقيقة واحدة، وفيها يتم تركيب سلسلة جديدة بدءا من البادئة واعتمادا على DNA القالب، تترك العينات بعد الدورة الأخيرة مدة 5 دقائق على درجة حرارة 72ºس، وقيست كمية وتركيز الحمض النووي (DNA) بوساطة جهاز الطيف الضوئي.

الرحلان الكهربائي والتلوين (Electrophoresis and staining):

بعد الانتهاء من تضاعف الدنا DNA وضعت العينات في جيوب هلامة من الأجاروز (1.5غ أجاروز تمت إذابته في 100مل محلول TBE (Tris 0.605g, Boric acid 0.2555g, EDTA 0.185g) تركيز 0.5X حتى الغليان) وأضيف 4 ميكرولتر من مادة بروميد الايثيديوم إلى الهلامة عند التحضير، تم تصوير الهلامة بوساطة جهاز التصوير (Gel Documentation System).

تحليل سلسلة الدنا المستخلص (DNA analysis) والاحماض الامينية:

أرسلت عينات الدنا (DNA) الناتجة من الاختبار إلى شركة Macrogen لمعرفة ترتيب القواعد النيتروجينية (النيوكليوتيدات) (DNA sequencing) لسلسلة الدنا (DNA) الناتجة من التفاعل وبعد الحصول على النتائج تم تحليلها بوساطة نظام DNAMAN-6.0 Demo وتمت مقارنة التطابق (Alignment) في ترتيب سلسلة النيوكليوتيدات لعزلات الدنا (DNA) مع بعضها بعضاً وكذلك مع بعض عزلات فيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) الموجودة في الـ Genebank وتم تحليل البروتين-سلسلة الأحماض الأمينية (amino acids)- لعينات الدنا (DNA) ومقارنة العينات مع بعضها بعضاً ومع عزلة للفيروس من التشيلي (accession no. AF308732).

النتائج

الأعراض الحقلية:

أبدت عينات الكوسا المختارة والمصابة إصابة منفردة بفيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) أعراض إصابة ظاهرية مختلفة حيث أبدت العزلة (JOR-JS58-05) (JOR-N1) بثرات واصفرار الأوراق، والعزلة SS22-06 (SYR-N2) اصفرار وتشوه الأوراق، والعزلة JS32-06 (JOR-N3) اصفرار العروق والتفاف حواف الورقة للأعلى، والعزلة (SYR-N4) SS24-06 تشوه الأوراق وتمزقها على نحو خيطي والعزلة (SYR-N5) SS59-05 تبقعات واصفرار وسط الورقة (الجدول 1 والصورة 1).

الاختبارات المصلية:

أبدت نتائج اختبار الادمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (اليزا) (ELISA) إصابة 25 عينة من العينات إصابة منفردة بفيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV).

الجدول1: نتائج اختبار الادمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (اليزا) (ELISA)

الرقم	رمز العينة	Accessions no.	الموقع	التاريخ	الأعراض	القراءة
1	JS58-05 ** (JOR-N1)	EU999761	وادي الأردن/ ديرعلا	19/4/2005	بثرات واصفرار	0.825
2	SS22-06 * (SYR-N2)	EU999762	سورية/ جيلين المساكن	8\8\2006	اصفرار وتشوه الأوراق	1.119
3	JS32-06 (JOR-N3)	EU999763	وادي الأردن/ الكرامة	20/12/2006	اصفرار العروق والتفاف حواف الورقة للأعلى	0.871
4	SS24-06 (SYR-N4)	EU999764	سورية/ دمشق	6/8/2006	تشوه الأوراق وتمزقها على نحو خيطي	0.544
5	SS59-05 (SYR-N5)	EU999765	سورية/درعا	9/7/2005	تبقعات واصفرار وسط الورقة	0.81

*SS: Syrian isolate ،**JS: Jordanian isolate

العدوى الميكانيكية والاختبارات المصلية للعزلات على النباتات الدالة:

