ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TRAKYA BÖLGESİNDEN TOPLANMIŞ *Tuber excavatum* ÖRNEKLERİNİN KONAKLIK ETTİĞİ RNA MİKOVİRÜSLERİNİN TANIMLANMASI VE MOLEKÜLER OLARAK NİTELENDİRİLMESİ

Elifnaz BORA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TRAKYA BÖLGESİNDEN TOPLANMIŞ *Tuber excavatum* ÖRNEKLERİNİN KONAKLIK ETTİĞİ RNA MİKOVİRÜSLERİNİN TANIMLANMASI VE MOLEKÜLER OLARAK NİTELENDİRİLMESİ

Elifnaz BORA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ilgaz AKATA

Bu çalışma, Trakya bölgesinden toplanan *Tuber excavatum* örneklerinde RNA mikovirüslerinin varlığını ve genetik özelliklerini araştırmaktadır. Moleküler ve konvansiyonel tür teşhisi yapılan örneklere Viral Çift İplikçikli RNA (dsRNA) taraması yapılmıştır. Tanımlanan dsRNA segmentlerinin eşlenik DNA'ları (cDNA'ları) rastgele (random) PZR (rPZR) yöntemi ile amplifiye edilmiş ve Yeni Nesil Dizileme (NGS) yöntemiyle analiz edilmiştir. Tanımlanan dsRNA segmentlerinin 5' ve 3' terminal bölgelerinin RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) ile çoğaltılması ve Sanger sekanslama yöntemi ile dizilerinin belirlenmesi sonucu elde edilen tüm viral genomlara ait dsRNA dizilerinin biyoinformatik ve filogenetik analizleri sonucunda, Tuber excavatum mitovirüs olarak bilinen ve resmi olarak *Triamitovirus tuex1* olarak adlandırılan bir mitovirüsün ikinci izolatı tanımlanmış ve tüm genomu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmada tanımlanan *Triamitovirus tuex1* izolat Tekirdag ve önceden tanımlanmış izolat Lammspringe, sırasıyla Türkiye ve Almanya'dan toplanan *T. excavatum* izolatlarında tanımlanmıştır. Yapılan karşılaştırmalı genom analizleri, iki virüs izolatının RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) alanını içeren proteinlerinin %94,60'lık bir benzerlik oranına sahip olduğunu göstermiştir. Viral genomların en çok farklılık gösteren kısmının %78,53'lük bir dizi benzerliği gösteren 5' translasyonu yapılmayan bölgeler (UTR'ler) olduğu, 3' UTR'lerin ise %91,53'lük bir dizi benzerliği ile en çok korunmuş kısımlar olduğu bulunmuştur. İki virüs izolatının tüm genomlarının %85,33'lük bir dizi benzerliği paylaştığı ortaya koyulmuştur. *Triamitovirus tuex1* izolatlarının aynı konak tür içinde ortaya çıkması, adaptif radyasyondan kaynaklanan bir duplikasyon olayını yansıtıyor gibi görünmektedir.

Haziran 2024, 51 sayfa

Anahtar kelimeler: *Tuber excavatum*, Fungal virüsler, dsRNA, Enfeksiyon, Mikoviral biyoçeşitlilik, ITS

ABSTRACT

Master Thesis

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF RNA MYCOVIRUSES HOSTED BY *Tuber excavatum* SAMPLES COLLECTED FROM TRAKYA REGION

Elifnaz BORA

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

Supervisor: Prof. Dr. Ilgaz AKATA

This thesis investigates the abundance and genetic characteristics of RNA mycoviruses in *Tuber excavatum* samples collected from the Trakya region. Viral Double Stranded RNA (dsRNA) screening was performed on the samples after molecular and conventional species identification. Conjugated DNAs (cDNAs) of the identified dsRNA segments were amplified by random PCR (rPZR) and analyzed by Next Generation Sequencing (NGS). As a result of bioinformatics and phylogenetic analysis of the dsRNA sequences of all viral genomes obtained by amplifying the 5' and 3' terminal regions of the identified dsRNA segments with RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) and determining their sequences by Sanger sequencing method, the second isolate of a mitovirus known as Tuber excavatum mitovirus and officially named *Triamitovirus tuex1* was identified and its entire genome was revealed. The *Triamitovirus tuex1* isolate Tekirdag and the previously described isolate Lammspringe were identified in *T. excavatum* isolates collected from Turkey and Germany, respectively. Comparative genome analyses showed that the proteins containing the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) domain of the two virus isolates had a similarity of 94.60%. The most divergent part of the viral genomes was found to be the 5' untranslated regions (UTRs) with a sequence similarity of 78.53%, while the 3' UTRs were the most conserved with a sequence similarity of 91.53%. The whole genomes of the two virus isolates were found to share 85.33% sequence similarity. Considering the shared host species, the emergence of these *Triamitovirus tuex1* isolates appears to reflect a duplication pattern resulting from adaptive radiation.

June 2024, 51 pages

Key Words: *Tuber excavatum*, Fungal viruses, dsRNA, Infection, Mycoviral biodiversity, ITS

TEŞEKKÜR

Tez sürecimde derin bilgi birikimi benimle paylaşan, ilham verici tavsiyeleri ile rehberlik ederek bana yol gösteren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Ilgaz AKATA'ya (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı), değerli zamanını benimle paylaşıp önerileriyle tezimi ileriye taşıyan, bilgi ve deneyim konusunda eğitimime çok büyük katkı sağlayan sayın hocam Doç. Dr. Ergin ŞAHİN'e (Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı), birlikte çalıştığımız süre boyunca samimiyetleri, yardımseverlikleri ve motive edici tavırlarını hep hatırlayacağım, gerek laboratuvarda gerek arazide desteklerini her zaman hissettiğim kıymetli arkadaşlarım Gülce EDİŞ, Hatice SAİF ve Eda KUMRU'ya, beni her zaman hem akademik anlamda hem de hayatta destekleyip cesaretlendiren ve yanımda olan Arş. Gör. Deniz SAREL'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı), hayatım boyunca gösterdikleri sevgi, sabır, anlayış ve destek için sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmama 121Z924 numaralı proje ile kaynak sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim. 2210-Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programları kapsamında almış olduğum burs desteği için TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'e teşekkür ederim.

Elifnaz BORA
Ankara, Haziran 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK ..... **i**

ÖZET ..... **ii**

ABSTRACT ..... **iii**

TEŞEKKÜR ..... **iv**

SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**

1. GİRİŞ **1**

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ **3**

2.1 Mantar Moleküler Teşhisinde Kullanılan Gen Bölgeleri **3**

2.2 Mikovirüslerin Yapısı ve Özellikleri **4**

2.2.1 *Mitoviridae* **4**

2.3 Dünya'da Mikovirüsler Üzerine Yapılan Çalışmalar **6**

2.4 Türkiye'de Makrofunguslarda Görülen Mikovirüsler Üzerine Yapılan Çalışmalar **8**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **11**

3.1 *Tuber excavatum* Örneklerinin Temin Edilmesi **11**

3.2 Morfolojik Laboratuvar Çalışması **12**

3.2.1 Mikroskop çalışmaları **13**

3.3 Moleküler Laboratuvar Çalışması **13**

3.3.1 Genomik DNA izolasyonu **13**

3.3.2 Agaroz jel elektroforezi **14**

3.3.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) **15**

3.4 Moleküler Çalışma Sonuçlarının Analizleri **19**

3.5 *Tuber excavatum* Örneklerinin Genomik DNA'larının Saklanması **20**

3.6 *Tuber excavatum* Örneklerinden Viral Çift Zincirli RNA (dsRNA) Ekstraksiyonu **20**

3.7 cDNA ve Random PZR **21**

3.8 Yeni Nesil Dizileme, Elde Edilen Ham Okumaların Birleştirilmesi ve Viral RNA Tüm Genom Dizilerinin Ortaya Çıkartılması **22**

3.9 dsRNA Segmentlerinin 5' ve 3' Uç Bölgelerinin RACE Yöntemi ile Çoğaltılması ve Sanger Dideoksi Zincir Sonlanması Yöntemi ile Dizilerinin Belirlenmesi 22

3.10 Tüm Viral Genomlara Ait dsRNA Dizilerinin Biyoinformatik ve Filogenetik Olarak Analiz Edilmesi 24

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 25

4.1 *Tuber excavatum* Örneklerinin Morfolojik İnceleme Bulguları 25

4.2 *Tuber excavatum* Örneklerinin Moleküler Teşhis Bulguları 26

4.3 *Tuber excavatum*'dan İzole Edilip Tüm Genom Dizisi Elde Edilmiş Virüsün Değerlendirilmesi 30

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 39

KAYNAKLAR 42

ÖZGEÇMİŞ 51

SİMGELER DİZİNİ

-	Eksi
%	Yüzde
+	Artı
°C	Santigrat
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
A	Adenin
bp	Baz Çifti
C	Sitozin
C_2H_5OH	Etanol
dH_2O	Distile Su
G	Guanin
gr	Gram
kb	Kilo Baz
M	Molarite
mg	Miligram
MgCl2	Magnezyum Klorür
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum Klorür
NaClO	Sodyum Hipoklorit
Ng	Nanogram
nm	Nanometre
nt	Nükleotid
pmol	Pikomol
T	Timin
UV	Ultraviyole
v/v	Hacimce Yüzde
w/v	Hacimde Ağırlıkça Yüzde

Kısaltmalar

aa	Amino Asit
AfMV1	Albatrellopsis flettii mitovirus 1
AmMV1	Armillaria mellea mitovirus 1
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BME	β-Merkaptoetanol
CDD	Korunmuş Alanlar Veritabanı
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CfFV1	Caloscypha fulgens fusagravirus 1
CHV-1	Cryphonectria hypovirus 1
CHV1-4	Cryphonectria hypovirus 1–4
CMV	Cucumber mosaic virus

CTAB	Setiltrimetilamonyum Bromür
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleozit trifosfatlar
dsRNA	Çift Zincirli RNA
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
FgV1	Fusarium graminearum virus 1
GePV1	Gyromitra esculenta partitivirus 1
GPS	Küresel Konumlama Sistemi
GsMV1	Geopora sumneriana mitovirus 1
HpEnV1	Hygrophorus penarioides endornavirus 1
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
ITS	Internally Transcribed Spacers
LcPV1	Leucocybe candicans partitivirus 1
LDAF1	Lipid Droplet Assembly Factor 1
LSU	Büyük Alt Birim
MeFV1	Morchella esculenta fusarivirus 1
MeFV2	Morchella esculenta fusarivirus 2
mRNA	Mesajcı RNA
MUSCLE	Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
ORF	Açık Okuma Çerçevesi
PD	Primer-dimerleri
PVP	Polivinilpirolidon
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
rDNA	Ribozomal DNA
RdRp	RNA'ya Bağımlı RNA Polimeraz
RNA	Ribonükleik Asit
Rpm	Dakikada Devir
rPZR	Rastgele PZR
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
spp.	Tür
ssRNA	Tek Zincirli RNA
SSU	Küçük Alt Birim
TBE	Tris/Borik asit/EDTA
TcPV1	Terfezia claveryi partitivirüs 1
TeV	*Triamitovirus tuex1*
Tm	Erime Sıcaklığı
TMV	Tobacco mosaic virus
UTR	Çevrilmeyen (translasyonu yapılmayan) Bölgeler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Fungal rDNA ITS bölgesinin şematik gösterimi 3
Şekil 2.2 Mitovirüslerin şematik gösterimi 5
Şekil 3.1 Arazi yapılan alanlar ve dedektör köpeklerin görselleri 12
Şekil 4.1 Tuber excavatum örneklerinin ışık mikroskobu ve SEM/ taramalı elektron mikroskop çekimleri: 26
Şekil 4.2 25 örneğe ait jel görüntüleri. ITS1-ITS4 primerleri ile genomik DNA'lardan yapılan PZR'ler sonucunda amplifiye olmuş örneklerin agaroz jelde yürütülmüş hali 27
Şekil 4.3 ITS primerleri ile amplifikasyon sonucu alınamayan örneklerin Yuvalanmış PZR jel görüntüsü 28
Şekil 4.4 *Tuber excavatum* örneklerinin filogenetik ağacı 30
Şekil 4.5 *Tuber excavatum*'dan izole edilen dsRNA için yapılan RACE PCR sonuçları 31
Şekil 4.6 Triamitovirus tuex1 Isolate Tekirdag ve diğer mitovirüslerin RdRp dizilerinin çoklu hizalamasına dayalı maksimum olasılıklı filogenetik ağaç. . 35
Şekil 4.7 Triamitovirus tuex 1 izolatı ve Triamitovirus cinsi içindeki yakın akraba virüsler arasında RdRp korunmuş motiflerinin (N-terminalinden C-terminaline sırayla F, A, B, C, D ve E) karşılaştırılması gösterilmektedir. Eşleşen amino asit kalıntıları sarı kutularda vurgulanırken, benzer kimyasal özellikleri paylaşan amino asit kalıntıları gri ve yeşil kutularda 36
Şekil 4.8 *Triamitovirus tuex1* Isolate Tekirdag'ın Isolate Lammspringe ile genom organizasyonunun şematik gösterimi. 37
Şekil 4.9 Triamitovirus tuex1 Isolate Tekirdag'ın 5'- (sol) ve 3'-terminallerinin (sağ) tahmin edilen ikincil yapısı. 38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Mitovirüslerin sınıflandırılması 5
Çizelge 3.1 Tez örneklerinin numarası, konumu ve habitatı 11
Çizelge 3.2 ITS PZR çözeltisinin içeriği 18
Çizelge 3.3 PZR ısıl döngü basamakları 18
Çizelge 3.4 rPZR ısıl döngü koşulları 22
Çizelge 4.1 *Tuber excavatum* örneklerinden izole edilen genomik DNA'ların saflık ve miktarlarının Nanodrop cihazında ölçüm sonuçları 26
Çizelge 4.2 BLASTn analiz sonuçları 28
Çizelge 4.3 Tüm genomu elde edilen virüsün özellikleri 38

