ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

LACTARİUS CİNSİ ÜYELERİNİN KONAKLIK ETTİĞİ MİKOVİRÜSLERİN TANIMLANMASI VE MOLEKÜLER OLARAK NİTELENDİRİLMESİ

Aigul KALIYEVA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2026

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

LACTARİUS CİNSİ ÜYELERİNİN KONAKLIK ETTİĞİ MİKOVİRÜSLERİN TANIMLANMASI VE MOLEKÜLER OLARAK NİTELENDİRİLMESİ

Aigul KALIYEVA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ilgaz AKATA
Eş Danışman: Doç. Dr. Ergin ŞAHİN

Bu çalışmanın amacı, Türkiye'de yayılış gösteren *Lactarius* cinsi üyelerini enfekte eden mikovirüslerin tanımlanması ve tüm genom dizilerinin yeni nesil dizileme ile ortaya koyularak tüm genom verisi üzerinden moleküler nitelemeleri ve filogenetik analizlerinin yapılmasıdır. Moleküler ve konvansiyonel tür teşhisi yapılan örneklere Viral Çift İplikçikli RNA (dsRNA) taraması yapılmıştır. Arazi çalışmaları sonucunda elde edilen *Lactarius* cinsi üyeleri'nin geleneksel ve moleküler yöntemler kullanılarak teşhisleri yapılmıştır. Lactarius örneklerinden genomik DNA izolasyonu CTAB yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Ribozomal RNA gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmış ve dizilenmiştir. Amplikonlar, BLASTn analizleri kullanılarak incelenmiş ve filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. dsRNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve S1 nükleaz kullanılarak dsRNA'lar muamele edilip analiz edilmiştir. dsRNA'lardan elde edilen cDNA'lar rPCR ile çoğaltılmış, saflaştırılmış ve yeni nesil dizileme ile analiz edilmiştir. Terminal bölgelerin çoğaltılması için RACE PCR ve Sanger dideoksi yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen viral genom dizileri biyoinformatik ve filogenetik olarak analiz edilmiştir. Bu çalışmada, *Lactarius* cinsi üyelerini enfekte eden bir mikovirüs tanımlanmıştır. " Lactarius mediterraneensis partitivirüs 1 (LmPV1)" olarak adlandırılan partitivirüsün tam genomu elde edilmiştir.

Haziran 2026, 72 sayfa
Anahtar kelimeler: *Lactarius* cinsi, Fungal virüsler, dsRNA, Enfeksiyon, Mikoviral biyoçeşitlilik, ITS

ABSTRACT

PhD Thesis

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MYCOVIRUSES INFECTING INHABITING THE MEMBERS OF THE GENUS *LACTARİUS*

Aigul KALIYEVA

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ilgaz AKATA
Co-supervisor: Doç. Dr. Ergin ŞAHİN

The aim of this study was to identify the mycoviruses infecting members of the genus Lactarius distributed in Turkey and to perform molecular characterization and phylogenetic analysis of their whole genome sequences by next generation sequencing. Viral double-stranded RNA (dsRNA) screening was performed on the molecular and conventional specimens. Members of the genus Lactarius obtained as a result of field studies were identified using conventional and molecular methods. Genomic DNA isolation from Lactarius samples was carried out by CTAB method. Ribosomal RNA gene regions were amplified by PCR. Amplicons were examined using BLASTn analyses and phylogenetic trees were constructed. dsRNA extraction was performed and dsRNAs were treated and analyzed using S1 nuclease. dsRNAs were amplified by rPCR, purified and analyzed by next generation sequencing. RACE PCR and Sanger dideoxy method were used for amplification of terminal regions. The viral genome sequences obtained were analyzed bioinformatically and phylogenetically. In this study, a mycovirus infecting members of the genus Lactarius was identified. The complete genome of the partitivirus, named “Lactarius mediterraneensis partitivirus 1 (LmPV1)”, was obtained.

June 2026, 72 page
Key Words: Genus *Lactarius*, Fungal viruses, dsRNA infection, Mycoviral biodiversity, ITS

TEŞEKKÜR

Doktora yolculuğum boyunca bana destek olan, yol gösteren ve katkı sağlayan herkese teşekkür ederim.

Öncelikle, tez sürecim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her aşamada yol gösteren ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Ilgaz AKATA' ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Doktora sürecimde sağladığı destek ve katkılar benim için son derece kıymetlidir.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, değerli katkılarıyla bana yol gösteren eş danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ergin ŞAHİN'e içten teşekkür ederim.

Doktora yolculuğum boyunca yanımda olan, desteklerini ve dostluklarını esirgemeyen tüm arkadaşlarıma ve meslektaşlarıma da teşekkür etmek isterim. Birlikte paylaştığımız güzel anlar ve dayanışma bu süreci benim için çok daha anlamlı hale getirdi.

Son olarak, her zaman yanımda olan, sabırları ve destekleriyle beni motive eden aileme ve yol arkadaşım Mehmet Ali Gökçe'ye en derin teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen; **FDK-2023-3017** numaralı "*Lactarius* Cinsi Üyelerinin Konaklık Ettiği Mikovirüslerin Tanımlanması ve Moleküler Olarak Nitelendirilmesi" başlıklı Doktora Tez projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle tez çalışmalarıma sağladıkları destekten dolayı Ankara Üniversitesi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Aigul KALIYEVA
Ankara, Haziran 2026

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETİ **6**
2.1 Mikovirüsler **6**
2.2 Mikovirüslerin Sınıflandırılması **8**
2.3 Mikovirüslerin Konak Üzerindeki Etkileri **10**
2.4 Mikovirüslerin Taşınması **11**
2.5 Mikovirüslerin Biyolojik Mücadelede Kullanımı **13**
2.6 Partitiviridae Familyası **14**
2.6.1 Genom organizasiyonu **16**
2.7 Ektomikorizal Mantarlarda Mikovirüsler **18**
2.8 Lactarius ve Mikovirüsler **18**
2.9 Türkiye'de Partitivirüs Çalışmaları **19**
3. MATERYAL ve YÖNTEM **21**
3.1 Materyal **21**
3.1.1 Lactarius cinsi örneklerinin temin edilmesi **21**
3.1.2 Morfolojik teşhis çalışmaları **21**
3.2 Lactarius Cinsi Örneklerinin Moleküler Teşhislerinin Yapılması **21**
3.2.1 Genomik DNA izolasyonu **21**
3.2.2 Lactarius cinsi örneklerinin moleküler teşhisi için ribozomal RNA içerisindeki ITS gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve nükleotit dizilerinin belirlenmesi **23**
3.2.3 PCR ile çoğaltılan dizilerin moleküler teşhisi için BLASTn kullanılması ve filogenetik analizlerin yapılması **27**
3.2.4 Lactarius Cinsi Örneklerinden Viral Çift İplikçikli RNA (dsRNA) Ekstraksiyonu **29**
3.2.5 Viral dsRNA içeriklerinin elektroforetik olarak belirlenmesi **31**
3.2.6 Tanımlanan dsRNA segmentlerinin cDNA'ya çevrilmesi ve rPCR tepkimesi **31**
3.2.7 Ham NGS verilerinin de novo birleştirme yaklaşımı ile oluşturulması ve değerlendirilmesi **32**
3.2.8 Tanımlanan dsRNA segmentlerinin 5' ve 3' Uç (Terminal) bölgelerinin RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) yöntemi ile çoğaltılması ve sanger dideoksi zincir sonlanması yöntemi ile dizilerinin belirlenmesi **32**
3.2.9 TA klonlama yönteminin uygulanması **34**
3.2.10 Elde edilen dsRNA viral genom dizilerinin birleştirilmesi ve tamamlanması **36**

3.2.11 Tüm viral genomlara ait dsRNA dizilerinin biyoinformatik ve filogenetik olarak analiz edilmesi.....37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 39
4.1 Lactarius Cinsi Örneklerinin Temin Edilmesi Ve Detaylı Bilgileri 39
4.2 Lactarius Cinsi Örneklerinin Moleküler Teşhisi.....39
4.3 DNA Dizi Analizi Sonuçları.....40
4.4 Lactarius Cinsi Örneklerinde Viral dsRNA içeriklerinin incelenmesi 42
4.5 Genomu Tüme Yakın Olan Virüs İlişkili Contiglere RACE Yöntemi Uygulanması.....51
4.6 Lactarius mediterraneensis partitivirus 1 (LmPV1) Tanımı ve Moleküler Özellikleri 54
4.7 Lactarius mediterraneensis partitivirus 1'in Tüm Genom Analizi.....56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 60
KAYNAKLAR.....65
ÖZGEÇMİŞ.....72

SİMGELER DİZİNİ

bp	Baz çifti
nt	Nükleotit
gr	Gram
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
pmol	Pikomol
Rpm	Dakikada Devir
α	Alfa
β	Beta
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
kb	Kilo baz
%	Yüzde

Kısaltmalar

aa	Amino Asit
BLASTBasic	Local Alignmet Search Tool
CDD	Korunmuş Alanlar Veritabanı
cDNA	Complementary DNA (Komplementer DNA)
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromür
CP	Kapsit proteini
dH_2O	Distile su
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozit trifosfat
dsRNA	Çift İplikçikli RNA
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtOH	Etanol
HCl	Hidroklorik Asit
ICTV	Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi
ITS	Internal transcribed spacer (Dahili Transkripsiyonu Yapılan Aralayıcı)
LrRV1	Lactarius rufus RNA virus
LtRV1	Lactarius tabidus RNA virüs1
LmPV1	Lactarius mediterraneensis partitivirus 1
NGS	Next generation sequencing (Yeni nesil dizileme)
NaCl	Sodyum Klorür
ORF	Açık okuma çerçevesi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PEG	Polietilen Glikol
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RdRp	RNA bağımlı RNA polimeraz
RNA	Ribonükleik asit
rPCR	Rastgele (random) polimeraz zincir reaksiyonu
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
Tm	Erime Sıcaklığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Doğal ortamda mikovirüslerin bulaşma ve kaybolma mekanizmalarının şematik gösterimi 13
Şekil 2.2 Partitivirus cinsine ait temsilci türlerden biri olan Rhizoctonia solani virus 717 (RhsV 717)'nin negatif boyama yöntemi ile elde edilmiş elektron mikroskobu görüntüsü 17
Şekil 2.2 Partitiviridae familyasına ait virüslerin çift segmentli dsRNA genom organizasyonunun şematik gösterimi 18
Şekil 3.1 CTAB yöntemi kullanılarak fungal örneklerden DNA izolasyon sürecinin aşamalı şematik gösterimi 23
Şekil 3.2 Lactarius cinsi türlerinden viral dsRNA ekstraksiyonunun şematik gösterimi 30
Şekil 4.1 ANK Akata & Kaliyeva 007 numaralı *Lactarius mediterraneensis* örneğine ait basidyokarp 39
Şekil 4.2 32 adet Lactarius cinsi örneğine ait ITS PCR sonrası agaroz jel görüntüleri 40
Şekil 4.3 *Lactarius* cinsi üyelerinin dizilerine dayanarak oluşturulan maksimum olasılık filogenetik ağacı 42
Şekil 4.4 Viral dsRNA jel elektroforezi 43
Şekil 4.5 Viral dsRNA jel elektroforezi 44
Şekil 4.6 Viral dsRNA jel elektroforezi 44
Şekil 4.7 rPCR işlemi sonunda agaroz jel elektroforezi 46
Çizelge 4.6 Contiglere özgü tasarlanan primerlerin listesi 51
Şekil 4.8 Semi-nested PCR ile elde edilen LmPV1 RdRp ve kapsid proteinine ait 5′ UTR bölgelerinin agaroz jel elektroforezi 52
Şekil 4.9 ANK Akata & Kaliyeva 007 numaralı *Lactarius mediterraneensis* örneğinde tespit edilen LmPV1'in RdRp ve CP 3' UTR terminal bölgesinin klonlanması sonucunda oluşan koloniler 53
Şekil 4.10 LmPV1 RdRp ve CP 3'UTR için yapılan koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi 54
Şekil 4.11 LmPV1'e ait dsRNA genom segmentlerinin organizasyonu ve moleküler özelliklerinin şematik gösterimi 56
Şekil 4.12 LmPV1'in filogenetik analizi ve motif karşılaştırması 57
Şekil 4.13 LmPV1 dsRNA1 (RdRp) segmentinin terminal dizileri ve primer bölgeleri 58
Şekil 4.14 LmPV1 dsRNA2 (CP) segmentinin terminal dizileri ve primer bölgeleri 59
Şekil 4.15 LmPV1'e ait RdRp proteininin amino asit dizisi 59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 *Partitiviridae* familyasındaki beş cinse ait genom segmenti ve protein uzunluk aralıkları 16
Çizelge 3.1 ITS PCR çözeltisinin içeriği 26
Çizelge 3.2 PCR Isıl döngü basamakları 26
Çizelge 3.3 dsRNA ekstraksiyonunda kullanılan tamponların içerikleri 30
Çizelge 4.1 BLASTn analizi sonuçları 41
Çizelge 4.2 Türkiye'de yayılış gösteren bazı *Lactarius* türlerinde dsRNA taraması 45
Çizelge 4.3 viral dsRNA pozitif olarak belirlenen örneklerin yüksek işlem hacimli dizileme (HTS) ile çalışılma durumları 46
Çizelge 4.4 Tez çalışması kapmasında tanımlanmış diğer partitivirüslerin segmentlerinin listesi 47
Çizelge 4.5 Tanımlanmış partitivirüs CP ve RdRp genom segmentlerinin listesi 50

.

1. GİRİŞ

Mikovirüsler (fungal virüsler), mantar âlemi boyunca yaygın olarak bulunan ve geniş bir konak aralığına sahip viral ajanlardır (Ghabrial, 2009, Abbas, 2016, Hough vd., 2023). Bugüne kadar doğada varlığı bilinen hemen her canlı organizma grubunun, en az bir viral türle enfekte olabildiği gösterilmiştir (Gergerich et al., 2006; Hosseinalizadeh et al., 2021). Mikovirüslerin büyük bir çoğunluğu, konak mantarda belirgin bir hastalık belirtisi oluşturmayan ve "kriptik" (cryptic) enfeksiyonlar ile karakterize edilen virüslerdir (Ghabrial vd., 2015, Hillman ve Cai cd.,2013). Bu nedenle mikovirüs enfeksiyonları genellikle konak organizma üzerinde belirgin bir fenotipik değişikliğe yol açmamakta ve uzun süre fark edilmeden varlığını sürdürebilmektedir.

Mikovirüslerin keşfi, ilk olarak 1962 yılında Hollings tarafından *Agaricus bisporus*'ta gözlemlenen virüs benzeri partiküllerin tanımlanması ile başlamış, ancak bu virüslerin hücre dışı bulaşma mekanizmalarının bulunmaması ve yalnızca hücre içi yollarla aktarılmaları nedeniyle mikoviroloji alanındaki ilerlemeler uzun süre sınırlı kalmıştır (Syun-ichi Urayama vd., 2024).

Mikovirüslerin *Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Zygomycota* ve diğer birçok fungal taksonomik gruplarda varlığı gösterilmiş olup, mantarların neredeyse tüm büyük taksonomik grupları ile ilişkili oldukları bilinmektedir (Hough vd., 2023, Myers vd., 2020, Son vd., 2015). Günümüzde Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından mikovirüsler, genom organizasyonlarına göre çok sayıda familya altında sınıflandırılmaktadır (Hough vd., 2023, Walker vd., 2020).

Mikovirüslerin büyük bir çoğunluğu RNA genomuna sahip olup, özellikle çift iplikli RNA (dsRNA) ve pozitif anlamlı tek iplikli RNA (+ssRNA) genom tipleri baskın olarak görülmektedir (Ghabrial vd., 2015; Hough vd., 2023). dsRNA mikovirüsleri doğada en yaygın olarak bulunan grup olup, *Amalgaviridae, Chrysoviridae, Megabirnaviridae, Partitiviridae, Polymycoviridae, Quadriviridae, Reoviridae* ve *Totiviridae* gibi birçok familyayı kapsamaktadır. Bu virüslerin genomları segmentasyon açısından çeşitlilik gösterebilmekte olup, monopartit, bipartit veya çok segmentli yapılar

sergileyebilmektedir (Hough vd., 2023, Walker vd., 2020, Kotta-Loizou., 2021). Özellikle *Partitiviridae* familyasında görülen iki segmentli (bipartit) genom organizasyonu, bu grubun ayırt edici özelliklerinden biridir.

Pozitif anlamlı tek iplikli RNA (+ssRNA) mikovirüsleri genellikle segmentsiz genom yapısına sahip olmakla birlikte, bazı yeni tanımlanan familyalarda çok segmentli genom yapıları da bildirilmiştir. Negatif anlamlı tek iplikli RNA (−ssRNA) mikovirüsleri ise *Mymonaviridae* familyası altında sınıflandırılmakta olup, daha sınırlı sayıda temsil edilmektedir (Hough vd., 2023, Walker vd., 2020, Kotta-Loizou., 2021). Bunun yanı sıra, nadir olmakla birlikte tek iplikli DNA (ssDNA) genomuna sahip mikovirüsler de tanımlanmış ve *Genomoviridae* familyası altında sınıflandırılmıştır (Hough vd., 2023, Krupovic vd., 2016, Varsani vd., 2021).

Mikovirüslerin konak mantar üzerindeki etkileri oldukça değişken olup, bazı türler konakta belirgin bir fenotipik değişime neden olmazken, bazıları patojen konağın virülensi üzerinde önemli etkiler oluşturabilmektedir (Hassan vd., 2025). Özellikle hipovirülens oluşturan mikovirüsler, konak mantarda büyüme hızının azalması, sporulasyonun baskılanması, pigmentasyon değişiklikleri ve eşeysel gelişim bozuklukları gibi çeşitli fenotipik değişimlere yol açabilmektedir (Dawe vd., 2001; Nuss, 2005; Hosseinalizadeh vd., 2021). Bunun yanı sıra, bazı mikovirüslerin konak gen ekspresyonunu etkileyerek hipervirülens etkiler oluşturabildiği de bildirilmiştir.

Mikovirüslerin bulaşma mekanizmaları, bitki ve hayvan virüslerinden farklı olarak hücre dışı faz içermemektedir. Bu virüsler genellikle hifal anastomoz, hücre bölünmesi ve spor oluşumu yoluyla hücreler arasında aktarılmaktadır. Hifal anastomozun yalnızca vejetatif olarak uyumlu mantar suşları arasında gerçekleşebilmesi, mikovirüslerin yayılımını sınırlayan önemli bir faktör olarak değerlendirilmektedir (Son vd., 2015; Hough vd., 2023., Nuss vd., 2025).

Son yıllarda yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinde yaşanan hızlı gelişmeler, mikovirüslerin keşif sürecini önemli ölçüde hızlandırmış ve bu virüslerin çeşitliliği hakkında daha kapsamlı verilerin elde edilmesine olanak sağlamıştır. Bu teknolojiler

sayesinde, daha önce tespit edilemeyen çok sayıda mikovirüs tanımlanmış, ayrıca bu virüslerin evrimsel ilişkileri, genom organizasyonları ve konak organizmalar ile etkileşim mekanizmaları daha ayrıntılı bir şekilde ortaya konulmuştur. Elde edilen bu yeni bilgiler, mikovirüslerin biyolojik özelliklerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlarken, özellikle tarım ve ormancılık alanlarında bitki patojenlerine karşı biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılma potansiyelini de ön plana çıkarmıştır (Rigling ve ark., 2018).

Bu kapsamda, özellikle çift iplikli RNA genomuna sahip *Partitiviridae* familyası üyeleri, genom organizasyonları ve konak ile etkileşimleri bakımından dikkat çekmekte olup, ektomikorizal mantarlarda bulunan partitivirüslerin tanımlanması ve moleküler olarak karakterize edilmesi, mikoviral çeşitliliğin anlaşılması açısından önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır.

Bugüne kadar tanımlanan mikovirüslerin önemli bir kısmının çift iplikli RNA (dsRNA) genomuna sahip olduğu bilinmektedir. Ancak bu durumun, kullanılan yöntemlerin çoğunlukla dsRNA virüslerin tespitine yönelik olmasından kaynaklanan bir araştırma yanlılığını da yansıtabileceği düşünülmektedir. Mikovirüsler genom yapılarına göre farklı familyalar altında sınıflandırılmakta olup, bu familyalar arasında *Partitiviridae* önemli bir yere sahiptir.

Partitiviridae familyasına ait virüsler, çoğunlukla mantar ve bitki konaklarında belirgin semptomlara yol açmadan kriptik enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Bu virüs familyası, *Alphapartitivirus*, *Betapartitivirus*, *Deltapartitivirus*, *Gammapartitivirus* ve *Cryspovirus* olmak üzere ICTV tarafından tanınan 5 cins ile temsil edilmektedir (https://ictv.global/report/chapter/partitiviridae). Familya adı, Latince “partitus” (bölünmüş) kelimesinden türetilmiş olup, bu isim virüslerin segmentli genom yapısını ifade etmektedir (Tavantzis., 2008).

Bu virüsler, birbirine benzer büyüklükte olan ve ayrı kapsitler içerisinde paketlenen iki adet çift iplikli RNA (dsRNA) segmentine sahiptir. Her bir segment genellikle tek bir açık okuma çerçevesi içermektedir. Söz konusu segmentlerden biri RNA’ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp), diğeri ise kapsit proteinini (CP) kodlamaktadır.

Lactarius cinsi, *Russulaceae* familyasında yer alan ve çoğunlukla ektomikorizal yaşam süren, yaygın makroskobik mantarları kapsamaktadır. Bu cinsin üyeleri, hasar gördüklerinde ya da kesildiklerinde dış ortama "latex" olarak adlandırılan süt benzeri bir sıvı salgılamalarıyla karakterize edilir (Heilmann-Clausen vd., 1998). Çam (*Pinus*) ve meşe (*Quercus*) gibi orman ağaçlarıyla simbiyotik ilişkiler kuran bu mantarların bazı türleri, gastronomik ve ekonomik açıdan da önem arz etmektedir (Verbeken & Nuytinck, 2013).

Lactarius mediterraneensis, genellikle Akdeniz'e özgü kalkerli topraklarda, *Quercus ilex* ve *Q. fagenia* türlerinin altında yetişen, orta büyüklükte bir mantardır. Şapka kısmı yapışkan, huni biçiminde ve kremden sarı-turuncuya kadar değişen renktedir. Şapka yüzeyinde koyu renkli halkalar ve kenarlarda düzensiz girintili çıkıntılar (skrobiküller) bulunur. Lamelleri krem ile okra tonları arasında olup, sap kısmına bitişik ya da hafifçe sapa doğru inme eğilimindedir ve zamanla kahverengimsi renk değişimleri gözlenebilir. Kesildiğinde veya zedelendiğinde beyaz renkte süt (lateks) salgılar; bu sıvı zamanla sarıya döner. Spor izi açık okra renklidir ve sporları altküresel (subgloboz) şekilli ve ağsı (retiküler) yapılıdır (Kaliyeva ve Akata, 2025). Türkiye'nin doğal orman ekosistemlerinde Lactarius cinsine ait pek çok tür yaygın olarak bulunmasına rağmen, bu gruba ait mikovirüsler üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Sutela ve Vainio (2020) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *Lactarius tabidus* ve *Lactarius rufus* türlerinde iki segmentli (bipartit) dsRNA genomuna sahip Lactarius tabidus RNA virus 1 (LtRV1) ve Lactarius rufus RNA virus 1 (LrRV1) tanımlanmıştır. Bu virüslerin genomu yaklaşık 2.2 kb ve 2.0 kb uzunluğunda iki segmentten oluşmakta olup, büyük segment RNA-bağımlı RNA polimerazı (RdRp) kodlamaktadır. Küçük segment ise fonksiyonu tam olarak bilinmeyen bir veya iki protein kodlamaktadır. Filogenetik analizler, bu virüslerin *Curvulaviridae* familyası içerisinde yer aldığını ortaya koymuştur (https://ictv.global/taxonomy). Ayrıca bu virüslerin konak spesifik olduğu ve farklı *Lactarius* cinsi türleri arasında yatay geçiş göstermediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, virüs enfeksiyonlarının konak mantarda uzun süre kalıcı olduğu ve belirgin bir fenotipik değişikliğe neden olmadığı, dolayısıyla kriptik enfeksiyon karakteri gösterdiği bildirilmiştir (Sutela ve Vainio, 2020).

Mikovirüslerin konak mantarlar üzerindeki etkileri, tür içi genetik çeşitlilik ve evrimsel ilişkiler açısından son derece önemlidir. Bu bağlamda, *Lactarius* cinsi türlerinde görülen mikovirüslerin çeşitliliğinin belirlenmesi, filogenetik sınıflandırılması ve moleküler olarak nitelendirilmesi, yalnızca fungal virolojinin gelişimine değil, aynı zamanda ektomikorizal simbiyozların ekolojik rolünün anlaşılmasına da katkı sunacaktır.

Önerdiğimiz bu doktora tez çalışmasında, Türkiye'nin farklı bölgelerinde yayılış gösteren *Lactarius* cinsini enfekte eden mikovirüslerin tanımlanması, moleküler özelliklerinin belirlenmesi ve böylece biyoçeşitliliklerinin ve filogenetik özelliklerinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

Tez çalışması kapsamında yapılan araştırmanın ulaşmayı hedeflediği sonuçlar doğrultusunda; *Lactarius mediterraneensis* türüne ait doğal örneklerden izole edilen ve çift segmentli çift sarmallı RNA (dsRNA) genomuna sahip yeni bir *Alphapartitivirus* türü olan Lactarius mediterraneensis partitivirus 1 (LmPV1) tanımlanmıştır. Bu, hem *L. mediterraneensis*'in ilk kez bir mikovirüsle enfekte olduğunun gösterilmesi hem de ektomikorizal *Lactarius* türlerinden rapor edilen ilk *Alphapartitivirus* olması açısından literatüre önemli bir katkıdır ve ektomikorizal mantarlarda mikovirüs çeşitliliğine dair mevcut bilgileri genişletmektedir.