أظهرت نتائج العدوى الميكانيكية لعزلات فيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) على النباتات الدالة ظهور بقع موضعية صفراء متماوتة على نباتات *C. amaranticolor* للعزلات JOR-N1 وJOR-N3 وSYR-N4 وبقعاً صفراء بداية ثم تحول لونها إلى اللون البنفسج المحمر للعزلات SYR-N2 وSYR-N5 الجدول 2 وأظهرت جميع العزلات بقع صفراء اللون متماوتة على نباتات الـ *C. quinoa*، كما أظهرت جميع العزلات أعراضا متباينة من موزاييك وتشوه الأوراق وشبكية وشفافية العروق وغيرها على نباتات الكوسا الدالة *Cucurbita pepo*، ولم تشاهد أية أعراض على كل من *Nicotiana rustica* و*Gomphrena globosa*، وبين اختبار الادمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (اليزا) (ELISA) نتائج ايجابية لفيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) على جميع النباتات الدالة التي أبدت أعراضاً فيروسية، الجدول 2.

1JOR N1. بثرات واصفرار للعزلة

2SYR-N2. اصفرار وتشوه الأوراق للعزلة

3. اصفرار العروق والتفاف حواف الورقة للأعلى للعزلة JOR-N3

4SYR-N4. تشوه الأوراق وتمزقها بشكل خيطي للعزلة

5SYR-N5. تبقعات واصفرار وسط الورقة للعزلة

الصورة 1: أعراض الإصابة الفيروسية الطبيعية على نباتات الكوسا المنتخبة (N1, N2, N3, N4, N5) وأظهرت إصابة منفردة بفيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV).

الجدول: 2 نتائج العدوى الميكانيكية لعزلات فيروس (ZYMV) وفحص الاليزا على النباتات الدالة

النباتات الداله	* Isolates **(Symptoms and ELISA results)				
	JOR-N1	SYR-N2	JOR-N3	SYR-N4	SYR-N5
Chenopodium amaranticolor	CLL (+)	RLL (+)	CLL (+)	CLL (+)	RLL (+)
C. quinoa	CLL (+)	CLL (+)	CLL (+)	CLL (+)	CLL (+)
Cucurbita pepo	Mm, Vy (+)	Sm, B (+)	M, Ld (+)	M, CLL (+)	Ld, B (+)
Nocotiana rustica	-	-	-	-	-
N. benthemiana	-	M	-	-	-
Gomphrena globosa	-	-	-	-	-
N. glutinosa	-	-	-	-	-

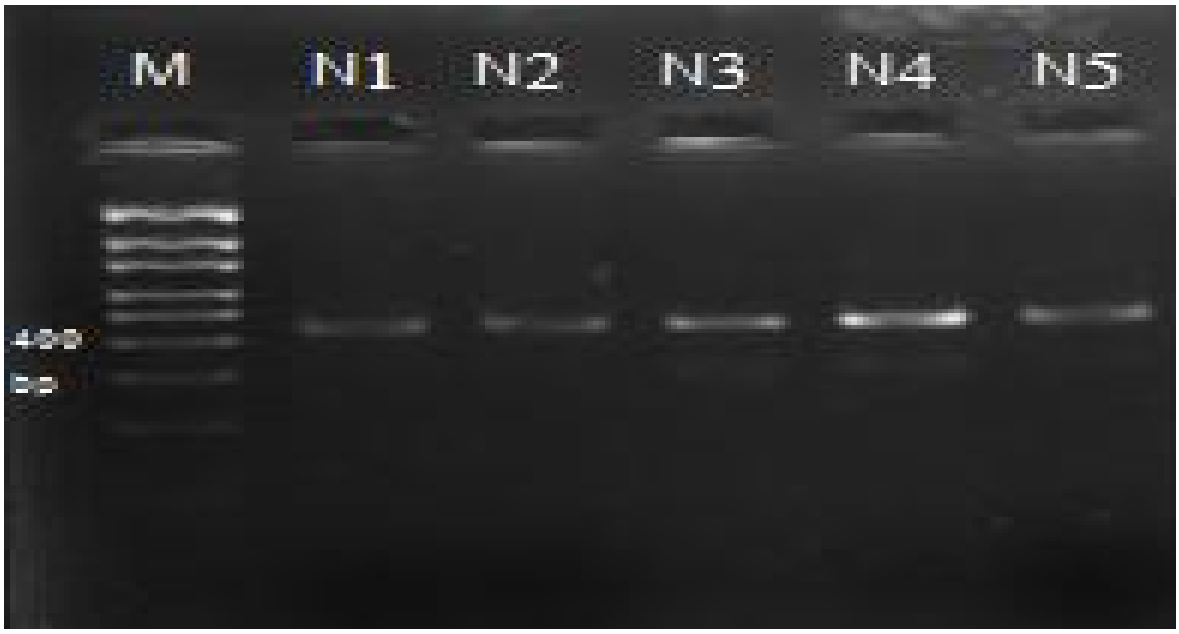
JS58-05(JOR-N1)*, SS22-06 (SYR-N2), JS32-06 (JOR-N3), SS24-06 SYR-N4), SS59-06 (SYR-N5), **Mm: mild mosaic, M: mosaic, Sm: severe mosaic, Vy: vein yellowing, -: not infected, CLL: chlorotic local lesions, RLL: red local lesions, Ld: leaf deformation, B: Blister, + positive ELISA, - negative ELISA

