

مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۹، شماره ۱، بهار ۱۴۰۵

شاپای چاپی: ۰۶۳۲ - ۲۷۱۷، شاپای الکترونیکی: ۹۸۰۴ - ۲۷۱۶

ویژگی‌های مولکولی و تکاملی جدایه ایرانی ویروس میوه‌ریزی گیلاس ۱ (*Velarivirus nanoavii*) بر اساس توالی کامل ژنوم

نوع مقاله: پژوهشی

پارسا گلابی^۱، احمد حسینی^{۱*}، مینا راستگو^۲

۱. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان

۲. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

hosseini@vru.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۶/۰۱، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۷/۰۹

چکیده

ویروس Little cherry virus 1 (LChV-1) از اعضای جنس *Velarivirus* در خانواده *Closteroviridae* است و یکی از عوامل مهم مرتبط با بیماری میوه‌ریزی گیلاس محسوب می‌شود. با توجه به اهمیت اقتصادی گیلاس در ایران و اطلاعات محدود درباره تنوع ژنتیکی LChV-1، مطالعه حاضر با هدف شناسایی و تعیین ویژگی‌های مولکولی و تکاملی یک جدایه ایرانی این ویروس با استفاده از فناوری RNA-seq انجام شد. ژنوم کامل جدایه *Urmia* ویژگی‌های سازمان ژنومی LChV-1 و جنس *Velarivirus* را تایید کرد. تحلیل‌های فیلوژنتیکی بر اساس ژنوم کامل و ژن‌های منتخب، جدایه *Urmia* را در یکی از گروه‌های فیلوژنتیکی شناخته‌شده LChV-1 قرار داد و نزدیکی آن را با برخی جدایه‌های اروپایی نشان داد. بررسی تنوع ژنتیکی نشان داد که نواحی مرتبط با همانندسازی، به‌ویژه RdRp، نسبت به پروتئین‌های ساختاری از حفاظت بیشتری برخوردارند. تحلیل dN/dS نیز غالب بودن انتخاب طبیعی را در ژن‌های مورد بررسی نشان داد. همچنین، شواهد محاسباتی از وقوع نوترکیبی در جمعیت LChV-1 به دست آمد که بیانگر نقش احتمالی نوترکیبی در ایجاد تنوع ژنتیکی این ویروس است. در مجموع، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که ویروس LChV-1 احتمالاً حاصل تعامل جهش، نوترکیبی و انتخاب طبیعی است. این مطالعه اولین گزارش از تعیین ترادف کامل ژنوم ویروس در ایران است.

واژه‌های کلیدی: RNA-seq، ژنوم کامل، فیلوژنی، نوترکیبی، انتخاب طبیعی

مقدمه

گیلاس (*Prunus avium*) یکی از مهم‌ترین درختان میوه مناطق معتدل جهان است و به‌عنوان یک درخت میوه با میوه‌های شیرین و خوشمزه شناخته می‌شود. این درخت به دلیل سازگاری با شرایط آب و هوایی مختلف و همچنین کیفیت بالا و طعم لذیذ میوه‌اش در بسیاری از مناطق جهان کشت می‌شود. کشورهایی مانند ایالات متحده، ترکیه، ایران و ایتالیا از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان گیلاس در جهان هستند (Webster and Looney, 1996). بر اساس آمار سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO)، ایران با دارا بودن بیش از ۱۴ هزار هکتار سطح زیر کشت گیلاس و تولید سالانه بیش از ۱۰۰ هزار تن محصول یکی از تولیدکنندگان مهم گیلاس در غرب آسیا به شمار می‌رود و کشت این محصول در استان‌هایی مانند آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، تهران، البرز، قزوین، خراسان رضوی، چهارمحال و بختیاری و اصفهان رواج گسترده‌ای دارد. استان آذربایجان غربی با ۳۷۰۰ هکتار باغ، بالاترین سطح زیر کشت گیلاس را در ایران به خود اختصاص می‌دهد. شهرستان‌های تولیدکننده گیلاس در استان شامل ارومیه، اشنویه، خوی، مهاباد و بوکان هستند. بیش از ۲۵ هزار تن گیلاس در سطح باغ‌های این استان برداشت می‌شود.

درختان گیلاس (*Prunus avium*) میزبان طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها، فیتوپلاسم‌ها و ویروس‌ها هستند. در میان بیماری‌های مهم، پوسیدگی قهوه‌ای ناشی از گونه‌های *Monilinia*، بیماری لکه غربالی و شانکر باکتریایی ناشی از *Pseudomonas syringae* از عوامل مهم محدودکننده تولید گیلاس در بسیاری از مناطق کشت به شمار می‌روند. به‌ویژه، شانکر باکتریایی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی جنس *Prunus* است که می‌تواند با ایجاد شانکر، گموز، مرگ شاخه‌ها و در موارد شدید، زوال یا

مرگ کامل درخت، خسارت قابل توجهی به باغ‌های گیلاس وارد کند (Marroni et al., 2024). با این حال، بیماری‌های ویروسی و شبه‌ویروسی نیز از عوامل مهم تهدیدکننده تولید پایدار گیلاس محسوب می‌شوند. تاکنون بیش از ۳۵ بیماری ویروسی و شبه‌ویروسی در گیلاس شناسایی شده است که برخی از آنها می‌توانند موجب کاهش رشد و بنیه درخت، کاهش عملکرد و افت کیفیت میوه شوند. از مهم‌ترین ویروس‌های مرتبط با گیلاس می‌توان به *Prune dwarf virus* (PDV)، *Cherry necrotic ringspot virus* (PNRSV)، *Little cherry virus 1* (CVA)، *Tomato ringspot virus* (ToRSV) و *Cherry leaf roll virus* (CLRV) اشاره کرد. بسیاری از این ویروس‌ها به‌صورت نهفته در گیاه باقی می‌مانند، اما در برخی ارقام یا تحت شرایط محیطی خاص موجب کاهش شدید عملکرد و کیفیت محصول می‌شوند (James and Jelkmann, 2007; Candresse and Martelli, 2011). همچنین بیماری X مرتبط با *Candidatus Phytoplasma pruni* از بیماری‌های مهم فیتوپلاسمایی گیلاس است (Reinhold and Pscheidt, 2023).

ویروس *Little cherry virus 1* (LChV-1) با نام جدید *Velarivirus nanoavii* یکی از گونه‌های مهم جنس *Velarivirus* محسوب می‌شود. اعضای خانواده *Closteroviridae* از نظر تاکسونومی و روابط تکاملی به چندین جنس تقسیم شده‌اند که مهم‌ترین آن‌ها شامل *Closterovirus*، *Crinivirus*، *Ampelovirus* و *Velarivirus* هستند (Fuchs et al., 2020). این جنس‌ها علاوه بر تفاوت در میزبان، ناقل، سازمان ژنومی و برخی ژن‌های فرعی، در روابط فیلوژنتیکی نیز از یکدیگر متمایز هستند. جنس *Velarivirus* نسبت به سایر جنس‌های خانواده *Closteroviridae* دیرتر معرفی شد و گونه‌های آن عمدتاً فاقد ناقل شناخته‌شده

"گلایی و همکاران، طراحی، ویژگی‌های مولکولی و تکاملی جدایه ایرانی ویروس میوه‌ریزی گیلاس ۱..."

Apricot latent virus و *virus* (ACLSV) (ApLV) گزارش شده است (Hajizadeh et al., 2009; Pourrahim and Farzadfar, 2025). نخستین گزارش LChV-1 در ایران در سال ۲۰۱۸ منتشر شد و نشان داد که این ویروس در باغ‌های گیلاس شمال غرب کشور شیوع دارد (Pourrahim and Farzadfar, 2018). تحلیل فیلوژنتیکی مبتنی بر ژن پروتئین پوششی (CP) بیانگر آن بود که جدایه‌های ایرانی در یکی از گروه‌های شناخته‌شده جهانی قرار می‌گیرند. با وجود این، تعداد اندک جدایه‌های بررسی‌شده و استفاده از توالی بخشی از ژنوم، امکان نتیجه‌گیری دقیق درباره تنوع ژنتیکی و جایگاه تکاملی جمعیت‌های ایرانی را محدود کرده است. از آنجا که شناخت تنوع ژنتیکی ویروس، مبنای طراحی آزمون‌های تشخیصی دقیق، بررسی مسیرهای انتشار، ارزیابی خطر ورود ژنوتیپ‌های جدید و تدوین برنامه‌های گواهی سلامت نهال است، تعیین ژنوم کامل و تحلیل فیلوژنتیکی جدایه‌های ایرانی می‌تواند نقش مهمی در تکمیل دانش موجود درباره این ویروس و بهبود مدیریت بیماری میوه‌ریزی گیلاس در ایران و سایر کشورهای تولیدکننده گیلاس ایفا کند. در سال‌های اخیر، به‌کارگیری تعیین توالی ژنوم کامل با فناوری تعیین توالی نسل جدید (High throughput sequencing, HTS) فرصت مناسبی برای بازنگری در تنوع مولکولی و روابط فیلوژنتیکی این ویروس فراهم کرده است (Tahzima et al., 2019).

در بازدیدها و نمونه‌برداری‌های صورت گرفته در بهار و تابستان ۱۴۰۳ از باغات گیلاس استان آذربایجان غربی علائمی مانند موزاییک و بدشکلی برگ مشاهده شد. پژوهش حاضر به‌منظور شناسایی ویروس‌های آلوده‌کننده باغات گیلاس این استان با استفاده از روش‌های مولکولی و به‌خصوص تکنیک توالی‌یابی نسل جدید، تعیین توالی کامل یا ناقص ژنوم ویروس‌های شناسایی

هستند (Katsiani et al., 2018). انتقال اعضای این جنس عمدتاً از طریق پیوند، تکثیر رویشی و مواد گیاهی آلوده صورت می‌گیرد. ویروس LChV-1 عامل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی گیلاس، یعنی Little Cherry Disease است که کاهش اندازه میوه، افت کیفیت، کاهش قند، رنگ‌گیری نامناسب و کاهش ارزش اقتصادی محصول را در ارقام حساس ایجاد می‌کند. دامنه میزبانی این ویروس عمدتاً گونه‌های جنس *Prunus* شامل گیلاس شیرین، گیلاس ترش (*P. cerasus*)، آلو، زردآلو، هلو، بادام و برخی گیاهان زینتی این جنس را در بر می‌گیرد، اگرچه شدت علائم در میزبان‌های مختلف متفاوت است و بسیاری از میزبان‌های غیرگیلاس بدون علامت باقی می‌مانند (Matic et al., 2007; Šafářová et al., 2016; Jevremović et al., 2025).