2. KAYNAK ÖZETİ

2.1 Mikovirüsler

Mikovirüsler, mantar hücreleri içerisinde kalıcı olarak bulunan ve çoğunlukla konak hücreyi lizise uğratmadan yaşamlarını sürdüren virüslerdir (Syun-ichi Urayamaa vd., 2024). Makromantarlar, sporoforları çıplak gözle seçilebilen, mantarlar aleminin özel bir kısmını oluştururlar ve iki tane şube içerisinde yer alırlar: *Askomikota* ve *Bazidiyomikota* (Servi vd. 2010). Makromantarları da içeren pek çok mantar türünün, hali hazırda birden fazla sayıda virüs ailesine ait fungal virüslerle enfekte halde oldukları rapor edilmiştir (Deakin vd. 2017). Mikovirüslerin keşfi, hayvanların, bitkilerin ve prokaryotların virüslerinin tanımlanması ve karakterize edilmelerine kıyasla daha geç yapılmıştır. Bu durum, olasılıkla fungal virüslerin çoğu zaman belirgin bir belirti oluşturmayan yapısından kaynaklanmaktadır. (Pearson vd. 2009). Mikovirüslerin önemli bir özelliği, bitki ve hayvan virüslerinden farklı olarak hücre dışı bulaşma mekanizmalarının bulunmamasıdır. Bu virüsler genellikle hifal anastomoz, spor oluşumu ve hücre bölünmesi yoluyla hücreler arasında taşınmaktadır. Bu durum, mikovirüslerin yayılımını sınırlayan önemli bir faktör olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, bazı mikovirüslerin konak mantarın virülensini azaltarak biyolojik mücadelede kullanılabileceği gösterilmiş olup, bu alandaki en başarılı örneklerden biri *Cryphonectria hypovirus 1 (CHV1)*'dir.

Mikovirüsler üzerine yapılan araştırmalar, virüs çeşitliliğinin daha iyi anlaşılmasına önemli katkılar sağlamıştır. Özellikle NGS yöntemleri sayesinde, daha önce fark edilmeyen RNA virüs çeşitliliği ortaya konmuş ve hücre dışı bulaşma mekanizması bulunmayan virüslerin yapısı ve özellikleri daha detaylı şekilde incelenmiştir (Kotta-Loizou, 2021, Roossinck, 2011; 2012). Mantarlar gibi mikroskobik organizmalarda fenotipik değişimlerin gözlemlenmesinin zor olması nedeniyle, günümüzde mikovirüslerin tespitinde fenotipten bağımsız yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu durum, mantarlarda virüslerin yalnızca hastalık belirtileri gösteren örneklerde değil, sağlıklı görünen örneklerde de araştırılmasına olanak sağlamış ve mikovirüs çeşitliliğinin

daha kapsamlı şekilde ortaya konmasına katkı sağlamıştır (Syun-ichi Urayamaa vd., 2024, Ghabrial vd., 2009).

Hücre dışı bulaşma mekanizmasına sahip az sayıda mikovirüs de tanımlanmıştır (Yu vd., 2013). Genel olarak mikovirüsler; çoğunlukla konak hücreyi öldürmeyen, belirgin semptom oluşturmayan enfeksiyonlar meydana getirmeleri, kalıcı bir yaşam döngüsüne sahip olmaları ve genellikle RNA genomu taşımaları ile karakterizedir. İzole edilen fungal suşlarda RNA mikovirüslerinin görülme sıklığının %7–80 arasında değişebildiği bildirilmektedir (Ghabrial vd., 2015; Kotta-Loizou ve Coutts, 2017). Tipik bir RNA mikovirüs genomu yaklaşık 2–15 kb uzunluğunda olup, 1 ile 12 arasında protein kodlayabilmektedir. Viral RNA'nın çoğaltılmasından sorumlu RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ve kapsit proteinlerini (CP) kodlayan genler dışında, çoğu genin fonksiyonu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu durum, mikovirüs genlerinin fonksiyonel analizlerinin, bitki ve hayvan virüslerine kıyasla daha sınırlı kaldığını göstermektedir.

Mikovirüs araştırmaları için çeşitli model sistemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında en iyi bilinen örnek, kestane yanıklığı etmeni *Cryphonectria parasitica* ve bu mantarı enfekte eden *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) sistemidir. Bu sistem, bitki patojeni mantarların biyolojik kontrolünde önemli bir model olarak kullanılmakta olup, cDNA aracılığıyla virüslerin yeniden oluşturulmasına olanak sağlamıştır. Ayrıca, konak mantar üzerinde genetik değişikliklerin gerçekleştirilebildiği ve RNA interferans (RNAi) mekanizmasının, konakta virüslere karşı savunmada etkili olduğu gösterilmiştir. RNA interferans (RNAi), hücrede yabancı RNA'ların parçalanarak etkisiz hale getirildiği bir savunma mekanizmasıdır (Segers vd., 2007).

Benzer şekilde, *Fusarium graminearum* üzerinde de kapsamlı mikovirüs çalışmaları yürütülmüş (Chu vd.,2004; Yu ve Kim, 2020) ve mikovirüslerin bir gen ekspresyon baskılanma aracı olarak kullanılmasıyla patojenite ile ilişkili genlerin baskılanabileceği ortaya konmuştur (Zhang vd., 2023a).

Son yıllarda, konak mantarları hücre dışı yolla enfekte edebilen bir DNA mikovirüsünün tanımlanması dikkat çekmiştir (Li vd., 2020; Yu vd., 2010; 2013). Bu gelişmenin, mikovirüslerin bulaşma mekanizmalarına ilişkin mevcut bilgileri genişletmesi ve yeni model sistemlerin geliştirilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

Mikovirüsler, mantarların hemen hemen tüm taksonomik gruplarında yaygın olarak bulunan ve çoğunlukla çift iplikli RNA (dsRNA) genomuna sahip virüslerdir. Bu virüsler genellikle hücre içi yollarla, özellikle hifal anastomoz, spor oluşumu ve hücre bölünmesi sırasında aktarılmakta olup, yaşam döngülerinde ekstraselüler bir faz bulunmamaktadır (Ghabrial vd., 2015). Mikovirüs enfeksiyonlarının büyük bir kısmı konak organizmada belirgin bir fenotipik değişikliğe neden olmadan asemptomatik olarak seyretmektedir. Bununla birlikte bazı mikovirüsler, konak mantarın büyümesini, gelişimini ve virülensini etkileyerek hipovirülens gibi önemli biyolojik sonuçlara yol açabilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle mikovirüsler, özellikle biyolojik mücadele ve bitki patolojisi alanlarında dikkat çekmektedir (Ghabrial vd., 2015).

Mikovirüslerin, *Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Zygomycota ve Neocallimastigomycota* gibi başlıca fungal taksonomik grupların çoğu ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Tanımlanan ilk mikovirüs, yenilebilir mantarlarda (*Agaricus bisporus*) hastalığa neden olan bir virüs olarak rapor edilmiştir (Romaine vd., 2002). 1962 yılında Hollings tarafından hastalıklı mantarlarda virüs benzeri partiküllerin gözlemlenmesi, mikoviroloji alanının başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Bu tarihe kadar mantarların virüsler tarafından enfekte olabileceği bilinmemekteydi. Söz konusu keşif, mikovirüslerin özellikle bitki patojeni mantarların biyolojik kontrolünde kullanılabileceğine yönelik önemli bir potansiyel ortaya koymuştur. Günümüzde bu alandaki çalışmalar giderek artmakta ve mikovirüs araştırmaları önemli bir bilimsel alan olarak gelişimini sürdürmektedir.

2.2 Mikovirüslerin Sınıflandırılması

Mikovirüs verilerini incelemek ve moleküler özellikleri ile biyoteknolojik kullanımlarını değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiş literatür taraması ile elde edilen sonuçlar, toplam 267 mikovirüs türünün varlığını ortaya koymuş olup, bunların 189'unun Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV) tarafından tanındığı belirlenmiştir.

Tanımlanan mikovirüslerin büyük çoğunluğunun çift iplikli RNA (dsRNA) genomuna sahip olduğu (%38,6), buna karşılık *Botourmiaviridae* (pozitif anlamlı tek iplikli RNA, +ssRNA) familyasının tek başına mikovirüs çeşitliliğinin %14'ünü temsil ettiği saptanmıştır.

Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV), mikovirüsleri günümüzde genom tiplerine göre 23 aile ve 1 sınıflandırılmamış cins altında toplamaktadır (Walker vd., 2020; Ghabrial vd., 2015). Virüsler çoğunlukla çift iplikli RNA (dsRNA) veya pozitif anlamlı tek iplikli RNA (+ssRNA) genomuna sahip olup, yaşam döngülerinde genellikle hücre dışı bir faz bulunmamaktadır. dsRNA genomuna sahip mikovirüsler; *Amalgaviridae, Chrysoviridae, Megabirnaviridae, Partitiviridae, Polymycoviridae, Reoviridae, Quadriviridae, Totiviridae* aileleri ile *Botybirnavirus* cinsi altında yer almaktadır (Walker vd., 2020; Kotta-Loizou vd., 2021; Hough vd., 2023).Pozitif anlamlı tek sarmallı RNA (+ssRNA) genom taşıyan mikovirüsler ise; *Alphaflexiviridae, Barnaviridae, Deltaflexiviridae, Endornaviridae, Gammaflexiviridae, Hadakaviridae, Hypoviridae, Mitoviridae, Narnaviridae* ve *Yadokariviridae* ailelerinde sınıflandırılmaktadır. Buna ek olarak, *Metaviridae* ve *Pseudoviridae* aileleri ters transkripsiyon (RT) mekanizmasına sahip tek sarmallı RNA genomlu mikovirüsleri içermektedir (Walker vd., 2020; Kotta-Loizou vd., 2021; Sato vd., 2023). Negatif anlamlı tek sarmallı RNA (−ssRNA) genomuna sahip mikovirüsler ise *Mymonaviridae* ailesi altında yer almaktadır (Walker vd., 2020; Lin vd., 2019; Guo vd., 2021; Hough vd., 2023). Ayrıca son yıllarda tek sarmallı DNA (ssDNA) genom taşıyan mikovirüsler de tanımlanmış olup, bunlardan yalnızca ikisi tanınmış bir aile olan *Genomoviridae* içerisinde sınıflandırılmaktadır: Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence-associated DNA virus 1 ve Fusarium graminearum gemytripvirus 1 (Yu vd., 2010; Krupovic vd., 2016;

Varsani vd., 2021, Koonin vd., 2020, Hough vd., 2023). dsRNA genomuna sahip mikovirüsler arasında *Chrysoviridae, Amalgaviridae, Megabirnaviridae, Quadriviridae, Partitiviridae, Polymycoviridae, Reoviridae, Totiviridae* aileleri ve sınıflandırılmamış *Botybirnavirus* cinsi yer almaktadır. +ssRNA genomuna sahip olan mikovirüsler ise *Endornaviridae, Alphaflexiviridae, Barnaviridae, Deltaflexiviridae, Gammaflexiviridae, Hypoviridae, Narnaviridae, Mitoviridae, Hadakaviridae* ve *Yadokariviridae* aileleri ile ters transkripsiyon yapan *Metaviridae* ve *Pseudoviridae* aileleri altında toplanmaktadır.

2.3 Mikovirüslerin Konak Üzerindeki Etkileri

Mikovirüsler, enfekte ettikleri fungal konaklar üzerinde farklı düzeylerde fizyolojik ve morfolojik değişimlere neden olabilen önemli virüslerdir. Bu etkiler; konak mantarın büyüme hızı, miselyal gelişimi, sporulasyon kapasitesi, pigmentasyon özellikleri ve metabolik aktivitelerinde değişiklikler şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Mikovirüs enfeksiyonlarının konak üzerindeki etkileri oldukça değişken olup, bazı durumlarda hipovirülense (virülens azalması), bazı durumlarda ise hipervirülens (virülens artışı) neden olabildiği bildirilmektedir (Dawe vd., 2001; Nuss, Eastwood, D., 2005, Hosseinalizadeh vd., 2021). Hipovirülens oluşturan mikovirüsler, özellikle bitki patojeni mantarlarda yaygın olarak tespit edilmiştir. Bu virüsler, konak mantarda virülens azalması, düzensiz büyüme, anormal pigmentasyon ve eşeysel gelişim bozuklukları gibi çeşitli fenotipik değişimlere yol açabilmektedir (Ghabrial vd., 2015; Villan Larios vd., 2023). Örneğin, Flammulina velutipes browning virus'un *Flammulina velutipes*'te büyüme bozukluklarına ve morfolojik değişimlere neden olduğu; Mushroom bacilliform fungus virus (MBV)'un *Agaricus bisporus*'ta miselyal gelişimi olumsuz etkilediği ve Lentinula edodes negatif iplikçikli RNA virüsü 1'in *Lentinula edodes*'te anormal kahverengileşmeye yol açtığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, Fusarium oxysporum chrysovirus 1, Botryosphaeria dothidea chrysovirus 1 ve Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-A gibi virüslerin konak mantarlarda büyüme hızını ve virülens düzeyini azalttığı gösterilmiştir (Villan Larios et al., 2023).

Mikovirüslerin konak üzerindeki etkileri yalnızca hipovirülens ile sınırlı olmayıp, bazı durumlarda hipervirülens etkiler de oluşturabilmektedir. Bu tür virüsler, konak mantarın

patojenik etkisini artırarak çevresel koşullara daha iyi uyum sağlamasına katkıda bulunabilmektedir. Ayrıca bazı mikovirüslerin konak gen ekspresyonunu etkileyerek belirli genlerin susturulmasına veya farklı düzeylerde ifade edilmesine neden olduğu ve bu durumun fenotipik değişimlerle sonuçlandığı bildirilmektedir.

Öte yandan, bazı mikovirüs enfeksiyonları konak üzerinde belirgin bir fenotipik değişikliğe yol açmadan seyredebilmektedir. Bu durum, mikovirüs-konak etkileşiminin oldukça karmaşık olduğunu ve virüsün etkisinin hem viral özelliklere hem de konak türüne bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir (Villan Larios vd., 2023). Mikovirüslerin konak mantar üzerindeki etkileri çok yönlü olup, bu etkiler hipovirülens, hipervirülens şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Bu çeşitlilik, mikovirüslerin fungal biyoloji üzerindeki rolünün anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır (Ghabrial vd., 2015).

2.4 Mikovirüslerin Taşınması

Mikovirüslerin büyük çoğunluğunda hücre dışı bulaşma mekanizmaları bulunmamaktadır (Son vd., 2015; Hough vd., 2023). Bu nedenle yayılımları ağırlıklı olarak hücre içi süreçlere bağlıdır ve başlıca iki şekilde gerçekleşir: sporlar aracılığıyla dikey bulaşma ve hifal anastomoz yoluyla yatay bulaşma. Hifal anastomoz, mantar hifleri arasında sitoplazmik bağlantı oluşmasını sağlayarak virüslerin bir hücreden diğerine geçişine olanak tanımaktadır (Munoz-Adalia vd., 2016; Kahraman vd., 2019). Bununla birlikte, bu aktarım her zaman yüksek verimlilikte gerçekleşmemekte; özellikle spor oluşumu sırasında virüslerin yeni hücrelere geçişi sınırlı kalabilmekte ve belirli oranlarda kayıplar gözlenebilmektedir (Sutela vd., 2019). Bu durum, mikovirüslerin doğal fungal popülasyonlar içerisinde değişken bir dağılım göstermesine neden olmaktadır (Şekil 1) (García-Pedrajas vd., 2019).

Yatay bulaşmayı etkileyen en önemli faktörlerden biri, konak mantarların vejetatif uyumluluk durumudur. Farklı vejetatif uyumluluk gruplarına (VCG) ait mantarlar arasında hifal birleşmenin gerçekleşmemesi, virüs aktarımını da önemli ölçüde sınırlandırmaktadır. Bu uyumsuzluk, vic genleri tarafından düzenlenmekte ve çoğunlukla

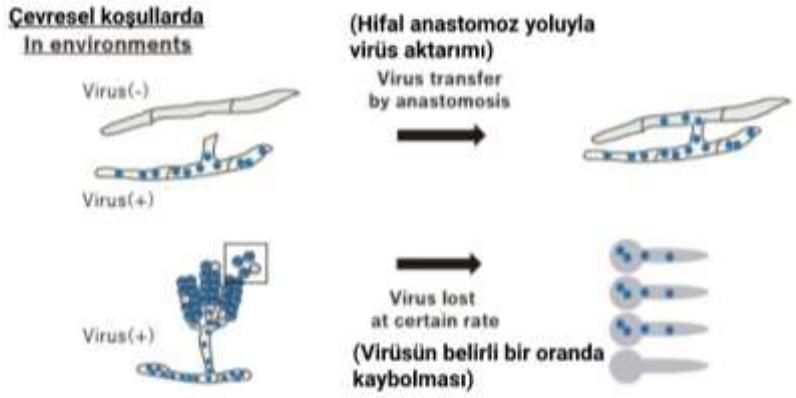
programlı hücre ölümü (PCD) ile sonuçlanarak virüsün yayılmasını engellemektedir (García-Pedrajas vd., 2019; Hough vd., 2023, Paoletti vd., 2016). Bununla birlikte, bazı mikovirüslerin bu savunma mekanizmasını baskılayarak farklı VCG grupları arasında da yayılabildiği bildirilmiştir (Wu vd., 2012). Bu durum, konak ve virüs arasındaki etkileşimin bulaşma dinamikleri üzerinde belirleyici olduğunu göstermektedir.

Dikey bulaşma ise eşeyli ve eşeysiz sporlar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Özellikle eşeysiz sporlar yoluyla bulaşma, mikovirüslerin yayılımında önemli bir rol oynamakta ve bu sayede virüslerin fungal popülasyonlarda korunmasına katkı sağlamaktadır (Van Diepeningen vd., 2006, Pearson vd., 2013, Lemus-Minor vd., 2019, Hough vd., 2023, Yang vd., 2018). Eşeysiz sporlarla aktarımın genellikle daha yüksek oranlarda gerçekleştiği bilinmekle birlikte, mikovirüslerin eşeyli sporlar yoluyla da taşınabildiği gösterilmiştir (Chun vd., 1997; Kahraman vd., 2019).

Mikovirüslerin yayılımı yalnızca konaklar arası temasla sınırlı olmayıp, çevresel koşullardan da etkilenmektedir. Doğal ortamlarda gerçekleştirilen çalışmalar, mikovirüslerin sahada laboratuvar koşullarına kıyasla daha etkin bir şekilde yayılabildiğini ortaya koymaktadır (García-Pedrajas vd., 2019). Ayrıca bazı mikovirüslerin böcekler veya diğer toprak organizmaları aracılığıyla taşınabileceği ve nadir durumlarda farklı mantar türleri arasında da geçiş yapabildiği bildirilmektedir (Yu vd., 2013, Vainio vd., 2017).

RNA genomuna sahip mikovirüslerin hücre dışı yolla taşınamamasının temel nedenlerinden biri, bu virüslerin hareket proteinine sahip olmamasıdır (Kahraman vd., 2019). Bu nedenle mikovirüslerin büyük bölümü yalnızca hücre içi bulaşma mekanizmalarına bağımlıdır. Bununla birlikte, son yıllarda hücre dışı bulaşma yeteneğine sahip nadir mikovirüslerin tanımlanması, mikovirüs biyolojisinin hâlâ tam olarak anlaşılmadığını ortaya koymaktadır (Yu vd., 2013; Li vd., 2020).

Tüm bu bilgiler değerlendirildiğinde, mikovirüslerin bulaşma mekanizmalarının ayrıntılı olarak anlaşılması, özellikle biyolojik mücadele yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.



Şekil 2.1 Doğal ortamda mikovirüslerin bulaşma ve kaybolma mekanizmalarının şematik gösterimi

Virüs taşıyan (Virus +) ve taşımayan (Virus –) mantar hifleri arasında hifal anastomoz yoluyla virüsün yatay olarak aktarılabildiği gösterilmektedir. Bununla birlikte, spor oluşumu sırasında mikovirüslerin belirli bir oranda kaybolabildiği ve bazı yeni hücrelerin virüssüz hale gelebileceği görülmektedir

2.5 Mikovirüslerin Biyolojik Mücadelede Kullanımı

Mikovirüslerin konak mantar üzerindeki etkilerinden biri, virülens düzeyinin azalması olarak tanımlanan hipovirülens durumudur. Bu olgu, en iyi şekilde kestane yanıklığı etmeni *Cryphonectria parasitica* üzerinde yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu mantarı enfekte eden bazı mikovirüslerin, konak mantarın hastalık oluşturma kapasitesini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Özellikle *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1), konak mantarda hipovirülens oluşturarak hastalığın şiddetini düşürmekte ve bu özelliği sayesinde biyolojik mücadele çalışmalarında önemli bir model sistem olarak kabul edilmektedir. Avrupa'da kestane yanıklığı hastalığının kontrol altına alınmasında hipovirülent suşların başarıyla kullanılması, mikovirüslerin biyolojik mücadele ajanı olarak değerlendirilmesine yönelik çalışmalara önemli bir katkı sağlamıştır (Hillman ve Suzuki, 2004, Rigling vd., 2018, Hough vd., 2023). Ayrıca, *Alphapartitivirus* grubuna ait *Rosellinia necatrix partitivirus 2* ve *Heterobasidion partitivirus 13* gibi partitivirüslerin de farklı fungal türlerde hipovirülens oluşturabildiği ve biyolojik mücadele açısından potansiyel taşıdığı bildirilmiştir (Hough vd., 2023).

Bununla birlikte, mikovirüslerin konak üzerindeki etkileri yalnızca virülens azalması ile sınırlı olmayıp, bazı durumlarda konak gen ekspresyonunu etkileyerek fenotipik değişimlere de yol açabilmektedir. Örneğin, *Mycoreovirus 1*'in bazı genleri susturarak miselyal gelişimi etkilediği; Sclerotinia minor endornavirus 1 ve Helicobasidium mompa endornavirus'un ise konak mantarda büyüme azalması ve morfolojik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Villan Larios vd., 2023). Öte yandan, bazı partitivirüslerin konak mantar üzerinde farklı etkiler oluşturabildiği, örneğin Trichoderma harzianum partitivirus 2 ile enfekte edilen izolatlarda miselyal yoğunluk ve spor üretiminin arttığı ve bu izolatların diğer patojen mantar türlerini inhibe edebildiği gösterilmiştir (Villan Larios vd., 2023).

Biyokontrol, bitki patojenleri ve diğer zararlı organizmaların neden olduğu olumsuz etkilerin kimyasal yöntemler yerine doğal süreçler aracılığıyla azaltılmasını hedefleyen sürdürülebilir bir yaklaşımdır. Bu bağlamda, bazı mikovirüslerin konak mantarın virülensini azaltarak hipovirülens oluşturabilmesi, bu virüslerin biyolojik mücadele kapsamında değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Ancak, bu potansiyele rağmen mikovirüslerin saha koşullarında bitki patojenlerinin kontrolünde başarılı bir şekilde kullanıldığı örneklerin sınırlı olduğu bildirilmektedir.

Mikovirüslerin biyokontrol ajanı olarak etkinliğini belirleyen en önemli faktörlerden biri, mantarlar arasında yayılım yetenekleridir. Bu virüsler genellikle hücre dışı bulaşma kapasitesine sahip olmadığından, yayılımları büyük ölçüde hifal anastomoz, hücre bölünmesi ve spor oluşumu ile sınırlıdır. Özellikle hifal anastomozun yalnızca vejetatif olarak uyumlu suşlar arasında gerçekleşebilmesi, mikovirüslerin farklı mantar populasyonları arasında yayılımını kısıtlayan önemli bir engel olarak değerlendirilmektedir (Son vd., 2015, Hough vd., 2023). Bu nedenle, mikovirüslerin uzun süreli ve etkili biyokontrol stratejilerinde kullanılabilmesi için yayılım dinamiklerinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

Partitivirüslerin çoğu konaklarında belirgin bir fenotipik değişikliğe neden olmasa da, bazı çalışmalar bu virüslerin konak mantar üzerinde önemli biyolojik etkiler oluşturabileceğini göstermektedir. Özellikle bazı partitivirüslerin konakta hipovirülense

yol açarak patojenitenin azalmasına neden olabildiği bildirilmektedir. Örneğin, Rosellinia necatrix partitivirus 2 ve Heterobasidion partitivirus 13'ün konak mantarlarda büyüme geriliği ve virülens azalması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Vainio vd., 2018). Bu bulgular, partitivirüslerin biyolojik mücadele açısından potansiyel taşıdığını göstermektedir.

2.6 *Partitiviridae* Familyası

Partitiviridae familyası, çift iplikli RNA (dsRNA) genomuna sahip virüsleri içeren önemli bir mikovirüs grubudur. Bu familyaya ait virüsler, başta mantarlar ve bitkiler olmak üzere çeşitli ökaryotik konakları enfekte edebilmekte ve çoğunlukla konaklarında belirgin bir hastalık belirtisi oluşturmayan asemptomatik enfeksiyonlar ile karakterize edilmektedir (Ghabrial vd., 2015; Vainio vd., 2018). Partitivirüsler genellikle konak hücre içerisinde kalıcı (persistent) enfeksiyonlar oluşturmakta ve konak ile uzun süreli bir denge ilişkisi kurmaktadır.