التفاعل التسلسلي للبوليميراز العكسي RT-PCR:

أظهرت نتائج تفاعل البلمـرة المتسلـسل العكـسي باستخدام إنزيم النسخ العكسي (Reverse Transcriptase AMV) وبـادئ عـشوائي (Random primer) و2 ميكرولتر من الرنا (RNA) المستخلص من عزلات فيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) المستخدمة في البحث إلى تكوين سلسلة الدنا المكملة (cDNA) لجميـع العـزلات وتراوحت قراءة الكثافة الضوئية (امتصاص الأشعة) لسلسلة الدنا المكملة (cDNA) في جهاز الطيـف الـضوئي علـى الطولين الموجيين 280/260 بين 1.600 و2.000 وتركيـز الحمـض النـووي (cDNA) بـين (0.297 µg/µl) و(0.447µg/µl).

تفاعل البلمرة التسلسلي للبوليميراز PCR:

أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلـسل باسـتخدام زوج البادئات المتخصصة ZYMVfor وZYMVrev أن جميع عزلات فيروس الموزاييـك الأصـفر للكوسـا (ZYMV) أظهرت حزما بحجم يقارب 395bp وهذا هو الحجم المتوقع الذي ينتجه هذا الزوج من البادئات والذي يـضاعف قطعـة الدنا (DNA) من مورثة الغلاف البروتيني لعزلـة التـشيلي لفيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) (accession no. AF308732) (Prieto *et al*., 2001) (الشكل 1) ولم يلحظ فرق واضح في الحجوم؛ حيـث إن جميـع العـزلات متقاربة بالحجم وفي المسافة التي قطعتهـا عـن حجـرات الهلامة سواء العزلات من جنوبي سورية أو وادي الأردن.



الشكل 1: النماذج الالشكلية للمكاثرة RT-PCR لعزلات فيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV)

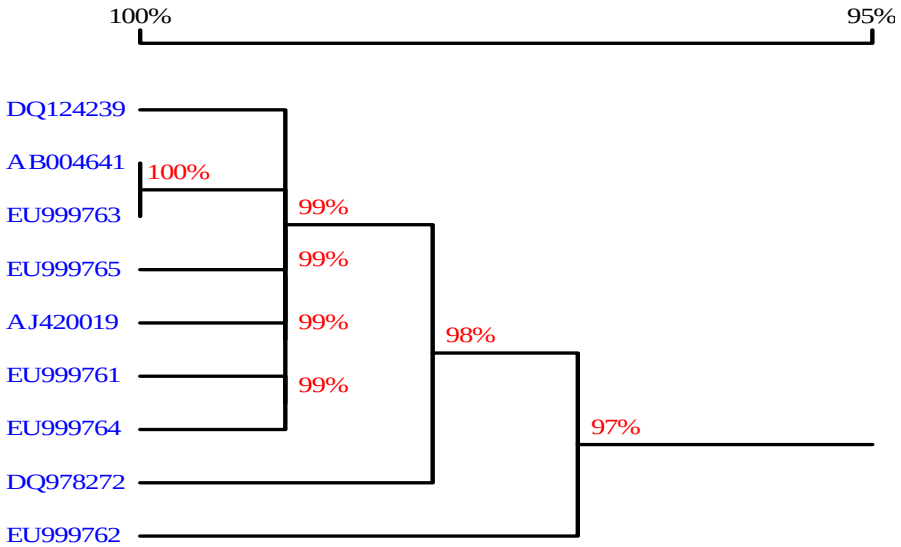
تحليل سلسلة الدنا المستخلص (sequence analysis):