مطالعات مولکولی نشان داده‌اند که ژنوم LChV-1 بین حدود ۱۶ تا ۱۷ کیلوباز طول دارد و فاقد دم پلی (A) در انتهای ۳' است، در حالی که انتهای ۵' دارای ساختار cap است. این ویژگی، مشابه سایر اعضای خانواده *Closteroviridae* است و نقش مهمی در پایداری آر‌ان‌ا و آغاز ترجمه دارد. ژنوم LChV-1 دارای هشت ORF اصلی است که پروتئین‌های مرتبط با همانندسازی، حرکت، تشکیل کپسید و چندین پروتئین کمکی با عملکردهای ناشناخته را رمزگذاری می‌کنند. اگرچه سازمان کلی ژنوم در تمام جدایه‌های شناخته‌شده حفظ شده است، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که تفاوت‌های قابل توجهی در طول ژنوم، محل آغاز ترجمه، اندازه برخی ORF‌ها، نواحی بین‌ژنی و توالی‌های غیرکدکننده بین جدایه‌های مختلف وجود دارد که احتمالاً در سازگاری ویروس با میزبان و تکامل آن نقش دارند (Katsiani et al., 2018).

از باغات گیلاس ایران ویروس‌های CVA، PNRSV، PDV، LChV-1، *Apple chlorotic leaf spot*،

شده و بررسی روابط فیلوژنتیکی و تکاملی آن‌ها انجام گرفت.

مواد و روشها

نمونه برداری: نمونه برداری طی اردیبهشت تا پایان مردادماه ۱۴۰۳، از شش شهرستان استان آذربایجان غربی شامل ارومیه، اشنویه، خوی، سلماس، بوکان و مهاباد انجام گرفت. در مجموع ۸۳ نمونه‌ی برگ‌ی از درختان دارای علائم مشکوک به آلودگی ویروسی مانند موزاییک، کوچک شدن برگ، پیچ خوردگی، تغییر رنگ غیرطبیعی و ضعف رشدی با ذکر اطلاعات دقیق جمع‌آوری و در دمای پایین و در داخل یخ خشک به آزمایشگاه منتقل شد.

استخراج آران‌ا کل از نمونه‌ها: به این منظور از بافر CTAB، با استفاده از روش Gambino و همکاران (۲۰۰۸) بهره گرفته شد. از هر منطقه یک نمونه برگ‌ی انتخاب و استخراج آران‌ا کل از آنها صورت گرفت. برای بررسی خلوص و غلظت آران‌ا استخراج‌شده، از دستگاه نانودراپ (NanoDrop ND-2000, USA) استفاده شد. نسبت جذب نوری در طول موج‌های A260/A280 و A260/A230 برای سنجش خلوص نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین، جهت ارزیابی سلامت آران‌ا، باندهای ۲۸S و ۱۸S در ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. نمونه‌های آران‌ا تأییدشده مربوط به شش منطقه نمونه‌برداری شده با یکدیگر ترکیب و در لوله‌های RNase-free، در حجم و غلظت مورد نظر آماده‌سازی و به شرکت NovoGene چین برای خوانش از هر دو طرف (paired) با استفاده از پلتفرم Illumina HiSeq 6000 ارسال شد.

آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): پس از استخراج آران‌ا کل از نمونه‌های گیاهی، قبل از انجام PCR، آران‌ا تبدیل به دی‌ان‌ا مکمل شد که ساخت آن در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده

از کیت نسخه‌برداری معکوس محصول شرکت پیشگام (ایران) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. جهت تکثیر دی‌ان‌ا مکمل تکثیر شده واکنش PCR انجام شد. برای انجام واکنش PCR از Master mix ساخت شرکت پیشگام (ایران) با بهره‌گیری از جفت آغازگر اختصاصی LCUW7090/ LCUWc7389 استفاده شد (Bajet et al., 2008).

تعیین ترادف آران‌ا: داده‌های اولیه حاصل از RNA-seq توسط نرم‌افزار FastQC v.0.11.9 ارزیابی شدند (Andrews, 2010). خوانش‌های خام با استفاده از Cutadapt v. 2.0.4 پالایش شدند (Martin, 2011)، تا تنها خوانش‌هایی با حداقل طول ۵۰ باز و نمره کیفی فرد (Phred score) بیش از ۳۰ حفظ شوند؛ این مرحله منجر به پاکسازی خوانش‌های با کیفیت پایین و توالی‌های آداپتور شد. پس از حذف خوانش‌های با منشأ گیاهی (ژنوم مرجع گیلاس Prunus avium GCA_002207925.1، استخراج شده از NCBI)، خوانش‌های غیرگیاهی باقی‌مانده با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench v22.0.2 (CLC Bio, Aarhus, Denmark) به صورت کانتیگ مونتاژ شدند. کیفیت توالی‌های گردآوری شده با معیار N50 (طول کوتاه‌ترین کانتیگ که حداقل ۵۰ درصد از کل طول مجموعه کانتیگ‌ها را پوشش خواهد داد) مورد ارزیابی قرار گرفت.

کانتیگ‌های مونتاژ شده با استفاده از الگوریتم BLASTn در برابر پایگاه داده‌های عمومی نوکلئوتیدی NCBI با پارامترهای پیش‌فرض و همچنین پایگاه داده مرجع ویروسی (taxid:10239) بررسی شد. پس از انتخاب نزدیک‌ترین ویروس مشابه با توالی ویروس شناسایی شده در تحقیق حاضر، با استفاده از نرم افزار Geneious Prime (2019.1.3) هم‌ردیف سازی (alignment) این دو توالی انجام شد. پس از

"گلابی و همکاران، طراحی، ویژگی‌های مولکولی و تکاملی جدایه ایرانی ویروس میوه‌ریزی گیلان ۱..."

با در نظر گرفتن شرایط پیش‌فرض انجام شد (Martin *et al.*, 2021). تنها وقایع نوترکیبی شناسایی شده با حداقل چهار روش از شش روش (RDP, GENECONV, Chimaera, MaxChi, Siscan, BootScan و Seq ۳) با مقدار p-value کمتر از ۰.۰۱ قابل پذیرش برشمرده و گزارش شد.

بررسی انتخاب طبیعی: به منظور بررسی فشارهای انتخابی و ارزیابی نقش انتخاب طبیعی در تکامل مولکولی ویروس LChV-1، توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به چهار ژن *CP*، *HSP70*، *RdRp* و *CPm* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. توالی‌های همولوگ هر ژن پس از استخراج و هم‌ردیف‌سازی چندگانه، به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند و اطمینان حاصل شد که هم‌ترازی‌ها در چارچوب کدکننده صحیح و بدون تغییر در قاب خوانش انجام شده‌اند. برای هر ژن، تعداد جانشینی‌های دگرمعنی (dN) به جانشینی‌های هم‌معنی (dS) با استفاده از نرم‌افزار MEGA v12.0.9 و روش Nei-Gojobori برآورد شد. این روش تعداد جایگاه‌های بالقوه مترادف و غیرمترادف را محاسبه کرده و فاصله‌های dN و dS را پس از تصحیح برای جایگزینی‌های چندگانه برآورد می‌کند. نسبت dN/dS برای هر ژن به عنوان شاخصی از الگوی انتخابی حاکم بر تکامل توالی‌ها محاسبه شد؛ به طوری که مقادیر نسبت dN/dS کمتر از یک نشان‌دهنده انتخاب منفی یا پالایش‌کننده (Purifying selection)، برابر با یک به عنوان سازگار با تکامل خنثی و بیشتر از یک به عنوان نشانه‌ای از غلبه احتمالی انتخاب مثبت (positive selection) در نظر گرفته شد.

آن، با استفاده از نرم‌افزار ORF finder، ابتدا و انتهای تمام ORF‌ها مشخص و به توالی آمینواسیدی ترجمه شد (www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/). همچنین با استفاده از برنامه BLASTP، میزان تطابق پروتئین‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن بررسی و گونه و جدایه‌ی هر کدام از ویروس‌ها مشخص شد.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک: بررسی تبارشناسی جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA v12.0.9 بر اساس مقایسه توالی‌های کامل ژنوم، ژن آرانا پلی‌مراز (RdRp)، ژن پوشش پروتئینی (CP) و ژن *HSP70* جدایه‌های LChV1 با روش Maximum Likelihood انجام شد و درخت فیلوژنتیک بر این اساس ترسیم شد. در این نرم‌افزار، ابتدا مناسب‌ترین مدل تکاملی جایگزینی نوکلئوتیدها با استفاده از بخش Model Selection تعیین شد تا تحلیل بر اساس بهترین مدل آماری انجام گیرد. به منظور ارزیابی اعتبار آماری شاخه‌های درخت فیلوژنی، آزمون بوت‌استرپ با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد. اطلاعات مربوط به فهرست نام جدایه‌ها، شماره‌های دسترسی، میزبان‌ها و منشأ جغرافیایی توالی‌های مورد استفاده در آنالیز فیلوژنتیک ویروس‌های مورد بررسی در جدول ۱ آورده شده است.