Partitiviridae familyasının en belirgin özelliği, genomlarının iki ayrı segmentten oluşmasıdır. Bu segmentler benzer uzunlukta olup, her biri genellikle tek bir açık okuma çerçevesi (ORF) içermektedir. Bu segmentlerden biri RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp), diğeri ise kapsid proteinini (CP) kodlamaktadır. İki segmentten oluşmakta ve her bir segment, ikosahedral yapıya sahip ayrı viral partiküller içerisinde bağımsız olarak paketlenmektedir. Bu özellik, *Partitiviridae* üyelerinin ayırt edici yapısal özelliklerinden biri olarak kabul edilmektedir (Nibert vd., 2014; Vainio vd., 2018).

Partitiviridae familyası, *Cryspovirus*, *Alphapartitivirus*, *Betapartitivirus*, *Deltapartitivirus* ve *Gammapartitivirus* olmak üzere beş farklı cinsi içermektedir (Çizelge 2.1) (Nibert vd., 2014). Bu virüslerin konak aralığı bitkiler, mantarlar ve protozoaları kapsamaktadır (Vainio vd., 2018). *Alphapartitivirus* ve *Betapartitivirus* cinslerine ait türlerin hem bitki hem de mantar konaklarda bulunabildiği bilinmektedir (Nibert vd., 2014). Bu türler arasındaki genetik benzerlik, partitivirüslerin bitkiler ve mantarlar arasında hifal anastomoz yoluyla aktarılmış olabileceğini düşündürmektedir (Roossinck, 2010, Nibert vd., 2014). *Partitivirus* cinsine ait virüsler, izometrik yapıda ve

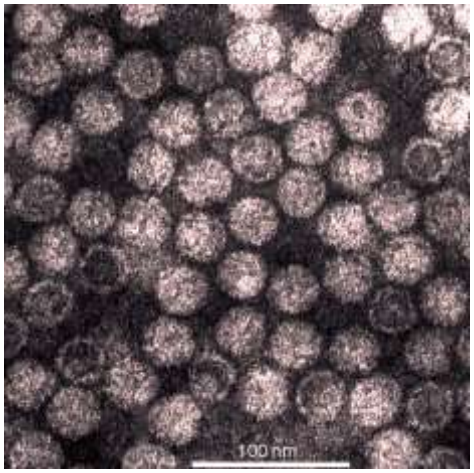
ikosahedral simetri gösteren virionlara sahiptir. Bu virüslerin partikül çapı genellikle 30–35 nm arasında değişmektedir. Negatif boyama yöntemi ile elde edilen elektron mikroskobu görüntülerinde, nükleik asit içermeyen virionların kapsitlerinin boyayı içeri alması nedeniyle merkezlerinin daha koyu göründüğü gözlenmektedir.

Çizelge 2.1 *Partitiviridae* familyasındaki beş cinse ait genom segmenti ve protein uzunluk aralıkları

Cins	dsRNA1 (bp)	dsRNA2 (bp)	RdRP (aa)	CP (aa)
Betapartitivirus	2180–2444	2135–2354	663–746	636–686
Alphapartitivirus	1873–2027	1708–1866	581–621	463–521
Gammapartitivirus	1645–1787	1445–1611	519–539	413–443
Deltapartitivirus	1563–1696	1415–1575	472–479	337–430
*Cryspovirus**	1786 (1836)‡	1374 (1510)‡	524	319

*Bu cins tek bir türden oluşmaktadır.
‡ Belirtilen genom segmentleri, Cryptosporidium parvum virus 1 (CSpV1-Iowa suşu)'na aittir (Vong ve ark., 2017)

Virion kapsiti zarfsız olup 12 kapsomerden oluşmakta ve toplamda yaklaşık 120 kapsid protein (CP) alt birimi içermektedir. Kapsid proteinlerinin moleküler ağırlığı yaklaşık 57–76 kDa arasında değişmektedir. Ayrıca virion ile ilişkili RNA polimeraz aktivitesi, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) enzimi tarafından sağlanmakta olup, bu proteinin büyüklüğü mantar partitivirüslerinde yaklaşık 77–86 kDa arasında bildirilmektedir (Şekil 2.2). Partitivirüsler genellikle izometrik kapsit yapısına sahip olup, bu özellik elektron mikroskobu görüntülerinde açıkça gözlenebilmektedir (Tavantzis, 2008).



Şekil 2.2 Partitivirus cinsine ait temsilci türlerden biri olan Rhizoctonia solani virus 717 (RhsV 717)'nin negatif boyama yöntemi ile elde edilmiş elektron mikroskobu görüntüsü. Virionların izometrik (küresel) yapıda olduğu ve yaklaşık 100 nm ölçek çubuğuna göre boyutlarının değerlendirilebildiği görülmektedir. Görüntü Tavantzis ve Bandy (1988)'den uyarlanmıştır

2.6.1 Genom organizasyonu

Partitivirüslerin virionları, iki segmentten oluşan çift sarmallı RNA (dsRNA) genomuna sahip olmaları ile karakterize edilir (Şekil 2.2). Bu segmentler dsRNA1 ve dsRNA2 olarak adlandırılmakta olup, uzunlukları genellikle yaklaşık 3–4,8 kbp uzunlukta arasında değişmektedir (Tavantzis, 2008). Aynı virüse ait dsRNA segmentleri çoğunlukla benzer büyüklükte olup, aralarındaki fark genellikle 20–200 baz çifti kadardır. Genom segmentlerinden daha büyük olan dsRNA1, RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) kodlarken, daha küçük olan dsRNA2 ise kapsid proteinini (CP) kodlamaktadır (Vainio vd., 2018; Nibert vd., 2014). Bu segmentlerin kodlayıcı ipliklerine ait 5′ uç bölgelerinin genellikle korunmuş olduğu ve ters tekrar dizileri içerdiği bilinmektedir. Bu diziler, RNA'nın kendi üzerine katlanarak saç tokası (stem–loop) yapıları oluşturmasına olanak sağlamaktadır. Bu yapıların, viral RNA'nın stabilitesi ve replikasyon süreçlerinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bazı partitivirüslerde, işlevi henüz tam olarak açıklanamamış bir proteini kodlayan üçüncü bir genom segmentinin de bulunabileceği bildirilmektedir (Tuomivirta ve Hantula, 2003, 2005; Nibert vd., 2014).



Şekil 2.2 Partitiviridae familyasına ait virüslerin çift segmentli dsRNA genom organizasyonunun şematik gösterimi (ICTV, 2023'ten alınmıştır)

Partitivirüslerin evrimsel olarak totivirüslerden evrimleşmiş olabileceği öne sürülmektedir. Totivirüslerde olduğu gibi partitivirüs genomu da iki temel geni (CP ve RdRp) içermektedir; ancak totivirüslerden farklı olarak bu genler ayrı dsRNA segmentleri üzerinde yer almakta olup, bu durum partitivirüslerin bipartit genom yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Buna karşılık birçok totivirüste RdRp, kapsit proteini ile birleşik (füzyon) bir protein olarak ifade edilmektedir. RdRp'yi ayrı bir protein olarak sentezleyen bazı totivirüslerin ise, atasal totivirüsler ile partitivirüsler arasında evrimsel bir geçiş formu olabileceği düşünülmektedir (Tavantzis, 2008).

2.7 Ektomikorizal Mantarlarda Mikovirüsler

Günümüze kadar, ektomikorizal basidiomiset cinslerinden *Thelephora* ve *Lactarius*'ta bazı mikovirüsler tanımlanmış olmakla birlikte (Petrzik vd., 2016; Sutela ve Vainio, 2020), ektomikorizal askomisetler arasında yalnızca *Tuber*, *Geopora*, *Gyromitra* ve *Morchella* cinslerinde mikovirüs varlığı bildirilmiştir (Stielow ve Menzel, 2010; Stielow vd., 2011, 2012; Şahin ve Akata, 2019; Gilbert vd., 2019).

Bununla birlikte, son yıllarda yüksek verimli dizileme (NGS) teknolojilerindeki gelişmeler, ektomikorizal mantarlardaki mikovirüs çeşitliliğinin daha önce tahmin edilenden çok daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Sutela ve Vainio, 2020; Villan Larios vd., 2023). Bu çalışmalar, doğal ortamlarda bulunan mantar türlerinde çoklu virüs enfeksiyonlarının yaygın olabileceğini ve bu virüslerin konak mantarın fizyolojisi ile simbiyotik ilişkileri üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir.

Ektomikorizal mantarlar ile bitki kökleri arasında kurulan yakın simbiyotik ilişki, mikovirüslerin yalnızca mantarlar arasında değil, aynı zamanda bitki–mantar etkileşimleri üzerinden yayılabileceğini göstermektedir. Bu durum, mikovirüslerin ekosistemde önemli olabileceğini göstermektedir. Ektomikorizal mantarlar arasında yer alan *Lactarius* cinsi, geniş tür çeşitliliği ve ekolojik önemi ile dikkat çekmekte; ancak bu gruptaki mikovirüsler üzerine yapılan çalışmalar henüz sınırlı kalmaktadır. *Lactarius* türlerinde mikovirüs varlığına ilişkin çalışmalar henüz sınırlıdır ve bu durum bu cinsin önemli bir araştırma potansiyeli taşıdığını göstermektedir.

2.8 *Lactarius* ve Mikovirüsler

Lactarius türlerinde mikovirüs varlığına ilişkin çalışmalar oldukça sınırlı olmakla birlikte, mevcut araştırmalar bu cinsin mikovirüs çeşitliliği açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle *Lactarius rufus* ve *Lactarius tabidus* türlerinde iki segmentli dsRNA genomuna sahip mikovirüslerin tanımlandığı ve bu virüslerin doğal populasyonlarda kalıcı enfeksiyonlar oluşturabildiği bildirilmiştir (Sutela ve Vainio, 2020)

Lactarius türlerinde mikovirüs çalışmalarının sınırlı kalmasının başlıca nedenleri arasında, bu mantarların ektomikorizal yaşam göstermesi ve laboratuvar koşullarında kültüre alınmalarının zor olması yer almaktadır. Ayrıca birçok mikovirüsün konakta belirgin fenotipik değişiklik oluşturmaması nedeniyle bu enfeksiyonlar uzun süre fark edilmeden kalabilmektedir. Bunun yanı sıra, geçmişte yapılan araştırmaların daha çok kültürü kolay ve patojenik mantarlara odaklanması, ektomikorizal mantarlarda mikovirüs araştırmalarının geri planda kalmasına neden olmuştur. Ancak son yıllarda gelişen yeni nesil dizileme teknolojileri sayesinde bu alandaki bilgi birikimi artmaya başlamıştır

2.9 Türkiye'de Partitivirüs Çalışmaları

Türkiye'de *Partitiviridae* familyasına yönelik çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, son yıllarda gerçekleştirilen moleküler araştırmalar bu alana önemli katkılar sağlamıştır. Özellikle ektomikorizal mantarlar üzerinde yürütülen çalışmalar, farklı mikovirüs türlerinin

tanımlanmasına ve bu virüslerin genetik özelliklerinin ortaya konulmasına olanak sağlamıştır (Şahin ve Akata, 2019; Şahin ve Akata, 2021).

Ektomikorizal bir mantar olan *Sarcosphaera coronaria* üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, askokarp örneklerinden partitivirüs segmentleri ile benzerlik gösteren toplam 75 kontig tespit edilmiştir. Bu dizilerin *Alphapartitivirus* ve *Betapartitivirus* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir. BLASTp analizleri sonucunda bu kontiglerin 41'inin (1623–2342 nt) kapsit proteinini (CP), 34'ünün (1764–2466 nt) ise RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) kodladığı ortaya konmuştur. Ayrıca aynı konak içerisinde birden fazla partitivirüsün birlikte bulunabildiği (çoklu enfeksiyon) belirlenmiştir. Bu bulgular, ektomikorizal mantarların zengin ve karmaşık bir mikovirüs çeşitliliğine sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, partitivirüslerin yalnızca bitki patojenleri ile sınırlı olmadığını, doğal ortamlarda bulunan simbiyotik mantarlarda da yaygın olarak bulunduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca *S. coronaria*'da tanımlanan bazı partitivirüslerin farklı coğrafi bölgelerde bildirilen türlerle yüksek benzerlik göstermesi, bu virüslerin geniş bir dağılıma sahip olduğunu ve uzak mesafeler arasında taşınabildiğini düşündürmektedir. Bu durum, partitivirüslerin mantar sporları aracılığıyla yayılabileceği hipotezini desteklemektedir (Şahin ve Akata vd., 2020).

Bu çalışmalara ek olarak, tez kapsamında gerçekleştirilen araştırmada ektomikorizal bir mantar olan *Lactarius mediterraneensis*'te yeni bir partitivirüs tanımlanmış ve *Lactarius mediterraneensis partitivirus 1* (LmPV1) olarak adlandırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda bu virüsün yaklaşık 1899 bp ve 1957 bp uzunluğunda iki ayrı dsRNA segmentinden oluşan bipartit bir genoma sahip olduğu belirlenmiştir. Bu segmentlerin sırasıyla RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) ve kapsid proteinini (CP) kodladığı tespit edilmiştir. Filogenetik analizler, LmPV1'in Partitiviridae familyası içerisinde *Alphapartitivirus* cinsi içinde yer aldığını ve özellikle *Sarcosphaera coronaria* partitivirüsleri ile yakın ilişkili olduğunu göstermiştir.

Bu bulgu, *Lactarius mediterraneensis*'te bildirilen ilk mikovirüs olması bakımından önem taşımakta olup, ektomikorizal mantarlarda mikovirüs çeşitliliğine dair mevcut bilgileri genişletmektedir. Ayrıca sonuçlar, *Lactarius* cinsi türlerinde mikovirüs çeşitliliğinin beklenenden daha fazla olabileceğini göstermektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 *Lactarius* Cinsi Örneklerinin temin edilmesi

Tez çalışması kapsamında 2019-2023 yılları arasında Türkiye'nin farklı belgelerinde toplanan *Lactarius* cinsi üyelerine ait fungus örnekleri oluşturmaktadır. ANK Herbaryumunda saklanmakta olan *Lactarius* cinsi üyelerine ait örnekler kullanılmıştır.

3.1.2 Morfolojik teşhis çalışmaları

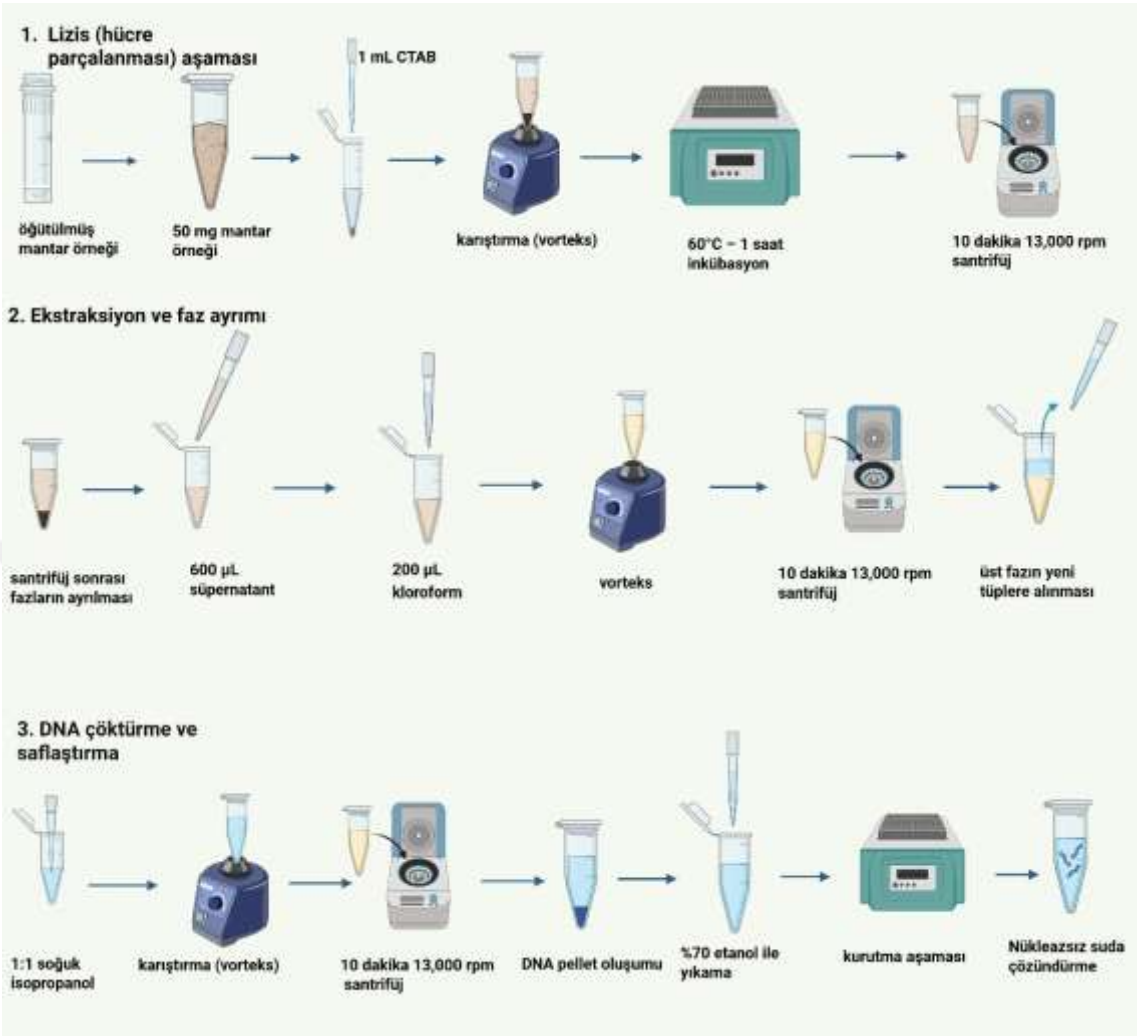
Yapılan arazi çalışmaları sonucunda bulunan taze *Lactarius* cinsi mantar örneklerinin üst kısımlarında oluşabilecek mikoorganizma bulaşısını önlemek amacıyla sırasıyla olmak üzere önce % 2'lik (W/V) Sodyum hipoklorit, ($NaClO$) ile 3 dakika ve ardından %70'lik etanol (C_2H_5OH) ile 10 sn muamele edilmiş ve sonrasında örnekler distile su ile iyice yıkanmıştır. Yıkaması yapılan örnekler mantar kurutma makinesine alınıp 24 saat boyunca 40.0 ºC sıcaklıkta iyice kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin hif, spor, bazidyum gibi mikroskobik yapılarının özellikleri not alınıp bu yapıların mikroskobik görüntüleri elde edilmiştir (bu görüntüler için mikroskopta; 10 x 10, 10 x 40 ve 10 x 100' lük büyütme ölçüleri kullanılmıştı). Mantarların tüm morfolojik teşhisleri mevcut literatür bilgileri göz önünde bulundurularak yapılmıştır.

3.2 Lactarius Cinsi Örneklerinin Moleküler Teşhislerinin Yapılması

3.2.1 Genomik DNA izolasyonu

Kurutulmuş *Lactarius* cinsi mantar örneklerinden genomik DNA izolasyonunda son derece verimli ve maliyeti oldukça düşük bir yöntem olan CTAB yönteminden yararlanılmıştır. (Rogers vd., 1994; Akata vd., 2019; Akata vd., 2020a; 2020b; Akata ve Erdoğdu, 2020; Altuntaş vd., 2020).

Bu yöntem kapsamında her bir örnek için 1,5 mL hacminde üç adet Eppendorf tüp kullanılmıştır. İlk olarak, ekstraksiyon için yeterli miktarda örnek ilk tüpe aktarılmış ve üzerine 1000 µL CTAB çözeltisi eklenmiştir. Karışım, homojen hale gelinceye kadar yaklaşık 3 dakika vortekslenmiş ve ardından 60 °C'de kuru ısıtıcı blokta 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda örnekler oda sıcaklığına getirilmiş ve 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında iki faz oluşumu gözlenmiştir: üst faz DNA'nın bulunduğu sıvı kısım, alt faz ise hücresel kalıntıların bulunduğu çökelti kısmıdır. Üst fazdan yaklaşık 600 µL alınarak yeni bir 1,5 mL'lik Eppendorf tüpe aktarılmıştır. Bu aşamada örneğe 200 µL kloroform eklenmiş ve karışım homojen hale gelinceye kadar vortekslenmiştir. Ardından tekrar 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonucunda üç faz oluşmuştur: en üst faz DNA'yı içeren sulu faz, orta faz proteinlerin bulunduğu beyaz kısım, en alt faz da diğer organik maddelerin (yağ vb.) bulunduğu kloroform fazıdır. Üstte bulunan DNA fazı, orta faza temas ettirilmeden dikkatlice 500 µL alınarak yeni bir tüpe aktarılmıştır. DNA'nın çöktürülmesi amacıyla, örneğe eşit hacimde (1:1 oranında) soğuk izopropil alkol eklenmiş ve karışım vorteks ile homojen hale getirilmiştir. Tekrar 5 dakika santrifüj yapıldı ve bu aşamada izopropil alkol varlığında genomik DNA'nın ependorf tüpün dibinde peletleştiği görülür. Pelete dokunmadan üstte kalan sıvı kısım (süpernatant kısım) atıldı. Artık oluşan peleti yıkama aşamasına geçilir. %70'lik ethanol ile 2 kez yıkama yapıldı. 1000µl %70'lik ethanol peletin üzerine eklenip, tüp hafifçe sallandı. Tekrar pelete dokunmadan üstteki sıvı ethanol (süpernatant kısım) atıldı. İkinci kez 1000µl %70'lik ethanol eklenip ikinci yıkama yapıldı. Tüpün kapakları açık bir şekilde 1-2 dakika 60 ºC'deki kuru blokta kurumaya bırakıldı. Bu aşamanın sonunda ethanolün tamamen uzaklaştığından emin olunmalıdır, çünkü alkol çok etkili bir PCR inhibitörüdür. Aksi halde PCR gibi daha sonraki deney aşamalarında kirlilik yaratıp deneyi inhibe edebilir. Kuru bloktan alınan her bir örnek başına 50µl moleküler biyoloji çalışmaları için yeterli kalitede olan su eklenip pipetleme yapılarak peletin çözünmesi sağlanmıştır (kullanılan su miktarı peletin büyüklüğüne göre değişebilir). DNA'nın iyice çözünebilmesi için pipetleme sonrası 5 dakika tekrar kuru blokta 60ºC'de bekletilmiştir. Genomik DNA izolasyonunun şematik gösterimi Şekil 3.1'de verilmiştir. İzole edilen genomik DNA örneklerinin miktarları ve saflık dereceleri NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) cihazında spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1 CTAB yöntemi kullanılarak fungal örneklerden DNA izolasyon sürecinin aşamalı şematik gösterimi (BioRender programı ile çizilmiştir)

3.2.2 *Lactarius* cinsi örneklerinin moleküler teşhisi için ribozomal RNA içerisindeki ITS gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve nükleotit dizilerinin belirlenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA'nın belirli bir bölgesinin kısa sürede ve özgül olarak çoğaltılmasını sağlayan temel bir moleküler biyoloji yöntemidir. Bu teknik, DNA polimeraz enzimi aracılığıyla hedef DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilmesine olanak tanır (Bartlett ve Stirling, 2003). Yüksek duyarlılığı sayesinde düşük miktarda DNA içeren örneklerde dahi güvenilir sonuçlar elde edilebilmekte ve bu nedenle rutin laboratuvar çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Kubista vd., 2006).

PCR reaksiyonu üç ana aşamadan oluşmaktadır: denatürasyon, hibridizasyon ve uzama. Denatürasyon basamağında çift sarmallı DNA yüksek sıcaklıkta (~94–95 °C) tek zincirlere ayrılmaktadır. Bunu takiben gelen hibridizasyon aşamasında sıcaklık düşürülerek primerlerin hedef DNA dizisine bağlanması sağlanmaktadır. Uzama aşamasında ise DNA polimeraz enzimi, primerlerin 3' ucundan başlayarak yeni DNA zincirini sentezlemektedir. Bu aşama genellikle 72 °C'de gerçekleşmekte olup, her döngüde hedef DNA bölgesi çoğaltılmaktadır (Mullis ve Faloona, 1987). Ribozomal DNA (rDNA) içerisinde yer alan Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgeleri, ökaryotik organizmalarda ribozomal RNA gen bölgesi arasında bulunan ve yüksek varyasyon gösteren nükleotid dizileridir. ITS bölgesi, 18S (küçük alt birim), 5.8S ve 28S (büyük alt birim) ribozomal RNA genleri arasında konumlanmış olup, iki ayrı değişken bölgeden oluşmaktadır: ITS1 ve ITS2. Bu bölgeler, türler arasında yüksek düzeyde dizisel farklılık göstermeleri nedeniyle moleküler taksonomi ve filogenetik analizlerde yaygın olarak kullanılan genetik belirteçler arasında yer almaktadır (Kendall ve ark., Schoch ve ark., 2012).

Mantarlar için uygun bir moleküler belirteci seçilmesine yönelik yapılan kapsamlı çalışmalar sonucunda, ITS bölgesinin en uygun genetik belirteç olduğu ortaya konulmuştur. ITS bölgesi, geniş mantar gruplarında yüksek amplifikasyon başarısı göstermesi ve türler arası ile tür içi varyasyon arasında belirgin bir fark sunması nedeniyle en yüksek tanımlama başarısına sahip bölge olarak öne çıkmaktadır. Bu nedenle ITS bölgesi, mantarlar için birincil moleküler belirteci olarak önerilmiştir (Schoch ve ark., 2012).