أظهرت نتائج تحليل ترتيب القواعد النيتروجينية (النيوكليوتيدات) لسلسلة الدنا (DNA) (DNA sequencing) لعزلات تفاعل البلمرة المتسلسل لعزلات فيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) ومطابقتها (alignment) مع العزلة السلوفاكية ومع عزلات أخرى من الـ GenBank وهي: سلوفاكيا Kuchyna DQ124239، اليابان AB004641 M، ألمانيا Berlin 1 AJ420019، جنوبي أفريقيا ZYMV-KZN DQ978272 (الشكل 2، الجدول 4، Appendix 1)، تشابه عزلة فيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) الأردنية رقم (JOR-JS32-06 N3) (Accession no. EU999763) مع العزلة اليابانية (M) لفيروس (ZYMV) (Accession no. AB004641) بنسبة 100% فيما تشابهت مع العزلات الآتية: (JOR-N1)JS58-05 (EU999761) (أردنية)، (SYR-N4) SS24-06 (EU999764) (سورية)، SS59-05 (SYR-N5) (EU999765) (سورية) وعزلة سلوفاكيا (Accession no. DQ124239) (Kuchyna) وعزلة Berlin 1 الألمانية (Accession no. AJ420019) بنسبة 99% وتشابهت بنسبة 97% مع العزلة السورية رقم SS22-06 (SYR-N2) (Accession no. EU999762) وبنسبة 98% مع عزلة جنوبي أفريقيا (ZYMV-KZN) (Accession no. DQ978272) كما نلاحظ تشابه العزلات السورية (SYR-N4) (EU999764) و(SYR-SS59-05 N5) (EU999765) مع بعضها بعضاً بنسبة 99% واختلفتا بنسبة 2% مع العزلة السورية رقم SS22-06 (SYR-N2) (Accession no. EU999762).

وتشابهت العزلات الخمسة (SYR-N2, JOR-N3, SYR-N4, SYR-N5 , JOR-N1) الناتجة من التفاعل بنسبة تتراوح بين 92-95% مع عزلة التشيلي (accession no. AF308732)، التي تم تحليلها بنفس البادئ المستخدم في التفاعل سابقاً، وكانت العزلة السورية (SYR-N2) هي أقل عزلة تشابهت مع عزلة التشيلي (92%) مقارنة مع باقي العزلات (95%) (الجدول 3).

الجدول 3: نسبة تشابه الـ DNA لعزلات التفاعل الأول مع عزلة التشيلي (accession no. AF 308732).

العزلات	ZYMV (AF 308732)	ZYMV (JOR-N1)	ZYMV (SYR-N4)	ZYMV (JOR-N3)	ZYMV (SYR-N2)	ZYMV (SYR-N5)
ZYMV (AF 308732)	100	95	95	95	92	95
ZYMV (JOR-N1)			99	98	97	99
ZYMV (SYR-N4)				98	96	99
ZYMV (JOR-N3)					97	99
ZYMV (SYR-N2)						97
ZYMV (SYR-N5)						100



Accession no.	الموقع والرمز للعزلة	Accession no.	الموقع والرمز للعزله
EU999761	JS58-05(JOR-N1) الأردن	DQ124239	سلوفاكيا Kuchyna
EU999762	SS22-06 (SYR-N2) سورية	AB004641	اليابان M
EU999763	JS32-06 (JOR-N3) الأردن	AJ420019	ألمانيا Berlin 1
EU999764	SS24-06 (SYR-N4) سورية	DQ978272	جنوبي أفريقيا ZYMV-KZN
EU999765	SS59-05 (SYR-N5) سورية	-	

الشكل 2. شجرة القرابة الوراثية لـ 5 عزلات من الدنا (DNA) لجزء الغلاف البروتيني من فيروس (ZYMV) ناتجة من تفاعل البادئين ZYMVfor وZYMVrev من الأردن وسورية و4 عزلات عالمية أخذت من ال GenBank للمقارنة.