1. GİRİŞ

Mantarlar, ekosistemlerde ayrıştırıcı, patojen ve simbiyont olarak pek çok farklı rol üstlenen çeşitli ökaryot organizmaların oluşturduğu bir alemdir. Ekosistemlerde besin döngüsü ve ayrıştırma süreçleri için hayati öneme sahip olan mantarlar, organik maddeleri parçalar (van der Heijden vd. 2015). Bazı mantarlar ekonomik öneme sahip bitkilerin ve çeşitli hayvanların patojenleridir ve tarımı, ormancılığı ve insan sağlığını etkileyen hastalıklara neden olurlar (Fisher vd. 2012). Doğadaki konumlarının dışında mantarların birçok endüstriyel uygulaması vardır, bunlar arasında gıda fermentasyonu, ilaç ve enzimlerin üretimi bulunur (Machida vd. 2008).

Tuber cinsi, toprak altı askomata ile bilinen ektomikorizal mantarları içerir (Akata vd. 2020). *Tuber* türlerinin birçok ağaç türü ile ektomikorizal birliktelikler kurduğu bilinmektedir (Patel 2012, Wanet vd. 2017). *Tuber* üyeleri temel olarak küresel ve lobludur, toprak altında büyüyen askomata ile katı ve sert glebaya sahiptir. Genellikle peridyum mermerimsi, pürüzsüz bir görünüme sahiptir. Askus, küresel veya armut biçimli olup genellikle 1-6 sporludur (Hansen and Knudsen, 2000).

Tuber excavatum, olgunlaştıktan sonra soluk sarımsı kahverengiden kırmızımsı kahverengi bir renge dönüşen yeraltı meyve gövdeleri ile ayırt edilir. Bu askomalar genellikle küresel veya hafif lobludur ve belirgin bir boşluğa sahiptir. İçindeki gleba beyaz veya saman renginde başlar ve dallanan sarımsı damarlardan oluşan bir ağ ile giderek koyulaşarak kırmızımsı kahverengiye dönüşür. Bu tür tipik olarak kalkerli topraklarda gelişir ve burada hem yaprak döken hem de kozalaklı ağaçlarla simbiyotik ilişkiler kurar (Castellano ve Türkoğlu 2012, Fan vd. 2013).

Virüsler, mantarlar ile bazen asemptomatik bazen de parazitik olabilen ilişkiler kurarlar ve hayvanlardan mikroorganizmalara kadar tüm yaşam formları virüsler tarafından enfekte edilebilir (Roossinck 2011). Virüsler zorunlu hücre içi parazitlerdir ve replikasyon için tamamen konak hücreye bağımlıdırlar ve virüslerin genetik materyali DNA veya RNA'dan oluşabildiği gibi tek veya çift zincirli de olabilir (Louten 2016).

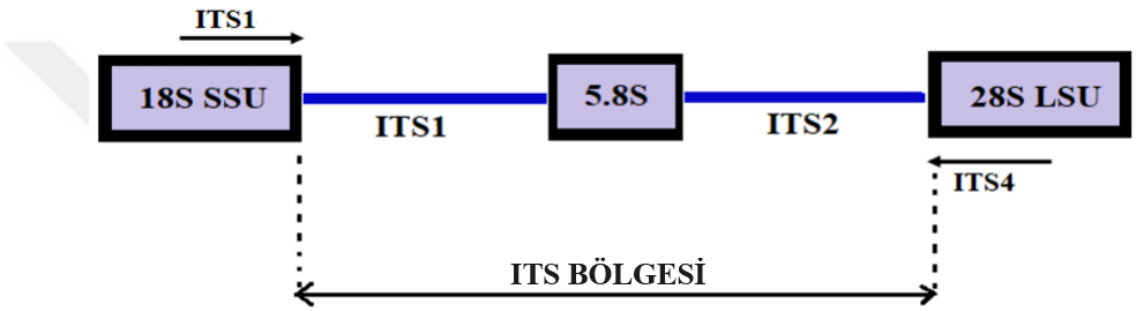
Mikovirüsler tüm büyük mantar taksonlarında tanımlanmıştır ve yeni tanımlanan türlerin sayısı artmaktadır (Ghabrial vd. 2015). Karakterize edilen mikovirüslerin çoğu, tek zincirli veya çift zincirli RNA'dan oluşan bir RNA genomuna sahiptir. Genel olarak, mikovirüsler hücre dışı fazı olmayan viral elementler olarak kabul edilir (Bartholomäus vd. 2016). Mantarlardaki RNA virüslerinin çeşitliliği göz önüne alındığında, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) geni, RNA virüsleri arasında evrensel olarak korunan tek gendir ve ilgili virüsler arasındaki evrimsel ilişkilerin tanımlanması için önem taşımaktadır (te Velthuis 2014).

Mitoviridae familyasına ait olan *Mitovirus* cinsinin üyeleri olan mitovirüsler, replikasyon bölgesi olarak konağa ait mitokondriyi kullanır, viryon oluşturmaz ve viral translasyon ve replikazın tanınmasından sorumlu olan farklı boyutlarda 5' ve 3' UTR'lere sahiptir (Akata vd. 2021). Tek parçalı, doğrusal, ssRNA(+) yapıda bir genomu vardır. Bitki ve entomopatojenik mantarlarda birçok mitovirüs tanımlanmıştır (Nibert vd. 2019).

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Mantar Moleküler Teşhisinde Kullanılan Gen Bölgeleri

Fungal ribozomal DNA (rDNA) Internally Transcribed Spacers (ITS) bölgeleri, mantar türlerini PZR ve dizi analizi ile ayırt etmede büyük öneme sahip yüksek değişkenlik gösteren dizilerdir. Bu nedenle mantar rDNA'sının ITS bölgelerini başarılı bir şekilde amplifiye eden primerler geliştirilmiştir (Martin ve Rygiewicz, 2005).



Şekil 2.1 Fungal rDNA ITS bölgesinin şematik gösterimi (Das vd. 2023)

Şekil 2.1'de gösterilen şema, 5.8S segmentiyle ayrılmış ITS1 ve ITS2 bölgelerinden oluşur. ITS1 ve ITS4, tüm ITS bölgesini çoğaltmak için yaygın olarak kullanılan evrensel ileri ve ters primerlerdir (Das vd. 2023).

Mantar ITS bölgeleri ile çalışmak için uygun görülen PZR primerleri, 5.8S-kodlama dizisi etrafında bulunan ITS1 ve ITS2 dizilerini amplifiye eden, bu tez çalışmasında da kullanılmış olan evrensel "ITS1" ve "ITS4" primerleridir. 5.8S kodlama dizisinin etrafında konumlanmış olan ribozomal operonun Küçük Alt Birim Kodlama Dizisi (SSU) ile Büyük Alt Birim Kodlama Dizisi (LSU) arasında bulunan ITS1 ve ITS2 dizilerini amplifiye etmek için ITS1 VE ITS4 primerleri kullanılır (White vd. 1990).

2.2 Mikovirüslerin Yapısı ve Özellikleri

Mantarları enfekte eden 23 familya ve bir sınıflandırılmamış cins şu anda Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV) tarafından tanınmaktadır ve son yıllarda birçok yeni virüs türü tanımlanmaya devam etmektedir (https://doi.org/10.3390/v15051202). Bu nedenle mikovirüslerin (mantar virüslerinin) taksonomisi hızla gelişmekte ve NGS yaklaşımı sayesinde mikovirüs keşiflerinin yakın gelecekte büyük miktarda artması beklenmektedir. Mikovirüsler, mantarlar alemi boyunca yaygın olarak bulunur. Mikoviral araştırmanın odak noktası, daha çok tarım alanına yönelik olarak bitki patojeni olan mantarları enfekte eden virüsler olmuştur. Bu virüslerin bazılarının konaklarının virülansını azaltma yeteneğine sahip olduğu anlaşılmıştır ve dolayısıyla bu mikovirüsler, konak olarak kullandıkları patojen mantarların biyokontrol ajanları olarak hareket etme potansiyeline sahiptir (Hough vd. 2023).

Genel olarak mikovirüsler, pozitif (+) veya negatif (-) anlamlı tek zincirli RNA (ssRNA) veya çift zincirli RNA (dsRNA) şeklinde bulunabilen RNA genomlarına sahiptir (Domingo ve Holland 1997). DNA genomlarına sahip mikrovirüsler daha az miktarda olmalarına rağmen varlıkları bilinmektedir. (Ghabrial vd. 2015). Tüm mikovirüs türlerinde hücre dışı enfeksiyon rotası eksiktir. Dolayısıyla, bir bireyden diğerine taşınmaları hücresel mekanizmalarla sınırlıdır (Voth vd. 2006). En yaygın iki iletim şekli vardır, bunlar aynı mantar türünün hiflerinin sitoplazmik birleşmesi (anastomoz) sonucu olan yatay aktarım ve eşeysiz spor üretimi yoluyla dikey aktarımdır (Pearson vd. 2009, Xie ve Jiang 2014).

2.2.1 *Mitoviridae*

Mitovirüsler, *Mitoviridae* familyasının üyeleri olup, boyutları 2,1 ila 4,9 kb arasında değişen pozitif anlamlı, tek zincirli RNA (ssRNA) genomlarına sahip, kapsitsiz RNA virüslerinden oluşur (Hillman ve Cai 2013, Koonin vd. 2020). Mitovirüslerin sahip olduğu tek bir açık okuma çerçevesi (ORF), konağın mitokondriyal genetik kodunu kullananarak, altı korunmuş amino asit dizisi motifini içeren bir RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) alanını kodlamakla görevlidir. İlk olarak mantarlarda tanımlanan,

bitkileri ve böcekleri etkileyen *Mitoviridae* familyasının yeni üyeleri yakın zamanda belgelenmiştir (Bruenn vd. 2015, Nibert vd. 2018, Fonseca vd. 2020). *Mitoviridae* ailesi tanımlanmış dört cins içerir: *Unuamitovirus, Duamitovirus, Triamitovirus* ve *Kvaramitovirus* (https://ictv.global/taxonomy). Mitovirüslerin sınıflandırılması çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Mitovirüslerin sınıflandırılması

Üst Alem	*Virus*
Alan	*Riboviria*
Alem	*Orthornavirae*
Bölüm	*Lenarviricota*
Sınıf	*Howeltoviricetes*
Takım	*Cryppavirales*
Familya	*Mitoviridae*
Cins	*Mitovirus*

Şekil 2.2'de gösterildiği üzere, Mitovirüslerin gerçek viryonu yoktur, yapısal olmayan proteinler içerirler. Genomlar, sitoplazmada RdRp'ler ile ilişkilidir. 2,5-2,9 kb'lik tek parçalı, doğrusal, ssRNA(+) yapıda bir genomu vardır. Viryon, hem genomik hem de viral mRNA olma özelliğine sahiptir. Genom, RNA'ya bağımlı bir RNA polimerazı kodlayan bir ORF'ye sahiptir. Görsel https://viralzone.expasy.org/9862?outline=all_by_species sitesinden alınmıştır.