Mantarlar için evrensel olarak kabul görmüş bir moleküler belirtecinin bulunmaması, özellikle ekolojik ve biyolojik çeşitlilik çalışmalarında önemli bir kısıt oluşturmaktadır. DNA barkodlama yaklaşımı, ökaryotik organizmaların tür düzeyinde tanımlanabilmesi için belirli uzunlukta (yaklaşık 500–800 bp) standart genetik bölgelerin kullanılmasına dayanmaktadır.

Mantar sistematiğinde ITS bölgesinin kullanımı, özellikle makroskobik ve mikroskobik karakterlerin yetersiz kaldığı durumlarda büyük önem taşımaktadır. Morfolojik olarak

benzerlik gösteren ancak genetik olarak farklı olan türlerin ayırt edilmesinde ITS dizileri kritik rol oynamaktadır. Bu durum, özellikle Lactarius gibi ektomikorizal mantar gruplarında daha da belirgin hale gelmektedir. Nitekim, *Lactarius* cinsine ait türlerin moleküler tanımlanmasında ITS dizilerinin kullanılması, türler arası ilişkilerin ortaya konulmasında önemli katkılar sağlamıştır (Verbeken ve Nuytinck, 2013).

Ribozomal gen bölgeleri ile protein kodlayan genlerin karşılaştırıldığı çalışmalarda, ribozomal belirteçlerin PCR amplifikasyonu açısından daha az sorun oluşturduğu belirlenmiştir. Özellikle küçük alt birim (SSU) gen bölgesi düşük tür ayırt ediciliği göstermesi ve taksonlar arasında en düşük varyasyon miktarına sahip olduğu, büyük alt birim (LSU) bazı gruplarda yüksek çözünürlük sağlamasına rağmen, genel olarak ITS bölgesi en hızlı evrimleştiği ve en yüksek varyasyonu gösterdiği belirlenmiştir (Schoch ve ark., 2012).

Bu çalışmada, *Lactarius* cinsi örneklerin moleküler tanımlanması ve filogenetik ilişkilerinin ortaya konulması amacıyla ITS bölgesi hedeflenmiş ve PCR yöntemi ile çoğaltılarak dizilenmiştir. Elde edilen ITS dizileri, GenBank veri tabanındaki referans diziler ile karşılaştırılarak tür düzeyinde teşhis ve filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

CTAB yöntemi ile *Lactarius* cinsi örneklerinden izole edilen genomik DNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak moleküler filogeni çalışmaları için (ITS) gen bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. PCR'da tepkimede istenmeyen primer dimerin oluşumunu azaltmak amacıyla hot start DNA polimeraz (Invitrogen) enzimi kullanılmıştır.

PCR tepkimesi, 200 µl'lik polipropilen tüplerde toplam 50 µl'lik hacimde gerçekleştirilmiştir. Her bir mantar örneği için hazırlanan tepkime çözeltisinin içeriği Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. PCR ısıl döngü basamakları çizelge 3.2'te verilmiştir.

Çizelge 3.1 ITS PCR çözeltisinin içeriği

Su	38 µL
Buffer (Tampon)	5 µL
dNTP	1 µL
Genomik DNA	1 µL
Primer ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	1 µL
Primer ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	1 µL
$MgCl_2$	3 µL
DNA polimeraz enzimi	0.25 µl

PCR ısıl döngü koşullarında istenmeyen primer dimeri oluşumunu en az seviyede tutmak için "İniş" (Touchdown) yaklaşımı kullanılmıştır. Tepkimenin ısıl döngü işlemi MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems) cihazında yapılmıştır.

Çizelge 3.2 PCR Isıl döngü basamakları

Basamak	**Sıcaklık**	**Süre**	**Açıklama**	**Döngü Sayısı**
Ön Denatürasyon	95 °C	2 dakika	DNA'nın tamamen ayrılması	1
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	Çift zincirin ayrılması	35
Bağlanma	65-50 °C	15 saniye	Primerlerin hedef bölgeye bağlanması	35
Uzama	72 °C	1-2 dakika	DNA sentezi (ampikon uzunluğuna bağlı)	35
Son Uzama	72 °C	7 dakika	Amplifiye edilen DNA fragmentlerinin tam olarak uzatılması	1

İzole edilen genomik DNA örneklerinin bütünlüğü, Sambrook vd. 1989'da tanımlanan yöntem doğrultusunda agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Elde edilen bant profilleri incelenerek amplifikasyonun başarısı ve özgüllüğü değerlendirilmiştir.

Agaroz jel elektroforezinde jel ve tank tamponu olarak Tris-borik asit-EDTA (TBE) tamponu (3,03 g Tris-base (1 M), 185 mg EDTA (20 mM), 1,55 g borik asit (1 M), pH: 8,3) kullanılmıştır. Jel, %1,75 agaroz konsantrasyonunda (0,61 g agaroz / 35 mL TBE) hazırlanmıştır. Elektroforez sırasında, elektrotlar arasındaki her 1 cm mesafe için yaklaşık 5 volt gerilim uygulanmıştır. DNA örnekleri Safe-Green boyası ile boyanarak mavi ışık transillüminatör altında görüntülenmiştir. DNA bantlarının büyüklüklerinin belirlenmesinde GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Her bir kuyucuğa 7 µL PCR ürünü ile 0,5 µL yükleme boyası karıştırılarak yükleme yapılmıştır.

Tek ve net bant veren PCR ürünleri, dizi analizi öncesinde GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemleri üretici firmanın önerdiği protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen amplikonların miktarları ve saflık dereceleri, NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) cihazı ile ölçülmüş ve dizileme için uygun hale getirilmiştir.

Dizileme aşamasında, PCR reaksiyonunda kullanılan primerler sekans primeri olarak kullanılmıştır. Amplikonların nükleotit dizileri Sanger dideoksi zincir sonlandırma yöntemi ile belirlenmiş olup, analizler dış hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 PCR ile çoğaltılan dizilerin moleküler teşhisi için BLASTn kullanılması ve filogenetik analizlerin yapılması

PCR işlemi sonrasında elde edilen amplikon dizileri, tür teşhisi amacıyla öncelikle NCBI veri tabanında yer alan NCBI'ın Nucleotide BLAST (Basic Local Alignmet Search Tool) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) aracı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu analizler kapsamında, elde edilen diziler GenBank veri tabanında daha önce tanımlanmış nükleotit dizileri ile karşılaştırılmış ve en yüksek benzerlik oranına sahip kayıtlar belirlenmiştir.

Moleküler tür teşhisinde, özellikle yüksek yüzde benzerlik gösteren dizilere ait türler dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır.

Dizileme sonucunda elde edilen kromatogram dosyaları, SnapGene Viewer 6.1.2 yazılımı kullanılarak incelenmiş ve dizilerin okuma kaliteleri kontrol edilmiştir. Düşük kaliteli bölgeler ayıklanarak güvenilir nükleotit dizileri elde edilmiş, ardından yüksek kaliteye sahip diziler BLASTn analizi için kullanılmıştır. Bu süreç sayesinde, Lactarius cinsi örneklerinin moleküler düzeyde hangi türlere daha yakın olduğu belirlenmiştir. BLASTn analizi, tür teşhisi ve genetik benzerliklerin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan güvenilir bir yöntemdir.

Lactarius cinsi örneklerinin moleküler tanımlamasını daha sağlam temellere oturtmak amacıyla, BLASTn sonuçları filogenetik analizlerle desteklenmiştir. Bu kapsamda, GenBank veri tabanında yer alan ve analiz edilen diziler ile yüksek benzerlik gösteren türlere ait diziler iç grup olarak seçilmiştir. Ayrıca, *Russulaceae* familyası içerisinde yer alan ancak hedef diziler ile düşük benzerlik gösteren uzak akraba türlere ait diziler dış grup olarak belirlenmiştir.

Filogenetik analizlerde, öncelikle elde edilen nükleotit dizileri MEGA11 yazılımı (Tamura vd., 2021) kullanılarak ClustalW algoritması ile hizalanmıştır. Ardından, veri setine en uygun nükleotit yer değişim (substitution) modeli belirlenmiş ve Neighbor-Joining (NJ) yöntemi kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Ağaçların güvenilirliği, 1000 tekrar içeren bootstrap analizi ile test edilmiştir.

Elde edilen filogenetik ağaçlar değerlendirilirken, *Lactarius* örneklerine ait dizilerin iç gruptaki referans diziler ile oluşturduğu kümelenme durumu dikkate alınmıştır. Ayrıca, BLASTn analizinde elde edilen dizi benzerlik oranları ile filogenetik yerleşim birlikte yorumlanarak tür teşhisi gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşım, moleküler verilerin daha güvenilir bir şekilde yorumlanmasına ve tür tayininin doğrulanmasına katkı sağlamaktadır.

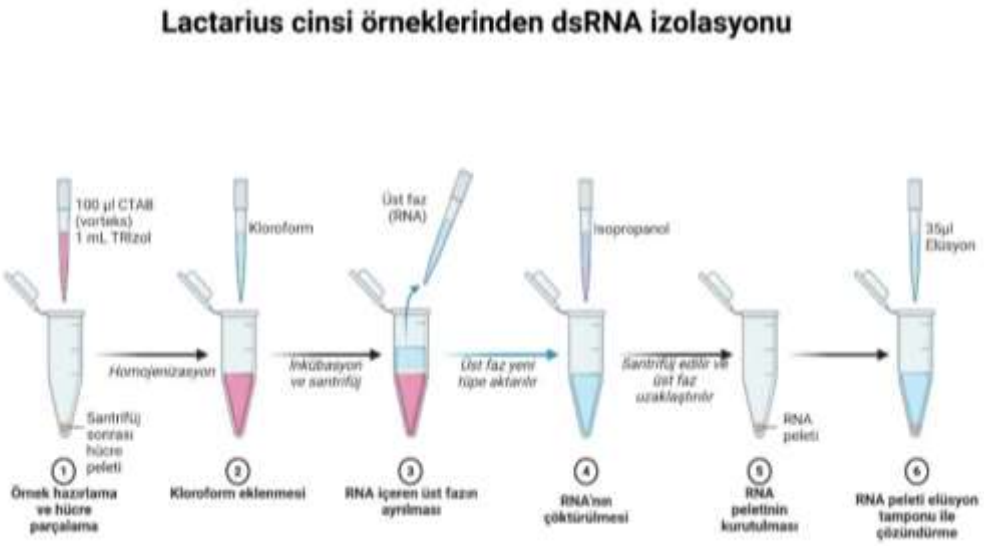
3.2.4 *Lactarius* Cinsi Örneklerinden Viral Çift İplikçikli RNA (dsRNA) Ekstraksiyonu

Lactarius cinsi mantar örneklerinden viral çift iplikçi RNA (dsRNA) izolasyonunda, selüloz kolonlara dayalı katı faz ekstraksiyon prensibine göre çalışan manuel bir protokol kullanılmıştır. Bu amaçla, önceden öğütülerek toz haline getirilmiş yaklaşık 30–35 mg kurutulmuş mantar örneği kullanılmıştır. Sigma Selüloz Type 101 protokolünde öncelikle selüloz kolonlar hazırlanmıştır. Toplama tüpü, spin kolon ve membran sırasıyla iç içe konulmuştur. Bu aşamanın ardında membranın üzerine Thermo Scientific Sigma Selülozdan 0,6 gr eklenerek spin kolonlar hazırlanmıştır. Burada fazla selüloz eklenirse sonraki aşamalarda RNA'yı ayırmak zorlaşır. Örnek başına 3 adet 1,5 µl'lik ependorf tüp çıkarılmıştır. Birinci ependorf tüpe bir spatül kadar öğütülmüş mantar örneği koyulup, üzerine 100µl CTAB eklenmiştir. (Burada CTAB 'pre-buffer' olarak kullanılır.) Kısa bir vorteks yapılmıştır. Örnek ve CTAB'ın iyice karışması sağlanır. Bu aşamanın ardından örneklerin üzerine 1000µl total RNA ekstraksiyonlarında kullanılan Trizol (ThermoFisher) ticari lizis tamponundan eklenmiştir. İyice karışana kadar 3 dakika süre ile vorteks yapılmıştır. Tüm örneğin lizis buffer'a (trizol) alınması için, iyi karışması oldukça önemlidir. 5 dakika beklenir bu sürede DNA parçalarının ayrılması sağlanır. Örneklerin üzerine 200 µl kloroform eklenmiştir. İyice karışana kadar vorteks yapılmıştır ve 5dakika rak üzerinde beklemeye alınmıştır. Faz ayrımı bu aşamada da görülebilir. Beklemenin ardından 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Bu aşamada artık net olarak gözle görülür bir faz ayrımı meydana gelmiştir (3 faz). En üstte, DNA'nın bulunduğu faz yeni bir ependorf tüpe aktarılır (500µl). Örneğin üzerine 100µl %100'lük etanol eklenip iyice karışana kadar vorteks yapılmıştır. Spin kolonları aktifleştirmek için, 600µl yıkama tamponu (Çizelge 3.3) selüloz membranın üzerine eklenip 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılmıştır. İkinci kez selüloz membran üzerine 600µl yıkama tamponu eklenerek tekrar 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Tekrar toplama tüpündeki sıvı atılır. Aktifleştirme işleminin ardından örneğin hepsi selüloz membran üzerine eklenip 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılmıştır. Sonraki aşama selüloz membrana tutunan örneğin yıkama tamponu ile 2 kez yıkanmasıdır. Bunun için, membran üzerine 600µl yıkama tamponu eklenip, 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpüne inen sıvı uzaklaştırılır. Tekrar selüloz membran üzerine 600 µl yıkama tamponu eklenerek 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

Toplama tüpüne inen sıvı uzaklaştırılır ve son kez boş olarak 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Sonraki aşamada DNA'lar, selüloz membrandan ayırılmıştır. Bu işlem için spin kolonlar yeni ependorf tüplere alınmıştır. Membranın tam ortasına gelecek şekilde her bir spin kolona 35µl elüsyon tamponu (Çizelge 3.1) eklenmiştir. Tüpler 1 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından 1 dakika aynı hızda santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda ependorf tüpe inen sıvı biraz pipetlenip tekrar membran üzerine bırakılmıştır. Ardından son kez 1 dakika 13000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında tüpte biriken sıvı pipetlenerek bir kez daha membrana eklenmiş ve 1 dakika 13000 rpm'de santrifüjlenmiştir. *Lactarius* cinsi örneklerindrn viral dsRNA ekstraksiyonunun şematik gösterimi Şekil 3.2'te verilmiştir.

Çizelge 3.3 dsRNA ekstraksiyonunda kullanılan tamponların içerikleri

Yıkama Tamponu	**Elüsyon Tamponu**	**2X STE Tamponu**
25 mL 2X STE tamponu 25 mL %34 EtOH	500 µl 2X STE tamponu 500 µl dH_2O	606 mg Tris (0,1 M) 584 mg NaCl (0,2 M) 29 mg EDTA (2mM) 325 mL HCl (%37)



Şekil 3.2 Lactarius cinsi türlerinden viral dsRNA ekstraksiyonunun şematik gösterimi (BioRender programı ile çizilmiştir)

3.2.5 Viral dsRNA içeriklerinin elektroforetik olarak belirlenmesi

dsRNA taraması kapsamında %0,65'lik agaroz jel hazırlanmıştır (0,23 g agaroz / 35 mL TBE tamponu). Elde edilen dsRNA ekstraktları, agaroz jel elektroforezi yöntemi ile analiz edilerek bant profilleri ve yaklaşık büyüklükleri belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforezi işlemi, Sambrook ve ark. (1989) tarafından tanımlanan standart protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sırasında her kuyucuğa 20 µL dsRNA örneği ile 4 µL yükleme boyası karıştırılarak yüklenmiştir. Jel ve koşma tamponu olarak TBE tamponu kullanılmıştır. Elektroforez koşulları, elektrotlar arasındaki mesafe dikkate alınarak santimetre başına 5 Volt olacak şekilde ayarlanmıştır.

Elektroforez sonrası dsRNA bantlarının görüntülenmesinde Safe-Green interkalatör boyası ve mavi ışık transillüminatör kullanılmıştır. Bantların yaklaşık büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) moleküler ağırlık belirteci kullanılmıştır.

3.2.6 Tanımlanan dsRNA segmentlerinin cDNA'ya çevrilmesi ve rPCR tepkimesi

Agaroz jel elektroforezi ile dsRNA varlığı tespit edilen örnekler, Primer–dN6 (5'-CCTGAATTCGGATCCTCCNNNNNN-3') oligonükleotit primeri kullanılarak ters transkripsiyon ile tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüştürülmüştür. cDNA sentezi, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için, 200 µL'lik polipropilen tüplerde 11 µL dsRNA örneği, 2 µL dN6 primer ve 2 µL dimetilsülfoksit (DMSO) karıştırılmıştır. Karışım, dsRNA'nın denatürasyonu amacıyla 99 °C'de 2 dakika inkübe edilmiş ve ardından buz üzerinde 1,5 dakika bekletilmiştir. Sonrasında tüplere 2 µL dNTP, 2 µL enzim tepkime tamponu (10x) ve 1 µL ters transkriptaz enzimi eklenmiş ve karışım homojen hale getirilmiştir. Ters transkripsiyon reaksiyonu 25 °C'de 10 dakika ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilerek gerçekleştirilmiş, ardından 85 °C'de 5 dakika bekletilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Elde edilen cDNA örnekleri, rastgele polimeraz zincir reaksiyonu (rPCR) yöntemi ile çoğaltılmıştır (Darissa vd. 2010; Sahin ve Akata 2019; Sahin vd. 2020; Akata vd. 2023a). rPCR için DNA polimeraz enzimi olarak Taq DNA Polimeraz

(Invitrogen) kullanılmıştır ve tepkime polipropilen tüplerde toplam 50 µl'lik hacimde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı; 5 µL Taq polimeraz tamponu (10x), 3 µL rPCR primer (5'-CCTGAATTCGGATCCTCC-3'), 3 µL $MgCl_2$ (50 mM), 1 µL dNTP karışımı, 1 µL cDNA kalıbı, 0,25 µL Taq DNA polimeraz enzimi ve toplam hacmi 50 µl'ye tamamlayacak kadar nükleazlardan arındırılmış dH_2O içermiştir. PCR amplifikasyonu, MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems) cihazında gerçekleştirilmiştir. Termal döngü koşulları; başlangıçta 95 °C'de 5 dakika denatürasyon, ardından 35 döngü boyunca 94 °C'de 18 saniye denatürasyon, 52 °C'de 15 saniye bağlanma ve 72 °C'de 40 saniye uzama şeklinde uygulanmıştır. Reaksiyon, 72 °C'de 5 dakika son uzama aşaması ile tamamlanmıştır. Tepkimenin ısıl döngü işlemi MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems) cihazında yapılmıştır. PCR sonunda elde edilen amplikonlar, yöntem 3.2.5'te belirtildiği gibi agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir ve kalitesi belirlenmiş amplikonlar dizi analizi için GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak saflaştırılmıştır. Yıkanan amplikonların saflık dereceleri ve miktarları, spektrofotometre (NanoDrop Lite) cihazında ölçülmüş ve yeni nesil dizileme (NGS) için uygun hale getirilmiştir.

3.2.7 Ham NGS verilerinin de novo birleştirme yaklaşımı ile oluşturulması ve değerlendirilmesi

Yeni nesil dizileme (NGS) sonucunda elde edilen ham okumalar, viral genom dizilerinin elde edilmesi amacıyla de novo (yeni baştan) birleştirme yaklaşımı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu analizler, CLC Genomics Workbench yazılımının 20.0.4 sürümü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Birleştirme işlemi sırasında kullanılan parametreler; otomatik eşleştirilmiş uzaklık tahmini (paired distance estimation), kelime büyüklüğü (word size) 26, kabarcık büyüklüğü (bubble size) 50 ve minimum contig uzunluğu 200 nükleotit olacak şekilde ayarlanmıştır. De novo birleştirme sonucunda elde edilen contigler ve bunlara karşılık gelen amino asit dizileri, virüs ile ilişkili sekansların belirlenmesi amacıyla yığın (batch) BLASTx ve BLASTp analizlerine tabi tutulmuştur. Bu analizlerde, eşleşme değeri (e-değeri < 1) olan contigler potansiyel viral sekanslar olarak değerlendirilmiştir. Son aşamada, virüs ile ilişkili contiglerdeki protein bölgelerinin tanımlanması amacıyla NCBI Korunmuş Bölge Veri Tabanı (Conserved Domain Database, CDD) kullanılmıştır. Bu analizler sonucunda, özellikle RNA-bağımlı

RNA polimeraz (RdRp) ve kapsid proteini (CP) gibi viral proteinlere ait korunmuş bölgeler belirlenmiştir.

3.2.8 Tanımlanan dsRNA Segmentlerinin 5' ve 3' Uç (Terminal) Bölgelerinin RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) Yöntemi ile Çoğaltılması ve Sanger Dideoksi Zincir Sonlanması Yöntemi ile Dizilerinin Belirlenmesi

Viral dsRNA moleküllerinin terminal bölgelerinin dizilerinin belirlenmesi amacıyla, moleküllerin 3′ uçlarına T4 RNA ligaz enzimi (New England Biolabs) kullanılarak 5′ ucundan fosfatlanmış ve 3′ ucundan amin grubu ile bloke edilmiş RLO (5′P-CATGGTGGCGACCGGTAG-NH_2-3′) oligonükleotit adaptörü ligasyon yoluyla eklenmiştir (Darissa vd., 2010; Şahin ve Akata, 2019; Şahin vd., 2020). Bu işlem için 200 µL'lik polipropilen tüpler içerisinde 20 pmol dsRNA (en fazla 10 µL içerisinde), 20 µl PEG 8000 (%50), 2 µl RLO primer (120 pmol), 5 µL 10x T4 RNA Ligaz tamponu, son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde 5 µl ATP, 4 µl DMSO (%10), 1 µL RNaz inhibitörü ve 2 µL 20 ünite T4 RNA Ligaz enzimi ile karıştırılmış ve son hacim RNazlardan arındırılmış dH_2O ile 50 µL'ye tamamlanmıştır. Ligasyon tepkimesi 37 °C'de 10 saat inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir. Ligasyon sonrasında ortamda bulunan fazla oligonükleotitler, GeneJET Gel Extraction and DNA Clean-Up Micro Kit (Thermo Scientific) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Ardından, 3′ uçlarından etiketlenmiş dsRNA moleküllerinden, Moloney Murine Leukemia Virüsünün (M-MuLV) ters transkriptaz enzimi (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezlenmiştir. cDNA sentezi, Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak, dsRNA'nın 3′ uçlarında bulunan etiketlere komplementer olan RTP (5′-CTACCGGTCGCCACCATG-3′) oligonükleotit primeri kullanılarak yöntem 3.2.6'da belirtildiği gibi yapılmıştır. Bu aşamada, standart protokolden farklı olarak 25 °C'de 10 dakika inkübasyon basamağı uygulanmamıştır. RACE-PCR analizlerinde kullanılmak üzere sekans spesifik primerler, Primer3 (versiyon 4.1.0) çevrimiçi aracı kullanılarak tasarlanmıştır. cDNA sentezi sonrası elde edilen ürünlerden 1 µL alınarak, RTP primeri ve hedef sekanslara özgü olarak tasarlanmış primerler (5′ uç için geri primer, 3′ uç için ileri primer) kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiş ve böylece dsRNA segmentlerinin 5′ ve 3′ terminal bölgeleri çoğaltılmıştır. Primerlerin erime sıcaklıkları (Tm), NEB Tm Calculator (https://tmcalculator.neb.com/#!/main) çevrimiçi aracı

kullanılarak belirlenmiştir. PCR, 200 µl'lik polipropilen tüplerde toplam 50 µl'lik hacimde gerçekleştirilmiştir. Her tüp, 3 µl $MgCl_2$ (50 mM), 1µl dNTP, 5 µl Taq DNA polimeraz tamponu (10x), 1 µl RTP: 5'-CTACCGGTCGCCACCATG-3', 1 µl sekans spesifik primer, 1 µl cDNA, 0.25 µl Taq DNA polimeraz enzimi ve 50 µl'ye tamamlayacak kadar nükleazlardan arındırılmış dH_2O içermiştir. PCR amplifikasyonu sonrası elde edilen ürünler, yöntem 3.2.5'te belirtildiği üzere agaroz jel elektroforezi ile doğrulanıp Sanger dideoksi zincir sonlanma yöntemi ile dizilerinin belirlenmesi üzere yıkanmıştır. Yıkanan amplikonların saflıkları ve miktarları NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Dizilerin belirlenmesinde sekans primerleri olarak RACE aşamasında kullanılan primer çiftleri kullanılmıştır. Sanger DNA dizi analizi dışarıdan hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.9 TA klonlama yönteminin uygulanması

RACE PCR sonrasında gerçekleştirilen agaroz jel elektroforezi değerlendirmelerinde belirgin tek bant vermeyen amplikonların dizilenebilmesi amacıyla TA klonlama yöntemi uygulanmıştır.

TA klonlama aşamasında vektör olarak pGEM-T Easy plazmit vektörü (Promega) tercih edilmiştir. Bu vektör, lacZ (beta-galaktozidaz) genini içermekte olup, girdi DNA'nın vektöre eklenip eklenmemesine bağlı olarak, transformasyon sonrasında X-Gal içeren besiyerinde oluşan kolonilerin mavi veya beyaz renk göstermesini sağlamaktadır. Bu özellik sayesinde pozitif klonların seçimi kolaylıkla yapılabilmektedir.

Ligasyon aşamasında; 1 µL pGEM-T Easy vektörü, yaklaşık 0,6 pmol PCR ürünü (1 µL), 2X ligasyon tamponu (5 µL) ve 1 µL T4 DNA ligaz enzimi 200 µL'lik propilen tüpe eklenmiş ve toplam hacim nükleazlardan arındırılmış dH2O ile 10 µL'ye tamamlanmıştır.