آنالیز نوترکیبی: در این بررسی پس از هم‌ردیف‌سازی ترادف‌های کامل ژنوم LChV1 توسط نرم‌افزار Geneious Prime (2019.1.3)، تشخیص رویدادهای نوترکیبی (Recombination events) با استفاده از آخرین بروزرسانی نرم‌افزار RDP (Recombination Detection Program 5)

جدول ۱. فهرست نام جدایه‌ها، شماره‌های دسترسی، میزبان‌ها و منشأ جغرافیایی جدایه‌های ویروس LChV1 مورد استفاده در آنالیز فیلوژنتیکی و تکاملی

کشور	میزبان	نام جدایه	رس شمار
Italy	<i>P. avium</i>	ITMAR	EU715989
Germany	<i>P. cerasus</i>	V2356	JX669615
China	<i>P. avium</i>	YD	KR080325
China	<i>P. avium</i>	Taian	KR736335
Spain	<i>P. avium</i>	Jerte	KX192366
Spain	<i>P. avium</i>	Ponferrada	KX192367
Australia	<i>P. domestica</i>	QLD13	LC523019
Australia	<i>P. avium</i>	TAS16	LC523020
Australia	<i>P. avium</i>	LV16_	LC523021
Australia	<i>P. avium</i>	LV27S1	LC523022
Australia	<i>P. avium</i>	LV27S2	LC523023
Australia	<i>P. avium</i>	LVV	LC523024
Iran	<i>P. avium</i>	Urmia	LC942399
Greece	<i>P. avium</i>	G15-3	LN794218
Japan	<i>P. serrulata</i>	Kyoto-2	MG934545
Spain	<i>P. avium</i>	P8-23	MH300060
Spain	<i>P. avium</i>	P8-42	MH300061
Greece	<i>P. avium</i>	C118-Iso1	MH364114
Greece	<i>P. avium</i>	C118-Iso13	MH364115
Greece	<i>P. avium</i>	C118-Iso15	MH364116
China	<i>P. avium</i>	BJ	MK775591
Belgium	<i>P. avium</i>	GBVC_LChV1_062	MK895510
Belgium	<i>P. cerasus</i>	GBVC_LChV1_068	MK895511
Belgium	<i>Prunus sp.</i>	GBVC_LChV1_101	MK895512
Australia	<i>P. avium</i>	FT12	MN131067
Australia	<i>P. armeniaca</i>	FT14	MN131068
Australia	<i>P. avium</i>	FT13	MN131069
Spain	<i>P. armeniaca</i>	Apr153	MN242215
Spain	<i>P. armeniaca</i>	Apr156	MN242216
Spain	<i>P. armeniaca</i>	Apr161	MN242217
Spain	<i>P. armeniaca</i>	Apr172	MN242218
Spain	<i>P. armeniaca</i>	Apr184R	MN242219
Canada	<i>P. avium</i>	Niagara-A22	MN508820
Spain	—	19SP003A	MZ291927
Spain	—	19SP003B	MZ291928
Spain	—	19SP003C	MZ291929
Spain	<i>P. dulcis</i>	Alm138	MZ570904
USA	<i>P. avium</i>	UW2	NC_001836
China	<i>P. domestica</i>	PM2	OQ513275
Russia	<i>P. cerasus</i>	Stepnoe	OR260412
China	<i>P. avium</i>	741M1-C9	OR497462
China	<i>P. dulcis</i>	sh31	OR519885
Montenegro	<i>P. persica</i>	137/21-1	PV763042
Montenegro	<i>P. persica</i>	137/21-2	PX560182

نتایج

کیفیت و خلوص آران‌ا استخراج شده از نمونه‌ها با استفاده از طیف‌سنج نانودراپ (NanoDrop) مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت‌های جذب نوری 260/280 بین ۱/۹-۲ و نسبت 260/230 بین ۱/۸-۲/۱ ثبت شد، که نشانگر وجود آران‌ا با خلوص مناسب و بدون آلودگی پروتئینی یا

ترکیبات آلی است. الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱٪ هم وجود دو باند واضح و مجزا مربوط به rRNAهای ۲۸S و ۱۸S (به ترتیب با اندازه‌های حدود ۴۷۰۰ و ۱۸۰۰ باز) و نسبت دو به یک (از نظر غلظت باندها) را نشان داد که معیار استاندارد برای بررسی سلامت و عدم تخریب آران‌ا در نظر گرفته می‌شود. علاوه بر این

"گلابی و همکاران، طراحی، ویژگی‌های مولکولی و تکاملی جدایه ایرانی ویروس میوه‌ریزی گیلان ۱..."

این است که درصد خطای توالی‌یابی (Error %) آن بسیار پایین و حدود ۰/۰۱ درصد ارزیابی شده است. معیار Q20 و Q30 که یک مقیاس کیفی برای ارزیابی دقت خوانش‌های توالی‌یابی (بر اساس Phred quality score) است نیز به ترتیب ۹۸/۲۴ و ۹۵/۳۸ تخمین زده شده است. Q20 معادل احتمال خطای حداکثر ۱٪ و Q30 معادل احتمال خطای حداکثر ۰/۰۱٪ (تقریباً دقت ۹۹/۹٪) برای تعیین یک باز است. مجموع نتایج حاضر نشانگر کیفیت بالای خوانش‌های انجام شده در این پژوهش است.

کیفیت‌سنجی صورت گرفته توسط شرکت Novogene (چین) بر اساس معیار سلامت آران (RNA integrity number (RIN) به میزان ۷/۴) تاییدی بر نتایج پیشین بود.

بررسی داده‌های خام RNA-Seq و آنالیز بیوانفورماتیک: با توجه به نتایج به دست آمده از تعیین ترادف نمونه آران استخراج شده (جدول ۲)، تعداد خوانش‌های خام حدود ۹۹ میلیون خوانش (معادل ۱۴/۸ گیگابایت داده) برآورد شده است. همچنین میزان داده‌های موثر (Effective %) یعنی درصد داده خام قابل استفاده برای آنالیزهای پایین‌دستی ۹۴/۵۶٪ بوده است. نقطه قابل توجه

جدول ۲. نتایج بدست آمده از RNA-seq نمونه استخراج شده از گیلان انجام شده توسط شرکت Novogene (چین)

نمونه	شناسه	تعداد داده های خام	حجم داده (گیگابایت)	Effective %	Error %	Q20(%)	Q30(%)
AA21981	FKRN240287259- 1_22GWMYLT4_L7	۹۸۹۵۵۰۴۰	۱۴/۸	۹۴/۵۶	۰/۰۱	۹۸/۲۴	۹۵/۳۸

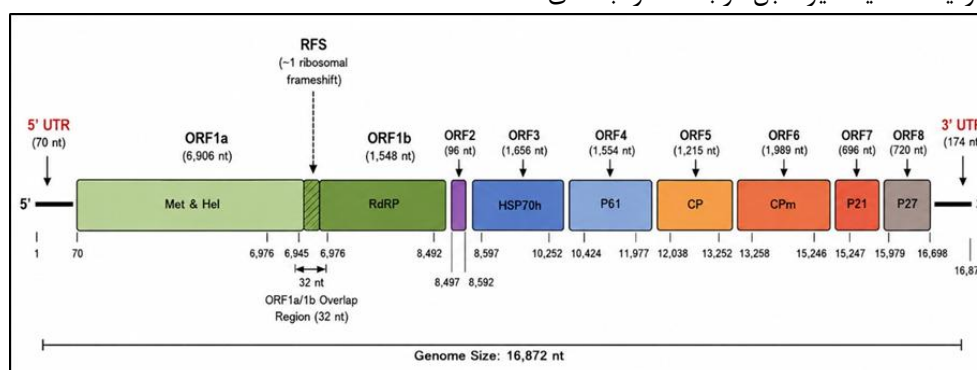
۱۶۹۰۰ جفت باز، را مشخص کرد. عمق خوانش در قسمتهای مختلف ژنوم از ۳۲۰ تا ۲۹۰۰ (با میانگین ۲۱۰۰) متغیر بود. در ادامه، ویژگی‌های جدایه ایرانی LChV-1 که از این به بعد جدایه Urmia خوانده خواهد شد مورد بررسی قرار خواهد گرفت. توالی کامل ژنوم جدایه Urmia پس از تعیین و اعتبارسنجی، در پایگاه داده GenBank تحت شماره دسترسی LC942399 ثبت شد.

نتایج آزمون بلاست: بر اساس BLASTn ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل جدایه Urmia، نزدیک‌ترین توالی قابل مشاهده در GenBank، مربوط به جدایه G15_3 از ویروس LChV-1 با رس شمار LN794218 است که ۱۰۰٪ ژنوم را پوشش داده و ۹۱/۱۶٪ یکسانی نوکلئوتیدی را نشان می‌دهد. پس از آن، جدایه C118-Iso1 (رس شمار MH364114) با پوشش ۹۸ درصدی ژنوم و یکسانی نوکلئوتیدی ۹۰/۹۲ درصدی قرار دارد. دو

پس از برش و حذف خوانش‌های با کیفیت پایین و توالی‌های آداپتور با استفاده از نرم‌افزار Cutadapt، در مجموع بیش از ۹۵ میلیون خوانش (بیش از ۹۶ درصد از خوانش‌های اولیه) کنترل کیفیت را با موفقیت پشت سر گذاشتند. میانگین طول خوانش‌ها قبل و بعد از پاکسازی به ترتیب ۱۵۰ و ۱۳۹ جفت باز بود.

پس از مرحله نگاشت (Map) خوانش‌ها بر روی ژنوم گیلان و حذف خوانش‌های با منشأ گیاهی توسط نرم‌افزار CLC Genomics Workbench، گردایش خوانش‌ها صورت گرفت. بیش از ۱۱۰۰۰ کانتیگ (Contig) با بازه طولی بین ۱۱۲۶ تا بیش از ۱۷۱۳۳ جفت‌باز و با میانگین طول ۱۶۱۹ جفت‌باز تولید شد. آنالیز BLASTn تمام کانتیگ‌های با طول بیش از ۱۵۰۰ جفت‌باز، وجود یک توالی ویروسی مرتبط با ویروس میوه‌ریزی گیلان ۱ (Little cherry virus 1, LChV-1) با

ژنوم (۵'UTR) با طول ۷۰ نوکلئوتید، هشت ORF شامل ORF1 (ORF1a و ORF1b) تا ORF8 و یک ناحیه غیر قابل ترجمه در انتهای ژنوم (۳'UTR) به طول ۱۷۴ نوکلئوتید است (شکل ۱). سازمان کلی ژنوم شامل ناحیه‌های مرتبط با همانندسازی در انتهای ۵' و سپس ژن‌های مربوط به پروتئین کوچک هیدروفوبیک، HSP70h، p61، پروتئین پوششی اصلی (CP)، پروتئین پوششی فرعی (minor coat protein, CPm) و پروتئین‌های کوچک انتهایی است. این آرایش با سازمان ژنومی توصیف شده برای LChV-1 و سایر Velarivirusها مطابقت دارد (Katsiani *et al.*, 2015).