Şekil 2.2 Mitovirüslerin şematik gösterimi

2.3 Dünya’da Mikovirüsler Üzerine Yapılan Çalışmalar

1948'de, ticari olarak üretilen yenilebilir mantar *Agaricus bisporus*'ta bir hastalık bildirilmiştir ve 'La France' hastalığı olarak adlandırılmıştır (Sinden ve Hauser 1950). Ekonomik olarak önemli olan *Agaricus bisporus*'ta görülen hastalığın nedeni olarak mikovirüslerin tanımlanması on yıldan fazla sürede gerçekleşmiştir (Hollings 1962). Bu keşif, mikoviroloji alanının hızla ortaya çıkmasını sağlanmıştır. Kısa bir süre sonra askomiset *Penicillium stoloniferum*'u enfekte eden mikovirüsler ortaya çıkarılmış ve devam eden çalışmalar sayesinde bu virüslerin memeli canlılarda interferon uyarımına sebebiyet verdikleri anlaşılmıştır (Ellis ve Kleinschmidt 1967, Banks vd. 1969). Ancak, mikoviroloji alanında büyük bir atılım 1970'lerde gerçekleşmiştir. Kestane yanıklık hastalığına neden olan patojen mantar *Cryphonectria parasitica*'nın bir mikovirüsünün, konakçısının virülansını azalttığı belirlenmiş ve bu bitki patojenik mantarla mücadelede biyokontrol ajanı olarak bu mikovirüsün kullanılabileceği anlaşılmıştır (Van Alfen vd. 1975). Bu potansiyelin keşfi, bitki patojeni olan mantarlarda mikovirüslerin tespit edilmesine ve araştırılmasına duyulan ilginin artmasına yol açmıştır. Bu dönemde yaşanan önemli bir gelişme, şarap, bira ve ekmek yapımında kullanılan maya *Saccharomyces cerevisiae*'de 'katil maya' fenotipini indükleyen mikovirüslerin keşfi olmuştur (Berry ve Bevan 1972). Bu mikovirüsler, mantar konaklarıyla ekstraselüler toksinler üreterek rekabet eden suşları ortadan kaldırmışlardır (Maske vd. 2022).

Mantar virüslerinin ortaya çıkışıyla ilgili farklı teoriler öne sürülmüştür. 'Eski evrim teorisi', mikovirüsler ile mantarlar arasındaki ilişkinin eski olduğunu ve uzun süreli ortak evrimi yansıttığını öne sürmektedir (Son vd. 2015, Ghabrial vd. 2015). Mikovirüslerin ekstraselüler olarak bulaşmaması, aynı virüslerin diğer mantar türlerine bulaşmasını zorlaştırır ve dolayısıyla mikovirüsler tek bir konakta var olan, bireysel virüsler olarak kalırlar (Donaire vd. 2016). Neupane ve ekibi (2018) tarafından yürütülen bir çalışma da bu teoriyi desteklemektedir. Konağına zararlı etkisi bulunmayan arbusküler mikorizal mantarlardan gelen mitovirüslerin dizilerinin yüksek derecede korunduğu ve diğer bitki patojenik mantarlardan gelen mitovirüslerle evrimsel olarak bağlantılı oldukları RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) dizilerinin filogenetik analizi ile ortaya çıkarılmıştır (Neupane vd. 2018).

Öte yandan, 'bitki virüsü teorisi', mikovirüslerin bitki konakçıdan mantara geçmiş olduklarını öne sürer (Son vd. 2015). Bu teorinin desteklenmesi için yapılan çalışmalar, mikovirüslerin filogenetik ağaçlarında genellikle bitki virüsleri ile kümelendiklerini göstermiştir (Nibert vd. 2014, Li vd. 2019). Bir çalışmada, mikovirüs olan Cryphonectria hypovirus 1–4 (CHV1-4), Fusarium graminearum virus 1 (FgV1) ve Botrytis virus X virüslerinin, bitkileri enfekte eden potivirüslerle veya potex benzeri virüslerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ghabrial vd. 2015). Mikovirüslerin çoğunun bir hareket proteinine sahip olmaması ve bazılarında genetik materyali kaplayan bir kapsit proteini bile olmaması, virüslerin mantar konaklarına daha iyi uyum sağlamak için işlevsiz genlerini kaybetmiş olabileceklerini işaret etmektedir (Donaire vd. 2016). Bir çalışmada, Cucumber mosaic virus (CMV) doğal yollarla patates bitkilerinden *Rhizoctonia solani*'ye aktarımını göstererek bazı virüslerin bitkiler ve mantarlar arasında kendiliğinden çapraz alem taşınması yapabildiği gösterilmiştir (Andika vd. 2017).

Bir diğer teori bitki virüslerinin bir mantardan bir bitkiye bulaşmasını öne sürer. ‘Bitki virüsü teorisi’nin araştırılması yapılan aynı çalışmada, CMV'nin *R. solani*'den bitki konakçıya geçtiği gösterilmiştir (Andika vd. 2017). Çapraz alem aktarımı, çoğu mikovirüs hattının bitki virüslerine bir atasal bağlantısı olduğu düşünüldüğünde, mikovirüslerin evriminde önemli bir nokta olarak öne sürülmüştür (Roossinck vd. 2019). Daha sonra yapılan başka bir çalışmada da mitoviral dizilerin *Botrytis cinerea* ve salatalık arasında çapraz aktarımını gösterilmiştir (Wang vd. 2022).

Mantarlar ve bitkiler arasında mikovirüs aktarımının bir bitki virüsü aracılığıyla olabileceği de alternatif bir yol olarak önerilmiştir. Bian (2020) tarafından yapılan bir çalışma, bir mantar virüsü olan Cryphonectria hypovirus 1 (CHV-1)'in, bir bitki virüsü olan Tobacco mosaic virus (TMV) ile aşılandığında *Nicotina tabacum*’u enfekte edebildiğini göstermiştir, bu da bazı virüslerin bitki-mantar sistemlerinde potansiyel bir etkileşime sebep olabileceğine işaret etmektedir (Bian vd. 2020). Cao ve ekibi (2022) tarafından yapılan çalışmada 11 farklı bitki virüsünün *Alternaria*, *Lecanicillium* ve *Sarocladium* gibi birkaç bitki patojenik mantar cinsini geçici olarak enfekte ettiği gösterilmiştir (Cao vd. 2022). Ancak, yeterince güçlü kanıt ve veri eksikliği nedeniyle, mikrovirüslerin kesin kökenleri hala belirsiz kalmaktadır.

2.4 Türkiye'de Makrofunguslarda Görülen Mikovirüsler Üzerine Yapılan Çalışmalar

2019 yılında yayınlanan çalışmada, ektomikorizal mantar *Geopora sumneriana* (Cooke) M. Torre'dan bir çift zincirli RNA (dsRNA) segmenti izole edilmiştir. Yapılan dizi analizi sonucunda, bu dsRNA segmentinin sahip olduğu açık okuma çerçevesinin *Tuber excavatum* mitovirüsü ile yüksek derecede benzerlik gösteren bir RNA bağımlı RNA polimerazı (RdRp) kodladığı ortaya konmuştur. Bu dsRNA segmenti, "Geopora sumneriana mitovirus 1" (GsMV1) olarak adlandırılan yeni bir mitovirüsün genom replikasyonundaki ara ürünün simgesidir. Yapılan filogenetik analiz sonucu, GsMV1'in *Narnaviridae* familyasına ait olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, *G. sumneriana*'da bir mitovirus genom dizisinin ilk raporudur (Sahin ve Akata, 2019).

Sarcosphaera coronaria'yı birlikte enfekte eden çeşitli farklı partitivirüslerin varlığı ortaya konmuştur. Mantar izolatının askokarp örneğinden *Alphapartitivirus* ve *Betapartitivirus* üyeleriyle ilgili toplam 75 tam ve kısmi dizi tespit edilmiştir. Tanımlanan partitivirüslerin iki genom segmentini eşleştirmek ve tek bir konakta birlikte yaşayan bireysel türleri ayırt etmek amacıyla dokuz olası genom segment çifti tanımlanmıştır (Sahin vd. 2020).

Albatrellopsis flettii'yi enfekte eden yeni bir mitovirüsün tüm genom sekansı belirlenmiş ve analiz edilmiştir. AfMV1'in filogenetik analizi, bu virüsün *Mitoviridae* familyası içinde *Mitovirüs* cinsine ait yeni bir üye olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, *Albatrellopsis flettii'*den izole edilen yeni bir mitovirus olan AfMV1'in tüm genom dizisinin ilk raporu olma özelliğine sahiptir (Akata vd. 2021).

2021 yılında yayınlanan bir çalışmada, *Hygrophorus penarioides'*te tespit edilen büyük bir dsRNA segmenti karakterize edilmiştir. Bu virüs, Hygrophorus penarioides endornavirus 1 (HpEnV1) olarak adlandırılmıştır. Poliprotein sekansı kullanılarak yapılan BLASTp taraması sonucunda elde edilen bilgiler, HpEnV1 ile en çok dizi benzerliği gösteren, tam olarak dizilenmiş endornavirüsün Ceratobasidium endornavirus B olduğunu ortaya koymuştur (Sahin vd. 2021a).

Caloscypha fulgens'te bir dsRNA mikovirüsünün varlığı rapor edilmiştir. "Caloscypha fulgens fusagravirus 1" (CfFV1) olarak adlandırılan yeni bir dsRNA virüsü, *C. fulgens*'in tek bir askokarpından izole edilmiş ve moleküler özellikleri ortaya çıkarılmıştır. Genom organizasyonu, dizi benzerliği ve filogenetik analiz, bu virüsün *Fusagraviridae* familyasının yeni bir üyesine ait olduğunu göstermektedir. Bu, *C. fulgens*'de bir mikovirüsün varlığına dair ilk rapordur (Sahin vd. 2021b).

*Leucocybe candicans'*ta tespit edilen ve "Leucocybe candicans partitivirus 1" (LcPV1) olarak adlandırılan yeni bir partitivirüs tanımlanmıştır. Kapsid proteini ve RNA'ya bağlı RNA polimeraz dizilerine göre yapılan filogenetik analizler, LcPV1'i *Alphapartitivirus* cinsinin yeni bir üyesi olarak sınıflandırmıştır. Bu rapor, *Leucocybe candicans*'ta tanımlanan bir mikovirüsü tanımlayan ilk rapordur (Sahin vd. 2021c).

Bir diğer çalışmada, *Gyromitra esculenta*'dan izole edilen ve "Gyromitra esculenta partitivirus 1" (GePV1) olarak adlandırılan yeni bir partitivirüs tanımlanmıştır. Kapsid proteini ve RNA'ya bağlı RNA polimeraz dizilerine dayanan filogenetik analiz, GePV1'i *Alphapartitivirus* cinsi, *Partitiviridae* familyasının bir üyesi olarak sınıflandırmıştır. Bu çalışma, *Gyromitra esculenta*'da tespit edilen yeni bir partitivirüs hakkında rapor veren ilk çalışmadır (Sahin vd. 2021d).

Morchella esculenta'dan ekstrakte edilen çift zincirli RNA'ların sekanslanmasıyla *Fusariviridae* familyasına ait iki varsayılan mikovirüs tanımlanmıştır. Bu mikovirüsler geçici olarak Morchella esculenta fusarivirus 1 (MeFV1) ve Morchella esculenta fusarivirus 2 (MeFV2) olarak adlandırılmıştır. MeFV1 ve MeFV2, *M. esculenta*'da tanımlanan ilk fusarivirüslerdir ve bu yayın viral RdRp'de Promethin/LDAF1 alanının varlığını bildiren ilk çalışmadır (Sahin vd. 2021e).

2023 yılında yayınlanan çalışmada, *Terfezia claveryi*'i enfekte eden yeni bir partitivirüs tanımlanmış ve "Terfezia claveryi partitivirüs 1" (TcPV1) olarak adlandırılmıştır. RdRp dizisine dayalı filogenetik analizler, TcPV1'in *Partitiviridae* familyasına ait *Betapartitivirus* cinsinin üyelerinden biri olarak sınıflandırılması gerektiğini göstermiştir.

Bu bulgular, *T. claveryi*'nin konaklık ettiği bir partitivirüsün ilk raporudur (Sahin vd. 2023).

Ankara Üniversitesi 10. Yıl yerleşkesi'nden *Hebeloma mesophaeum*'u doğal olarak enfekte eden üç yeni partitivirüsün tanımlanması ve tüm genom karakterizasyonu hakkında rapor sunulmuştur. Viral sekans analizleri sırasında, *Leucocybe candicans*'tan daha önce tanımlanan ve bildirilen partitivirüs (LcPV1) ile aynı türden olan bir partitivirüs tespit edilmiştir. İki farklı mantar örneği, araştırma alanında birbirlerine yakın mesafelerde fruktifikasyon meydana getirmektedir. İlgili makalede bu virüs bulaşmasının doğası, türler arası geçici misel teması hipoteziyle ilişkili olarak tartışılmıştır (Akata vd. 2023).

2024 yılında yayınlanan çalışmada, *Armillaria* cinsi üzerine araştırma yapılmıştır. *Armillaria mellea*'nın sporofor örneklerinde yeni bir mitovirüs bulunmuştur ve "Armillaria mellea mitovirus 1" (AmMV1) olarak isimlendirilmiştir. Moleküler filogenetik analizler, AmMV1'in *Mitoviridae* familyasına ait *Duamitovirus* cinsinin bir üyesi olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma, *Armillaria mellea'*da tanımlanan bir mitovirüsün ilk örneğini temsil etmektedir (Erkmen vd. 2024).