تحليل سلسلة الأحماض الامينية:

أظهرت نتائج تحليل ترتيب الأحماض الأمينية لسلسلة الدنا (DNA) لعزلات فيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) الناتجة من التفاعل ومطابقتها (alignment) مع بعضها بعضاً ومقارنتها مع عزلة التشيلي (Accession no. AF 308732) تشابه عزلات فيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) السورية والأردنية (N1, N2, N3, N4, N5) مع بعضها بعضاً بنسبة 96-100% (الجدول 4) وتشابهت بنسبة 94-98% مع عزلة التشيلي وكانت عزلة (SYR-N2) أقل تشابها مع عزلة التشيلي وبنسبة (94%).

الجدول 4: نسبة تشابه الأحماض الأمينية لعزلات التفاعل مع بعضها بعضاً ومع عزلة التشيلي (accession no. AF 308732).

العزلات	ZYMV (AF 308732)	ZYMV (JOR-N1)	ZYMV (SYR-N4)	ZYMV (JOR-N3)	ZYMV (SYR-N2)	ZYMV (SYR-N5)
ZYMV (AF 308732)	100	98	97	98	94	98
ZYMV (JOR-N1)			99	100	97	100
ZYMV (SYR-N4)				99	96	99
ZYMV (JOR-N3)					97	100
ZYMV (SYR-N2)						97
ZYMV (SYR-N5)						100

المنافشة:

هذه هي المرة الأولى التي يتم فيها مقارنة عزلات فيروس الموزاييك الأصفر للكوسا (ZYMV) في كل من جنوبي سورية ووادي الأردن فيما بينها بوساطة الطرائق البيولوجية والجزيئية واعتمادا على ترتيب النيوكليوتيدات (DNA sequence) لأجزاء من مورثة والغلاف البروتيني Cp (Coat protein) وكذلك بناء على المدى العوائلي وتسلسل الأحماض الامينية (البروتينات).

اختلفت الأعراض الحقلية لعزلات فيروس (ZYMV) في شدتها على نباتات الكوسا، وقد كانت العزلة السورية (SYR-N4) SS.24-06: أكثرها شدة فقد أظهرت تشوه للأوراق وتمزقها على نحو خيطي، فيما اختلفت بقية العزلات وبنسب متفاوتة في شدتها على نباتات الكوسا، ويتفق ذلك مع الدراسات السابقة بوجود عزلات فيروسية شديدة التأثير وأخرى متوسطة أو ضعيفة (Lisa & Lecoq, 1984; Risser *et al*., 1981; Lecoq & Pitrat, 1985; Wang *et al*., 1992; Choi *et al*., 2003; Hosseini *et al*., 2007)، كما توافقت الأعراض الحقلية في شدتها على نباتات الكوسا الدالة (*Cucurbita pepo*) التي تم إعدادها في المختبر، وقد أظهرت عزلة (SYR-N2) موزاييكاً شديداً وعزلة (SYR-N4) تبقعات وتشوهاً للأوراق.

وأظهرت نتائج العدوى الميكانيكية لعزلات فيروس (ZYMV) الآتية: JOR-N1, JOR-N3, SYR-N4, على النباتات الدالة *C. amaranticolor* و*C. quinoa* بقع

موضعية صفراء اللون متماوتة، وهذا يتفق مع الدراسات السابقة في عدد من الدول (Sidek *et al*., 1999; Lisa & Lecoq, 1984; Lecoq *et al*., 1981; Provvidenti *et al*., 1984a; Sidek *et al*., 1999)، وأظهرت جميع العزلات أعراض فيروسية جهازية على نبات الكوسا، وهذا يتفق مع الدراسات السابقة (Wong *et al*., 1994) كما اختلفت بقية العزلات من حيث الأعراض التي تسببها للنباتات الدالة؛ حيث إن العزلات المأخوذة من مناطق مختلفة أو من مناطق متجاورة تختلف بيولوجيا فيما بينها، وهذا يتفق مع (Lisa & Lecoq, 1984; Lecoq *et al*., 1981; Provvidenti *et al*., 1984a; Lecoq & Pitrat, 1985; Lecoq & Purcifull, 1992) وتشابهت عدد من عزلات فيروس (ZYMV) من حيث الأعراض التي تسببها على النباتات الدالة وهذا يتفق أيضا مع الدراسة السابقة (Desbiez *et al*., 1996).