شکل ۱. سازمان ژنومی جدایه Urmia ویروس LChV1

طول ۱۵۴۸ نوکلئوتید کدکننده آر.ان.ای پلیمرز وابسته به آر.ان.ای (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) است. ORF1a و ORF1b در جدایه Urmia به میزان ۳۲ نوکلئوتید با یکدیگر همپوشانی دارند. وجود چنین همپوشانی‌ای با مکانیسم بیان پروتئین همانندسازی از طریق فرایند تغییر چارچوب ریبوزومی (ribosomal frameshifting) در LChV-1 مطابقت دارد؛ در مطالعات قبلی نیز ORF1b به عنوان ORF حاصل از تغییر چارچوب ترجمه‌ای ORF1a گزارش شده است (Katsiani *et al.*, 2018). یکی از ویژگی‌های جالب جدایه Urmia، وجود UUG در ابتدای ORF1b است، بنابراین ORF1b این جدایه با

جدایه یاد شده از یونان و میزبان گیلان گزارش شده‌اند. سایر جدایه‌ها یکسانی نوکلئوتیدی بسیار پایین تری در محدوده ۷۷-۸۳٪ را نشان می‌دهند.

ویژگی‌های مولکولی ژنوم جدایه Urmia: ژنوم کامل جدایه Urmia دارای طول ۱۶۸۷۲ نوکلئوتید است. این اندازه در محدوده معمول ژنوم اعضای جنس Velarivirus، یعنی حدود ۱۶-۱۶۹ کیلوباز، قرار دارد و با اندازه ژنوم گزارش شده برای LChV-1 مطابقت دارد. ژنوم LChV-1 در میان اعضای این جنس از بزرگ‌ترین ژنوم‌ها بوده و برای جدایه UW2 طول ۱۶۹۳۴ نوکلئوتید گزارش شده است (Fuchs *et al.*, 2020). ساختار ژنومی Urmia متشکل از یک ناحیه غیر قابل ترجمه در ابتدای

در جدایه Urmia، ORF1a در موقعیت ۶۹۷۶-۷۱ قرار دارد و با طول ۶۹۰۶ نوکلئوتید، پروتئین همانندسازی حاوی دامنه‌های papain-like methyltransferase (MET)، protease (P-PRO) و helicase (HEL) را کد می‌کند. وجود این سه ناحیه در ORF1a یکی از ویژگی‌های حفاظت شده سازمان ژنومی LChV-1 و اعضای Velarivirus است (Katsiani *et al.*, 2015). موتیف GKS مربوط به فعالیت NTPase/helicase در ORF1a جدایه Urmia مشاهده شد؛ این یافته با ماهیت helicase وابسته به NTP در ویروس‌های این گروه سازگار است (Chirkov *et al.*, 2023). ORF1b در موقعیت ۸۴۹۲-۶۹۴۵ قرار گرفته است و با

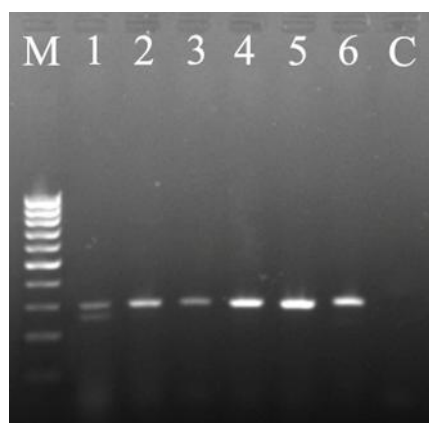
"گلابی و همکاران، طراحی، ویژگی‌های مولکولی و تکاملی جدایه ایرانی ویروس میوه‌ریزی گیلان ۱..."

پس از آن، ORF6 در موقعیت ۱۵۲۴۶-۱۳۲۵۸ کدکننده پروتئین پوششی غیر اصلی (CPm) است. این پروتئین برخلاف CP معمولاً تمام طول ویرون را نمی‌پوشاند؛ بلکه فقط بخش انتهایی ویرون را پوشش می‌دهد و برای تشکیل ساختار کامل ویرون اهمیت دارد. وجود CP و CPm در بخش انتهایی ژنوم از ویژگی‌های مشخص اعضای Velarivirus است (Fuchs et al., 2020). ORF7 (موقعیت ۱۵۹۴۲-۱۵۲۴۷) و ORF8 (موقعیت ۱۶۶۹۸-۱۵۹۷۹) پروتئین‌های کوچک انتهایی را رمزگذاری می‌کنند که در مطالعات قبلی به ترتیب به‌عنوان p21 و p27 توصیف شده‌اند. این دو پروتئین در میان جدایه‌های LChV-1 نسبتاً حفاظت‌شده‌اند اما عملکرد دقیق آنها در این ویروس هنوز مشخص نشده است.

آزمون RT-PCR: به‌منظور تأیید نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل RNA-Seq، آزمون RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی LCUW7090/ LCUWc7389 و با بهره‌گیری از نمونه‌های آرانا استخراج شده و انتخابی از شش منطقه نمونه‌برداری شده (نمونه‌های استخراج شده و ارسال برای RNA-Seq) صورت گرفت. آغازگرهای مورد استفاده به‌طور اختصاصی برای هدف قرار دادن ناحیه RdRp از ژنوم ویروس LChV-1 طراحی شده بودند و از این طریق امکان شناسایی دقیق ویروس را فراهم می‌کنند. مشاهده باند ۳۰۰ جفت بازی مورد انتظار در ژل آگارز یک درصد در هر شش منطقه نمونه‌برداری علاوه بر تأیید نتایج حاصل از RNA-Seq، بیانگر گستردگی شیوع ویروس LChV-1 در باغات استان آذربایجان غربی است (شکل ۲).

کدون آغازین غیر AUG آغاز می‌شود. مهم‌ترین یافته در ORF1b وجود موتیف GDD است که در توالی ترجمه‌شده RdRp (ORF1b) جدایه Urmia در حدود اسیدآمینه ۳۷۲ مشاهده می‌شود. وجود GDD یکی از شاخص‌ترین ویژگی‌های هسته catalytic مربوط به RdRp در ویروس‌های ssRNA(+) است و با دامانه حفاظت‌شده Closteroviridae_RdRp مطابقت دارد (Satyanarayana et al., 2000).

ORF2 در موقعیت ۸۵۹۲-۸۴۹۷ قرار دارد و یک پروتئین هیدروفوبیک کوچک را رمزگذاری می‌کند که دارای ناحیه transmembrane است و احتمالاً در سازمان‌دهی فرآیندهای مرتبط با غشا و کمپلکس‌های همانندسازی نقش دارد (King et al., 2012). ORF3 با موقعیت نوکلئوتیدی ۸۵۹۷-۱۰۲۵۲، پروتئین HSP70-like را کد می‌کند که یکی از پروتئین‌های حفاظت‌شده در ژنوم اعضای Closteroviridae است و در LChV-1 نیز در تمام مطالعات ژنومی اصلی به‌عنوان یکی از ORFهای شاخص ویروس گزارش شده است. این پروتئین در انتقال سلول به سلول ویروس، تشکیل کمپلکس همانندسازی و مونتاژ ویرون مشارکت دارد (Satyanarayana et al., 2000). در موقعیت ۱۱۹۷۷-۱۰۴۲۴ نوکلئوتیدی ORF4 قرار گرفته است که پروتئین p61 را کد می‌کند که به پروتئین HSP90 شباهت دارد (Katsiani et al., 2015). پروتئین p61 احتمالاً در مونتاژ و سازمان‌دهی ذرات ویروسی، به‌ویژه در همکاری با HSP70h و CPm نقش دارد (Satyanarayana et al., 2000). ORF5 در موقعیت ۱۳۲۵۲-۱۲۰۳۸ پروتئین پوششی اصلی (CP) را رمزگذاری می‌کند.



شکل ۲. نقوش الکتروفورزی محصول واکنش RT-PCR با جفت آغازگر LCUW7090 (for)، LCUWc7389 (Rev) برای شناسایی ویروس LChV-1 در ژل آگارز یک درصد رنگ آمیزی شده به وسیله Red-safe. راهک M نشانگر مولکولی ۱۰۰ bp و راهک های ۱ تا ۶ به ترتیب نمونه های برگ گیلاس دارای علائم آلودگی از شهرستان های بوکان، اشنویه، خوی، ارومیه، سلماس و مهاباد و راهک C مربوط به کنترل منفی (نمونه سالم) است.

بود و این ناحیه در مقایسه با سایر ORF های بررسی شده، محافظت شده ترین ناحیه ژنومی در جدایه Urmia محسوب شد. پس از ORF1b، ORF7 (P21) با میانگین شباهت حدود ۷۶/۲ درصد و ORF3 (HSP70-like) با حدود ۷۴/۸ درصد، بیشترین میزان حفاظت را نشان دادند. ORF1a، ORF4 و ORF8 نیز به ترتیب میانگین شباهت حدود ۷۲/۸، ۷۲/۶ و ۷۲/۱ درصد با سایر جدایه ها داشتند. در مقابل، ORF2 کمترین میانگین شباهت نوکلئوتیدی را در مقایسه Urmia با سایر جدایه ها نشان داد و مقدار میانگین آن حدود ۶۹ درصد بود. با این حال، تفسیر میزان تنوع ORF2 با توجه به اندازه کوچک آن (۹۶ نوکلئوتید) باید با احتیاط انجام شود. پس از ORF2، ORF6 (CPm) با میانگین شباهت حدود ۷۰/۱ درصد و ORF5 (CP) با حدود ۷۱/۵ درصد، از متغیرترین نواحی در مقایسه Urmia با سایر جدایه ها بودند (شکل ۳).