İki farklı *Terfezia claveryi* izolatında, *Alsuviricetes* sınıfından dört farklı üye, Terfezia claveryi flexivirus 1 (TcFV1) olarak adlandırılan bir flexivirüs ve üç endornavirüs (TcEV1, TcEV2 ve TcEV3) ortaya çıkarılmıştır. TcFV1'in keşfi, *Tymovirales* takımındaki mikovirüslerin genomik plastisitesine katkıda bulunarak evrimsel adaptasyonlarına ışık tutmaktadır. Ek olarak, *T. claveryi*'de yeni keşfedilen üç endornavirüs (TcEV1, TcEV2 ve TcEV3), diğer endornavirüslerle sınırlı dizi benzerlikleri ve ayırt edici özellikler sergilemiş ve *Alphaendornavirus* cinsi içinde yeni türlerin üyeleri olarak sınıflandırıldıklarını göstermiştir. *T. claveryi*'deki endornavirüslerin keşfi ile ayırt edici bir genom yapısına sahip yeni bir flexivirüsün tanımlanması, mikovirüs çeşitliliği ve evrimi hakkındaki anlayışı geliştirmektedir (Akata vd 2024).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 *Tuber excavatum* Örneklerinin Temin Edilmesi

25 adet *Tuber excavatum* örneğinin toplanması için yapılan arazi çalışması, 2022-2023 yılları arasında Trakya Bölgesi'nin Türkiye sınırları içinde kalan bölümünde gerçekleştirilmiştir. Toplanan örnekler, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde bulunan Fungaryum'da muhafaza edilmektedir. Örneklerin numara, konum ve habitat bilgileri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Tez örneklerinin numarası, konumu ve habitatı

Tez Örnek Numarası	Proje Örnek Numarası	İl, İlçe	Habitat
1	AKATA&SAHIN TT 002	Tekirdağ	Meşe ağacı altı
2	AKATA TT 110	Vize, Kırklareli	Ihlamur ağacı altı
3	AKATA TT 146	Merkez, Kırklareli	Kayın ağacı altı
4	AKATA TT 154	Merkez, Kırklareli	Kayın ağacı altı
5	AKATA TT 204	Pınarhisar, Kırklareli	Meşe ağacı altı
6	AKATA TT 271	Pınarhisar, Kırklareli	Meşe ağacı altı
7	AKATA TT 298	Keşan, Edirne	Çam ağacı altı
8	AKATA TT 363	Vize, Kırklareli	Gürgen ağacı altı
9	AKATA TT 374	Vize, Kırklareli	Gürgen ağacı altı
10	AKATA TT 412	Pınarhisar, Kırklareli	Meşe ağacı altı
11	AKATA TT 427	Keşan, Edirne	Çam ağacı altı
12	AKATA TT 454	Keşan, Edirne	Gürgen ağacı altı
13	AKATA TT 456	Vize, Kırklareli	Gürgen ağacı altı
14	AKATA TT 459	Keşan, Edirne	Meşe ağacı altı
15	AKATA TT 462	Keşan, Edirne	Meşe ağacı altı
16	AKATA TT 494	Saray, Tekirdağ	Meşe ağacı altı
17	AKATA TT 517	Pınarhisar, Kırklareli	Meşe ağacı altı
18	AKATA TT 518	Pınarhisar, Kırklareli	Meşe ağacı altı
19	AKATA TT 523	Pınarhisar, Kırklareli	Meşe ağacı altı
20	AKATA TT 532	Vize, Kırklareli	Kayın ağacı altı
21	AKATA TT 542	Vize, Kırklareli	Meşe ağacı altı
22	AKATA TT 543	Vize, Kırklareli	Meşe ağacı altı
23	AKATA TT 545	Vize, Kırklareli	Meşe ağacı altı
24	AKATA TT 546	Vize, Kırklareli	Meşe ağacı altı
25	AKATA TT 551	Vize, Kırklareli	Meşe ağacı altı



Şekil 3.1 Arazi yapılan alanlar ve dedektör köpeklerin görselleri

Şekil 3.1'de gösterilen alanlardan toplana önekler, mikoriza yaptıkları ağaca ait bir yaprakla beraber doğal ortamında fotoğraflanmıştır. Arazi boyunca, arazi defterine öncelikle örneğe verilen numara ve tarih sonrasında GPS cihazı kullanılarak örneğin toplandığı yerin yüksekliği ve koordinatları, örneğin yetiştiği substratın ve habitatın özellikleriyle birlikte kaydedilmiştir.

3.2 Morfolojik Laboratuvar Çalışması

Arazide toplanan örnekler, olası mikroorganizma kontaminasyonuna karşın ilk olarak % 2'lik sodyum hipoklorit (NaClO) solüsyonunda 3 dakika, sonrasında %70'lik etanol (C_2H_5OH) solüsyonunda 10 saniye işlem görmüştür. Dekontaminasyon işleminin ardından örnekler distile su ile yıkanmıştır. Yıkanan örnekler, taşınabilir mantar kurutma makinesinde 40°C'de 8 saat boyunca kurutulmuştur.

3.2.1 Mikroskop çalışmaları

Kurutulmuş örneklerin özelliklerini ve morfolojik yapılarını mikroskop altında incelemek üzere kesitler alınmıştır. Kesiti alınan bu yapıların, 10x10, 10x40 ve 10x100 büyütme oranlarında görüntülenerek mikroskobik fotoğrafları çekilmiştir. Mikroskobik çalışmalar sırasında farklı kimyasallar (distile su, kongo kırmızısı, %5'lik potasyum hidroksit) kullanılmıştır. Sporların daha detaylı incelenmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) altında da görüntü alınmıştır.

3.3 Moleküler Laboratuvar Çalışması

3.3.1 Genomik DNA izolasyonu

Kurutulmuş *Tuber excavatum* örnekleri bıçaklı homojenizatörle mekanik olarak toz haline getirimiştir. Örneklerin moleküler teşhisi için genomik DNA izolasyonunda etkili ve uygun maliyetli bir yöntem olan CTAB (Setiltrimetilamonyum bromür) (Doyle 1991) metodu kullanılmıştır.

CTAB Metodu

1) Öğütülerek toz hale getirilmiş örneklerden 50 mg alınarak 1,5 mL'lik ependorf tüplerine konulmuştur.
2) Örneklerin üzerlerine pH'ı 8 olan 50 mL'lik CTAB (CTAB, NaCl, EDTA, Tris, PVP, BME) lizis tamponundan 1 mL ilave edilmiştir. CTAB stoğu +4 °C soğutucuda muhafaza edilmiştir.
3) Örnekler 3 dakika boyunca vorteks ile karıştırılmış ve 60°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
4) Hücre zarının parçalanması aşamasından sonra örnekler 10 dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Üst fazdan 600 µL alınıp yeni tüplere aktarılmıştır.

5) Süpernatantların üzerine oda sıcaklığında muhafaza edilen kloroform-izoamilalkol (24:1 oranında) çözeltisinden 250 µL ilave edilmiştir. Karışım 10-15 saniye vorteks ile karıştırıldıktan sonra 5 dakika 13000 rpm'de santrifüjlenmiştir.

6) Santrifüj sonunda oluşan üst fazlar dikkatlice yeni tüplere alınmış ve üzerlerine 1:1 hacimde -20°C'de saklanan izopropil alkolden ilave edilmiştir. Tüpler 10 kez nazikçe alt üst edilerek karıştırılmıştır.

7) Örnekler 13000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve genomik DNA'lar pelet halinde çöktürülmüştür.

8) Tüplerdeki üst fazlar santrifüj sonunda atılmıştır ve tüpün dibine çöken DNA peletleri iki kez %70'lik etanol ile yıkandıktan sonra etanol kalıntılarından tamamen kurtulmak için tüpler ağızları hafif açık bir şekilde 60°C'de birkaç dakika bekletilmiştir.

9) Etanolden arındırılmış ve kısmen kurutulmuş DNA peletleri, peletin boyutuna uygun hacimde nükleazsız distile su ile önce kuru blokta 60°C'de birkaç dakika bekletilmiş daha sonra pipetleme yapılarak çözülmüştür.

10) Örneklerden izole edilen genomik DNA'ların saflık derecelerini ve miktarlarını spektrofotometrik olarak belirlemek için Nanodrop Lite cihazı kullanılmıştır. Cihazı kalibre etmek için 1,5 µL peletlerin çözüldüğü nükleazsız distile su kullanılmıştır. İzole edilen genomik DNA'lardan da 1,5 µL alınarak ölçüm yapılmıştır.

11) İzole edilen genomik DNA'ların bütünlükleri agaroz jelde elektroforetik olarak gözlemlenmiştir. Agaroz jel elektroforezi, Sambrook'un (1989) yürüttüğü şekilde standart olarak yapılmıştır (Sambrook vd. 1989).

12) DNA örnekleri güvenli mavi ışık transillüminatörü ve interkalatör safe green boyası kullanılarak görüntülenmiştir. DNA belirteci olarak 1kb Plus DNA Ladder kullanılmıştır.

3.3.2 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, 100 bp ile 25 kb arasındaki değişen boyuttaki DNA parçalarını ayırmak için en etkili yoldur (Sambrook ve Russell, 2001). Agaroz maddesi, *Gelidium* ve *Gracilaria* isimli deniz yosunu cinslerinden izole edilir ve tekrarlanan agarobioz (L- ve D- galaktoz) alt birimlerinden oluşur (Kirkpatrick vd. 1991).

DNA'yı agaroz jelde ayırmak için, DNA önceden hazırlanıp katılaşmış jelin haznelerine yüklenir ve uygun miktarda bir elektrik akımı uygulanır. DNA (ve RNA) molekülünün fosfat grubu negatif yüklü olduğu için DNA elektrik alan içine yerleştirildiğinde, DNA parçaları pozitif yüklü anoda doğru hareket eder. DNA'nın homojen kütle/yük oranına sahip olması nedeniyle, DNA molekülleri agaroz jel içinde boyuta göre ayrılır ve göç edilen mesafe, molekül ağırlığının logaritması ile ters orantılı bir şekilde ilerler (Helling vd. 1974). Bir DNA molekülünün jel içindeki göç hızı, aşağıdaki faktörlerle belirlenir:

- DNA molekülünün boyutu
- Agaroz konsantrasyonu
- DNA konformasyonu (Aaji ve Borst, 1972)
- Uygulanan gerilim
- Agarozun türü
- Elektroforez tamponu

Yapılan deneyde, jel ve tank tamponu olarak 0,5 M 500 mL TBE (Tris Base, Boric Acid, EDTA) tamponu kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforezinde agaroz konsantrasyonu %0,8 olarak kullanılmıştır. Elektroforez işleminde voltaj, elektrotlar arası mesafe santimetre başına 5-volt olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.3.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, belirli bir DNA segmentinin milyonlarca kopyasını hızla çoğaltmak için kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. *Thermus aquaticus*'tan izole edilen DNA polimeraz I enzimi kullanılarak DNA veya ribonükleik asit (RNA) dizilerinin kısa segmentlerini denatüre edilir ve yeniden yapılandırılır (Lorenz 2012).

PZR, bir test tüpünde DNA'nın kısa bir segmentine spesifik olarak odaklanan bir prosedürdür (Markham 1993). PZR prosedürlerinde bir dizi tekrarlayan denatürasyon ve renatürasyonu içerir ve ısıl stabil özelliği nedeniyle tercih edilen Taq polimeraz enzimi, yüksek sıcaklığa rağmen DNA sentezinin devam etmesine izin verir (Lorenz, 2012). PZR,

yüksek duyarlılığı nedeniyle birçok örneğin altın standart test prosedürü olması nedeniyle, birçok bakteriyel ve viral enfeksiyonun yanı sıra genetik hastalıkları taramada da tercih edilen belirgin bir prosedür olmuştur (Ghannam ve Varacallo 2018).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, bir test tüpünde bir DNA örneğinin ve diğer gerekli elemanların toplanmasıyla başlar (Markham 1993). PZR üç ana aşamadan oluşur: denatürasyon, hibridizasyon/çift zincir oluşturma, uzatma/amplifikasyon. Denatürasyon aşaması sırasında, DNA, çift zincirli DNA'nın komplementer baz çiftleri arasındaki hidrojen bağlarını ayırmak için 95°C sıcaklığa kadar ısıtılır. Denatürasyonun hemen ardından, hibridizasyon süreci gerçekleşir, hibridizasyon, denatüre edilmiş DNA'nın 37-72 °C aralığında bir sıcaklıkta soğutularak hidrojen bağlarının yeniden oluşmasına izin verir (Markham 1993). Hibridizasyon, 55 °C ile 72 °C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. 30-40 döngüden sonra, tekrarlayan döngülerin sınırlı reaktif yeteneği ve diğer katkıda bulunan faktörler, pirofosfat moleküllerinin birikimi, aşırı kendiliğinden hibridizasyon ve örnekteki PZR inhibitörlerinin varlığı nedeniyle tekrarlayan döngüler nihayetinde azalır (Ghannam ve Varacallo 2023).