أظهرت نتائج تحليل تسلسل الدنا (DNA Sequence analysis) للغلاف البروتيني (Coat protein) لعزلات فيروس (ZYMV) السورية والأردنية تشابها فيما بينها بنسبة 97-99% وهذا يتفق مع الدراسات السابقة حول تشابه عزلات فيروس (ZYMV) فيما بينها (Desbiez *et al*., 1996).

وتشابهت العزلات الفيروسية السورية والأردنية لفيروس (ZYMV) مع بعض العزلات العالمية بنسبة 98-100% وهذا يتفق مع دراسات أخرى حول تشابه عزلات فيروس (ZYMV) مأخوذة من منطقة جغرافية واحدة، وهي وسط أوروبا مع بعضها بعضاً في تسلسل الحمض النووي للغشاء البروتيني (Glasa & Pittnerová, 2006).

ولم يظهر تحليل الأحماض الامينية لعزلات فيروس (ZYMV) أية فروق معنوية، وتشابهت العزلات فيما بينها بتسلسل الأحماض الامينية بنسبة 96-100%، وتشابهت بنسبة 94-98% مع عزلة التشيلي وكانت عزلة (SYR-N2) أقل تشابها مع العزلة التشيلي وبنسبة (94%) التي أظهرت أعراضاً شديدة في الحقل وفي الإعداء الميكانيكي.

المراجع العربية

حاج قاسم، أمين عامر، خليل عبد الحليم، أم التقى غفران الرفاعي، واثق وراق. 2005. أهم الفيروسات التي تصيب القرعيات في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 23 العدد 1: 1-6.

قواص، هدى،2005. دراسة حول أهم الأمراض الفيروسية على القرعيات في جنوبي سورية. مجلة أبحاث التقانة الحيوية، 7 العدد 2: 84-112.

التميمي، ناصر، هدى قواص، عقل منصور. 2009. الأمراض الفيروسية التي تصيب الكوسا في جنوبي سورية ووادي الأردن، المجلة الزراعية الأردنية، المجلد 5، العدد 2.

المراجع الأجنبية

Albrechtsen, S. E. 2006. Testing methods for seed-transmitted viruses: principles and protocols. CABI Publishing, ISBN. pp 2.

Al-Musa, A. M. 1989. Severe mosaic caused by *Zucchini yellow mosaic* in Cucurbits from Jordan. *Plant Pathology*, 38: 541-546.

Augar, J., Martinez, C., Esterio, M. and Prieto, H. 2004. Identification and transmission of a strain of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) causal agent of fruit deformation in squash (*Cucurbita maxima*) in Chile. *Fitopatologia*, 39 (3): 133-143.

Balint, R., Plooy, I. and Steele, C. 1990. The nucleotide sequence of *zucchini yellow mosaic potyvirus*. *Abstr. VIIIth Int. Congress Virology*. 8: 84-107.

Bourdin, D. and Lecoq, H. 1991. Evidence of heteroencapsidaion between two *potyviruses* is involved in aphid transmission of a non-aphid-transmissible isolate from mixed infections. *Phytopathology*, 81 (11): 1459-1464.

Boyhan, G. E., Gudauskas, R. T., Norton, J. D. and Abrahams, B. R. 1994. Evaluation of watermelon and germ plasm for resistance to the Egyptian strain of *Zucchini Yellow Mosaic*

virus. *Plant Disease*, 78 (1): 100.