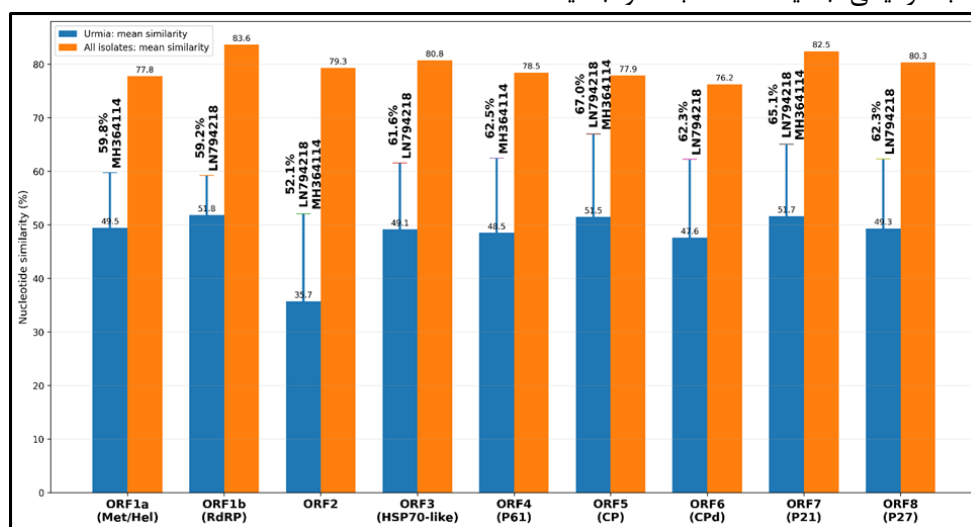
از نظر دامنه تغییرات بین کل جدایه ها نیز، بیشترین میزان حفاظت در RdRp مشاهده شد، در حالی که ORF2، CPm و CP دامنه وسیع تری از تفاوت های نوکلئوتیدی را نشان دادند. این الگو با

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه ها: مقایسه هم ردیف سازی چندگانه توالی های کامل نوکلئوتیدی ۴۳ جدایه LChV-1 با استفاده از نرم افزار Geneious Prime (2019.1.3) نشان داد که جدایه های مورد بررسی از نظر میزان شباهت ژنتیکی، تنوع قابل توجهی در نواحی مختلف ژنوم دارند. این تنوع در تمام ORF ها یکسان نبود و میزان حفاظت شدگی توالی ها بین ژن های مختلف تفاوت داشت. در مطالعات پیشین نیز مشخص شده است که تنوع ژنتیکی LChV-1 در سطح بین گروهی به مراتب بیشتر از تنوع درون گروهی است. به عنوان مثال، در یک بررسی مربوط به ژنوم های کامل LChV-1، پنج گروه فیلوژنتیکی متمایز شناسایی شد و میزان شباهت نوکلئوتیدی درون گروه ها ۹۲/۳ تا ۹۶ درصد و میانگین شباهت بین گروه های مختلف حدود ۷۶/۸ درصد گزارش شد (Chirkov et al., 2023). در تحلیل انجام شده در مطالعه حاضر، الگوی مشابهی از تفاوت ژنتیکی بین نواحی مختلف ژنوم مشاهده شد. در مقایسه اختصاصی جدایه Urmia با سایر جدایه ها، میانگین شباهت نوکلئوتیدی در ORF1b که پروتئین RdRp را رمزگذاری می کند، حدود ۸۱/۲ درصد

"گلابی و همکاران، طراحی، ویژگی‌های مولکولی و تکاملی جدایه ایرانی ویروس میوه‌ریزی گیلان ۱..."

از اهمیت عملکردی پروتئین RdRp و فشار انتخابی برای حفظ عملکرد پروتئین‌های دخیل در تکثیر آران‌ا ویروس سازگار است. در مقابل، تنوع بیشتر در پروتئین‌های ساختاری و برخی پروتئین‌های فرعی می‌تواند نشان‌دهنده فشارهای تکاملی متفاوت بر این نواحی باشد. یکی از یافته‌های قابل توجه در مقایسه توالی‌ها، الگوی مشابه نزدیکی جدایه Urmia به دو جدایه

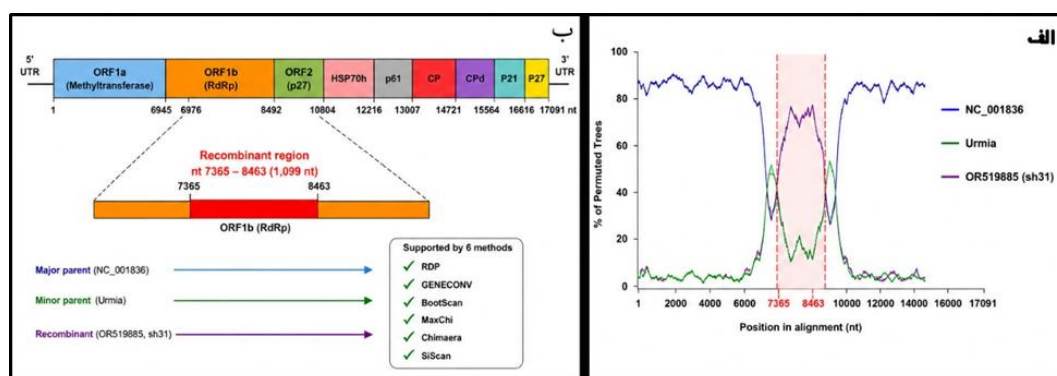
LN794218 و MH364114 در بسطیاری از ORFها بود. این دو جدایه در اغلب نواحی ژنومی بررسی شده از نزدیک‌ترین جدایه‌ها به Urmia محسوب شدند. این الگوی مشابه در ژن‌های *RdRp*، *HSP70-like*، *HSP90-like*، *CP*، *CPm*، *P21* و *P27* مشاهده شد و نشان می‌دهد که نزدیکی Urmia به این دو جدایه محدود به یک ناحیه منفرد از ژنوم نیست.



شکل ۳. میانگین شباهت نوکلئوتیدی جدایه Urmia با سایر جدایه‌های ویروس LChV-1 (ستون‌های آبی) در مقایسه با میانگین شباهت نوکلئوتیدی در میان تمام جدایه‌های مورد بررسی (ستون‌های نارنجی) برای هر یک از ORFهای ژنومی. رس‌شمار و درصد شباهت نزدیک‌ترین جدایه به جدایه Urmia در قسمت بالای ستون‌های آبی به صورت عمودی نمایش داده شده است.

آنالیز فرایند نوترکیبی: تجزیه و تحلیل نوترکیبی در ۴۳ ژنوم کامل از ویروس LChV1 منجر به شناسایی هشت رویداد نوترکیبی احتمالی شد. نتایج این بررسی مشخص کرد تنها در یک رویداد با احتمال آماری بالا، جدایه Urmia به عنوان والد فرعی احتمالی نقش داشته است. در این رویداد، جدایه چینی sh31(OR519885) جدانشده از بادام به عنوان نوترکیب معرفی شد که در آن، Urmia به عنوان والد فرعی و جدایه آمریکایی UW2(NC_001836) جدانشده از گیلان به عنوان والد اصلی شناسایی شدند. ناحیه نوترکیب بین

نوکلئوتیدهای ۷۳۶۵ و ۸۴۶۳ قرار داشت و توسط شش الگوریتم مستقل یعنی RDP، GENECONV، BootScan، Chimaera، MaxChi و SiScan با P-valueهای بسیار معنادار (۱۰-۱۷ تا ۱۰-۶۸) پشتیبانی شد (شکل ۴). دو رویداد دیگر نیز Urmia را به عنوان یک نوترکیب احتمالی پیشنهاد کردند؛ با این حال، این رویدادها دارای پشتیبانی آماری ضعیفی بوده و توسط نرم‌افزار RDP به عنوان مبهم (ambiguous) تعریف شده و بنابراین به جای قطعی، احتمالی (tentative) تلقی می‌شوند.



شکل ۴. رویداد نوترکیبی در ژنوم جدایه Urmia، شناسایی شده از طریق تجزیه و تحلیل RDP شامل توالی‌های کامل ویروس LChV1. این رویداد توسط شش الگوریتم مستقل (RDP، GENECONV، BootScan، MaxChi، Chimaera و SiScan) با P-value های ۱۰-۱۷ تا ۱۰-۶۸ شناسایی شده است. الف) ناحیه نوترکیبی با رنگ نارنجی از موقعیت‌های نوکلئوتیدی ۷۳۶۵ تا ۸۴۶۳ در ژنوم جدایه Urmia مشخص شده است. ب) موقعیت مکانی نوترکیبی احتمالی در نقشه ژنومی جدایه Urmia. جدایه sh31 (OR519885) به عنوان نوترکیب و جدایه‌های Urmia و UW2 (NC_001836) به ترتیب به عنوان والد فرعی و اصلی معرفی شده‌اند.

شاخه‌بندی فیلوژنتیکی LChV-1 الزاماً با میزبان یا منشأ جغرافیایی جدایه‌ها مطابقت ندارد (Tahzima et al., 2019).

در درخت ترسیم شده بر اساس توالی کامل نوکلئوتیدی ۴۳ جدایه LChV-1 آرایش گروه‌های پنجگانه به صورت زیر بود: گروه I در درخت حاضر یکی از گروه‌های نسبتاً بزرگ LChV-1 را تشکیل می‌دهد و شامل جدایه‌هایی از مناطق جغرافیایی مختلف از جمله کانادا، ایالات متحده، چین، اسپانیا، استرالیا، بلژیک و کره جنوبی است. این پراکندگی جغرافیایی نشان می‌دهد که Group I یک گروه محدود به یک منطقه جغرافیایی خاص نیست. برای مثال، KX192366 و KX192367 مربوط به جدایه‌های Jerte و Ponferrada از گیلان اسپانیا هستند و هر دو شباهت بالایی با Taian از چین نشان داده‌اند. همچنین MN508820 از گیلان کانادا تقریباً با جدایه MN131067 از کالیفرنیا یکسان گزارش شده است. از نظر دامنه میزبانی نیز Group I محدود به یک گونه از جنس Prunus نیست. جدایه‌های این گروه از گیلان، هلو و سایر گونه‌های Prunus

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک: انتخاب مدل تکاملی پیش از ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 12 انجام و مدل (GTR+G+I) به عنوان مدل بهینه انتخاب شد. درخت فیلوژنتیکی با روش Maximum Likelihood (ML) بر اساس این مدل بازسازی و میزان حمایت شاخه‌ها (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد. درخت فیلوژنی ترسیم شده مبتنی بر توالی کامل ژنوم جدایه‌های LChV-1 در مطالعه حاضر، وجود پنج گروه فیلوژنتیکی بزرگ (I-V) را نشان داد (شکل ۵). این شاخه‌بندی پنجگانه گروه‌ها در مورد ژن‌های CP و HSP70 نیز با آرایش تقریباً مشابهی مشاهده شد (شکل‌های پیوست). این توپولوژی با مطالعات پیشین مبتنی بر ژنوم کامل LChV-1 مطابقت دارد. در مطالعه Chirkov و همکاران (۲۰۲۳)، که ۳۸ ژنوم کامل LChV-1 را بررسی کردند، پنج گروه فیلوژنتیکی مشخص شد و میانگین شباهت نوکلئوتیدی بین گروه‌ها حدود ۹۲/۸٪ و شباهت درون گروهی در محدوده ۹۲/۳٪ تا ۹۶٪ گزارش شد. همچنین مطالعات پیشین بر پایه RdRp، HSP70h و CP نشان داده‌اند که

"گلابی و همکاران، طراحی، ویژگی‌های مولکولی و تکاملی جدایه ایرانی ویروس میوه‌ریزی گیلان ۱..."