Polimeraz zincir reaksiyonunun birkaç zor noktası bulunmaktadır. Bu uygulama son derece duyarlıdır ve DNA ve RNA'da en küçük kontaminasyonu tespit etme eğilimindedir, bu da yanlış sonuçlar elde edilmesine neden olabilir. PZR için tasarlanan primerler, belirli genleri tespit etmek için hedef bir diziye ihtiyaç duyar. Primerlerin bazen spesifik olmayan hedef genlere eşleşmesi, PZR'ın özgüllüğünü düşüren bir faktördür. DNA polimeraz tarafından amplifiye edilen primer-dimerleri (PD) potansiyel gelişimi, PZR reaktifleriyle rekabet etmesine neden olabilir (Ghannam ve Varacallo 2023).

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) Temel Bileşenleri

- Termal döngü cihazı
- Kalıp DNA
- İki primer (Forward (ileri) ve Reverse (geri) primerleri)
- Taq polimeraz (*Thermus aquaticus*)
- Tampon
- Deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP

- Magnezyum klorür ($MgCl_2$)
- Distile su (dH_2O)

Yuvalanmış (Nested) Polimeraz Zincir Reaksiyonu: Yuvalanmış PZR, reaksiyon duyarlılığını ve/veya özgünlüğünü artırmak için kullanılır. Yuvalanmış PZR genellikle iki ardışık amplifikasyon aşamasını içerir, bu reaksiyonların her biri farklı birer primer çifti kullanır. İlk amplifikasyonun ürünü, ikinci PZR'nin kalıbı olarak hizmet eder. İki primer çiftinin kullanılması, daha fazla döngü yapılmasına olanak tanır ve böylece reaksiyonun hassasiyetini artırır. Artan özgüllük, aynı hedef şablonun iki farklı primer setiyle çoğaltılmasından kaynaklanır (Green ve Sambrook 2019).

Fungusların tanımlanması için moleküler verilerin kullanımı, White (1990) tarafından fungal nükleer ribozomal operon primerlerini tanımlayan bir makaleyle otuz yıldan uzun süre önce başladı (White vd. 1990). Bu primerlerle üretilen mantar DNA dizileri, büyük alt birim (nrLSU-26S veya 28S), küçük alt birim (nrSSU-18S) ve tam iç transkripsiyon aralığı bölgesi (ITS1, 5.8S, ITS2, yaklaşık 0.45−0.80 kb), fungal moleküler filogenetik dizi tanımlamanın yeni bir çağını başlattı (Bruns vd. 1991, Seifert vd. 1995). Bu üç ayrı bölge için farklı evrim hızları gözlemlenmiş ve SSU'nun en yavaş evrimleştiği, dolayısıyla taksonlar arasında en düşük varyasyon miktarına sahip olduğu, ITS'in ise en hızlı evrimleştiği ve en yüksek varyasyonu gösterdiği belirlenmiştir (Mitchell ve Zuccaro 2006). ITS bölgesinin kolayca amplifiye edilebilmesi ve türler arası varyasyon farkına sahip olması, mantar moleküler filogenisi için barkod olarak seçilmesinin ve yaygın olarak kullanılmasının sebepleridir (Schoch vd. 2012).

Yuvalanmış Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Basamakları: Moleküler teşhisin PZR aşaması için CTAB yöntemi ile örneklerden izole edilen genomik DNA materyali kalıp olarak kullanılmıştır. Moleküler filogeni çalışmaları için ribozomal RNA gen bölgeleri PZR ile çoğaltılmıştır. DNA polimeraz enzimi olarak tepkimede istenmeyen primer dimeri oluşumunu engellemek için hot start DNA polimeraz kullanılmıştır. Reaksiyon, 200 µL'lik polipropilen tüplerde, 50 µL'lik hacimde gerçekleştirilmiştir. Tepkime çözeltisinin içeriği çizelge 3.2'de belirtildiği gibidir. PZR ısıl döngü basamakları çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.2 ITS PZR çözeltisinin içeriği

10X DNA polimeraz tamponu	5 µL
Deoksiribonükleozit trifosfat (dNTP) karışımı	1 µL
25 mM $MgCl_2$	3 µL
Genomik DNA kalıbı	1 µL
10 µM dizi spesifik oligonükleotit primerleri	1 µL
DNA polimeraz enzimi	0,5 µL
Nükleazlardan arındırılmış dH_2O	38 mL

Optimum PZR ısıl döngü koşulları belirlenmiş, primer dimeri oluşumunu en aza indirmek için "İniş" (Touchdown) yaklaşımı kullanılmıştır. Bu tezde, PZR için Miniamp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems) cihazı kullanılmıştır.

Çizelge 3.3 PZR ısıl döngü basamakları

Basamak	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü Sayısı**
Ön Denatürasyon	95 °C	2 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	35
Bağlanma (İniş Yöntemi ile)	65-50 °C	15 saniye	35
Uzama	72 °C	1-2 dakika (amplikonun uzunluğuna bağlıdır)	35
Son Uzama	72 °C	7 dakika	1

PZR sonunda elde edilen amplikonlar, %1'lik agaroz jelde elektroforetik olarak analiz edilmiş ve amplifikasyonun kalitesi belirlenmiştir. DNA amplikonlarının büyüklüklerinin tespit edilmesi için agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. Agaroz jel elektroforezi, Yöntem 3.3.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

DNA amplikonlarının kalitesi belirlendikten sonra dizi analizi için Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction and DNA Clean up Micro Kit kullanılmıştır. Yıkama ve saflaştırma aşamalarında kitin kullanım talimatı izlenmiştir.

Yıkaması yapılan amplikonların miktarları ve saflık dereceleri Nanodrop Lite cihazında spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Amplikonların sekanslanmasında PZR aşamasında kullanılan oligonükleotit primerler, sekans primerleri olarak kullanılmıştır. Amplikonların nükleotit dizileri, standart Sanger dideoksi zincir sonlanma yaklaşımı ile belirlenmiştir. Amplikonların DNA dizi analizi hizmet alımı ile kurum dışarısında yapılmıştır.

3.4 Moleküler Çalışma Sonuçlarının Analizleri

PZR ile elde edilen amplikon dizilerinin moleküler tür teşhisi analizleri için, Nucleotide BLAST (BLASTn) çevrimiçi dizi benzerliği tespit aracı olarak kullanılmıştır. Moleküler tür teşhisinde kullanılan BLASTn analizleri için, önceden tanımlanmış NCBI GenBank veri bankasındaki diziler arasında, incelenecek olan amplikon dizilerine en yakın olanlar tespit edilmiştir. Bu şekilde, analiz edilen örneklerin moleküler anlamda hangi türlere daha çok benzediği belirlenmiştir.

BLASTn analiz sonuçlarını desteklemek amacıyla filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Bu analizler yapılırken, NCBI GenBank veri bankasında daha önceden tanımlanmış olan diziler içerisinde, bu tezde çalışılan örneklerinin genomik DNA amplikonlarının dizileri ile en çok benzerlik gösterenler ve güncel rapor edilen yayınlardaki türlere ait diziler, filogenetik analizlerde kullanılmak için iç grup olarak belirlenmiştir. NCBI GenBank veri bankasından elde edilen ancak analiz edilen amplikona ait dizi ile benzerlik göstermeyen uzak akraba *Tuber* cinsi üyelerinin dizileri de filogenetik analizlerde kullanılmak üzere dış grup olarak belirlenmiştir. Filogenetik ağaç oluşturmada öncelikle elde edilen dizler, MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) algoritması kullanılarak iç grup ve dış gruba ait diziler ile alt alta sıralanmıştır. Daha sonra, en uygun nükleotit yer değişimi (substitution) modeli belirlenmiş ve Neighbour Joining algoritması ve 1000 önyükleme yinelemesi (bootstrap replicate) kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

3.5 *Tuber excavatum* Örneklerinin Genomik DNA'larının Saklanması

Genomik DNA izolasyonu yapılan *Tuber excavatum* örnekleri, derin dondurucuda -40 ˚C'de 48 saat bekletildikten sonra kilitli polietilen torbalar içine yerleştirilip saklama kutularına yerleştirilmiştir.

3.6 *Tuber excavatum* Örneklerinden Viral Çift Zincirli RNA (dsRNA) Ekstraksiyonu

Viral çift zincirli RNA ekstraksiyonunda, öğütülüp toz haline getirilmiş ve kurutulmuş olan 30-35 mg'lık *Tuber excavatum* örnekleri kullanılmıştır. Ekstrakte edilen NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific spektrofotometrede dsRNA'ların saflık dereceleri ve miktarları, 260nm, 280nm ve 230nm dalga boylarında ölçülerek belirlenmiştir. Type101 fibröz selüloz kromatografisi bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (Preisig vd. 1998). Bu aşamada aşağıda belirtilen talimatlar izlenmiştir.

1. 30-35 mg miktarda öğütülmüş *Tuber excavatum* örneği 1,5 mL ependorf tüpünün içine konur ve 100 µl CTAB ile ezilir.
2. Ependorf tüpüne 1 mL Lizis Tamponu ((RiboEx ™ Reagent) eklenir ve örnek lize edilir.
3. Oda sıcaklığında 10 saniye boyunca örnek yeterince homojenize olana kadar kuvvetlice vortekslenir ve oda sıcaklığında 5 dk bekletilir.
4. Örneklere 200 µl Kloroform eklenir ve karışana kadar vorteks yapılır.
5. Oda sıcaklığında 5 dk bekletilen çözelti, 13500 rpm'de (4°C) 10 dk santrifüjlenir. Sonrasında üste çıkan fazın 500 µl'si boş 1,5 mL'lik ependorf tüpüne aktarılır.
6. Santrifüjleme sırasında Spin Kolon/Koleksiyon Tüpü ikilisine 500 µL %17 EtOH içeren 2x STE (0.1 M Tris–HCl, 0.2 M NaCl ve 2 mM EDTA, pH 7.0) Yıkama Tamponu eklenir. Spin Kolon/Koleksiyon Tüpü ikilisi 13500 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra dipteki sıvı atılır ve Spin Kolonunu aynı Koleksiyon Tüpüne geri yerleştirilir. Yıkama işlemi toplamda 2 kez yapılır. Bu adım, dsRNA ile bağlanma için Kolonun etkinleştirilme aşamasıdır.
7. Santrifüjden sonra, aktarılan üst sıvıya 100 µL saf EtOH eklenir ve pipetleme yapılır ve oda sıcaklığında 1 dk bekletilir.

8. Hazırlanan tüm örnek karışımı bir Spin Kolonuna aktarılır, Spin Kolonunu 13500 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenir. Örnek karışımının tamamen Spin Kolonundan geçtiğinden emin olduktan sonra süzülen sıvı atılır ve Spin Kolonu aynı Koleksiyon Tüpüne geri yerleştirilir. Bu işlem toplamda 2 kez yapılır.
9. Kolon membranını kurutmak için Spin Kolonu/Koleksiyon Tüpü ikilisi 13500 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüjlenir.
10. Her bir Spin Kolonu yeni bir 1,5 mL ependorf tüpüne yerleştirilir. Her bir Spin Kolonu membranına doğrudan 10 µL Elüsyon Tamponu (1x STE) eklenir ve dsRNA'yı elde etmek için 13500 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenir.

3.7 cDNA ve Random PZR

Çift zincirli RNA segmentleri, Primer–dN6: 5'-CCTGAATTCGGATCCTCC NNNNNN-3' oligonükleotit primeri kullanılarak ters transkripsiyonla cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA sentezinde, Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır.

200 µL'lik polipropilen tüpler içerisinde, 50-100 ng dsRNA örneği (en fazla 4µL içerisinde), 100 pmol (1 µL) Primer-dN6 oligonükleotit primer ve 1,5 µL Dimetilsülfoksit (DMSO) ile karıştırılmış ve toplam hacim RNaz içermeyen dH_2O ile 10 µL'ye tamamlandıktan sonra dsRNA örnekleri 99 °C'de 3 dakika bekletilerek denatüre olmaları sağlanmıştır. Bu denatürasyon aşamasının hemen ardından tüpler buz üzerine alınmış ve bir dakika bekletildikten sonra üzerlerine 4 µL enzim tepkime tamponu (5x), 1 µL, 100 µM deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP), 2 µL (20 ünite) ters transkriptaz enzimi (M-MuLV RT) ve 1 µL RNaz inhibitörü ilave edilmiş ve RNazlardan arındırılmış dH_2O ile hacim 20 µL'ye tamamlanmıştır. Tüplerdeki çözeltiler karıştırıldıktan sonra, oda sıcaklığında 3 dakika ve daha sonra 55 °C'de bir saat tutulmuştur. Tüpler 85 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra reaksiyon sonlandırılmıştır.