Ligasyon reaksiyonu 22 °C'de 1,5 saat inkübe edilmiş ve kullanılmadan önce 4 °C'de yaklaşık 10–12 saat bekletilmiştir. Ligasyon işlemi tamamlandıktan sonra yaklaşık 1 µL ligasyon ürünü, kimyasal olarak kompetent hale getirilmiş ve mavi/beyaz koloni seçimine

uygun olan *Escherichia coli* dH5α suşuna transformasyon yoluyla aktarılmıştır. *E. coli* dH5α hücrelerinin kompetent hale getirilmesi ve transformasyon işlemleri Chung vd. (1989) tarafından tanımlanan yönteme göre gerçekleştirilmiştir.

Bu yöntemde kullanılan transformasyon ve saklama çözeltisi (TSS), steril LB sıvı besiyeri (10g/L tripton, 10g/L NaCl ve 5g/L maya ekstraktı) içerisine son konsantrasyonları sırasıyla 5 g PEG 6000, 2.5mL DMSO ile birlikte, 50 mM olacak şekilde $MgCl_2$ ve $MgSO_4$ eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0,22 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek steril edilmiş ve -20 °C'de saklanmıştır.

E. coli dH5α suşunun kompetent hale getirilmesi ve transformasyonu sırasında şu adımlar izlenmiştir:

1- Aktif *E. coli* dH5α kültürü steril LB besiyerine ekilmiş ve 30 °C'de OD600 değeri 0,3–0,5 olana kadar inkübe edilmiştir. 2-Kültür, 4 °C'de 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. 3- Oluşan bakteri peleti, kültür hacminin 1/10'u kadar TSS çözeltisi ile süspanse edilmiş ve 30 dakika buz üzerinde bekletilerek kompetent hale getirilmiştir.4- 3 µL plazmit, 1,5 mL'lik steril tüplere alınmış ve üzerine 100 µL kompetent hücre eklenerek 30–60 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. 5- Ardından tüpler 42 °C'de 90 saniye bekletilerek ısı şoku uygulanmıştır. 6- Isı şoku sonrası tüpler tekrar buz üzerine alınarak 1–2 dakika bekletilmiştir. 7- Daha sonra hücrelere %1 glikoz içeren 900 µL LB besiyeri eklenmiş ve 37 °C'de 45–60 dakika inkübe edilmiştir. 8- İnkübasyon sonrasında yaklaşık 200 µL bakteri süspansiyonu, 100 µg/mL ampisilin ve 40 µL X-Gal içeren LB agar besiyerine yayılmış ve plaklar 37 °C'de 16 saat, ardından 4 °C'de 10 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, girdi DNA'yı içeren rekombinant koloniler lacZ geninin inaktif olması nedeniyle beyaz renkte, girdi içermeyen koloniler ise lacZ geninin aktif olması sonucu X-Gal'ın parçalanmasıyla mavi renkte gözlemlenmiştir. Beyaz renkli (pozitif) kolonilerden 20–25 tanesi seçilerek, girdi DNA'nın varlığı ve yaklaşık büyüklüğünün doğrulanması amacıyla vektör üzerinde insertin her iki yanında bulunan M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') ve M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') primerleri kullanılarak koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR'da kalıp DNA yerine, steril pipet ucu ile kolonilere temas edilerek alınan bakteri örnekleri kullanılmıştır.

Reaksiyonlar 200 µL'lik polipropilen tüplerde toplam 50 µL hacimde hazırlanmıştır. Her bir tüp; 5 µL Taq DNA polimeraz tamponu, 3 µL $MgCl_2$ (50 mM), 1'er µL M13F ve M13R primerleri, 1 µL dNTP karışımı, 0,25 µL Taq DNA polimeraz enzimi, bakteri örneği ve toplam hacmi 50 µL'ye tamamlayacak şekilde nükleazlardan arındırılmış dH_2O içermektedir.

Girdi DNA'nın (dsRNA dizisine ait cDNA) varlığı ve yaklaşık büyüklüğü doğrulandıktan sonra, seçilen koloniler (20–25 adet) ampisilin içeren LB sıvı besiyerinde çoğaltılmış ve hedef DNA dizisinin belirlenebilmesi amacıyla plazmit vektör izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmit izolasyonunda WizPrep Plasmid DNA Mini Kit (Wizbiosolutions) kullanılmıştır.

Seçilen plazmit vektörlerde bulunan dsRNA dizisine ait cDNA'nın nükleotit dizisi, Sanger dideoksi zincir sonlandırma yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Dizileme işlemlerinde, koloni PCR aşamasında kullanılan M13F ve M13R primerleri sekans primeri olarak kullanılmıştır. Sanger DNA dizi analizi dış hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

3.2.10 Elde edilen dsRNA viral genom dizilerinin birleştirilmesi ve tamamlanması

NGS analizleri sonucunda elde edilen contig dizileri, rPCR, RACE ve TA klonlama yöntemleri ile elde edilen dizilerle birleştirilerek dsRNA virüs genomlarına ait tam dizi bilgisi elde edilmiştir. Dizi birleştirme dizi birleştirme sırasında ortaya çıkan eksik bölgeler, sekansa özgül oligonükleotit primerler kullanılarak, yöntem 3.2.8'da belirtildiği şekilde PCR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen ürünlerin dizilenmesi ile eksik bölgeler tamamlanmış ve böylece viral genomların tam uzunluktaki dizi organizasyonu oluşturulmuştur.

3.2.11 Tüm viral genomlara ait dsRNA dizilerinin biyoinformatik ve filogenetik olarak analiz edilmesi

Elde edilen dsRNA genom dizilerinde protein kodlayan açık okuma çerçeveleri (ORF'ler), NCBI ORFfinder kullanılarak belirlenmiştir. Tanımlanan ORF'lere ek olarak, viral genomların 5′ ve 3′ uçlarında yer alan ve translasyonu gerçekleşmeyen bölgeler (untranslated regions, UTR) analiz edilmiştir. Bu bölgelerin, özellikle RNA stabilitesi, replikasyon ve paketlenme (enkapsidasyon) süreçlerinde rol oynayan cis-aktif elementler içerdiği bilinmektedir.

Segmentli genom yapısına sahip partitivirüslerde (genellikle bipartit dsRNA virüsler), UTR bölgeleri yüksek derecede korunmuş diziler içerebilmektedir. Bu nedenle, çoklu enfeksiyon durumlarında farklı genom segmentlerinin doğru şekilde eşleştirilmesinde UTR dizilerinin benzerlikleri önemli bir kriter olarak kullanılmaktadır.

Elde edilen dsRNA dizilerinin filogenetik analizleri hem nükleotit dizileri hem de kodladıkları proteinlerin (özellikle RNA-bağımlı RNA polimeraz, RdRp ve kapsid proteini, CP) amino asit dizileri temel alınarak MEGA11 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tamura vd., 2021). Filogenetik analiz öncesinde, dizilerin benzerlik ilişkilerini belirlemek amacıyla BLASTn ve BLASTp analizleri yapılmıştır.

BLAST analizleri sonucunda, GenBank veri tabanında yer alan ve analiz edilen dizilerle en yüksek benzerliği gösteren viral sekanslar filogenetik analizlerde iç grup olarak seçilmiştir. Buna karşılık, daha düşük benzerlik gösteren ancak aynı veya yakın familyalara ait diziler dış grup olarak belirlenmiştir.

Filogenetik ağaçların oluşturulmasında Neighbor-Joining (NJ) algoritması ve 1000 tekrar bootstrap analizi kullanılmıştır. Ayrıca, amino asit dizileri için en uygun evrimsel modelin belirlenmesinde MEGA11 yazılımının "en iyi protein modeli seçimi" modülünden yararlanılmıştır.

Elde edilen filogenetik ağaçlarda, analiz edilen viral dizilerin konumları, ilgili referans sekanslarla olan kümelenme durumlarına göre değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, dizilerin mevcut türler ile aynı klad içerisinde yer alıp almadığı veya ayrı bir filogenetik grup oluşturup oluşturmadığı dikkate alınarak taksonomik konumları yorumlanmıştır.

Partitiviridae familyasında tür ve cins ayrımı, tek bir sabit dizi benzerlik eşik değerine dayanmayıp; filogenetik ilişkiler, genom organizasyonu ve özellikle RdRp amino asit dizisi benzerliği gibi çoklu kriterlere göre belirlenmektedir. Genel olarak, RdRp dizilerinde yaklaşık %90'ın altındaki amino asit benzerlikleri farklı türleri işaret edebilmekte, ancak bu sınır familya içindeki farklı cinsler ve gruplar arasında değişkenlik gösterebilmektedir (Vainio vd., 2018; ICTV).

Buna ek olarak, partitivirüslerde genom segment sayısı (çoğunlukla iki segment: RdRp ve CP), kapsid protein dizilerinin benzerliği ve konak organizma özellikleri de taksonomik sınıflandırmada önemli kriterler arasında yer almaktadır. Bu çalışmada tanımlanan viral dizilerin tür, suş veya varyant düzeyindeki konumlarının belirlenmesinde, *Partitiviridae* familyası için tanımlanmış olan bu çok yönlü kriterler birlikte değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *Lactarius* Cinsi Örneklerinin Temin Edilmesi Ve Detaylı Bilgileri

Bu tez çalışması kapsamında, arazi çalışmalarında toplanan ve Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Fungaryum'unda muhafaza edilen örnekler olmak üzere, toplam 23 adet *Lactarius* cinsine ait örnekle çalışılmıştır. *Lactarius* cinsine ait örneklerin cins ve tür teşhisleri, dsRNA taramaları ve filogenetik analizleri yapılmış ve taranan mantarlar arasında yer alan *Lactarius mediterraneensis*'te bulunan bir virüsün tüm genomu ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 4.1 ANK Akata & Kaliyeva 007 numaralı *Lactarius mediterraneensis* örneğine ait basidyokarp

4.2 *Lactarius* Cinsi Örneklerinin Moleküler Teşhisi

ANK Herbaryumu'nda bulunan ve arazi çalışmaları sonucunda elde edilen mantar örnekleri, morfolojik özelliklerine göre teşhis edilmiştir. Morfolojik teşhise ek olarak, örneklerin çalışılan cinse ve türlere ait olduğunun doğrulanması amacıyla toplam 32 *Lactarius* cinsi mantar örneği üzerinde moleküler teşhis çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda öncelikle genomik DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen DNA örneklerinin miktar ve saflıkları spektrofotometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir.

Genomik DNA'ları elde edilen izolatlardan PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. Elektroforez sonucunda hedef bölgelere ait bant oluşumları gözlenmiştir. Elde edilen bant profilleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2 32 adet Lactarius cinsi örneğine ait ITS PCR sonrası agaroz jel görüntüleri (M: 100 bp DNA belirteci)

4.3 DNA dizi analizi sonuçları

Mantar türlerinin moleküler tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi, tür düzeyinde ayrım için en güvenilir genetik belirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir. Ancak, tür sınırlarının yalnızca yüzde (%) dizi benzerliği eşik değerlerine dayanarak belirlenmesi her zaman mümkün değildir. Hawksworth ve Lücking (2017), türler arasında sabit bir benzerlik eşik değerinin bulunmadığını ve genetik farklılaşmanın, ilgili taksonların evrimsel geçmişi ve çeşitlenme düzeyi ile doğrudan ilişkili olduğunu belirtmiştir.

Bu bağlamda, ITS1-5.8S-ITS2 rDNA bölgesi için genel kabul gören tür sınırları çoğunlukla %98–99 benzerlik aralığında olmakla birlikte, bu eşik değerin farklı mantar gruplarında değişkenlik gösterebildiği bildirilmektedir (Hawksworth ve Lücking, 2017., Bonito vd., 2010, Lücking vd., 2020). Örneğin, bazı taksonlarda %97 benzerlik dahi farklı

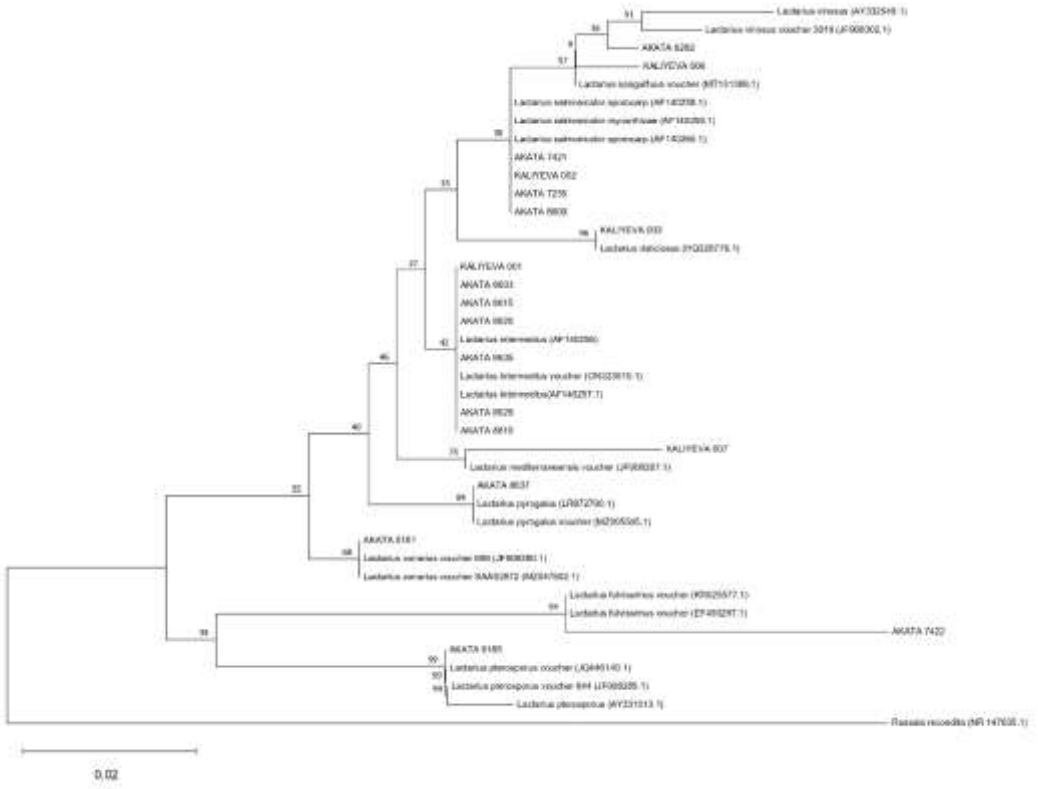
türleri ayırt etmek için yeterli olabilirken, yakın akraba tür komplekslerinde %99'un üzerindeki benzerlik değerleri bile tür ayrımında yetersiz kalabilmektedir. Bu durum, özellikle kriptik türlerin bulunduğu gruplarda daha belirgin hale gelmektedir.

Dolayısıyla, tür tanımlamalarında yalnızca BLASTn analizlerinden elde edilen yüzde benzerlik değerlerine dayanmak yerine, filogenetik analizler ve morfolojik veriler ile birlikte değerlendirme yapılması önerilmektedir. Bu çalışmada elde edilen BLASTn analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 BLASTn analizi sonuçları

Örnek Numarası	Tür Adı	Dizi Sorgu Kapsamı Oranı (%) (QC)	Dizi Benzerlik Oranı (PI) (%)
AKATA 6161	*Lactarius zonarius*	%100	%99.84
AKATA 6185	*Lactarius pterosporus*	%100	%100
AKATA 6282	*Lactarius vinosus*	%98	%99.84
AKATA 7235	*Lactarius salmonicolour*	%100	%100
AKATA 7421	*Lactarius salmonicolor*	%99	%100
AKATA 7422	*Lactarius fulvissimus*	%100	%100
AKATA 8603	*Lactarius intermedius*	%100	%100
AKATA 8609	*Lactarius salmonicolor*	%100	%99.85
AKATA 8610	*Lactarius intermedius*	%100	%100
AKATA 8615	*Lactarius intermedius*	%100	%100
AKATA 8620	*Lactarius intermedius*	%100	%100
AKATA 8629	*Lactarius intermedius*	%100	%100
AKATA 8635	*Lactarius intermedius*	%100	%100
AKATA 8636	*Lactarius vellereus*	%100	%99.85
AKATA 8637	*Lactarius pyrogalus*	%100	%99.79
AKATA 8638	*Lactarius controversus*	%99	%99.55
KALIYEVA 001	*Lactarius intermedius*	%100	%99,86
KALIYEVA 002	*Lactarius salmonicolour.*	%100	%100
KALIYEVA 003	*Lactarius deliciosus*	%100	%100
KALIYEVA 004	*Lactarius deliciosus*	%100	%100
KALIYEVA 005	*Lactarius controversus*	%100	%99.12
KALIYEVA 006	*Lactarius sanguifluus*	%100	%100
KALIYEVA 007	*Lactarius mediterraneensis*	%100	%100

Lactarius örneklerinin moleküler analizleri için BLASTn analizleri sırasında, önceki yapılan çalışmalarda tanımlanan diziler içerisinde, analizi yapılan amplikona ait diziye en yakın benzerliği gösteren ve yakın tarihli yayınlarda rapor edilmiş türlere ait diziler filogenetik analizler sırasında iç grup olarak seçilmiştir. NCBI GenBank veri bankasından elde edilen ve analizi yapılan dizi ile herhangi bir benzerliği bulunmayan uzak akraba olarak tanımlanan mantarlara ait diziler dış grup olarak seçilmiştir. Filogenetik ağaç oluşturulması sırasında ortaya çıkarılan diziler MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log Expectation) algoritması kullanılarak iç ve dış gruplara ait diziler ile birlikte alt alta sıralanıp en uygun nükleotit yer değişimi (substitution) modeli belirlenip seçilmiştir. Neighbour Joining algoritması, 500 önyükleme yinelemesi (bootstrap replicate) kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.3).

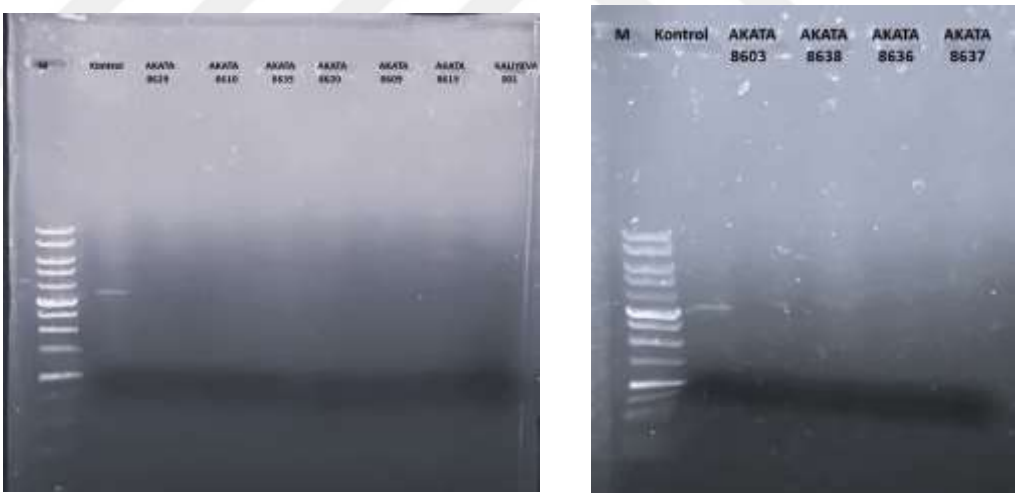


Şekil 4.3 *Lactarius* cinsi üyelerinin dizilerine dayanarak oluşturulan maksimum olasılık filogenetik ağacı

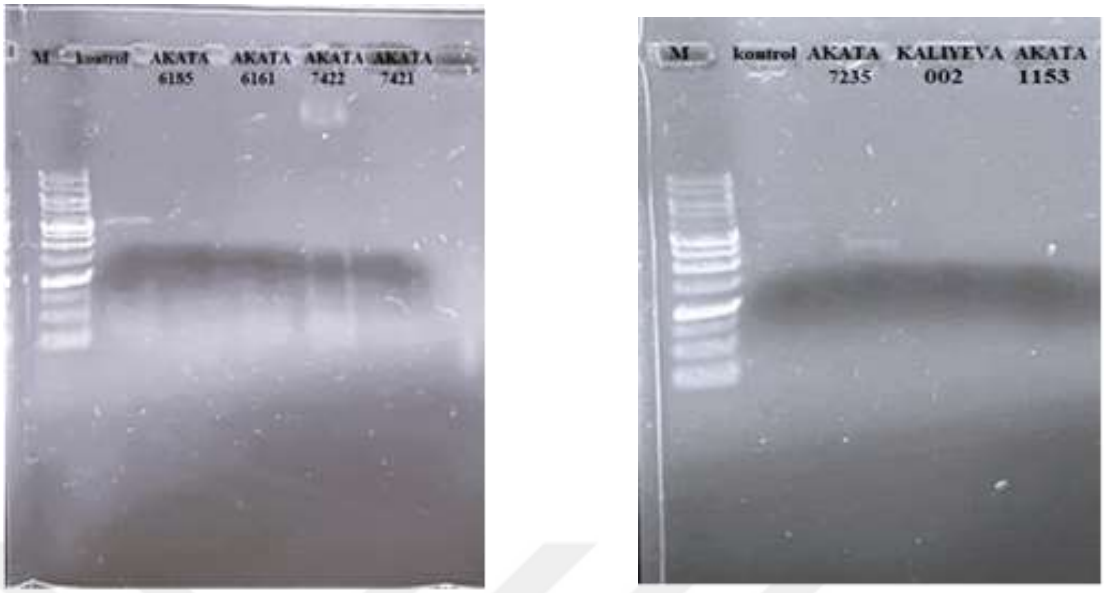
Çekirdek ITS rDNA bölgelerine göre, K2+G+I evrim modeli kullanılarak tahmin edilen, 23 *Lactarius* cinsine ait mantar örneklerinin filogenetik ilişkilerini ortaya koyan en olası ağaç. Her dal için, yüzde önyükleme değerleri belirtilmiştir. Bu çalışmada elde edilen diziler AKATA ve KALIYEVA kodları ile gösterilmiştir. Ağaçta filogenetik analize dahil edilen tüm diziler GenBank'tan alınmıştır. *Russula rekondita* dış grup örneği olarak filogenetik analize dahil edilmiştir. Sol alttaki çubuk 0.02 genetik mesafeyi temsil etmektedir.

4.4 *Lactarius* Cinsi Örneklerinde Viral dsRNA içeriklerinin incelenmesi

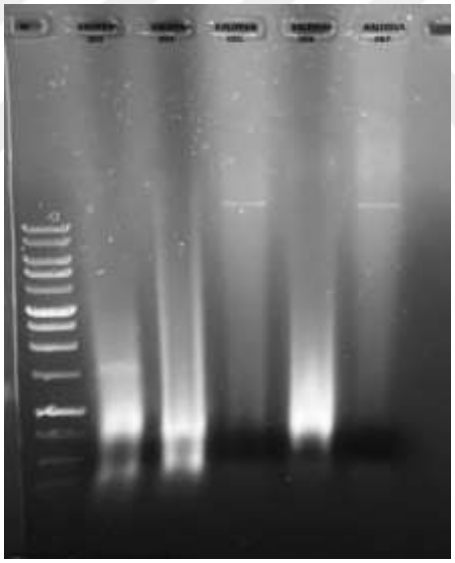
23 *Lactarius* örneğinden viral çift iplikçikli RNA ekstraksiyonunda, selüloz kolonlarla afinite kromatografisi esasına göre çalışan Double-RNA Viral dsRNA Extraction Mini Kit (iNtRON) kullanılmıştır. Mikoviral dsRNA profilinin agaroz jel görüntüsü şekil 4.4,4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.4 Viral dsRNA jel elektroforezi (M: 1 kb DNA belirteci)



Şekil 4.5 Viral dsRNA jel elektroforezi (M: 1 kb DNA belirteci)



Şekil 4.6 Viral dsRNA jel elektroforezi (M: 1 kb DNA belirteci)

Viral dsRNA taraması yapılan 23 tane mantar türünün listesi Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Türkiye'de yayılış gösteren bazı *Lactarius* türlerinde dsRNA taraması

No	Örnek Numarası	Tür Adı	Şube
1	AKATA 6161	*Lactarius zonarius*	*Basidiomycota*
2	AKATA 6185	*Lactarius pterosporus*	*Basidiomycota*
3	AKATA 6282	*Lactarius vinosus*	*Basidiomycota*
4	AKATA 7235	*Lactarius salmonicolour*	*Basidiomycota*
5	AKATA 7421	*Lactarius salmonicolor*	*Basidiomycota*
6	AKATA 7422	*Lactarius fulvissimus*	*Basidiomycota*
7	AKATA 8603	*Lactarius intermedius*	*Basidiomycota*
8	AKATA 8609	*Lactarius salmonicolor*	*Basidiomycota*
9	AKATA 8610	*Lactarius intermedius*	*Basidiomycota*
10	AKATA 8615	*Lactarius intermedius*	*Basidiomycota*
11	AKATA 8620	*Lactarius intermedius*	*Basidiomycota*
12	AKATA 8629	*Lactarius intermedius*	*Basidiomycota*
13	AKATA 8635	*Lactarius intermedius*	*Basidiomycota*
14	AKATA 8636	*Lactarius vellereus*	*Basidiomycota*
15	AKATA 8637	*Lactarius pyrogalus*	*Basidiomycota*
16	AKATA 8638	*Lactarius controversus*	*Basidiomycota*
17	KALIYEVA 001	*Lactarius intermedius*	*Basidiomycota*
18	KALIYEVA 002	*Lactarius salmonicolour*	*Basidiomycota*
19	KALIYEVA 003	*Lactarius deliciosus*	*Basidiomycota*
20	KAIYEVA 004	*Lactarius deliciosus*	*Basidiomycota*
21	KALIYEVA 005	*Lactarius controversus*	*Basidiomycota*
22	KALIYEVA 006	*Lactarius sanguifluus*	*Basidiomycota*
23	ANK Akata & KALIYEVA 007	*Lactarius mediterraneensis*	*Basidiomycota*

Yapılan virüs taramaları sonucunda 23 *Lactarius* örneği içerisinde 5 örnekte net olarak viral dsRNA segmentleri gözlemlenmiştir. Geri kalan 18 örnek dsRNA negatif olarak belirlenmiştir. Böylece dsRNA taraması sonucunda *Lactarius* cinsine ait örneklerin %21.73'ü dsRNA pozitif olarak belirlenmiştir. Viral dsRNA taraması sonucunda pozitif olarak belirlenen *Lactarius* cinsi örneklerine dsRNA'dan cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezlendikten sonra ise rPCR ile virüsle ilişkili diziler rastgele (random) çoğaltılmıştır ve agaroz jel elektroforezi yapılarak bantlar gözlemlenmiştir. Oluşan bantlar Şekil 4.7'de gösterilmiştir. rPCR sonrasında viral RNA içeriklerinin analiz edilmesi için NGS yöntemi kullanılmıştır ve bu dışarıdan hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.7 rPCR işlemi sonunda agaroz jel elektroforezi (M: 100 bp DNA belirteci)

Viral dsRNA pozitifliği belirlenen 5 adet *Lactarius* örneğinin rPCR ürünleri, viral dsRNA içeriklerinin karakterizasyonu amacıyla yeni nesil dizileme (NGS) ile analiz edilmiştir. Bu örneklerin yüksek işlem hacimli dizileme (HTS) durumları Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 viral dsRNA pozitif olarak belirlenen örneklerin yüksek işlem hacimli dizileme (HTS) ile çalışılma durumları

Voucher numarası	**Moleküler (ITS rDNA) ve Morfolojik Tür Teşhi Sonuçları**	**Yüksek işlem hacimli dizileme (HTS) Durumu**
KALIYEVA 003	*Lactarius deliciosus*	HTS ön analizinde kalite kontrolden geçemedi
KALIYEVA 004	*Lactarius deliciosus*	HTS ön analizinde kalite kontrolden geçemedi
KALIYEVA 005	*Lactarius controversus*	HTS analizleri sonucunda elde edilen virüs ilişkili contigler, tüm viral genom dizi bilgisi ortaya çıkarılmayacak kadar kısadır.
KALIYEVA 006	*Lactarius sanguifluus*	HTS ön analizinde kalite kontrolden geçemedi
KALIYEVA 007	*Lactarius mediterraneensis*	HTS analizi sonucunda 1 adet 2 segmentli Partitivirus tespit edildi. RACE için primerler tasarlandı, RACE ile tüm genom dizi bilgisi elde edilecek.