تعداد ژنوم‌های در دسترس ممکن است تغییر کند و طبقه‌بندی بر اساس مجموعه‌های کوچک‌تر لزوماً پایدار نباشد.

گروه IV شامل جدایه‌هایی از جمهوری چک، ایتالیا، استرالیا و سایر مناطق است و از نظر میزبان نیز طیف وسیعی از جنس *Prunus* را در بر می‌گیرد. در این گروه جدایه‌های حاصل از زردآلو، گیلان شیرین، گیلان ترش و بادام مشاهده می‌شوند. نمونه مهم این گروه OR519885 (sh31) است که طبق اطلاعات مورد استفاده در مطالعه حاضر از بادام در چین جدا شده است. حضور OR519885 در گروه IV از نظر نتایج نوترکیبی مطالعه حاضر اهمیت ویژه‌ای دارد. بر اساس تحلیل RDP انجام‌شده روی ۴۴ ژنوم کامل، OR519885 به‌عنوان جدایه نوترکیب احتمالی شناسایی شد و *Urmia* به‌عنوان والد فرعی احتمالی و *UW2* (NC_001836) به‌عنوان والد اصلی احتمالی معرفی شدند. بنابراین، گروه IV فقط از نظر تنوع جغرافیایی و میزبان اهمیت ندارد، بلکه شامل جدایه‌ای است که احتمالاً در تاریخچه تکاملی آن، تبادل ژنتیکی با جدایه‌ای از گروه V، یعنی *Urmia*، رخ داده است.

این موضوع اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا مطالعات قبلی نیز شواهدی از نوترکیبی در LChV-1 گزارش کرده‌اند. Katsiani و همکاران (۲۰۱۵) یک رویداد نوترکیبی را در ناحیه انتهایی RdRp گزارش کردند و مطالعه دیگر آنها در سال ۲۰۱۸ نیز وجود رویدادهای نوترکیبی را در ژنوم ITMAR نشان داد. بنابراین، نتایج مطالعه حاضر در چارچوب شواهد قبلی نشان می‌دهد که نوترکیبی احتمالاً یکی از عوامل مؤثر در ایجاد تنوع ژنتیکی LChV-1 است، هرچند برای نسبت دادن قطعی هر رویداد به تاریخچه تکاملی ویروس باید حمایت آماری و تحلیل نقاط شکست در نظر گرفته شود.

گزارش شده‌اند. وجود جدایه KR080325 از هلو در همین lineage در کنار جدایه‌های متعدد گیلان، نمونه‌ای از نبود اختصاصیت شدید میزبان در این گروه است.

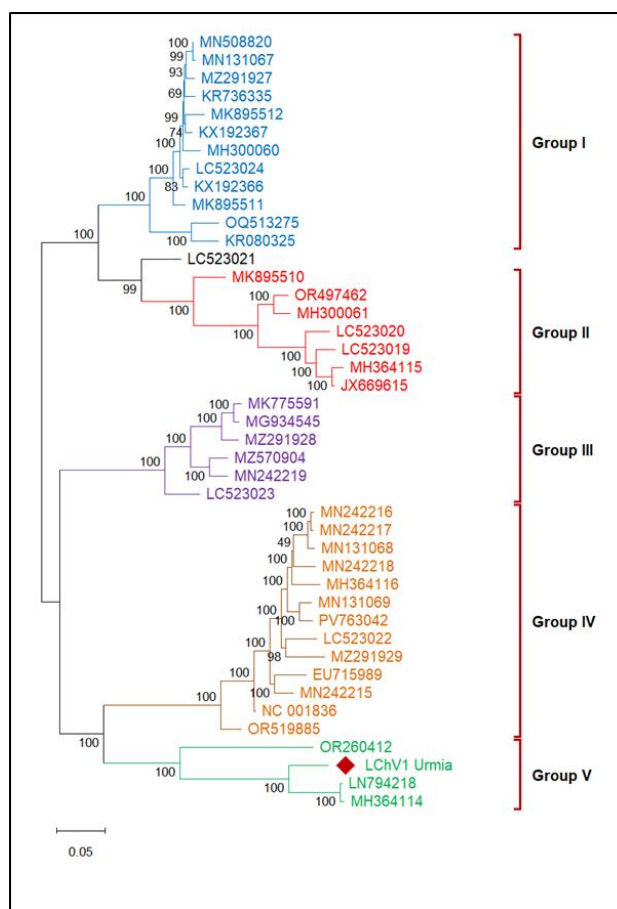
گروه II شامل جدایه‌هایی از آلمان، اسپانیا، استرالیا و یونان است و از نظر میزبان نیز تنوع قابل توجهی دارد. در این گروه جدایه‌هایی از گیلان، گیلان ترش و آلو دیده می‌شوند. برای مثال جدایه آلمانی (V2356) JX669615 از گیلان ترش، MH364115 از یونان از گیلان و جدایه استرالیایی LC523019 از آلو در این مجموعه قرار گرفته‌اند. از نظر تکاملی، گروه II را می‌توان یک شاخه نسبتاً گسترده با حضور جدایه‌های اروپایی و استرالیایی دانست، اما داده‌های موجود اجازه نمی‌دهند که برای این گروه یک مرکز جغرافیایی یا میزبان اختصاصی تعیین شود.

گروه III از نظر جغرافیایی و میزبانی یکی از متنوع‌ترین گروه‌هاست. این گروه شامل جدایه‌هایی از جمهوری چک، ژاپن، کانادا، چین و استرالیا است. از نظر میزبان نیز زردآلو، گیلان شیرین و گیلان زینتی (*P. serrulata*) در این گروه مشاهده می‌شوند. جدایه‌های شاخص آن شامل MN242219 از زردآلوی جمهوری چک، MG934545 (Kyoto-2) از گیلان زینتی، MZ291928 از کانادا، MK775591 از گیلان شیرین چین و LC523023 از گیلان شیرین استرالیا هستند. وجود جدایه ژاپنی MG934545 (Kyoto-2) از گیلان زینتی در این گروه اهمیت ویژه‌ای دارد. این جدایه در مطالعات پیشین به‌عنوان یک گروه مستقل و بسیار واگرا شناخته شده بود، اما با افزایش تعداد ژنوم‌های کامل، Chirkov و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که Kyoto-2 در Group III در کنار چند جدایه جدید قرار می‌گیرد. این موضوع نشان می‌دهد که تعریف phylogroupها در LChV-1 با افزایش

اساس کل ژنوم، بلکه با الگوی شباهت ژن‌های RdRp، HSP70h و CP (پیوست) نیز سازگاری دارد. از نظر جغرافیایی، گوناگونی جدایه‌های گروه V بسیار قابل توجه است، زیرا اعضای آن از ایران، یونان و روسیه منشأ گرفته‌اند. از نظر میزبان نیز دست‌کم گیلاس و هیبریدهای بین‌گونه‌ای *Prunus* در این گروه حضور دارند. بنابراین، حتی این گروه که نسبت به سایر گروه‌ها تمایز ژنتیکی مشخصی دارد، فاقد یک الگوی جغرافیایی یا میزبانی کاملاً اختصاصی است. مطالعه Chirkov و همکاران (۲۰۲۳) نشان داد که جدایه روسی *Stepnoe* در کنار دو جدایه یونانی قرار می‌گیرد و این موضوع را به‌عنوان گسترش دامنه جغرافیایی این شاخه تفسیر کردند. افزوده شدن *Urmia* به همین شاخه، در صورت تأیید توسط تحلیل‌های بیشتر، دامنه جغرافیایی گروه V را به غرب آسیا نیز گسترش می‌دهد.

گروه V از نظر تکاملی یکی از جالب‌ترین گروه‌هاست و شامل OR260412، *LChV1 Urmia*، LN794218 و MH364114 است. جدایه‌های LN794218(G15_3) و MH364114 (C118-Iso1) از یونان و از روی گیلاس هستند، در حالی که OR260412 (*Stepnoe*) از روسیه و از یک هیبرید بین‌گونه‌ای *Prunus* جدا شده است. مطالعه Chirkov و همکاران نشان داد که *Stepnoe* با G15_3 از یونان نزدیک‌ترین رابطه را دارد، اگرچه کل ژنوم آنها تنها حدود ۷۷/۳ درصد شباهت نشان می‌دهند؛ این مقدار بسیار کمتر از محدوده معمول شباهت درون‌گروهی *LChV-1* است و نشان‌دهنده واگرایی زیاد این شاخه است. جدایه *Urmia* نیز در همین گروه قرار گرفته است. این جدایه در شاخه‌ای نزدیک به LN794218 و MH364114 قرار دارد و با bootstrap بالا حمایت می‌شود. بنابراین، جایگاه *Urmia* در گروه V نه‌تنها بر

"گلابی و همکاران، طراحی، ویژگی‌های مولکولی و تکاملی جدایه ایرانی ویروس میوه‌ریزی گیلاس ۱..."