Elde edilen cDNA örnekleri, rPZR yapılarak çoğaltılmıştır. PZR için DNA polimeraz olarak hot start MyTaq DNA polimeraz enzimi (Bioline) kullanılmıştır. Tepkime, 200 µL'lik polipropilen tüplerde toplam 50 µL'lik hacimde gerçekleştirilmiştir. Tepkime

çözeltisi, 10X MyTaq DNA polimeraz tamponundan 5 µL, cDNA kalıbından 2 µL, 10 µM rPCR Primeri (5'-CCTGAATTCGGATCCTCC-3') primerinden 1 µL, MyTaq DNA polimeraz enziminden 1 µL (5 ünite) ve toplam hacmi 50 µL'ye tamamlayacak kadar nükleazlardan arındırılmış dH_2O içermektedir. rPZR ısıl döngü koşulları çizelge 3.4'te belirtildiği gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.4 rPZR ısıl döngü koşulları

Ön Denatürasyon	95 °C	2 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	35
Bağlanma (İniş Yöntemi ile)	58 °C	15 saniye	35
Uzama	72 °C	40 saniye	35
Son Uzama	72 °C	30 dakika	1

PZR sonunda elde edilen amplikonlar, yöntem 3.3.2'de belirtildiği gibi agaroz jel elektroforezi ile analiz edildikten sonra GeneJET Gel Extraction and DNA Clean up Micro Kit (Thermo Scientific) ile yıkanmış ve saflaştırılmıştır.

3.8 Yeni Nesil Dizileme, Elde Edilen Ham Okumaların Birleştirilmesi ve Viral RNA Tüm Genom Dizilerinin Ortaya Çıkartılması

Öncelikle hazırlanan rPZR ürünlerinin yeni nesil dizilemesi yapılmıştır. NGS dizi analizleri ve elde edilen ham okumaların yeni baştan (de novo) birleştirilmesi yapılarak viral genomların tüm veya tüme yakın dizileri elde edilmesi dışarıdan hizmet alımı şeklinde dışarıda yaptırılmıştır.

3.9 dsRNA Segmentlerinin 5' ve 3' Uç Bölgelerinin RACE Yöntemi ile Çoğaltılması ve Sanger Dideoksi Zincir Sonlanması Yöntemi ile Dizilerinin Belirlenmesi

RNA Etiketleme: dsRNA moleküllerinin terminal bölgelerinin dizilerinin belirlenmesinde ilk önce molekülün 3' uçlarına, T4 RNA Ligaz enzimi (New England Biolab) yardımıyla 5' ucundan fosfatlanmış ve 3' ucundan amin grubu ile bloke edilmiş

olan 5’P-CATGGTGGCGACCGGTAG-NH2 3’ oligonükleotit etiketi takılmıştır. T4 RNA Ligazı, tek zincirli RNA veya DNA parçalarını birleştirmek için kullanılan bir ligasyon enzimidir, tek zincirli RNA veya DNA'nın 5'-fosfat ve 3'-hidroksil uçları arasında fosfodiester bağlarının oluşumunu katalize eder (Darissa vd 2010, Sahin ve Akata 2019, Sahin vd. 2020).

Bu işlem için 200 µL’lik polipropilen tüpler içerisinde 20 pmol dsRNA (en fazla 10 µL içerisinde), 120 pmol oligonükleotit, 2 µL 10x T4 RNA Ligaz tamponu, son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde ATP, 1 µL RNaz inhibitörü ve 2 µL 20 ünite T4 RNA Ligaz ile karıştırılmış ve son hacim RNazlardan arındırılmış dH_2O ile 20 µL’ye tamamlanmıştır. Ligasyon reaksiyonu 37 °C’de 10 saat inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir. Bu tepkime sonunda artakalan fazlalık oligonükleotitler GeneJET Gel Extraction and DNA Clean up Micro Kit (Thermo Scientific) nükleik asit yıkama kiti ile giderilmiş ve 3’ uçlarından etiketlenmiş olan dsRNA’lardan moloney murine leukemia virüsünün ters transkriptaz enzimi kullanılarak (Thermofisher) tam uzunlukta olan komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir.

cDNA sentezi: cDNA sentezi, Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak, dsRNA’nın 3’ uçlarında bulunan etiketlere komplementer olan 5’ CTACCGGTCGCCACCATG 3’ oligonükleotit primeri kullanılarak yöntem 3.9’da belirtildiği gibi yapılmıştır. Bu tepkime sonunda elde edilen cDNA’nın 1 µL’si ve cDNA sentezinde kullanılan primer kullanılarak yöntem 3.9’da belirtildiği gibi Rastgele PZR yapılmıştır. Dizi analizi sonucunda elde edilen bilgiler doğrultusunda tasarlanan oligonükleotit primerler (5’ terminal bölgesi için geri primer, 3’ terminal bölgesi için ileri primer) kullanılarak PZR gerçekleştirilerek dsRNA segmentlerinin 5’ ve 3’ uç bölgeleri çoğaltılmıştır. PZR aşaması yöntem 3.3.3’te belirtildiği gibi yapılmıştır ancak ısıl döngü koşullarındaki bağlanma sıcaklıkları ve uzama süreleri sırasıyla PZR’de kullanılan primerlerin ve amplikonların uzunluklarına göre ayarlanmıştır. PZR sonucunda ortaya çıkan amplikonlar, yöntem 3.3.2’de belirtildiği gibi agaroz jel elektoroforezi ile doğrulanıp Sanger dideoksi zincir sonlanma yöntemi ile dizilerinin belirlenmesi üzere GeneJET Gel Extraction and DNA Clean up Micro Kit (Thermo Scientific) kullanılarak saflaştırılmıştır.

rPZR ve RACE sonucunda elde edilen diziler Geneious Prime 2019.1.3 biyoinformatik yazılımı (Biomatters Ltd) kullanılarak birleştirilmiş ve dsRNA viral genomlara ait tüm dizi bilgisi elde edilmiştir. Elde edilen diziler alt alta hizalama (alignment) temelinde birleştirilmiştir.

3.10 Tüm Viral Genomlara Ait dsRNA Dizilerinin Biyoinformatik ve Filogenetik Olarak Analiz Edilmesi

Elde edilen tüm viral genomlara ait dsRNA dizilerindeki protein kodlayan açık okuma çerçeveleri (ORF), NCBI ORFfinder çevrim içi aracı kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra, tanımlanan tüm viral genomların 5' ve 3' uç kısımlarında bulunan, kodlama yapmayan ve enkapsidasyon, transkripsiyon, translasyon ve replikasyon süreçlerinde görev alan cis elementleri içeren regulatör bölgeler (UTR) belirlenmiştir.

Elde edilen dsRNA dizilerinin filogenetik analizi hem nükleotit dizileri ile hem de kodladığı proteinlerin (RNA bağımlı RNA polimeraz, Nükleokapsit gibi) aminoasit dizileri esas alınarak, MEGA-X yazılımı kullanılarak yapılmıştır (Kumar vd. 2018). Bunun için öncelikle dsRNA dizileri, BLASTx çevrimiçi dizi benzerliği analizi aracı ile analiz edilmiştir. BLAST analizinde, GenBank DNA veri bankasında daha önceden tanımlanmış olan diziler içerisinde, analiz edilen dsRNA dizisine en çok dizi benzerliği gösterenleri, filogenetik analizlerde kullanılmak üzere iç grup olarak belirlenmiştir. NCBI GenBank veri bankasından elde edilen ve analiz edilen dsRNA dizisi ile dizi benzerliği göstermeyen diğer viral dsRNA dizileri de filogenetik analizlerde kullanılmak üzere dış grup olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde, analiz edilen dsRNA'dan kodlanan proteinlerin amino asit dizilerinin filogenetik analizlerinde de Protein BLAST çevrim içi aracı kullanılarak iç grup ve dış gruplar belirlenmiştir. En olası filogenetik ağaçların oluşturulmasında, Neighbour Joining algoritması ve 1000 önyükleme yinelemesi (bootstrap replicate) kullanılmıştır. Filogenetik analizlerde en doğru amino asit yer değiştirme/substitüsyon modelinin seçiminde MEGA X yazılımının "en iyi protein modelinin belirlenmesi" modülü kullanılmıştır. dsRNA'ların nükleotit dizileri ile ve ayrıca dsRNA moleküllerinden kodlanan proteinlerin amino asit dizileri ile yapılan filogenetik analizler sonucunda elde edilecek olan ağaçlarda analiz edilen dizinin yeni bir dsRNA virüsü cinsine veya familyasına ait olup olmadığının belirlenmesinde iç gruba ait dizilerle aynı veya farklı grupta toplanmaları göz önünde bulundurulmuştur.

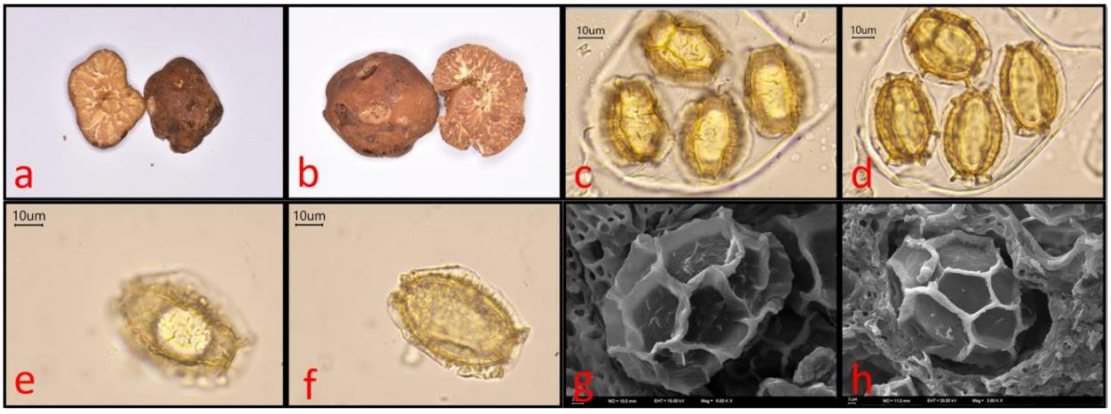
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Amplikon diziler, öncelikle BLAST çevrimiçi dizi haritalama ve benzerlik analizi araçları ile analiz edilmiştir. Moleküler çalışmalar sonunda toplam 25 örneğin ITS dizi bilgisine ulaşılmıştır. Toplanan örneklerin moleküler analizleri için BLASTn analiz sonuçlarını desteklemek amacıyla filogenetik ağaçlar meydana getirilmiştir. Makroskobik ve mikroskobik veriler ile moleküler analizlerlerden sağlanan verilerle örneklerin rRNA gen bölgesine ait nükleotit dizileri ile yapılan filogenetik analizler sonucunda, 25 adet örneğin *Tuber excavatum* olduğu belirlenmiştir.

4.1 *Tuber excavatum* Örneklerinin Morfolojik İnceleme Bulguları

Sistematik Bakış:
Alem: Fungi
Bölüm: *Ascomycota* Caval.-Sm.
Ordo: *Pezizales* J. Schröt.
Familya: *Tuberaceae* Dumort
Sp.: *Tuber excavatum* Vittad.

Şekil 4.1'de *Tuber excavatum* örneklerinin ışık mikroskobu ve SEM/ taramalı elektron mikroskop görüntüleri verilmiştir. *Tuber excavatum*'a ait askomata 15-30 mm, hipogean, globoz, subgoloboz veya düzensiz, başlangıçta sarımsı kahverengi, sonra turuncu-kahverengi ve turuncumsu kahverengi bir renk alır. Gleba katı, sıkı, sarımsı kahverengiden kırmızımsı kahverengi, beyazımsı- sarı damarlı yapı mermer dokusu görünümüne neden olur. Peridium iki tabakalıdır. Dış tabaka beyazımsı ila sarı, şişkin, düzensiz hücrelerden oluşurken iç tabaka iç içe geçmiş hiflerden oluşmuştur. Kokusu tazeyken sarımsağı andır. Tadı belirsizdir. Askuslar subgloboz veya elips şeklinde ve 1-4 sporludur. Askosporlar elips şeklinde, sarıdan sarımsı kahverengiye değişen tonlarda, spor boyunca 3-4 gözenekli düzensiz ağsı bir ornamentasyona (süse) sahiptir. Sporların ornamentasyonsuz boyutu 35-40 x 22-32 µm aralığındadır.