Lactarius mediterraneensis türünün biyoinformatik analizi sonucunda 12 contigin mikovirüsler ile ilişkili olduğu ve bu contigler içerisinde contig 9'un RdRp ve contig 3'ün CP kodladığı bulunmuş olup, ilgili contiglerin numaraları ve sekans uzunlukları (nt), BLASTp aramasından elde edilen e-değerleri, yüzde benzerliği ile en iyi BLASTp eşleşmesi ve önerilen familya bilgisi Çizelge 4.4'te verilmiştir. *Partitiviridae*, çift sarmallı RNA (dsRNA) genomlara sahip, kapsitli ve bölünmüş (segmentli) yapıda virüslerden oluşan bir virüs familyasıdır. Bu familyaya ait virüslerin genomu genellikle iki segmentten oluşur; dsRNA1 segmenti RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) kodlarken, dsRNA2 segmenti ise kapsit proteinini (CP) kodlar (Nibert et al., 2014; Vainio et al., 2018). Her bir segment, tek bir açık okuma çerçevesi (ORF) içerir ve bu ORF'ler genellikle kısa 5' ve 3' UTR bölgeleri ile çevrilidir. RdRp gen bölgesinde beş korunmuş motif bulunur ve bu motifler familya içi filogenetik sınıflandırmada önemli rol oynar (Li et al., 2018). Son yıllarda yapılan derinlemesine transkriptom analizleri ve yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin yaygınlaşması sayesinde, özellikle mantar viromları içinden birçok yeni *Partitiviridae* üyesi tanımlanmıştır (Vainio & Chiba, 2020; Sahin & Akata, 2021; Akata et al., 2024).

Çizelge 4.4 Tez çalışması kapmasında tanımlanmış diğer partitivirüslerin segmentlerinin listesi

Virüs Konağı	**CP veya RdRp (kısaltma) (nt) Contig numarası**	**En iyi BLASTp Eşleşmesi (Erişim numarası; e-değeri; yüzde benzerlik)**	**Önerilen cins/ familya**	**GenBank erişim numarası**
Lactarius mediterraneensis	Lactarius mediterraneensis Sarcosphaera coronaria partitivirus CP (LmPV CP) (1241) Contig 31	Sarcosphaera coronaria partitivirus (QLC36760.1; 0.0; 78.38%)	*Partitiviridae*	-
	Lactarius mediterraneensis Rhizoctonia solani fusarivirus 3 RdRp (LmFV 3 RdRp) (2254) Contig 46	Rhizoctonia solani fusarivirus 3 (YP_010799751.1; 8e-104; 48.62%)	*Riboviria*	-

Çizelge 4.4 Tez çalışması kapmasında tanımlanmış diğer partitivirüslerin segmentlerinin listesi (devam)

	Lactarius mediterraneensis Sarcosphaera coronaria partitivirus CP (LmPV CP) (1241) Contig 31	Sarcosphaera coronaria partitivirus (QLC36760.1; 0.0; 78.38%)	*Partitiviridae*	-
	Lactarius mediterraneensis Rhizoctonia solani fusarivirus 3 RdRp (LmFV 3 RdRp) (2254) Contig 46	Rhizoctonia solani fusarivirus 3 (YP_010799751.1; 8e-104; 48.62%)	*Riboviria*	-
	Lactarius mediterraneensis Macrophomina phaseolina endornavirus 1 RdRp (LmEV 1 RdRp) (2039) Contig 51	Macrophomina phaseolina endornavirus 2 (QOE55585.1; 5e-04; 34.58%)	*Endornaviridae*	-
	Lactarius mediterraneensis Caloscypha fulgens partitivirus 7 CP (LmPV 7 CP) (1540) Contig 54	Caloscypha fulgens partitivirus 7 (QOI17260.1; 3e-167; 55.56%)	*Partitiviridae*	-
	Lactarius mediterraneensis Lentinula edodes partitivirus 2 RdRp (LmPV 2 RdRp) (1625) Contig 47	Lentinula edodes partitivirus 2 (QOX06026.1; 0.0; 62.47%)	*Partitiviridae*	-
	Lactarius mediterraneensis Gaeumannomyces tritici partitivirus 3 RdRp (LmPV 3 RdRp) (1642) Contig 72	Gaeumannomyces tritici partitivirus 3 (UYB78865.1; 2e-124; 49.88%)	*Riboviria*	-

Çizelge 4.4 Tez çalışması kapmasında tanımlanmış diğer partitivirüslerin segmentlerinin listesi (devam)

	Lactarius mediterraneensis Sarcosphaera coronaria partitivirus RdRp (LmPV RdRp) (1889) Contig 38	Sarcosphaera coronaria partitivirus (QLC36807.1; 0.0; 60.29%)	*Partitiviridae*	MT466047.1
	Lactarius mediterraneensis Rosellinia necatrix partitivirus 18 RdRp (LmPV 18 RdRp) (657) Contig 129	Rosellinia necatrix partitivirus 18 (BBU59844.1; 1e-103; 78.37%)	*Partitiviridae*	-
	Lactarius mediterraneensis Rhizoctonia solani fusarivirus 3 RdRp (LmFV 3 RdRp) (1656) Contig 222	Rhizoctonia solani fusarivirus 3 (YP_010799751.1; 6e-25; 40.69%)	*Riboviria*	-

NGS analizi sonucunda tespit edilen virüsler arasında, *Lactarius mediterraneensis* örneğinin biyoinformatik analizi sonucunda elde edilen contiglerden birinin partitivirüslerle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu viral genomun iki segmentten oluştuğu ve her bir segmentin, sırasıyla RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ve kapsid proteini (CP) kodlayan tek bir açık okuma çerçevesi (ORF) içerdiği tespit edilmiştir.

İlgili contigin numarası, sekans uzunluğu (nt), e-değeri, yüzde benzerliği, en iyi BLASTp eşleşmesi, segmentin cins düzeyindeki sınıflandırması ile ORF, 5′ ve 3′ UTR bölgelerinin uzunlukları ve kodlanan RdRp ile CP proteinlerinin uzunlukları Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 Tanımlanmış partitivirüs CP ve RdRp genom segmentlerinin listesi

Virüs Konağı	**Cp veya RdRp (kısaltma) (nt) Contig numarası**	**BLASTp Eşleşmesi (Erişim numarası.; e-değeri; yüzde benzerlik)**	**Önerilen Cins**	**5' UTR (nt)**	**ORF (nt)**	**3' UTR (nt)**	**Protein uzunluğu (aa)**
Lactarius mediterraneensis	Lactarius mediterraneensis Sarcosphaera coronaria partitivirus RdRp (LmPV 1 RdRp) (1899) Contig 38	Sarcosphaera coronaria partitivirus (QLC36807.1; 0.0; 60.29%)	*Alphapartitivirus*	89	1749	61	582
Lactarius mediterraneensis	Lactarius mediterraneensis Rosellinia necatrix partitivirus CP (LmPV 1 CP) (1957) Contig 44	Rosellinia necatrix partitivirus 26 (QMU26431.1; 3e-31; 25.80%)	*Alphapartitivirus*	86	1695	176	564

NGS analizleri sonucunda *Lactarius* cinsi örneklerinde birden fazla viral kontig tespit edilmiştir. Bu kontigler arasında yapılan biyoinformatik analizler doğrultusunda, partitivirüslerle ilişkili olduğu belirlenen dizilere odaklanılmıştır. Elde edilen veriler, partitivirüslere özgü olarak iki segmentli genom yapısına sahip viral dizilerin varlığını ortaya koymuştur.

Ancak, analiz edilen bazı kontiglerin birbirleri ile olan ilişkileri incelendiğinde, bu segmentlerin aynı virüse ait olup olmadığının belirlenmesi amacıyla 5′ ve 3′ UTR bölgeleri karşılaştırılmıştır. Partitivirüslerde genom segmentlerinin eş olarak değerlendirilebilmesi için UTR bölgelerinde yüksek dizi benzerliği bulunması beklenmektedir. Bu çalışmada elde edilen segmentler arasında yapılan karşılaştırmalarda, UTR dizileri arasında anlamlı bir benzerlik tespit edilememiştir. Bu durum, söz konusu segmentlerin aynı partitivirüse ait olmadığını, farklı partitivirüslere ait bağımsız genom parçaları olabileceğini göstermektedir.

Buna ek olarak, bazı viral contiglerin uzunluklarının sınırlı olması ve tüm genomu kapsayacak yeterli veri içermemesi nedeniyle, bu virüslere ait tam genom

organizasyonları ortaya konulamamıştır. Bununla birlikte, elde edilen sonuçlar *Lactarius* cinsi türlerinde birden fazla partitivirüsün eş zamanlı olarak bulunabileceğini ve bu durumun viral çeşitliliğin beklenenden daha yüksek olduğunu göstermektedir.

4.5 Genomu Tüme Yakın Olan Virüs İlişkili Contiglere RACE Yöntemi Uygulanması

BLASTx ve haritalama analizleri sonucunda partitivirüslerle ilişkili olduğu belirlenen dizilerin genomlarının tamamlanabilmesi amacıyla RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) yöntemi uygulanmıştır. RACE PCR için primer tasarımı yapılırken, partitivirüslere özgü olduğu düşünülen ve RdRp ile kapsid proteini (CP) bölgelerini içeren contigler dikkate alınmış ve bu dizilere özgü primerler Primer3 çevrim içi aracı kullanılarak tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlere ait contig numarası, primer adı ve primer dizileri Çizelge 4.6'te sunulmuştur. NGS sonuçlarına göre *Lactarius* örneklerinde tespit edilen partitivirüsler arasından en kapsamlı diziye sahip olan seçilmiş ve genomun tamamlanması için RACE PCR çalışmaları yapılmıştır.

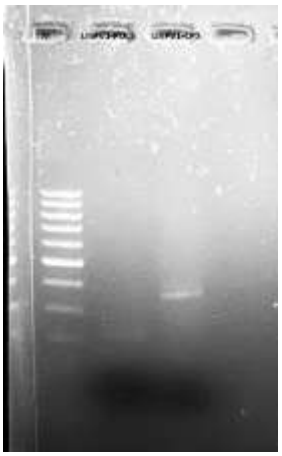
Çizelge 4.6 Contiglere özgü tasarlanan primerlerin listesi

Virüs Adı	**Contig Numarası**	**Primer Adı**	**Primer Dizisi**
Sarcosphaera coronaria partitivirus RdRp	Contig 38	LmPV1-POL5RACE	5'-CGTCGTCGGAAAAGGGAAAG-3'
	Contig 38	LmPV1-Pol5.2RACE	5'-ACTTCTGGGGAGTAGTGTTTGT-3'
	Contig 38	LmPV1-POL3RACE	5'-TGCCTTTCCCTTCTTTCGAG-3'
	Contig 38	LmPV1-POL3.2RACE	5'-CGAGAATTGGGAGAGCAACC-3'
Rosellinia necatrix partitivirus CP	Contig 44	LmPV1-CP5	5'-CGTGTTGGTCTGGGCTTTAG-3'
	Contig 44	LmPV1-CP5.2	5'-TCATGTGAGGAGCCAGAGAG-3'
	Contig 44	LmPV1-CP3	5'-GAGTTGTCAAGCGTCGTCTC-3'
	Contig 44	LmPV1-CP3.2	5'-GATTCCCGAAACACCGATGG-3'

RdRp ve kapsid proteini (CP) bölgelerine ait dsRNA segmentlerinin 5′ uç bölgelerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle bu bölgelere özgü primerler tasarlanmıştır. Ancak ilk aşamada gerçekleştirilen PCR denemelerinde hedeflenen amplifikasyon ürünleri elde edilememiştir. Bunun üzerine, amplifikasyon verimini artırmak amacıyla yeni primer

çiftleri tasarlanmış ve elde edilen PCR ürünleri şablon (template) olarak kullanılarak semi-nested PCR yaklaşımı uygulanmıştır. Semi-nested PCR, ilk PCR ürününün şablon olarak kullanıldığı ve primerlerden birinin iç bölgeden yeniden tasarlandığı iki aşamalı bir amplifikasyon yöntemidir. Bu yöntem, düşük miktarda hedef DNA içeren veya zor çoğaltılan bölgelerde duyarlılığı ve özgüllüğü artırmak amacıyla kullanılmaktadır (Bartlett & Stirling ,2003).

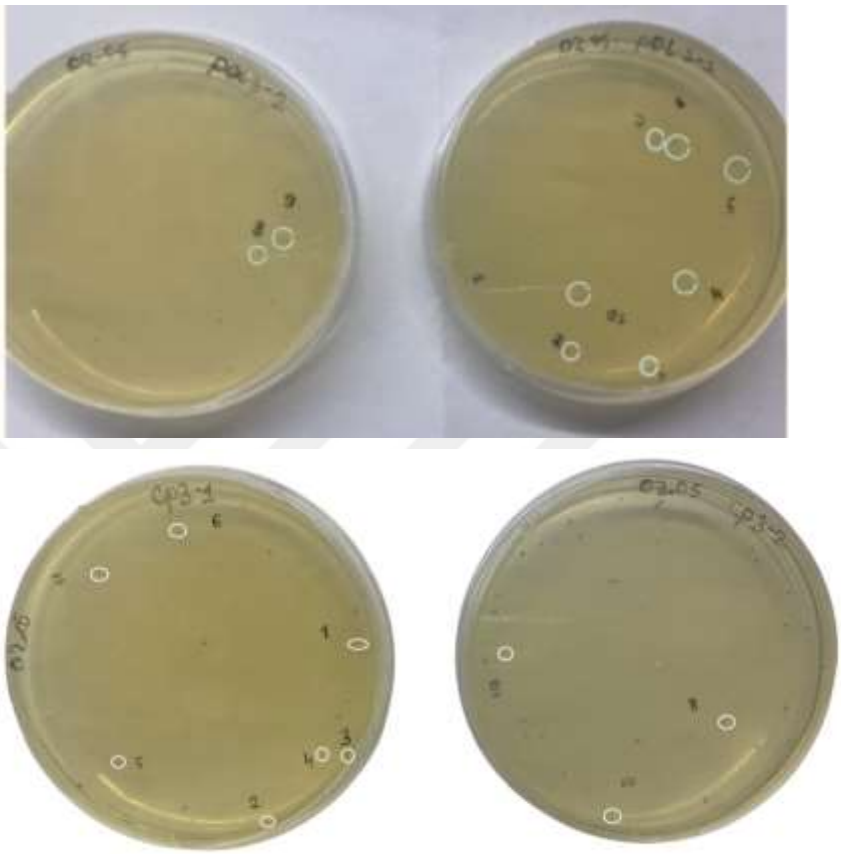
Semi-nested PCR'da, ilk RACE PCR aşamasında elde edilen ürün ikinci bir PCR reaksiyonunda yeniden çoğaltılır. Bu aşamada primerlerden biri korunurken, diğeri daha iç bölgeyi hedefleyen yeni bir primer ile değiştirilir. Bu sayede hedef bölgenin daha spesifik ve duyarlı bir şekilde çoğaltılmasını sağlamaktadır. Bu yöntem, özellikle düşük miktarda nükleik asit içeren örneklerde veya zor amplifiye edilen bölgelerde başarı oranını artırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Semi-nested PCR yaklaşımının uygulanması ile hedeflenen bölgelerde amplifikasyon veriminde artış sağlanmış ve elde edilen ürünler sonraki analizler için kullanılmıştır. Semi-nested PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.8'de LmPV1 RdRp ve kapsid proteinin 5' UTR bölgeleri verilmiştir.



Şekil 4.8 Semi-nested PCR ile elde edilen LmPV1 RdRp ve kapsid proteinine ait 5′ UTR bölgelerinin agaroz jel elektroforezi (M:100 bp DNA belirteci)

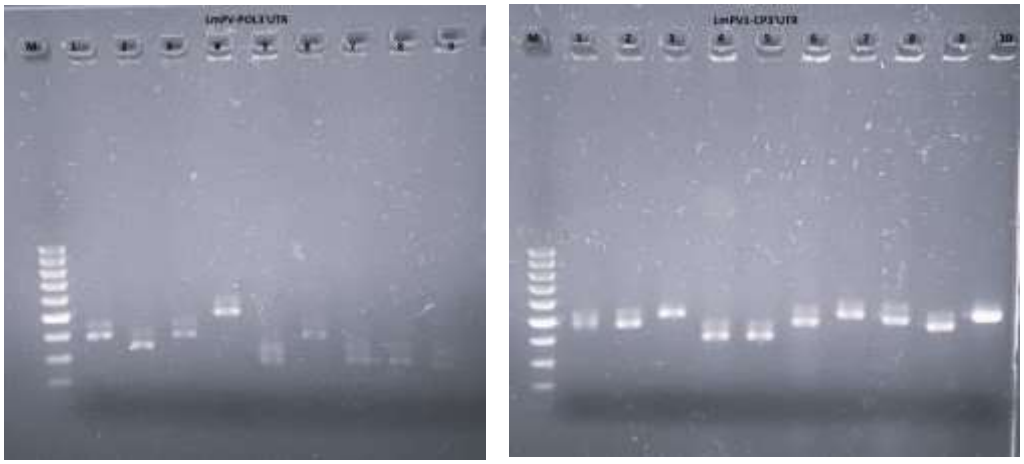
Benzer şekilde, RdRp ve kapsid proteini (CP) bölgelerine ait 3′ UTR dizilerinin elde edilmesine yönelik RACE PCR denemeleri gerçekleştirilmiş, ancak bu denemelerde hedeflenen amplifikasyon ürünleri jelde tek bant halinde değil çoklu bantlar halinde

gözlenmiştir. Bu nedenle, ilgili bölgelerin dizilerinin elde edilmesi amacıyla TA klonlama yöntemi kullanılmıştır. Klonlama sonrası petride gözlenen beyaz bakteri kolonileri Şekil 4.9'da gösterilmektedir.



Şekil 4.9 ANK Akata & Kaliyeva 007 numaralı *Lactarius mediterraneensis* örneğinde tespit edilen LmPV1'in RdRp ve CP 3' UTR terminal bölgesinin klonlanması sonucunda oluşan koloniler

Beyaz renkli koloniler arasından seçilen bakterilere, yöntem 3.2.8'de belirtilen protokole göre koloni PCR uygulanmıştır. TA klonlama sonrasında elde edilen koloniler üzerinde gerçekleştirilen koloni PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir (Şekil 4.10). Yapılan analizler sonucunda, RdRp 3′ UTR bölgesine ait 1, 2, 3 ve 4 numaralı örnekler ile kapsid proteini (CP) 3′ UTR bölgesine ait 2, 3, 9 ve 10 numaralı örnekler sekans analizi için seçilmiştir. Seçilen örneklerden plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen diziler Sanger dideoksi zincir sonlandırma yöntemi ile belirlenmiştir.



Şekil 4.10 LmPV1 RdRp ve CP 3'UTR için yapılan koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (M:100 bp DNA belirteci)

4.6 Lactarius mediterraneensis partitivirus 1 (LmPV1) Tanımı ve Moleküler Özellikleri

Kasım 2022'de Türkiye'nin Ege Bölgesi'nde, Aydın ili sınırları içerisindeki Dilek Yarımadası Büyük Menderes Deltası Milli Parkı'nda yapılan bir arazi çalışması sırasında, *Quercus ilex* (yeşil meşe) ile simbiyotik ilişki içinde yetişen *L. mediterraneensis* türünden izole edilen LmPV1'e ait iki RNA segmentinin (dsRNA1 ve dsRNA2) tam uzunlukta dizileri elde edilmiş ve detaylı biyoinformatik analizleri gerçekleştirilmiştir.

NCBI BLASTx analizi kullanılarak gerçekleştirilen biyoinformatik tarama sonucunda, 1500 nükleotitten (nt) daha uzun toplam 153 contig arasından iki adet anlamlı viral sekans tespit edilmiştir. Contig 38 (1781 nt), Sarcosphaera coronaria partitivirus ANK VIR-52'nin RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) ile %65,22 amino asit benzerliği göstermiştir (QLC36808.1). Buna karşılık contig 44 (1834 nt), Rosellinia necatrix partitivirus 26'nın kapsid proteini (CP) ile %26,53 oranında benzerlik göstermiştir (QMU26431.1).

Elde edilen bu dizi benzerliği sonuçları ve viral taksonomi kriterleri doğrultusunda, *Partitiviridae* familyasına ait yeni bir virüs tanımlanmış ve bu virüs Lactarius mediterraneensis partitivirus 1 (LmPV1) olarak adlandırılmıştır.

Yeni tanımlanan LmPV1, iki segmentten oluşan bir genoma sahip olup, dsRNA1 (1899 bp) ve dsRNA2 (1957 bp) segmentlerinden meydana gelmektedir (Şekil 4.11 B). Tüm genom dizileri GenBank veritabanında PV176078–PV176079 erişim numaraları ile kayıt altına alınmıştır. Ayrıca contig oluşturulmasında kullanılan ham NGS verileri, NCBI BioSample veritabanında SAMN53629509 erişim numarası ile sunulmuştur.

Biyoinformatik analizler, dsRNA1 segmentinin 90–1838 nükleotid pozisyonları arasında yer alan ve 582 amino asit uzunluğunda (68,18 kDa) bir RdRp proteinini kodladığını göstermiştir. dsRNA2 segmentinin ise 87–1781 nükleotidleri arasında konumlanan ve 564 amino asit uzunluğunda (62,43 kDa) bir kapsid proteini (CP) genini içerdiği belirlenmiştir.

Her iki genom segmentinin de poliadenilasyon (poly(A)) uçlarına sahip olduğu ve korunmuş 5' UTR bölgelerinin sırasıyla 89 bp ve 86 bp uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. Bu bölgeler arasında %84,88 oranında dizi benzerliği bulunmakta olup, bu durum *Alphapartitivirus* üyeleri için tipik bir özelliktir (Ong ve ark., 2018) (Şekil 4.11 C).