شکل ۵. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس مقایسه توالی کامل نوکلئوتیدی جدایه‌های LChV1 این درخت با استفاده از نرم‌افزار MEGA (نسخه ۱۲.۰.۹) و با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood) ترسیم شده است. اهمیت آماری شاخه‌ها با استفاده از آنالیز بوت‌استرپ (۱۰۰۰ تکرار) ارزیابی شد.

dN در این ناحیه تنها ۰/۰۳۲۰ در مقابل میانگین dS برابر با ۱/۳۸۹۸ بود و نسبت dN/dS برابر با ۰/۰۲۳۰ به دست آمد. همچنین در تمام مقایسه‌های معتبر، dN/dS کمتر از یک بود. ژن *HSP70h* نیز الگوی مشابهی نشان داد و دارای dN/dS برابر ۰/۰۵۸۲ بود. در این ژن نیز تمام مقایسه‌ها دارای $dN/dS < 1$ بودند. در مقایسه با ژن‌های مرتبط با تکثیر، *CP* و *CPm* نسبت‌های dN/dS بالاتری داشتند. برای *CP*، میانگین dN/dS به ترتیب ۰/۱۳۴۶ و ۱/۲۷۰۳ و نسبت کلی dN/dS برابر با ۰/۱۰۵۹ بود. ژن *CPm* بیشترین مقدار dN/dS را در میان چهار ژن نشان داد (۰/۱۲۶۳). با این حال، حتی در *CPm* نیز تمام

بررسی انتخاب طبیعی: بر اساس تجزیه و تحلیل نسبت جایگزینی‌های غیرهم‌معنی به هم‌معنی (dN/dS) در چهار ناحیه کدکننده اصلی LChV-1 شامل *CP*، *HSP70h*، *RdRp* و *CPm* نشان داد که هر چهار ژن دارای نسبت dN/dS کمتر از یک هستند (جدول ۲). نسبت کلی dN/dS، که از تقسیم میانگین dN بر میانگین dS به دست آمد، برای *CP*، *HSP70h*، *RdRp* و *CPm* به ترتیب ۰/۰۲۳۰، ۰/۰۵۸۲، ۰/۱۰۵۹ و ۰/۱۲۶۳ بود. بنابراین، در هر چهار ناحیه، جایگزینی‌های هم‌معنی به‌طور قابل توجهی بیشتر از جایگزینی‌های غیر هم‌معنی بودند. ژن *RdRp* بیشترین محدودیت تکاملی را نشان داد. میانگین

۰/۰۵۸۷، ۰/۱۳۷۹ و ۰/۱۱۹۵ بود. بنابراین، حتی در این جدایه نیز هر چهار ژن تحت محدودیت تکاملی قرار دارند. در این میان، کمترین نسبت dN/dS را نشان داد، در حالی که CP و CPM نسبت‌های بالاتری داشتند.

مقایسه‌ها دارای $1 < dN/dS$ بودند؛ بنابراین هیچ‌یک از چهار ژن در سطح مقایسه‌های دوجه‌دو الگوی غالبی از انتخاب مثبت نشان ندادند. در جدایه Urmia نیز همین الگو مشاهده شد. نسبت dN/dS بر اساس نسبت میانگین‌ها برای RdRP، HSP70h، CP و CPM به ترتیب حدود ۰/۰۲۸۴،

جدول ۲. تجزیه و تحلیل نسبت جایگزینی‌های غیرهم معنی به هم معنی (dN/dS) در چهار ناحیه کدکننده جدایه‌های LChV-1

ژن	تعداد جدایه‌ها	تعداد مقایسه‌های معتبر	میانگین dN	میانگین dS	نسبت کلی dN/dS	میانگین dN/dS دوجه‌دو	میان dN/dS	دامنه dN/dS	درصد مقایسه‌های $dN/dS < 1$
RdRP	۴۳	۸۹۶	۰/۰۳۲۰	۱/۳۸۹۸	۰/۰۲۳۰	۰/۰۳۰۴	۰/۰۲۴۹	۰-۰/۲۲۵۰	۱۰۰٪
HSP70h	۴۳	۹۰۰	۰/۰۷۵۸	۱/۳۰۲۱	۰/۰۵۸۲	۰/۰۶۶۴	۰/۲۵۹۵	۰-۰/۲۵۸۸	۱۰۰٪
CP	۴۳	۹۰۱	۰/۱۳۴۶	۱/۲۷۰۳	۰/۱۰۵۹	۰/۱۲۲۵	۰/۱۰۸۹	۰/۰۴۳۹- ۰/۷۳۸۷	۱۰۰٪
CPd	۴۳	۸۹۹	۰/۱۶۱۳	۱/۲۷۷۳	۰/۱۲۶۳	۰/۱۴۷۴	۰/۱۳۳۰	۰/۰۸۹۱- ۰/۲۱۰۴	۱۰۰٪

بحث

شناسایی و تعیین توالی کامل جدایه Urmia از *Little cherry virus 1* شواهد جدیدی از تنوع ژنتیکی و ساختار تکاملی این ویروس در ایران فراهم می‌کند. ویروس LChV-1 از اعضای جنس *Velarivirus* در خانواده *Closteroviridae* است و دارای ژنوم آرانا تک‌ رشته‌ای با قطبیت مثبت و اندازه‌ای در حدود ۱۶ تا ۱۷ کیلوباز است. سازمان ژنومی، شامل ژن‌های مرتبط با همانندسازی، HSP70h، p61، پروتئین پوششی (CP)، پروتئین پوششی فرعی (CPM) و پروتئین‌های انتهایی ۳، از ویژگی‌های مشخص اعضای این جنس محسوب می‌شود (Fuchs et al., 2020).

ساختار ژنومی جدایه Urmia با الگوی شناخته‌شده LChV-1 و سایر اعضای *Velarivirus* مطابقت دارد. به‌ویژه، وجود ناحیه همانندسازی در انتهای ۵، همراه با HSP70h، p61، CP و CPM،

نشان‌دهنده حفاظت قابل توجه سازمان ژنومی در این گروه ویروسی است. این حفاظت ژنومی احتمالاً منعکس‌کننده اهمیت عملکردی این پروتئین‌ها در همانندسازی، حرکت و تشکیل ذرات ویروسی است. در LChV-1، همانند سایر ویروس‌های کلسیتروویریده، HSP70h و پروتئین‌های پوششی از اجزای مهم چرخه بیماری‌زایی و مونتاژ ویرون محسوب می‌شوند (Katsiani et al., 2015).

از نظر تکاملی، نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ژنوم LChV-1 تحت فشارهای انتخابی یکنواختی قرار ندارد. حفاظت بیشتر نواحی مرتبط با همانندسازی، در مقایسه با CP و CPM، با اهمیت عملکردی بالاتر این پروتئین‌ها سازگار است. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که RdRP و HSP70h تحت انتخاب طبیعی شدید قرار دارند، در حالی که CP تنوع بیشتری نشان می‌دهد؛ با

"گلابی و همکاران، طراحی، ویژگی‌های مولکولی و تکاملی جدایه ایرانی ویروس میوه‌ریزی گیلان ۱..."

این حال CP نیز در سطح جمعیت، عمدتاً تحت انتخاب منفی قرار دارد. بنابراین، افزایش تنوع در یک ژن الزاماً به معنای انتخاب مثبت نیست، بلکه می‌تواند بیانگر تحمل بیشتر آن ناحیه نسبت به تغییرات باشد.

یکی از ویژگی‌های قابل توجه جمعیت LChV-1، وجود تنوع ژنتیکی نسبتاً زیاد میان جدایه‌هاست. مطالعات اولیه بر اساس RdRp، HSP70h و CP چهار گروه تکاملی را شناسایی کردند و نشان دادند که این گروه‌ها ارتباط مشخصی با گونه میزبان یا منشأ جغرافیایی جدایه‌ها ندارند. مطالعات بعدی مبتنی بر ژنوم کامل نیز وجود پنج گروه فیلوژنتیکی را نشان داده‌اند. در این چارچوب، قرار گرفتن جدایه Urmia در گروه V و نزدیکی آن به جدایه‌های یونانی اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا گروه V پیش‌تر نیز شامل جدایه‌هایی از یونان و روسیه گزارش شده است (Chirkov *et al.*, 2023). این الگوی فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که تنوع LChV-1 احتمالاً صرفاً حاصل تکامل مستقل جمعیت‌های ویروس در مناطق جغرافیایی مختلف نیست. انتقال مواد تکثیری آلوده، به‌ویژه در گیاهان چندساله جنس *Prunus*، می‌تواند موجب جابه‌جایی ژنوتیپ‌های ویروسی بین مناطق دور از یکدیگر شود (Tahzima *et al.*, 2019). ازاین‌رو، نزدیکی جدایه Urmia به جدایه‌های اروپایی نباید الزاماً به‌عنوان شواهدی از انتقال مستقیم و اخیر ویروس از اروپا به ایران تفسیر شود؛ بلکه می‌تواند ناشی از وجود نیای مشترک یا تاریخچه طولانی انتقال مواد گیاهی باشد.

در کنار جهش و انتخاب طبیعی، نوترکیبی نیز احتمالاً در تکامل LChV-1 نقش دارد. در مطالعات پیشین، رویدادهای نوترکیبی در ناحیه RdRp و همچنین در سایر بخش‌های ژنوم این ویروس گزارش شده‌اند (Tahzima *et al.*, 2019). بنابراین، شواهد نوترکیبی مشاهده‌شده در مجموعه ژنوم‌های مورد بررسی، با شناخت فعلی از تکامل

LChV-1 سازگار است. با این حال، رویدادهای شناسایی‌شده با روش‌های محاسباتی باید به‌عنوان شواهد احتمالی نوترکیبی تفسیر شوند و تأیید قطعی آن‌ها نیازمند بررسی‌های تجربی یا داده‌های توالی‌یابی مستقل است (Martin *et al.*, 2015). اهمیت نوترکیبی در LChV-1 زمانی بیشتر آشکار می‌شود که با نتایج انتخاب طبیعی در کنار یکدیگر تفسیر شود. به نظر می‌رسد نوترکیبی می‌تواند ترکیب‌های ژنتیکی جدیدی را در جمعیت ویروس ایجاد کند، در حالی که انتخاب طبیعی بسیاری از تغییرات نامطلوب را حذف می‌کند. در نتیجه، تنوع مشاهده‌شده در جمعیت LChV-1 حاصل تعامل میان نوترکیبی، جهش و انتخاب طبیعی است؛ به‌گونه‌ای که تنوع ژنتیکی ایجاد می‌شود، اما بخش عمده تغییرات نامطلوب در ژن‌های حیاتی حفظ نمی‌شوند. این الگو با یافته‌های قبلی درباره تکامل LChV-1 نیز مطابقت دارد (Holmes, 2009; Domingo *et al.*, 2012).