Şekil 4.1 Tuber excavatum örneklerinin ışık mikroskobu ve SEM/ taramalı elektron mikroskop çekimleri: a-b. ascomata, c-d. askus içerisinde askosporlar (ışık mikroskop görüntüsü), e-f. askospor (ışık mikroskop görüntüsü), g-h. askospor (SEM görüntüsü)

4.2 *Tuber excavatum* Örneklerinin Moleküler Teşhis Bulguları

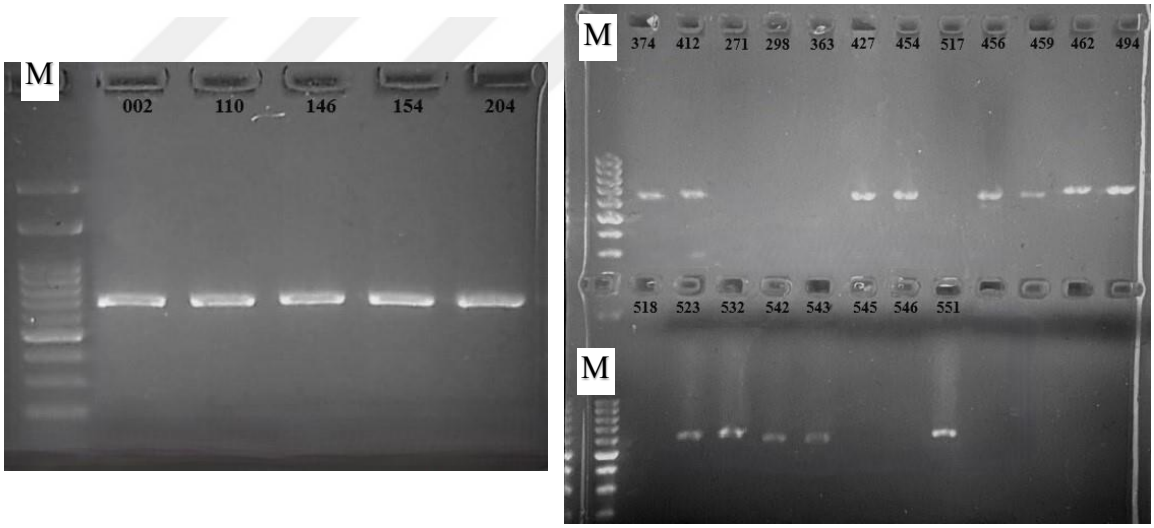
Genomik DNA'sı izole edilen örnekler, saflık ve miktar bilgilerinin kalite kontrolünü yapmak amacıyla ilk önce Nanodrop Lite cihazında ölçülmüştür ve elde edilen sonuçlar çizelge 4.1'de verilmiştir. Daha sonra yapılmış olan PZR sonucunda elde edilen jel görüntüleri şekil 4.2 ve şekil 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 *Tuber excavatum* örneklerinden izole edilen genomik DNA'ların saflık ve miktarlarının Nanodrop cihazında ölçüm sonuçları

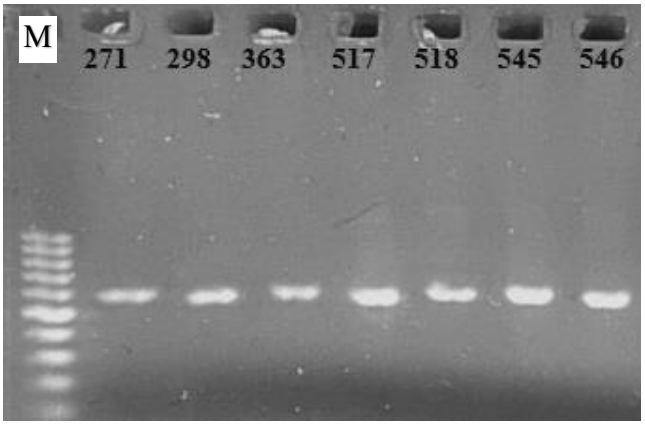
Örnek Numarası	Saflık	Miktar (ng/µL)
1	1,96	178,1
2	1,97	242,5
3	1,71	250,8
4	1,97	725,7
5	2,01	521
6	2	353,5
7	2,04	494,3
8	1,92	198,9
9	2,05	647
10	1,84	580
11	1,78	628

Çizelge 4.1 *Tuber excavatum* örneklerinden izole edilen genomik DNA'ların saflık ve miktarlarının Nanodrop cihazında ölçüm sonuçları (devam)

12	1,91	1071
13	1,86	348
14	1,88	613
15	1,96	836
16	1,96	180
17	1,98	379,4
18	1,89	899,8
19	1,96	649,6
20	1,97	556
21	1,91	840
22	1,80	873
23	1,81	678
24	1,97	327
25	1,95	234



Şekil 4.2 25 örneğe ait jel görüntüleri. ITS1-ITS4 primerleri ile genomik DNA'lardan yapılan PZR'ler sonucunda amplifiye olmuş örneklerin agaroz jelde yürütülmüş hali (M: 100 bp DNA belirteci).



Şekil 4.3 ITS primerleri ile amplifikasyon sonucu alınamayan örneklerin Yuvalanmış PZR jel görüntüsü. Yuvalanmış PZR yapılması sonucunda ITS ile çoğalamayan örneklerde bantlar gözlemlenmiştir.

Yüzde (%) gen dizi benzerlikleri temelinde yapılan tür tanımlamalarında, türlere ait sabit bir yüzde benzerlik eşik değeri olmayıp, karşılaştırılan diziler arasındaki farklılaşmalar, tür komplekslerinin evrimsel yaşları ile doğru orantılıdır (Hawksworth ve Lücking 2017). Mantar türleri için yüzde, dizi benzerlikleri temelinde dikkate alınan tür sınırlaması yaklaşık 500-600 nükleotit uzunluğundaki ITS1-5.8S-ITS2 rDNA bölgesi için çoğunlukla <%98-99'dur (Bonito vd. 2010, Hawksworth ve Lücking 2017, Lücking vd. 2020). BLASTn analizleri sonucu elde edilen bulgular çizelge 4.2'de verilmiştir.

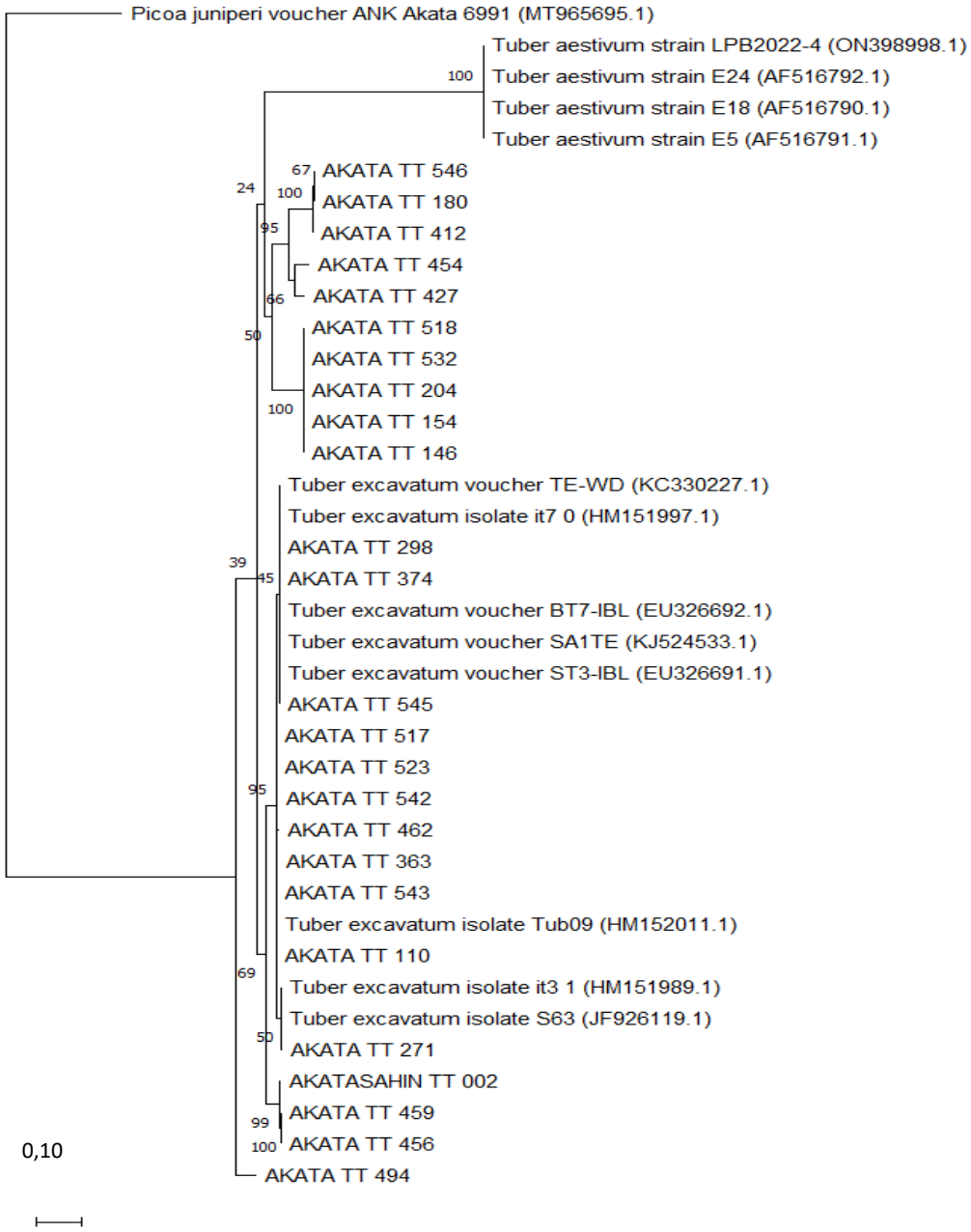
Çizelge 4.2 BLASTn analiz sonuçları

Tez Örnek Numarası	**Proje Örnek Numarası**	**BLASTn Eşleşmesinde Dizi Benzerlik Oranı (PI) (%)**	**BLASTn Eşleşmesinde Dizi Sorgu Kapsamı Oranı (%) (QC)**	**En İyi Eşleşme Sonucunun GenBank Numarası**
1	AKATA&SAHIN TT 002	99,59	100	KJ524534.1
2	AKATA TT 110	100	100	KJ524533.1
3	AKATA TT 146	99,47	100	OR267353.1
4	AKATA TT 154	99,42	99	OR267352.1
5	AKATA TT 204	99,45	99	MW884550.1
6	AKATA TT 271	99,78	98	OR223360.1
7	AKATA TT 298	100	96	HM151997.1
8	AKATA TT 363	99,63	100	HM152011.1
9	AKATA TT 374	100	100	EU326691.1

Çizelge 4.2 BLASTn analiz sonuçları (devam)

10	AKATA TT 412	99,42	99	MN044441.1
11	AKATA TT 427	97,16	100	FM205662.1
12	AKATA TT 454	99,66	98	HM152013.1
13	AKATA TT 456	99,45	100	KJ524534.1
14	AKATA TT 459	99,44	100	FM205687.1
15	AKATA TT 462	99,43	99	HM152011.1
16	AKATA TT 494	99,75	98	EU784425.1
17	AKATA TT 517	100	100	HM152011.1
18	AKATA TT 518	99,46	100	OR267353.1
19	AKATA TT 523	99,81	100	OR223360.1
20	AKATA TT 532	99,44	98	MW884550.1
21	AKATA TT 542	99,84	98	HM152011.1
22	AKATA TT 543	100	99	HM152011.1
23	AKATA TT 545	100	99	KJ524533.1
24	AKATA TT 546	99,22	100	MN044441.1
25	AKATA TT 551	98,34	98	MW884550.1

Filogenetik ağaç oluşturulurken, çekirdek ITS rDNA bölgelerine göre, K2+G evrim modeli kullanılarak tahmin edilen filogenetik ilişkilerini ortaya koyan en olası ağaç oluşturulmuştur. Her dal için, yüzde önyükleme değerleri belirtilmiştir. AKATA TT kodlu örnekler hariç filogenetik analize dahil edilen tüm diziler GenBank'tan alınmıştır. *Picoa juniperi* dış grup örnekleri olarak filogenetik analize dahil edilmiştir (Şekil 4.4).