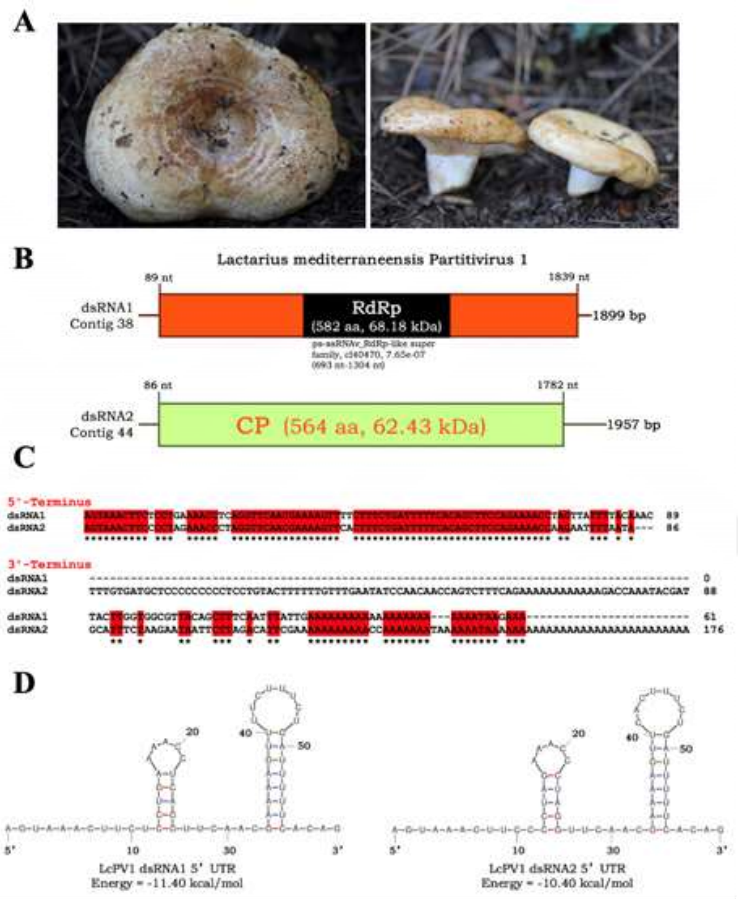
3' UTR bölgeleri uzunluk bakımından farklılık göstermektedir (61 bp ve 176 bp; poly(A) kuyrukları dahil). Bununla birlikte, ikincil yapı analizleri bu bölgelerin segment tanıma mekanizmalarında fonksiyonel olarak korunduğunu göstermektedir (Şekil 4.11 D).

RdRp ve kapsid proteinine (CP) dayalı filogenetik analizler, LmPV1'in *Alphapartitivirus* grubu içerisinde yer aldığını ve en yakın akrabasının Sarcosphaera coronaria partitivirus ANK VIR-52 olduğunu göstermiştir (RdRp için %65,22 amino asit benzerliği).

Buna karşılık, kapsid proteininde Rosellinia necatrix partitivirus 26 ile daha düşük düzeyde (%26,53) benzerlik saptanmıştır.

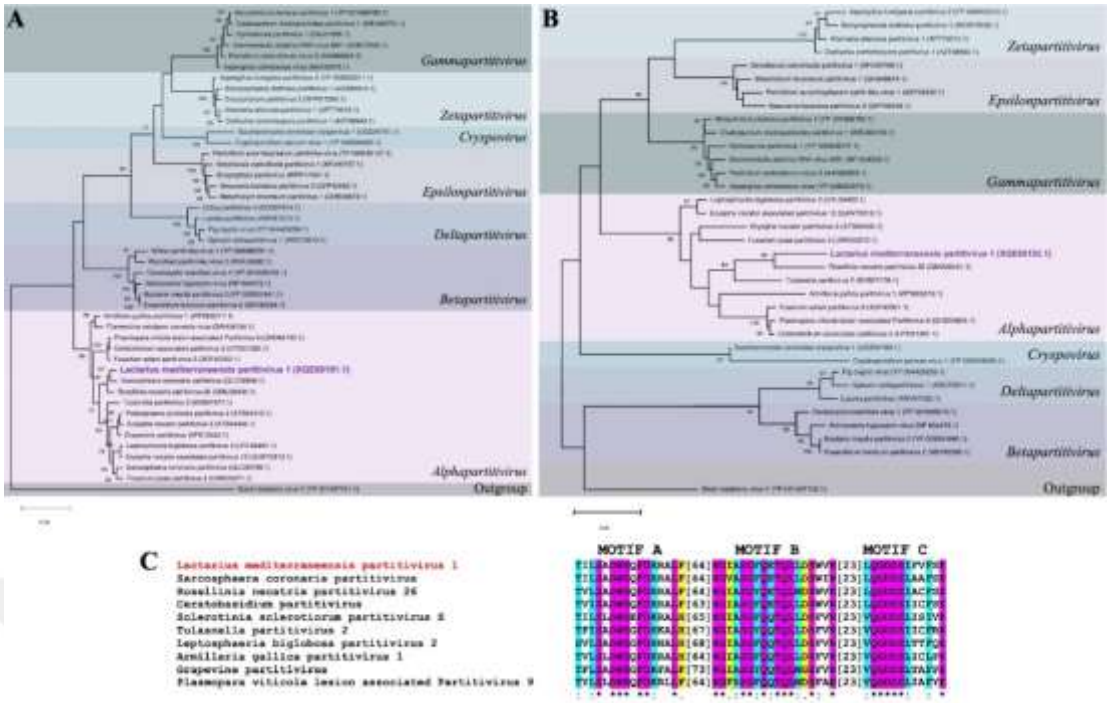
Yapısal analizler, RdRp proteininin 201–405 amino asitleri arasında yer alan katalitik "palm" alt domaininde, Motif A, Motif B ve Motif C gibi korunmuş motiflerin varlığını

doğrulamıştır (Şekil 4.12 B). Bu motiflerin korunmuş olması, dsRNA virüslerinde gözlenen genel replikasyon mekanizmaları ile uyumlu bulunmuştur (te Velthuis, 2014). RdRp (%90) ve CP (%80) için belirlenmiş tür tanımlama eşik değerlerinin altında kalan dizi benzerlikleri (Vainio ve ark., 2018), LmPV1'in *Alphapartitivirus* cinsi içerisinde yeni bir tür olduğunu göstermektedir (Şekil 4.12 A). Ayrıca bu çalışma, *Lactarius mediterranee*nsis türünden tanımlanan ilk partitivirüs olma özelliğini taşımaktadır.



Şekil 4.11 LmPV1'e ait dsRNA genom segmentlerinin organizasyonu ve moleküler özelliklerinin şematik gösterimi

A. ANK Akata & Kaliyeva 007 numaralı örneğe ait basidiokarp.**B.** LmPV1 genom yapısının şematik gösterimi. Her bir genomik segment (dsRNA1 ve dsRNA2), sırasıyla RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ve kapsid proteini (CP) kodlayan, dikdörtgen kutularla gösterilen tek bir açık okuma çerçevesi (ORF) içerir. dsRNA1 üzerindeki RdRp bölgesine gelen kısımı vurgulanmıştır. Her segmentin 5′ ve 3′ uçlarında yer alan çevrilmemiş bölgeler (UTR'ler) de gösterilmiştir. **C.** LmPV1'e ait dsRNA1 ve dsRNA2 segmentlerinin 5′ ve 3′ UTR dizilerinin hizalaması.**D.** LmPV1 dsRNA1'in (üstte) ve dsRNA2'nin (altta) 5′ UTR bölgelerinin öngörülen ikincil yapıları. RNA katlanma, hibridizasyon ve serbest Gibbs enerjisi hesaplamaları, UNAFold web sunucusu (https://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form-v2.php) kullanılarak gerçekleştirilmiştir**.**



Şekil 4.12 LmPV1'in filogenetik analizi ve motif karşılaştırması

(A–B) Lactarius mediterraneensis Partitivirus 1 (LmPV1) genomuna ait RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) protein sekansına dayalı olarak maksimum olasılık (maximum likelihood) yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağaçlar. Ağaçlar, *Alphapartitivirus, Betapartitivirus, Deltapartitivirus, Epsilonpartitivirus, Zetapartitivirus, Gammapartitivirus* ve *Cryspovirus* cinslerine ait referans sekanslar ile LmPV1'in filogenetik ilişkisini göstermektedir. LmPV1, *Alphapartitivirus* kladı içerisinde Rosellinia necatrix partitivirus 26 ve Armillaria gallica partitivirus 1 gibi yakın akraba türlerle birlikte kümelenmiştir. Filogenetik analizde bootstrap değerleri dal düğümlerinin güvenilirliğini temsil eder.**(C)** LmPV1 ve *Alphapartitivirus* grubundaki diğer seçilmiş virüslere ait RdRp protein sekansları hizalanarak, üç korunan RNA polimeraz motifinin (Motif A, Motif B ve Motif C) karşılaştırması yapılmıştır. Bu motifler, virüs replikasyonu için kritik öneme sahip olup, motif C içerisinde yer alan GDD üçlüsü tüm virüslerde korunmuş durumdadır. Bu karşılaştırma, LmPV1'in *Alphapartitivirus* cinsine ait olduğunu moleküler düzeyde de göstermektedir.

4.7 Lactarius mediterraneensis partitivirus 1'in Tüm Genom Analizi

LmPV1'e ait dsRNA1 (1899 bp) ve dsRNA2 (1957 bp) segmentlerinin genel genom organizasyonu gösterilmektedir (Şekil 4.13, 4.14). Her iki segment tek bir açık okuma çerçevesi (ORF) içermekte olup, sırasıyla RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) ve kapsid proteini (CP) kodlamaktadır. Tüm genom dizileri GenBank veritabanında PV176078–PV176079 erişim numaraları ile kayıt altına alınmıştır.

Lactarius mediterraneensis partitivirus 1

>LmPV1 RNA1

AGTAAACTTCTCCTGAAAACCTCAGGTTCAACGAAAAGTTTTCTTTCTGATTTTTCACAGCTTCCAGAAAACCTA
GTTATTTTACAAAC**ATG**CCTGCTCCGAATATACGATTCATTCGCACCCTTTCCCCTCAATGGAGACTGAATACTC
GAGAAGAAAAGTTCGACAACGTACTTTCCCTTTTCCGACGACGCATCATCCTCAAGGCAATGTACAAACACTACT
CCCCAGAAGTGGTTGAACAAGTTAAAGCACAACGACGTTCAATTGTCAACGAATCTGCTCTTATCGAAGACTTCG
AAAAGACCGAACAACCGCTGATCAATCTCAAACGAGACTACCACTATAAGAGAGCCCTCAAGGTTATGACCAAAG
CGTTTAAACCTAAGGAACTGTACAAGCCCGTTGCGTTCCCAGACCTCCGTTACTACCCATGGCACCTCCCCGTGT
CCGCTGAAGCCCCTTACAGAGGCTCACCGAAATGGGCAGCTTACCTCGCTCGCAAGTTCTCTGATGGACAGATCT
CCAACGCATCTGCCACATTCAGGAATCTATTCGACGAACTATTTTGGGTCAATCGACATCTAGTTCACAAAATCA
AAGATGCTGATCCAGCATTCTTTGAAGCAGACGGCACTCCCCGACCCTACTATTGGGTCAACCTACACGCTCGCG
CTCACGTAGTCGGCCCCGACGACGATGACAAAATTCGAGCTGTTTTTGGAGTTCCAAAACTTCTCCTATTCGTGG
AGAACATGTTCATTTGGCCTATGCAAGCCGACCTTCTCAACCGCAATCCCGTTGACTCACCTATGATGTGGGGAA
ACGAGATTATGCGTGGTGGATGGAAACGACTCCGCAACCTCATCAATCGTAAGACGAAAGGACAGTATTCAACTA
TTCTTTCAGCCGACTGGTCTCAATTCGACCGCCGCGCTCTTTTCGATATTATCGATGACGTTCACGAGATTTGGT
ATTCCTTCTACGACATGAGTGGCGCTTACCAGCCAACAAACTTCTACCCCGATGCTTCAACTCACCCCGAGCGCA
TCGACAACCTTTGGAGATGGTTCACACACAACGTGAAACATTATCCAATTCTACTTCCCGACGGACGCTTAATGC
AGTGGACCCGAAACGGCATAGCCTCTGGCTTTCAAGAAACCCAATTATTGGACTCTTGGGTCAATGGTATTATGC
TTCTCACTGTTCTGTCCGAACACGGAGTCAACATCGAAGCCGAGAGCTTTTTCTTTCGACTTCAAGGTGATGACT
CAATCTTCGTGTTTTCTGAACCTTTCTTCAGATTCTACGGCAAGCAACGCTTCCTCAAGATGCTCAGTGACTCCG
CAGCTCTGCGATTTAACGCAAAGCTCTCCACAGAGAAATCCGATCTTCATGATCGCCTTGATGGCGTTTACATTT
TAGGGTATTACAATCAACACGGCATAGCCTGGCGCACCGATGTTGACCTACTTTCACACTTACTGTTCCCAGAAC
GAGTTCAACGCATCCCTGCAACTGCAGGTACTTGCATTGGAATCGCGATGGCAGCACAAGGCTGTTCCCCCGGCG
TATACAACGTATGTCGAGACGTTTTCGACTTTATCACTCGAGAATTGGGAGAGCAACCTATCATCGATCAGACGA
TGCAAAGGAAACTTCTTTATCTTGTCAACATGACATCAGAAGAATCCGAAGCACTCGCGACGATGCCTTTCCCTT
CTTTCGAGAGGACGTACTTTCAAAATTACGTTCTAGATGGAAGATCCGAATCCGACCGACAACGGACCTGGCCCA
CAGATCCCGCGTACACTGGTGGATTTCACTTTATT**TAG**TACTTGGTGGCGTTACAGCTTTCAATTTATTGAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAATAAGAAA

Şekil 4.13 LmPV1 dsRNA1 (RdRp) segmentinin terminal dizileri ve primer bölgeleri

Segmentlerin 5’ ve 3’ uç bölgelerine ait nükleotid dizileri gösterilmiştir. Kırmızı ile belirtilen bölgeler sırasıyla 5’ UTR ve 3’ UTR dizilerini temsil etmektedir. Kalın yazılmış ATG ve TAG kodonları, açık okuma çerçevesinin başlangıç ve sonlanma bölgelerini göstermektedir. Sarı, mor, yeşil ve açık mavi renklerle vurgulanan diziler, RACE-PCR analizlerinde kullanılan primer bölgelerini göstermektedir.

UTR bölgelerinde gözlenen korunmuş ve kısmen tamamlayıcı diziler, segmentler arasında olası “panhandle” benzeri ikincil yapıların oluşabileceğini düşündürmekte olup, bu yapıların viral replikasyon ve segment tanıma mekanizmalarında rol oynayabileceği değerlendirilmektedir.

>LmPV1 RNA2
AGTAAACTTCCCCTAGAAACCCTAGGTTCAACGAAAAGTTCACTTTCTGATTTTTCACAGCTTCCAGAAAACCAA
GAATTTTAATAATGCAGTCCCGCCCCCGCTTTCAGATGTCCAAGCCCTCCAGCTTGAAACGTCCCTCGCCCCGTC
CTGTCGGCTCTGAGGCCACCAAGCCCAAGCCTAGCACGAAGGTCGATCCCCCGACCTACGAGCAGCAAGACAAAG
AGCAAGGTGAAATTGATGGCTCTTCTTCCGAAGGTGAAGAAGTTGAAGAGGAAATGGCCGCTCCTTCCCAGGAGA
CGAAGACCAATCTTCGTCCTTCTAAAGCCCAGACCAACACGGTCTTCGCTCAAGATGGCGCTCCCCGTCCTAAGC
GCACAACCCGCCCCGCGCAAAAGAACGTCCCCTCCAACCCCCTCACTGATGGTGCCTCTCTGGCTCCTCACATGA
AGATGCTCGCTCTCACTTCCTCGTCTAAGTCGGTCCCCGCAAAGGTAAATGGTCACTCGTTTTTCGTCCCGTTCC
TCGCAATGTTCGCGTACGTTAACCAAGCCGTCGCTTCCCTCCTCGTCAACAAGAAACAGGTCCAAGAATCGCACC
CGCTTTACAACTCCATCTTTACCCGCACTGCCATTTTCATCCTCGCCCACATTCACATCCTCCGCGCCCGAGAAC
ACGCTAACATCATCACTGATGATGAACTCAAGGTCTTGAAACGGTTCAAGTCGTCATTCGACTTTAACAAAATCG
TTATCCCTGGCCCTTACGTTCTGCTGTTCCAGTCGATCGGTATCTGTATCCCTGGAAACAAGAGGTTCCTCCCCA
CCGTCCCTGCCTTCCCACAACTCTCGTCCTTAATCAAGGCACAAGGCACCGGAACTGGAATCGCTCCTTCCTCTG
GATCCTGGTCCACCGCCCTCGGCTTCCTCCCCTGGCTCATTGGCATGTCTTCCCTTATCGCTACCAAAGCGTCAA
TTGGTGAAGAGGCTAAGATGCAAAAGACTGATGGCTCCGATGAGAAGAAGCTCCCGCTTAACTTCGATGGTCGTT
ATTTCGTTCCTTTCCACCGTGATCGCAAGAACAAAAACGATTTCCTCGGCTCTAAGTACGAAAACGCGCCCACCC
CGCTTTCGCCAACCGCTTACTTCGCAACGTCGTCCTCATTCTGCGTCCCGTTCCCCGATTCTCTCAACCACTTGA
AGAACGTTTACGAGGCCGTCCCTCCCGTCCGCTTCCCCTCCCACACCGCCGGAAAGAAACTCAACCGCTTGATGG
ATTACTTCTATCTTGATAAAGACGTCTCTTTCTACTCTGTCCTCTTCGAGGCTCTCGCTATCGAAGCTCGGTTCT
TTGAAGGTATGACTACCTTTGAGAACATCGACATTGAAACTGGTGCCTCCGTCAATTGTGTTCGCCACGTTAAAT
ACGATGGTCCGAACCTTCCGGAGAACCTAGAGTGGTTCGAACGCCTCCCCGTCATCGATGACGGAATCACAGTTG
AATCCCATGTGTCTGACATCACTGACACTGACCTTCAGATCGCTGCCTACTCTGGCATTATCTCAACTTTCTCAG
TTGAAGGTACTCCTGCTCACACGATCCCTGGTCCAACTTTCGATTCCCGAAACACCGATGGTGAAGACCTAGCAA
CTATCACTTCTGGTACTATCTACCATGAAGGAGTTGTCAAGCGTCGTCTCGCCCGACAGAACCCATTCGTCGACG
AGATCCGAACCCACATCTACACTTCTATGGCGTATGATATCTCTACCGTCCTTTGATTTGTGATGCTCCCCCCCC
CTCCTGTACTTTTTTGTTTGAATATCCAACAACCAGTCTTTCAGAAAAAAAAAAAAGACCAAATACGATGCATTT
CTAAGAATAATTCTTAGACATTCGAAAAAAAAAAACCAAAAAAATAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAA

Şekil 4.14 LmPV1 dsRNA2 (CP) segmentinin terminal dizileri ve primer bölgeleri

LmPV1'in dsRNA1 ve dsRNA2 genom segmentleri sırasıyla RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ve kapsid proteinini (CP) kodlamaktadır. dsRNA1 segmenti 582 amino asit uzunluğunda bir RdRp proteini kodlarken, dsRNA2 segmenti 564 amino asit uzunluğunda bir kapsid proteini (CP) kodlamaktadır. Bu proteinlerin amino asit dizileri, Expasy çevrimiçi aracı (Translate Tool; https://web.expasy.org/translate/) kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen RdRp ve CP amino asit dizileri Şekil 4.15 ve 4.16'da verilmiştir.

>LmPV1 RdRp
MPAPNIRFIRTLSPQWRLNTREEKFDNVLSLFRRRIILKAMYKHYSPEVVEQVKAQRRSIVNESALIEDFEKTEQ
PLINLKRDYHYKRALKVMTKAFKPKELYKPVAFPDLRYYPWHLPVSAEAPYRGSPKWAAYLARKFSDGQISNASA
TFRNLFDELFWVNRHLVHKIKDADPAFFEADGTPRPYYWVNLHARAHVVGPDDDKIRAVFGVPKLLLFVENMFI
WPMQADLLNRNPVDSPMMWGNEIMRGGWKRLRNLINRKTKGQYSTILSADWSQFDRRALFDIIDDVHEIWYSFYD
MSGAYQPTNFYPDASTHPERIDNLWRWFTHNVKHYPILLPDGRLMQWTRNGIASGFQETQLLDSWVNGIMLLTVL
SEHGVNIEAESFFFRLQGDDSIFVFSEPFFRFYGKQRFLKMLSDSAALRFNAKLSTEKSDLHDRLDGVYILGYYN
QHGIAWRTDVDLLSHLLFPERVQRIPATAGTCIGIAMAAQGCSPGVYNVCRDVFDFITRELGEQPIIDQTMQRKL
LYLVNMTSEESEALATMPFPSFERTYFQNYVLDGRSESDRQRTWPTDPAYTGGFHFI

Şekil 4.15 LmPV1'e ait RdRp proteininin amino asit dizisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sunulan tez çalışmasında, Türkiye'nin farklı bölgelerinde yayılış gösteren *Lactarius* cinsi üyelerini enfekte eden RNA virüslerinin tanımlanması ve moleküler özelliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi ANK Herbaryumu'nda mevcut olan toplam 23 *Lactarius* örneğine ait materyallerde çift iplikçikli RNA (dsRNA) taraması gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda yaklaşık 200 adet Sanger DNA dizi analizi ve 7 adet yeni nesil dizileme (NGS) analizi için hizmet alımı yapılmıştır.

Bu çalışmada, *Lactarius mediterraneensis* türüne ait örneklerden izole edilen ve çift segmentli çift sarmallı RNA (dsRNA) genomuna sahip yeni bir *Alphapartitivirus* türü olan *Lactarius mediterraneensis partitivirus 1* (LmPV1) tanımlanmıştır. Bu bulgu, hem *L. mediterraneensis*'in ilk kez bir mikovirüs ile enfekte olduğunun gösterilmesi hem de ektomikorizal *Lactarius* türlerinden bildirilen ilk *Alphapartitivirus* olması bakımından literatüre önemli bir katkı sunmaktadır.

Partitiviridae familyası, bitkiler, mantarlar ve protozoalar gibi çeşitli ökaryotik konakları enfekte eden çift zincirli RNA (dsRNA) virüslerini içermektedir (Vainio ve ark., 2018). Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu virüslerin konak aralığının bakteriyel sistemleri (Neri ve ark., 2022, Kaliyeva ve Akata vd., 2026) ve ayrıca böcekler ile oomisetleri de kapsayabileceğini göstermektedir (Shi ve ark., 2016; Shiba ve ark., 2018; Cross ve ark., 2020, Kaliyeva ve Akata vd., 2026). Ancak bu ilişkiler henüz ICTV tarafından resmi olarak kabul edilmemiştir.

Partitivirüslerin bulaşma mekanizmalarının genellikle hücre içi yollarla sınırlı olduğu bilinmekle birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar bu virüslerin belirli koşullar altında farklı konak türleri arasında da aktarılabildiğini ortaya koymuştur. Özellikle *Heterobasidion* türleri üzerinde gerçekleştirilen araştırmalar, partitivirüslerin sporlar aracılığıyla yayılabildiğini ve hifal anastomoz yoluyla farklı türler arasında geçiş yapabildiğini göstermektedir. Ayrıca bazı çalışmalarda aynı partitivirüsün farklı fungal türlerde doğal olarak bulunması, bu virüslerin doğada türler arası geçiş yapabileceğine

işaret etmektedir. Bununla birlikte, bu tür geçişlerin çoğunlukla yakın akraba türler arasında gerçekleştiği, daha uzak taksonomik gruplar arasında ise genellikle kontrollü deneysel koşullarda gözlemlendiği bildirilmektedir.

Partitivirüsler uzun süre konak üzerinde belirgin bir etki oluşturmayan kriptik virüsler olarak değerlendirilmiş olsa da son yıllarda yapılan çalışmalar bu virüslerin konak üzerinde farklı biyolojik etkiler oluşturabileceğini göstermektedir. Bu etkiler; büyüme hızında değişim, sporulasyon kapasitesinde azalma ve rekabet gücünde farklılaşma gibi fenotipik değişiklikler şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Bunun yanı sıra bazı durumlarda partitivirüslerin konak için faydalı olabileceği de bildirilmiştir. Ancak bu etkilerin konak türüne ve çevresel koşullara bağlı olarak değişkenlik gösterebildiği ifade edilmektedir. Bu çalışmada LmPV1'in konak üzerindeki etkileri doğrudan incelenmemiştir. Bununla birlikte, literatürde yer alan bu bulgular, LmPV1'in de konak mantar üzerinde benzer etkiler oluşturma potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Basidiokarp oluşturan mantarlar, çoğunlukla diğer filamentöz mantarlar tarafından kolonize edilebilmektedir. Bu durum, mantarlar âleminde yaygın olarak görülen simbiyotik veya ekolojik etkileşimlerin bir sonucu olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle, basidiokarp oluşturan mantarlar üzerinde gerçekleştirilen viral çeşitlilik çalışmaları hem ana konaktan hem de bu yapılar üzerinde gelişen diğer mantarlardan kaynaklanan viral toplulukları içerebilir. Bu durum, virüs–konak ilişkisinin doğru şekilde belirlenmesini zorlaştırabilmektedir. Ancak bu çalışmada kullanılan örneklerin fungikoloz mantarlar tarafından kolonize edilmediği düşünülmektedir. Bunun üç temel nedeni bulunmaktadır. İlk olarak, NGS verilerinde *Lactarius mediterraneensis* dışında herhangi bir konak organizmaya ait RNA dizisine rastlanmamıştır (dsRNA ekstraktlarının genellikle konak RNA'sı da içerebildiği bilinmektedir). İkinci olarak, nrITS bölgesinin PCR amplifikasyonu yalnızca *L. mediterraneensis*'e ait diziler vermiş, başka bir fungal taksona ait herhangi bir sekans elde edilmemiştir. Ayrıca, LmPV1'in en yakın akrabasının ektomikorizal bir mantar olan *Sarcosphaera coronaria* içerisinde bulunması, benzer ekolojik koşulları paylaşan organizmaların benzer virüsleri barındırabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, virüs–konak ilişkilerinin çevresel faktörlerden etkilenebileceğini göstermektedir. Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde,

LmPV1'in gerçek konağının *L. mediterraneensis* olduğu sonucuna varılmıştır (Kaliyeva ve Akata vd., 2026).