در مجموع، قرار گرفتن Urmia در گروه V، نزدیکی آن به LN794218 و در عین حال شناسایی آن به‌عنوان والد فرعی احتمالی در رویداد نوترکیبی OR519885، نشان می‌دهد که این جدایه از نظر تکاملی ویژگی قابل توجهی دارد. این یافته‌ها در کنار تفاوت میزان حفاظت ژن‌های مختلف LChV-1 نشان می‌دهند که تکامل این ویروس احتمالاً حاصل برهم‌کنش واگرایی ژنتیکی، انتخاب و نوترکیبی است و تاریخچه تکاملی کل ژنوم الزاماً تاریخچه یکسانی برای همه نواحی ژنومی ارائه نمی‌دهد.

از دیدگاه تشخیصی، تنوع ژنتیکی LChV-1 اهمیت قابل توجهی دارد. مطالعات مبتنی بر توالی‌یابی با توان بالا نشان داده‌اند که این ویروس می‌تواند تنوع ژنتیکی قابل توجهی حتی در سطح یک میزبان داشته باشد و وجود واریانت‌های مختلف در یک گیاه نیز ممکن است رخ دهد. بنابراین، استفاده از نواحی نسبتاً حفاظت‌شده

تکامل این ویروس ارائه می‌کند که در آن تبادل ژنتیکی موجب ایجاد تنوع و فشار انتخابی موجب حفظ عملکرد ژن‌های ضروری می‌شود. از این رو، تعیین توالی ژنوم کامل جدایه‌های بیشتر از ایران و کشورهای همسایه می‌تواند در آینده برای روشن تر شدن تاریخچه پراکنش، ساختار جمعیت و مسیرهای تکاملی LChV-1 بسیار ارزشمند باشد. سپاسگزاری: نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه ولی عصر رفسنجان بابت پشتیبانی مالی و تجهیزاتی این پژوهش قدردانی می‌کنند.

مانند RdRp برای تشخیص عمومی ویروس و استفاده از نواحی متغیرتر مانند CP برای مطالعات فیلوژنتیکی و تفکیک جدایه‌ها می‌تواند راهبرد مناسبی باشد (Katsiani *et al.*, 2018). در مجموع، یافته‌های مربوط به جدایه Urmia نشان می‌دهد که LChV-1 در ایران بخشی از یک جمعیت ژنتیکی گسترده و متنوع است که روابط تکاملی آن الزاماً با مرزهای جغرافیایی یا میزبان مطابقت ندارد. جایگاه جدایه Urmia در یکی از گروه‌های فیلوژنتیکی شناخته‌شده، همراه با شواهد نو ترکیبی و غالب بودن انتخاب طبیعی، تصویری از

منابع

- Andrews S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Bajet NB, Unruh TR, Druffel KL, Eastwell KC. (2008) Occurrence of Two Little Cherry Viruses in Sweet Cherry in Washington State. *Plant Diseases*. 92(2): 234-238. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-2-0234>.
- Candresse T, Martelli GP. (2011) Family Betaflexiviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. (Eds.). Virus taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (pp. 920–941). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384684-6.00078-1>.
- Chirkov S, Sheveleva A, Tsygankova S, Slobodova N, Sharko F, Petrova K, Mitrofanova I. (2023) First Report and Complete Genome Characterization of Cherry Virus A and Little Cherry Virus 1 from Russia. *Plants*. 12(18): 3295. <https://doi.org/10.3390/plants12183295>.
- Domingo E, Sheldon J, Perales C. (2012) Viral quasispecies evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76(2): 159–216. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05023-11>.
- Fuchs M, Bar-Joseph M, Candresse T, Maree HJ, Martelli GP, Melzer MJ, Menzel W, Minafra A, Sabanadzovic S. (2020) Report Consortium I. ICTV Virus Taxonomy Profile: Closteroviridae. *Journal of General Virology*. 101(4): 364-365. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001397>.
- Gambino G, Perrone I, Griboaldo I (2008) A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*. 19: 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>.
- Hajizadeh M, Afsharifar AR, Izadpanah K. (2009) Incidence and distribution of Prunus necrotic ringspot virus and Prune dwarf virus in stone fruit trees in Iran. *Archives of Virology*. 154(8): 1369–1373.
- Holmes, EC. (2009) The Evolution and Emergence of RNA Viruses. Oxford University Press.
- James D, Jelkmann W. (2007) Virus and virus-like diseases of Prunus species. In: Loebenstein G, Thottappilly G, (Eds.). Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries. *Dordrecht*. Springer; p. 415–430. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0791-7_2.
- Jevremović D, Vasiljević B, Paunović S. (2025) Detection and molecular characterization of two little cherry viruses infecting stone fruits in Serbia. *Journal of Plant Pathology*. 107: 715–722.
- Katsiani AT, Maliogka VI, Amoutzias GD, Efthimiou KE, Katis NI. (2015) Insights into the genetic diversity and evolution of Little cherry virus 1. *Plant Pathology*. 64(4): 817–824.

"گلابی و همکاران، طراحی، ویژگی‌های مولکولی و تکاملی جدایه ایرانی ویروس میوه‌ریزی گیلاس ۱ ..."

<https://doi.org/10.1111/ppa.12309>.

Katsiani A, Maliogka VI, Katis N, Svanella-Dumas L, Olmos A, Ruiz-García AB, Marais A, Faure C, Theil S, Lotos L, Candresse T. (2018) High-Throughput Sequencing Reveals Further Diversity of Little Cherry Virus 1 with Implications for Diagnostics. *Viruses*. 21;10(7): 385. <https://doi.org/10.3390/v10070385>.

King A, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz E J. (2012) Closteroviridae. *Virus Taxonomy*. 987–1001. Elsevier Press

Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*. 17(1): 10–2. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.

Martin DP, Varsani A, Roumagnac P, Botha G, Maslamoney S, Schwab T, Kelz Z, Kumar V, Murrell B. (2021) RDP5: A computer program for analyzing recombination in, and removing signals of recombination from, nucleotide sequence datasets. *Virus Evolution*. 12;7(1): veaa087. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa087>.

Marroni M, Casonato S, Visnovsky S, Pitman A, Beresford R, Jones E. (2024) Pathogenicity and virulence-associated factors of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. amygdali* pv. *morsprunorum* strains from New Zealand sweet cherry (*Prunus avium*) orchards. *Journal of Phytopathology*. 172: e13390. <https://doi.org/10.1111/jph.13390>.

Matic S, Myrta A, Minafra A. (2007) First report of little cherry virus 1 in cherry, plum, almond and peach in Italy. *Journal of Plant Pathology*. 89: S75. <https://hdl.handle.net/20.500.14243/26706>.

Pourrahim R, Farzadfar S. (2018) Molecular Detection of Little Cherry Virus 1 (LChV-1) from Iran. *Iranian Journal of Virology*. 12(1):1–5.

Pourrahim R, Farzadfar S. (2025) The incidence and genetic analysis of two Betaflexiviruses Capillovirus alphavii and Tepovirus tafpruni in Iran. *Plant Pathology Journal*. 41(1): 38. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.RW.11.2024.0204>.

Reinhold LA, Pscheidt JW. (2023) Diagnostic and historical surveys of sweet cherry (*Prunus avium*) virus and virus-like diseases in oregon. *Plant Diseases*. 107(3): 633-643. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-21-0327-SR>.

Šafářová D, Faure C, Candresse T, Navrátil M, Nečas T, Marais A. (2016) First report of Little cherry virus 1 infecting apricot in the Czech Republic. *Plant Diseases*. 101:845. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-16-1289-pdn>.

Satyanarayana T, Gowda S, Mawassi M, Albiach-Martí MR, Ayllón MA, Robertson C, Garnsey SM, Dawson WO. (2000) Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology*. 278(1): 253-65. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0638>.

Tahzima R, Foucart Y, Peusens G, Beliën T, Massart S, De Jonghe K. (2019) High-Throughput Sequencing Assists Studies in Genomic Variability and Epidemiology of Little Cherry Virus 1 and 2 infecting *Prunus* spp. in Belgium. *Viruses*. 11(7): 592. <https://doi.org/10.3390/v11070592>.

Webster AD, Looney NE. (1996) Cherries: Crop physiology, production and uses. CAB International

Molecular and Evolutionary Characterization of the Iranian Isolate of Little cherry virus 1 (*Velarivirus nanoavii*) Based on Its Complete Genome Sequence

Parsa Golabi¹, Ahmad Hosseini^{1*}, Mina Rastgoo²

1. Department of Phytomedicine, Faculty of Agriculture, Vali Asr University of Rafsanjan

2. Department of Phytomedicine, Faculty of Agriculture, Urmia University

hosseini@vru.ac.ir

Abstract

Little cherry virus 1 (LChV-1), a member of the genus *Velarivirus* within the family *Closteroviridae*, is an important virus associated with little cherry disease in *Prunus* species. Given the economic importance of sweet cherry in Iran and the limited information available on the genetic diversity of LChV-1, this study aimed to characterize an Iranian isolate of the virus at the molecular and evolutionary levels using RNA-seq. The complete genome sequence of the Urmia isolate exhibited the characteristic genomic organization of LChV-1 and the genus *Velarivirus*. Phylogenetic analyses based on the complete genome and selected genes placed the Urmia isolate within a recognized LChV-1 phylogenetic group and revealed a close relationship with several European isolates. Genetic diversity analyses indicated greater conservation of replication-associated regions, particularly RdRp, compared with structural proteins. The dN/dS analyses indicated that purifying selection predominated across the examined genes. In addition, computational analyses provided evidence for recombination within the LChV-1 population, suggesting that recombination may contribute to the generation of genetic diversity in this virus. Overall, the findings indicate that evolutionary dynamics of LChV-1 are shaped by the interplay of mutation, recombination, and natural selection. This is the first report of the complete genome sequence of LChV-1 from Iran.

Keywords: RNA-seq; complete genome; phylogeny; recombination; natural selection