Choi, S. K., Yoon, J. Y., Choi, S. H. and Ryu, K. H. 2003. Movement of *Zucchini yellow mosaic virus* involved in symptoms severity on Zucchini Squash. *Plant Pathology Journal*, 19 (4): 217-220.

Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475 - 483.

De Bon, H., Boissot, N., Girard, J. C., Michellon, R., Reynaud, B. and Vercambre, B. 1992. A note on research on vegetable crops in Reunion. In: Ninth STASM (Societe de Technologie Agricole et Sucriere de Maurice) Conference. Reduit, Mauritius: *Revue Agricole et Sucriere de I'IIe Maurice*, 71:148-152.

Desbiez, C. and Lecoq, H. 1997. Review *zucchini yellow mosaic virus*. *Plant Pathology* 46: 809-829.

Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Granier, F., Robaglia, C., Delaunay, T. and Lecoq, H. 1996. Biological and molecular variability of *Zucchini yellow mosaic virus* on the Island of Martinique. *Plant Disease*, 80: 203-207.

Dougherty, W. G. and Semler, B. L. 1993. Expression of virus encoded proteinases, functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiology Review*, 57: 781-822.

Glasa, M. and Pittnerová, M. S. 2006. Complete genome sequence of a Slovak isolate of *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV) provides further evidence of a close molecular relationship among central European ZYMV isolates. *Journal of Phytopathology*, 154: 436-440.

Granier, F., Durand, T. M., Casse, D. F., Lecoq, H. and Robaglia, C. 1993. Mutations in *Zucchini yellow mosaic virus* helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. *Journal of General Virology*, 74: 2737-2742.

Huang, C. H., Chao, Y. J., Chang, C. A., Hseu, S. H. and Hsiao, C. H. 1987. Identification and comparison of different viruses on symptom expression in loofah. *Journal of Agricultural Research of China*, 36 (4):413-420.

Hosseini, S., Mosahebi, G. H., Koohi Hbibi, M. and Okhovvat, S. M. 2007. Characterization of the *Zucchini yellow mosaic virus* from squash in Tehran Province, *Journal Agriculture Science Technology*, 9: 137-143.

Lecoq H., Bourdin D., Raccah, B., Hiebert, E. and Purcifull, D. E. 1991. Characterization of a *Zucchini yellow mosaic virus* isolate with a deficient helper component. *Phtopathology*, 81: 1087-1091.

Lecoq, H. and Pitrat, M. 1983. Field experiments on the integrated control of aphid-borne viruses in muskmelon. In: Plumb RT, Tresh JM, eds *Plant virus Epidemiology*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, pp 169-176.

Lecoq, H. and Pitrat, M. 1985. Specificity of the helper-componant-mediated aphid transmission of three potyviruses infecting muskmelon. *Phytopathology*, 75: 890-903.

Lecoq, H., Pitrat, M. and Clement M. 1981. Identification et caracterisation d'un potyvirus provoquant la maladie du rabougrissement jaune du melon. *Agronomie*, 1: 827-34.

Lecoq, H. and Purcifull, D. E. 1992. Biological variability of potyviruses, an example: *Zucchini yellow mosaic virus*. *Archives of Virology Vienna*, Austria; Springer-Verlag/Wien, Supplementum, 5:229-234.

Lisa, V. and Lecoq, H. 1984. *Zucchini yellow mosaic virus* CMI/AAB. *Description of Plant viruses*. No. 282.

Lisa, V., Boccardo, G., D'Agostino, G., Dellavalle, G., D'Aquilio, M. 1981. Characterization of a *potyvirus* that causes *zucchini yellow mosaic virus*. *Phytopathology*, 71: 667-672.

Mansour, A. N. 1981. Isolation and Identification of plant Viruses affecting Squash (*Cucurbita pepo*) in Jordan. M.Sc. Thesis, University of Jordan, Amman, Jordan.

Mansour, A and AL-Musa, A. 1982. Incidence, economic importance and prevention of *watermelon mosaic virus-2* in squash (*Cucurbita pepo*) fields in Jordan *Phtopathology*. Z. 103: 35-40.

Prieto, H., Bruna, A., Hinrichsen, P. and Muñoz, C. 2001. Isolation and molecular characterization of a Chilean isolate of *zucchini yellow mosaic virus*. *Plant Disease*, 85:

644-648.