Ektomikorizal ve saprotrofik mantarların aynı habitatta birlikte bulunabildiği ve bu türler arasında çeşitli etkileşimlerin gerçekleşebildiği bilinmektedir. Bununla birlikte, farklı fungal türler arasında mikovirüslerin aktarımı sınırlı olup, genellikle hifal anastomoz gibi doğrudan hücresel temas gerektirmektedir. Ancak filogenetik olarak uzak türler arasında bu tür temasların nadir gerçekleştiği ve bu nedenle virüs aktarımının da sınırlı olduğu bildirilmektedir. Ayrıca türler arası virüs geçişinin hangi mekanizmalarla gerçekleştiği ve hangi koşullarda mümkün olduğu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Sahin ve Akata, 2020).

Karşılaştırmalı analizler, LmPV1'in RdRp dizisinin, oomisetleri enfekte eden bir *Alphapartitivirus* olan Plasmopara viticola-associated partitivirus *9* ile %43,51 oranında amino asit benzerliği gösterdiğini ortaya koymuştur (Chiapello ve ark., 2020). Oomisetler, fonksiyonel olarak mantarlara benzemekle birlikte filogenetik olarak kahverengi alglerle akraba olan Stramenopil grubuna aittir. BLASTp analizleri ayrıca LmPV1 ile bitkileri enfekte eden partitivirüsler (örneğin Poaceae liege partitivirus *2*) ve artropod virüsleri (örneğin brine shrimp partitivirus 1) arasında da benzerlikler olduğunu göstermiştir. Bu durum, partitivirüslerin farklı biyolojik âlemler arasında geniş bir konak aralığına sahip olabileceğini göstermektedir.

De novo oluşturulan contig verilerinin analizi, LmPV1 genomunda ek (üçüncü) bir segmentin bulunmadığını göstermiştir. Bu durum bazı partitivirüsler için tipik olmakla birlikte tüm üyeler için geçerli değildir. Son yıllarda yüksek verimli dizileme teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte bazı partitivirüslerde ek genom segmentlerinin varlığı daha sık rapor edilmektedir. Bununla birlikte, LmPV1'in tipik olarak iki segmentli bir genom yapısına sahip olduğu belirlenmiştir. Genel olarak, partitivirüslerin segmentli genom yapısı yeni RNA parçalarının kazanılmasına olanak tanıyabilmekte, ancak bu tür ek segmentler çoğunlukla zorunlu olmayıp virüsün çoğalması için ana genom segmentlerine bağımlı kalmaktadır.

Simbiyotik mantarlardaki viral popülasyonların incelenmesi, patojen veya kültürü yapılan türlere odaklanan çalışmalara önemli katkılar sağlayarak mikovirüs çeşitliliği ve evrimsel eğilimlerin daha kapsamlı anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Bu çalışmada ektomikorizal bir basidiomiset olan *Lactarius mediterraneensis*'ten izole edilen yeni bir partitivirüs olan LmPV1'in analizi, fungal virüslerin karşılaştırmalı virolojisine yönelik genomik veri kaynaklarını genişletmektedir.

Biyoinformatik analiz kapsamında, 1500 nükleotitten uzun 153 contig üzerinde gerçekleştirilen NCBI BLASTx taraması sonucunda iki önemli viral dizi tespit edilmiştir. Contig 38 (1781 nt), Sarcosphaera coronaria partitivirus ANK VIR-52'ye ait RNA'ya bağımlı RNA polimeraz ile %65,22 amino asit benzerliği gösterirken, contig 44 (1834 nt) ise Rosellinia necatrix partitivirus 26'nın kapsid proteini ile %26,53 benzerlik göstermiştir. Bu benzerlik sonuçları ve viral taksonomi kriterleri doğrultusunda, *Partitiviridae* familyasına ait yeni bir virüs tanımlanmış ve Lactarius mediterraneensis partitivirus 1 (LmPV1) olarak adlandırılmıştır (Kaliyeva ve Akata vd., 2026).

Tanımlanan LmPV1, dsRNA1 (1899 bp) ve dsRNA2 (1957 bp) olmak üzere iki segmentten oluşan bipartit bir genoma sahiptir. Tüm genom dizileri GenBank veri tabanına PV176078-9 erişim numaraları ile kaydedilmiştir. Ayrıca, contig oluşturulmasında kullanılan ham NGS verileri NCBI BioSample veri tabanında SAMN53629509 erişim numarası ile sunulmuştur.

Biyoinformatik analizler, dsRNA1 segmentinin 90–1838 pozisyonları arasında yer alan 582 amino asit uzunluğunda (68,18 kDa) bir RdRp proteinini kodladığını göstermiştir. dsRNA2 segmenti ise 87–1781 nükleotidleri arasında yer alan 564 amino asit uzunluğunda (62,43 kDa) bir kapsid proteini (CP) genini içermektedir. Her iki segmentin de poliadenillenmiş uçlara sahip olduğu ve korunmuş 5' UTR bölgeleri içerdiği belirlenmiştir. Bu bölgeler arasında %84,88 oranında benzerlik bulunması, *Alphapartitivirus* üyeleri için tipik bir özellik olarak değerlendirilmektedir (Ong ve ark., 2018). 3' UTR bölgeleri uzunluk bakımından farklılık göstermekte olup (61 bp ve 176 bp), ikincil yapı analizleri bu bölgelerin segment tanıma mekanizmalarında işlevsel olarak rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

RdRp ve CP dizilerine dayalı filogenetik analizler, LmPV1'in Alphapartitivirus grubu içerisinde yer aldığını ve en yakın akrabasının *Sarcosphaera coronaria partitivirus* olduğunu ortaya koymuştur. RdRp'de %65,22 ve kapsid proteininde %26,53 oranında gözlenen benzerlik değerleri, tür sınırlarının altında kalmakta olup (Vainio ve ark., 2018), LmPV1'in yeni bir *partitivirüs* türün üyesi olarak değerlendirilmesini desteklemektedir.

Ayrıca RdRp proteininde katalitik palm alt bölgesine ait korunmuş motiflerin varlığı doğrulanmış olup, bu durum dsRNA virüslerine özgü yapısal korunum ile uyumludur (te Velthuis, 2014). Tüm bu bulgular doğrultusunda, LmPV1 hem Alphapartitivirus cinsine ait yeni bir türün üyesi olarak tanımlanmakta hem de *Lactarius mediterraneensis*'ten bildirilen ilk partitivirüs olma özelliğini taşımaktadır (Kaliyeva ve Akata vd., 2026).

KAYNAKLAR

Akata, I, Altuntaş, D, & Kabaktepe, Ş. (2019). Fungi Determined in Ankara University Tandoğan Campus Area (Ankara-Turkey). Trakya University Journal of Natural Sciences, 20(1), 47-55.

Akata, I., Edis, G., Keskin, E., & Sahin, E. (2023a). Diverse partitiviruses hosted by the ectomycorrhizal agaric Hebeloma mesophaeum and the natural transmission of a partitivirus between phylogenetically distant, sympatric fungi. Virology, 581, 63-70.

Abbas, A. (2016). A Review Paper on Mycoviruses. Journal of Plant Pathology & Microbiology, 7(12), 390.

Bartlett, J. M., & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. PCR protocols, 3-6.

Cross ST, Maertens BL, Dunham TJ, Rodgers CP, Brehm AL et al. (2020). Partitiviruses infecting *Drosophila melanogaster* and *Aedes aegypti* exhibit efficient biparental vertical transmission. Journal of Virology 94 (20): 10-1128. https://doi. org/10.1128/jvi.01070-20

Chiapello M, Rodríguez-Romero J, Ayllón MA, Turina M (2020). Analysis of the virome associated to grapevine downy mildew lesions reveals new mycovirus lineages. Virus Evolution 6 (2): veaa058. https://doi.org/10.1093/ve/veaa058

Chun, S. J., & Lee, Y. H. (1997). Inheritance of dsRNAs in the rice blast fungus, Magnaporthe grisea. FEMS microbiology letters, 148(2), 159-162.

Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. 1989. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86(7), 2172-2175.

Darissa, O, Willingmann, P, & Adam, G (2010). Optimized approaches for the sequence determination of double-stranded RNA templates. Journal of virological methods, 169(2), 397-403.

Dawe, A. L. ve Nuss, D. L. (2001). Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. Annual review of genetics, 35(1), 1-29.

Deakin, G., Dobbs, E., Bennett, J. M., Jones, I. M., Grogan, H. M., & Burton, K. S. (2017). Multiple viral infections in Agaricus bisporus-Characterisation of 18 unique RNA viruses and 8 ORFans identified by deep sequencing. Scientific Reports, 7(1), 2469.

Eastwood, D., Green, J., Grogan, H., & Burton, K. (2015). Viral agents causing brown cap mushroom disease of Agaricus bisporus. Applied and Environmental Microbiology, 81(20), 7125-7134.

García-Pedrajas, M. D., Cañizares, M. C., Sarmiento-Villamil, J. L., Jacquat, A. G., & Dambolena, J. S. (2019). Mycoviruses in biological control: From basic research

to field implementation. Phytopathology, 109(11), 1828-1839.

Gergerich, R. C., Welliver, R. A., & Scott, S. W. (2006). Fundamentals of Plant Virology. In Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises (pp. 309–328).

Ghabrial SA, Caston JR, Jiang D, Nibert ML, Suzuki N (2015) 50-plus years of fungal viruses. Virology 479-480:356-368. doi:10.1016/j.virol.2015.02.034

Ghabrial, S. A., & Suzuki, N. (2009). Viruses of plant pathogenic fungi. Annual review of phytopathology, 47(1), 353-384.

Gilbert, K. B., Holcomb, E. E., Allscheid, R. L., & Carrington, J. C. (2019). Hiding in plain sight: New virus genomes discovered via a systematic analysis of fungal public transcriptomes. PLoS One, 14(7), e0219207.

Guo, M., Shen, G., Wang, J., Liu, M., Bian, Y., & Xu, Z. (2021). Mycoviral diversity and characteristics of a negative-stranded RNA virus LeNSRV1 in the edible mushroom Lentinula edodes. Virology, 555, 89-101.

Hassan, S., Coutts, R. H. A., Jamal, A., & Kotta-Loizou, I. (2025). A comprehensive review of mycoviruses infecting the plant pathogenic fungus Rosellinia necatrix. Frontiers in Virology, 5, 1513097.

Hawksworth, D. L. and Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology spectrum*, *5*(4), 10-1128.

Heilmann-Clausen, J., Verbeken, A., & Vesterholt, J. (1998). *The Genus Lactarius* (Vol. 2). Tilst, Denmark: Svampetryk.

Hillman, B.I., Suzuki, N. (2004). Viruses of the Chestnut Blight Fungus, Cryphonectria parasitica. Advances in Virus Research, 63, 423-472. doi.org/10.1016/S0065-3527(04)63007-7.

Hillman BI, Annisa A, Suzuki N (2018) Viruses of Plant-Interacting Fungi. Adv Virus Res 100:99-116. doi:10.1016/bs.aivir.2017.10.003

Hillman, B. I., & Cai, G. (2013). The family Narnaviridae: simplest of RNA viruses. Advances in virus research, 86, 149-176.

Hosseınalızadeh, S., & Açıkgöz, S. (2021). Yeni nesil dizileme teknolojilerinin mikovirolojide uygulanması. Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 35(1), 247-263

Hough, B., Steenkamp, E., Wingfield, B., & Read, D. (2023). Fungal Viruses Unveiled: A Comprehensive Review of Mycoviruses. Viruses, 15(5), 1202.

Kalıyeva, A., Sahin, E., Ediş, G., & Akata, I. (2025). Complete genome characterization of a new alphapartitivirus identified in the ectomycorrhizal fungus *Lactarius mediterraneensis*.

Kahraman, Ç. Ö., & Yıldız, F. (2019). Bitki Fungal Hastalıkları ile Biyolojik Savaşımda Yeni Yaklaşımlar: Fungal Virüsler. İzlek Akademik Dergi, 2(1), 33-48.

Kendall, J.M., Rygiewicz, P.T. (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiology.

5:28 doi:10.1186/1471-2180-5-28.

Kotta-Loizou, I. (2021). Mycoviruses and their role in fungal pathogenesis. Current Opinion in Microbiology, 63, 10-18.

Kotta-Loizou, I. ve Coutts, R. H. (2017). Mycoviruses in Aspergilli: a comprehensive review. Frontiers in Microbiology, 8, 1699.

Kotta-Loizou, I., Castón, J. R., Coutts, R. H., Hillman, B. I., Jiang, D., Kim, D. H., ... ve ICTV Report Consortium. (2020). ICTV virus taxonomy profile: Chrysoviridae. Journal of General Virology, 101(2), 143-144.

Kotta-Loizou, I., Coutts, R. H. ve ICTV Report Consortium. (2022). ICTV virus taxonomy profile: Polymycoviridae. Journal of General Virology, 103(5), 001747.

Koonin, E. V., Dolja, V. V., Krupovic, M., Varsani, A., Wolf, Y. I., Yutin, N., ... & Kuhn, J. H. (2020). Global organization and proposed megataxonomy of the virus world. Microbiology and molecular biology reviews, 84(2), 10-1128.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Ståhlberg, A. (2006). The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine, 27(2-3), 95-125.

Krupovic, M.; Ghabrial, S.A.; Jiang, D.; Varsani, A. (2016) Genomoviridae: A new family of widespread single-stranded DNA viruses. Arch. Virol. 161, 2633–2643.

Neri U, Wolf YI, Roux S, Camargo AP, Lee B et al. (2022). Expansion of the global RNA virome reveals diverse clades of bacteriophages. Cell 185 (21): 4023-4037. https://doi. org/10.1016/j.cell.2022.08.023

Nibert, M. L., Ghabrial, S. A., Maiss, E., Lesker, T., Vainio, E. J., Jiang, D., & Suzuki, N. (2014). Taxonomic reorganization of family Partitiviridae and other recent progress in partitivirus research. Virus research, 188, 128-141.

Nuss, D. L. (2005). Hypovirulence: mycoviruses at the fungal–plant interface. Nature Reviews Microbiology, 3(8), 632-642.

Villan Larios, D. C., Reyes Diaz, B. M., Priminho, P. C., Loguercio, L. L., Santos, V.C., …& Eric Roberto Guimarães, R.A. (2023). Exploring the Mycovirus Universe: Identification, Diversity, and Biotechnological Applications. J. Fungi 2023, 9(3), 361; doi.org/10.3390/jof9030361.

Lemus-Minor, C. G., Cañizares, M. C., García-Pedrajas, M. D., & Pérez-Artés, E. (2019). Horizontal and vertical transmission of the hypovirulence-associated mycovirus Fusarium oxysporum f. sp. dianthi virus 1. European Journal of Plant Pathology, 153, 645-650.

Li, C. X., Shi, M., Tian, J. H., Lin, X. D., Kang, Y. J., Chen, L. J., & Zhang, Y. Z. (2018). Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. eLife, *7*, e31978. doi.org/10.7554/eLife.31978.

Li, P., Wang, S., Zhang, L., Qiu, D., Zhou, X., & Guo, L. (2020). A tripartite ssDNA

mycovirus from a plant pathogenic fungus is infectious as cloned DNA and purified virions. Science advances, 6(14), eaay9634.

Lin, Y. H., Fujita, M., Chiba, S., Hyodo, K., Andika, I. B., Suzuki, N., & Kondo, H. (2019). Two novel fungal negative-strand RNA viruses related to mymonaviruses and phenuiviruses in the shiitake mushroom (Lentinula edodes). Virology, 533, 125-136.

Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Ariyawansa, H. A., Aoki, T. and Schoch, C. L. (2020). Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? IMA fungus, 11(1), 14.

Muñoz-Adalia, E. J., Fernández, M. M., & Diez, J. J. (2016). The use of mycoviruses in the control of forest diseases. Biocontrol Science and Technology, 26(5), 577-604.

Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In Methods in enzymology (Vol. 155, pp. 335-350).

Myers, J.; Bonds, A.; Clemons, R.; Thapa, N.; Simmons, D.; Carter-House, D.; Ortanez, J.; Liu, P.; Miralles-Durán, A.; Desirò, A. (2020) Survey of early-diverging lineages of fungi reveals abundant and diverse mycoviruses. Mbio **2020**, 11, e02027-20.

Paoletti, M. (2016). Vegetative incompatibility in fungi: From recognition to cell death, whatever does the trick. Fungal Biology Reviews, 30(4), 152-162.

Pearson, M. N., Beever, R. E., Boine, B., & Arthur, K. (2009). Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. Molecular plant pathology, 10(1), 115-128.

Petrzik K, Sarkisova T, Stary J, Koloniuk I, Hrabakova L, Kubesova O (2016) Molecular characterization of a new monopartite dsRNA mycovirus from mycorrhizal Thelephora terrestris (Ehrh.) and its detection in soil oribatid mites (Acari: Oribatida). Virology 489:12-19. doi:10.1016/j.virol.2015.11.009

Rigling, D., Borst, N., Cornejo, C., Supatashvili, A., Prospero, S. (2018). Genetic and Phenotypic Characterization of Cryphonectria hypovirus 1 from Eurasian Georgia. Viruses. 30(12):687. doi: 10.3390/v10120687.

Roossinck, M. J. (2011). The good viruses: Viral mutualistic symbiose. Nature Reviews Microbiology, 9(2) 99-108.

Roossinck, M. J. (2012). Persistent Plant Viruses: Molecular Hitchhikers or Epigenetic Elements? Viruses: Essential Agents of Life. pp 177-186.

Rogers, S. O., Bendich, A. J. (1994). Sayfa 183-190. Plant Molecular Biology Manual. Editörler: Gelvin, S. B., Schilperoort, R. A. Dordrecht: Springer.

Romaine, C.P., Goodin, M, M. (2002). Unraveling the viral complex associated with La France disease of the cultivated mushroom, Agaricus bisporus. Forestry and Medicine. 237–257

Sahin E, Akata I (2018) Viruses infecting macrofungi. Virusdisease 29 (1):1-18. doi:10.1007/s13337-018-0434-8

Sahin E, Akata I (2019) Complete genome sequence of a novel mitovirus from the ectomycorrhizal fungus Geopora sumneriana. Arch Virol 164 (11):2853-2857. doi:10.1007/s00705-019-04367-x

Sahin E, Akata I (2021) Full-length genome characterization of a novel alphapartitivirus detected in the ectomycorrhizal fungus Hygrophorus penarioides. doi:10.1007/s11262- 020-01814-9

Sahin E, Akata I, Keskin E (2020) Novel and divergent bipartite mycoviruses associated with the ectomycorrhizal fungus Sarcosphaera coronaria. Virus Res 286:198071. doi:10.1016/j.virusres.2020.198071

Sahin E, Keskin E, Akata I (2021a) Novel and diverse mycoviruses co-inhabiting the hypogeous ectomycorrhizal fungus Picoa juniperi. Virology 552:10-19. doi:10.1016/j.virol.2020.09.009

Sahin, E., Akata, I., Keskin, E. (2021b). Molecular characterization of a new endornavirus inhabiting the ectomycorrhizal fungus Hygrophorus penarioides. Brazilian Journal of Microbiology, 1-6.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Sato, Y., Das, S., Velasco, L., Turina, M., Osaki, H., Kotta-Loizou, I., ... ve ICTV Report Consortium. (2023). ICTV Virus Taxonomy Profile: Yadokariviridae 2023. Journal of General Virology, 104(1), 001826.

Sato, Y., Das, S., Velasco, L., Turina, M., Osaki, H., Kotta-Loizou, I., ... & ICTV Report Consortium. 2023a. ICTV virus taxonomy profile: Yadokariviridae 2023. Journal of General Virology, 104(1), 001826.

Sato, Y., Miyazaki, N., Kanematsu, S., Xie, J., Ghabrial, S. A., Hillman, B. I., ... ve ICTV Report Consortium. (2019). ICTV virus taxonomy profile: Megabirnaviridae. Journal of General Virology, 100(9), 1269-1270

Sato, Y., Turina, M., Chiba, S., Okada, R., Bhatti, M. F., Kotta-Loizou, I., ... & ICTV Report Consortium. 2023b. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hadakaviridae 2023. Journal of General Virology, 104(1), 001820.

Servi, H., Akata, I., & Çetin, B. (2010). Macrofungal diversity of bolu abant nature park (Turkey). African Journal of Biotechnology, 9(24), 3622-3628.

Segers, G.C., Zhang, X., Deng, F., Nuss, D.L. (2007). Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. 104 (31) 12902-12906. doi.org/10.1073/pnas.0702500104

Son, M., Yu, J., & Kim, K. H. (2015). Five questions about mycoviruses. PLoS pathogens, 11(11), e1005172.

Son, M., Yu, J., Kim, K. H., & Lee, Y. W. (2015). The diversity of mycoviruses in fungal pathogens and their potential as biological control agents. Molecules and Cells,

38(1), 1–9 doi.org/10.14348/molcells.2015.2262.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., C André Levesque, C.A., Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. 109(16):6241-6. doi: 10.1073/pnas.1117018109.

Shi M, Lin XD, Tian JH, Chen LJ, Chen X et al. (2016). Redefining the invertebrate RNA virosphere. Nature 540 (7634): 539-543. https://doi.org/10.1038/nature20167

Shiba K, Hatta C, Sasai S, Tojo M, Ohki ST et al. (2018). Genome sequence of a novel partitivirus identified from the oomycete *Pythium nunn*. Archives of Virology 163: 2561-2563. https:// doi.org/10.1007/s00705-018-3880-0

Stielow B, Klenk HP, Menzel W (2011) Complete genome sequence of the first endornavirus from the ascocarp of the ectomycorrhizal fungus Tuber aestivum Vittad. Arch Virol 156 (2):343-345. doi:10.1007/s00705-010-0875-x

Stielow B, Menzel W (2010) Complete nucleotide sequence of TaV1, a novel totivirus isolated from a black truffle ascocarp (Tuber aestivum Vittad.). Arch Virol 155 (12):2075-2078. doi:10.1007/s00705-010-0824-8

Stielow JB, Bratek Z, Klenk HP, Winter S, Menzel W (2012) A novel mitovirus from the hypogeous ectomycorrhizal fungus Tuber excavatum. Arch Virol 157 (4):787-790. doi:10.1007/s00705-012-1228-8

Sutela, S., & Vainio, E. J. (2020). Virus population structure in the ectomycorrhizal fungi Lactarius rufus and L. tabidus at two forest sites in Southern Finland. Virus research, 285, 197993.

Syun-ichi Urayama., Yan-jie Zhao, Misa Kuroki, Yuto Chiba, Akihiro Ninomiya., Daisuke Hagiwara. 2024. Greetings from virologists to mycologists: A review outlining viruses that live in fungi. PMCID: PMC11371549.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular biology and evolution, 38(7), 3022-3027.

Tavantzis, S, M. (2018). Partitiviruses of Fungi. "Encyclopedia of Virology" 3rd Edition, Vol. 4, pp. 63-68. B. W. V.

Te Velthuis AJ. 2014. Common and unique features of viral RNA-dependent polymerases. Cell Mol Life Sci. 71:4403–4420.

Tuomivirta, T.T., Hantula, J. (2003). Two unrelated double-stranded RNA molecule patterns in Gremmeniella abietina type A code for putative viruses of the families Totiviridae and Partitiviridae. PMID: 14648287 DOI: 10.1007/s00705-003-0194-6.

Tuomivirta, T.T., Hantula, J., 2005. Three unrelated viruses occur in a single isolate of *Gremmeniella abietina* var. *abietina* type A. Virus Research 110: 31–39.

Van Diepeningen, A. D., Debets, A. J., & Hoekstra, R. F. (2006). Dynamics of dsRNA mycoviruses in black Aspergillus populations. Fungal Genetics and Biology, 43(6), 446-452.

Varsani, A., Krupovic, M. 2021. Family Genomoviridae: 2021 taxonomy update. Arch. Virol. 166, 2911–2926.

Vainio, E. J., Chiba, S., Ghabrial, S. A., Maiss, E., Roossinck, M., Sabanadzovic, S., ... & ICTV Report Consortium. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Partitiviridae. Journal of General Virology, 99(1), 17-18.

Vainio, E. J., Pennanen, T., Rajala, T., & Hantula, J. (2017). Occurrence of similar mycoviruses in pathogenic, saprotrophic and mycorrhizal fungi inhabiting the same forest stand. FEMS microbiology ecology, 93(3), fix003.

Vainio, E. J., Jurvansuu, J., & Hantula, J. (2018). A novel partitivirus from a basidiomycete fungus uncovers new evolutionary aspects of Partitiviridae. Archives of Virology, *163*, 3175–3179. https://doi.org/10.1007/s00705-018-3975-1

Verbeken, A., & Nuytinck, J. (2013). Not every milkcap is a Lactarius. Russulales 2010, Proceedings, 51, 162-168. Meise, Belgium: National Botanical Garden Belgium.

Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adriaenssens, E. M., Dempsey, D. M., ... & Davison, A. J. 2020. Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020).

Wu, M., Jin, F., Zhang, J., Yang, L., Jiang, D., & Li, G. (2012). Characterization of a novel bipartite double-stranded RNA mycovirus conferring hypovirulence in the phytopathogenic fungus Botrytis porri. Journal of virology, 86(12), 6605-6619.

Yang, D., Wu, M., Zhang, J., Chen, W., Li, G., & Yang, L. (2018). Sclerotinia minor endornavirus 1, a novel pathogenicity debilitation-associated mycovirus with a wide spectrum of horizontal transmissibility. Viruses, 10(11), 589.

Yu, X., Li, B., Fu, Y., Jiang, D., Ghabrial, S. A., Li, G., ... & Yi, X. 2010. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(18), 8387-8392.