Provvidenti, R., Gonsalves, D. and Humaydan, H. S. 1984a. Occurrence of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucurbits from Connecticut, New York, Florida and California. *Plant Disease*, 68: 443-6.

Provvidenti, R., Munger, H. M., Paulus, M.O. 1984b. Epidemics of *Zucchini yellow mosaic virus* in Egypt in the spring of 1983. *Cucurbit Genetics Cooperative*, 7, 78-79.

Risser, G., Pitrat, M., Lecoq, H. and Rode, J. C. 1981. Sensibilité variétale du melon (*Cucumis melo*) au virus du rabougrissement jaune du melon (MYSV) et à sa transmission par *Aphis gossypii*, Hérédite de la reaction de flétrissement. *Agronomie*, 1: 835.

Sidek, Z., Sako, N. and Ohshima, K. 1999. Characterization and coat protein sequence of a Malaysian isolate of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Journal of Plant Protection in Tropics* 12 (2): 92-105.

Wang H. L., Gonsalves D., Provvidenti R. and Zitter, T. A. 1992. Comparative biological and serological properties of four strains of *Zucchini yellow mosaic virus Plant Disease* 76 (5): 530-535.

Wisler, G., Purcifull, D. and Hiebert, E. 1995. Characterization of P1 protein and coding region of *zucchini yellow mosaic virus*. *Journal of General Virology*, 76: 37-45.

Wong, S., Chng, C. G., Chng, C. Y. and Chong, P. L. 1994. Characterization of an isolate of *Zucchini yellow mosaic virus* from cucumber in Singapore. *Journal of Phytopathology*, 141: 355-368.

Biological and Molecular Characterization of Some *Zucchini yellow mosaic* Virus Isolates from Southern Syria and Jordan Valley

Al-Tamimi*, N., Kawas**, H., Mansour, A., Arabiat****, and Nida Salem********

ABSTRACT

Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) is an important viral pathogen of squash plants. This study was conducted during the growing seasons of (2005/2006-2006/2007) to differentiate between 5 ZYMV isolates obtained from southern Syria (3) and Jordan Valley (2) using biological and molecular techniques. The nomenclature of the virus isolates was as follows: JOR-N1, SYR-N2, JOR-N3, SYR-N4، SYR-N5**.** Indicator plants reacted differently when they were inoculated with these isolates. Isolates JOR-N1, JOR-N3 and SYR-N4 induced chlorotic local lesions on *Chenopodium amaranticolor* and *C. quinoa,* whereas red to pink local lesions were observed on plants inoculated with SYR-N2 and SYR-N5 isolates. On *Cucurbita pepo,* JOR-N1 isolate caused mild mosaic and vein yellowing while, isolate SYR-N2 induced severe mosaic and blister. Isolate JOR-N3 caused mosaic and leaf deformation. Squash plants inoculated with SYR-N4 developed chlorotic local lesions and mosaic symptoms while, SYR-N5 induced leaf deformation and blister. Total RNA isolation was extracted from squash plants infected with JOR-N1, SYR-N2, JOR-N3, SYR-N4، SYR-N5 isolates and oligonucleotide primer pair ZYMVfor/ZYMVrev was used to amplify a fragment of about 395bp of the coat protein gene of ZYMV. Sequence analysis of the amplified PCR product showed that JOR-N3 isolate shared high (100%) nucleotide identity with the Japanese isolate (AB004641) of ZYMV, while, the nucleotide similarity of the other isolates ranged between 97% and 99%. On the other hand, the nucleotide sequence similarities between the five isolates studied in this work and ZYMV isolates from Slovakia, Germany and South Africa ranged between 97% and 99%. The lowest sequence similarity of the five isolates was recorded with ZYMV isolate from Chili. Sequence analysis of amino acids indicated that the five isolates shared high (96-100%) identities with each other, and 94-98% when compared with the Chili isolate.

Keywords: ZYMV isolates, southern Syri, Jordan Valley, squash viruses.

* .

** .

Received on 5/5/2009 and Accepted for Publication on 9/12/2009.