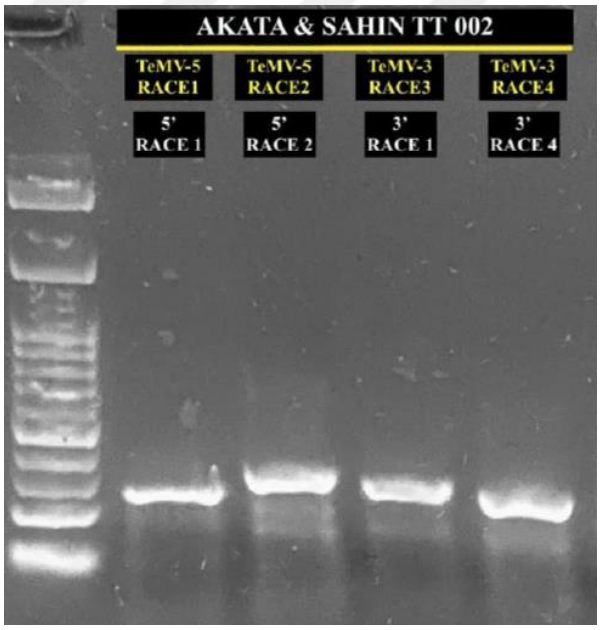
Şekil 4.4 *Tuber excavatum* örneklerinin filogenetik ağacı

4.3 *Tuber excavatum*'dan İzole Edilip Tüm Genom Dizisi Elde Edilmiş Virüsün Değerlendirilmesi

Viral dsRNA pozitif olarak belirlenen 1 adet *Tuber excavatum* örneğinin rPCR çalışmaları sonucunda örneğe ait viral RNA içerikleri analiz edilmesi üzere NGS yöntemi kullanılmıştır. Bu örneğin viral dsRNA içeriklerinin NGS ve sonrasında biyoinformatik

yöntemler ile analizleri yapılmıştır. RACE PCR çalışmalarından elde edilen sonuçlar dikkate alınarak 1 virüse ait çoğaltılmış olan terminal bölgelerin, çalışmada materyal ve yöntem kısmında belirtildiği gibi Sanger DNA dizileme yöntemi ile dizileri belirlenmiştir.

NGS analizi yapılan örneğe ait ham okumaların de novo birleştirmelerinden elde edilen dizilerin BLASTx ve haritalama çalışmaları sonucunda, örneği enfekte eden 1 adet RNA mikovirüsü belirlenmiştir. Söz konusu mikovirüsün genom segmentinin 3' ucu etiketlenmiştir. Etiketlenmiş viral dsRNA segmentlerinin eşlenik DNA'ları (cDNA) sentezlenmiştir. Sentezlenen cDNA'lar ile RACE PCR çalışmaları yürütülmüştür. Söz konusu RACE PCR çalışmalarından elde edilen sonuçlara ait agaroz jel görüntüleri şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5 *Tuber excavatum*'dan izole edilen dsRNA için yapılan RACE PCR sonuçları

rPCR ve RACE sonucunda elde edilen diziler Geneious Prime 2019.1.3 biyoinformatik yazılımı (Biomatters Ltd) kullanılarak birleştirilmiş ve dsRNA viral genomlara ait tam dizi bilgisi elde edilmiştir. AKATA&SAHİN TT 002 numaralı *T. excavatum* örneğinden dsRNA ekstraksiyonu sonucunda elde edilen çoğaltılmış ve birleştirilmiş kontiglerin BLASTx analizleri, daha önce Almanya'nın Aşağı Saksonya eyaletinde bulunan Lammspringe köyünden toplanan bir *T. excavatum* izolatında tanımlanan bir mitovirüsün

RdRp'sine %94,60 aa (amino asit) dizi benzerliği sergileyen bir kontig ortaya çıkarmıştır. Tuber excavatum mitovirus isolate Lammspringe virüsü (Stielow vd. 2012) ile birlikte *Triamitovirus tuex1* türünün bir suşu genotipi olduğu belirlenmiştir ve bu bağlamda örnek Terkirdağ'dan toplandığı için ilk başta "Tuber excavatum mitovirus isolate Tekirdag" olarak adlandırılmıştır. İki virüs arasında RdRp dizi benzerliği %94 olarak belirlenmiştir. Bunun dışında 5' UTR dizi benzerlikleri %76,58, 3' UTR dizi benzerlikleri ise %91,53 olarak belirlenmiştir. Daha sonra örneğin ismi daha uygun olacağından *Triamitovirus tuex1* (TeV isolate Tekirdag) olarak yenilenmiştir.

NCBI Korunmuş Alanlar Veritabanında (CDD) yapılan aramalar, TeV izolatları Tekirdag ve Lammspringe tarafından kodlanan polipeptitlerin sırasıyla 211, 712, 206 ve 707 aa pozisyonları arasında bulunan RdRp alanlarını içerdiğini ortaya koymuştur. CDD'de yapılan ileri analizler, her iki izolatın bu korunmuş RdRp alanlarının mitovirüs RdRp ailesinin bir parçası olduğunu göstermiştir (Erişim: cl05469, E-değerleri sırasıyla 3.09586e-67 ve 9.95093e-67).

Ek olarak, BLASTp analizleri TeV izolatları Tekirdag ve Lammspringe'nin RdRp'lerinin birbirleriyle %94,60 dizi benzerliği sergilediğini ve Tuber mitovirüs 3'ün RdRp'sinin (NCBI GenBank erişimi: WZN15221.1) sırasıyla %68,09 ve %68,34 özdeşlik ile ikinci en iyi eşleşme olduğunu göstermiştir. Her iki izolatın genom dizileri karşılaştırıldıktan sonra, 3' UTR'lerin %91,53 nt dizi özdeşliği ile en yüksek benzerliği gösterdiği bulunmuştur. Bunu takiben, RdRp alanı kodlayan bölgeler %88,65 nt özdeşlik sergilerken, ORF'ler %87,51 nt özdeşlik göstermiştir. Tüm genomlar arasındaki genel benzerlik %85,33'tür. Buna karşılık, en farklı bölgeler %78,53 nt dizi benzerliği ile 5' UTR'ler olmuştur. Protein düzeyinde, izolatlar tek ORF'leri tarafından kodlanan tüm proteinlerinde %94,60 amino asit dizisi benzerliğini paylaşmaktadır (Şekil 4.8).

Aşağıda TeV isolate Tekirdag'ın NGS ve RACE yaklaşımları ile elde edilmiş olan tüm genom dizisi ve kodladığı RNA bağımlı RNA polimerazın amino asit dizisi fasta formatında verilmiştir.

TeV isolate Tekirdag Contig 3 (GenBank Accession: OR157964.1)

TAACATTCCTGTTCCTCACTTCGAGATGGCAGACACTTCTCTAGAGACCAATTTCAAGTTAGATATCGTTATCAT
TTAACTTTAAACAAATATGATGACTCGGTAAGAACAATATAGGAATTAGTCATCCCTATATTGTTTACTAATGAA
TTAGGTTGACTACCAAGTTCATGACGGAATTACCAAATAAGTATAATACATTAGTGTTATCCTTAGTTCATGTGA
GACGCAACAGGATCTTAATCTCACTTCCAGGAGTGTATAAACACCTGGACGGGTTGGTCAAACGCGGAATAAAGT
TGACCCGGTAAGGATAAGAAATTGCCATGGGAGCCGAGATATACCCGTACGGTGTTGTTTGTCGGTTTGTTAATA
GAAACCAATAACCTGAAAGCATTGGAGGAGGACTATATTTGAAGAACGTAGTGTTCAGAAAATTATCCTCTTTCT
TGTGATTACATGAGGTTAATGCTTGCCTATATTAATTCCATTTGCGGTATTTTGTGTAGGTTTAACGAATGTTAA
ACCTAATCCGCTAATAATAGGTTAATTCAATAACTGATTAAGAAAATTTTATCACATTAAGTTGGTAATTAATTA
AACTATTAGATGAAAATGGATGAAATCAACCCCTAATAGGGATAAGTTGTTTCTTTGTTCTTTGTTTATTCTGTC
ACGACAGGTTCATTATGTGGTACATAATGAACTAGGTATTGTAAAGTATCGTGAGGTCAATATTCAAGTTAATCA
CAAAATGTTATTAATATAGAGCAAATT**ATG**AGTTATGAGATTATGAGAGAGAGTATGATTCGTTTTGCAAAGATT
TCTTCCCCTGCTACTACTGTCGCACCCTTTGTAATTCCGAGTACGAACAATGCTCGTAATTCAAAGAGATATGGC
TTAGCTTCTTCAACTCTTAGGAAGTGACTAATGGAAATGTTGGAACCTCAATTTCTTGGTCTGTCACAGTCATTA
GTTCCATTAATGTCTTATTCAGATACGAAGGATATTAATGCCCAGGAGGTACTTGTTGTTTCACTAGGAACAGTC
AAGATTTGGTTCCTTGAATATTTAGTCTCAGGGAAGAAAATTCAGGGCATAATACCAAATGCTTTCTGGGATAGG
TCTAATAATTGCCCTGTCTCCGTGGTCGACTTCTTTAAATGAGTTGACAGTACAGGGAGAGATCTTAGGGATATG
AGGCCTGTCATTAGGTTTATGATGTCATGATTAGATCTTGGAAAGGTTTATACAATACCTAAGAATCCTAGTCTA
TCTCCAATAGTGTCCAAGTTTTCTGGTGTTGATCCTTTATTGAAGGATTACAATATTAGTGAAGCTATAGAGTCA
CTCGGAATACTGGTTTCTGATTCTAAGGTGGCATTTAAATCAGCATGTGAGAACTTTTCATTCCATGAAAGTTCT
GCCGCAGGACCAAACGGTCATGCATTATGGGCATCTCACATGGATGGGGCTGCTATAGATAATGATCCTAAGTTA
CTTAAGATCATTACCAGTCTTGCAGATAAGACTGGGTTAACTCAGGTGACTGAGATGGCATCCAACTCGTCATTA
ATTATGACGGATATATCACCGATGCGCGAAGGTAAATTACAGTCTGCTATTCATAGTAGACTGCATCTTATCTTC
GAAAAGGGTATTAAGTCTCGTATTATTGCAATAGGAGATTATTACTCCCAGTGTTTGTTATCTCCATTCATGGTT
ACACTACGATCATGCTTGGAACGTATACCTCAAGATTATACATATAATCAAGAGGCGGGCTTCTCTAAGGTACTT
GACTTTACAAGGCTAGGGAAGACCTGTTACTCACTAGATCTATCTAAGGCCACGGATAGACTACCTCTTGCTCTA
CAGGAGAGGGTTATGGGTATTATATTGGGTGATAATGAACTGGCAAAACTCTGATCATCATTATTGAGTTCAAGA
GAGTTTGTCACTCAAACTGGGCATAAGGTGCGGTATGAAGTTGGACAACCACAGGGGTTCAAGTCTTCATTCCAC
TCCTTAGCTATGACACACCATGTCATAGTTCGGTTAGCCGCATTACGAGCCAGCGAAATGAATTTTACAGATTAT
GTAATTCTAGGAGATGATATAGTACTGACTAATGAGAAGGTAGTCAAGGAATATATGATTTTAATGGAATTACTA
GGTGTGAAAATATCTTTAGAGAAATCTCTATTTCATAAAGATCATTCATCGATGGCGGAATTCTGTAAAAGAATT
GCCTGTAATGGGCATGAGGTTACAGGGATTCCAATGCACTTATTAGCAAATACGATTATAGATCCACAATACACC
ATGGAGTTATGGGAGTATATGGCATCTAGAAGTATTTGTAAAGGATTCGATCTATACGAATTCTTTGGGTTGTTC
CTTGGGGACCTAGATTTTGAAAGACTAGGGTTACTTAATGTGTTACCGGTGACGGTGACAGGTATGAGAAGTAGG
GTAATTCTTGAGGATTCCCCTCTATATTCAACAAGCAAGTTTGAAGAGGCTTTCGGTTTTAGTTTACAAGATGTT
GAGAACTATTACTATTATTGTTTGGTCTCTGATCAAATTGCGAAGGTGGATGGGATTATCAAGAAGGCATCTAGT
TTCTTGTCAATTGCTTTAGAGACAAGCAAACTAGGTTATACTGATGGTACCGAACTTGTTGGGACAGGGATTCCA
TTAACTGTAGCTATACAGGATAAATTATCTAAGAAAGATAGTGAGCTACAAGTGATGCATCCAGTACAGTCAGCA
GCAAGGACACTAGGTGTCAAGGTGATCAGTATACTGAATGCATTTGCAGCGGATGTATCTAAGTTACCAGTACTA
TTAAAGTCTGGTGCACTTAATGCATTAGGTGTTTCCTTAGATGCTCTACCACAATTCCTACAAATGGATAAAACC
ATATATGGGAATAGAAGAGTATTAGATAAAGCTATACGTATGTTAGAAGAATCTGTTATGGATGACTCTAAAACG
TCGCGTAATTTTATCGGTAAGGTGACAGGTGTATCTCAGGCATGATCCGTTTCAGTTGGGTTGGGTAGAGGGCTT
GTGGTGAGTCCTCAAAACAGTGTGATTAAAGGTGTGATCGGAACATCTAAGTCACGACTAATGAAGATGAAAGGA
GCTTCATCTTCATCAGTGATGCGCGGTCGGAAG**TAG**GGTCGTTTTAATTGCTTGGCGGGTCAGGTCATGGGTTTA

CCATATGGTAAACCTAACCCTGTGTATGTTAGTATGGATGTAAATACAAGATCACTACACGAACGTGGTGATTTC
CCCA

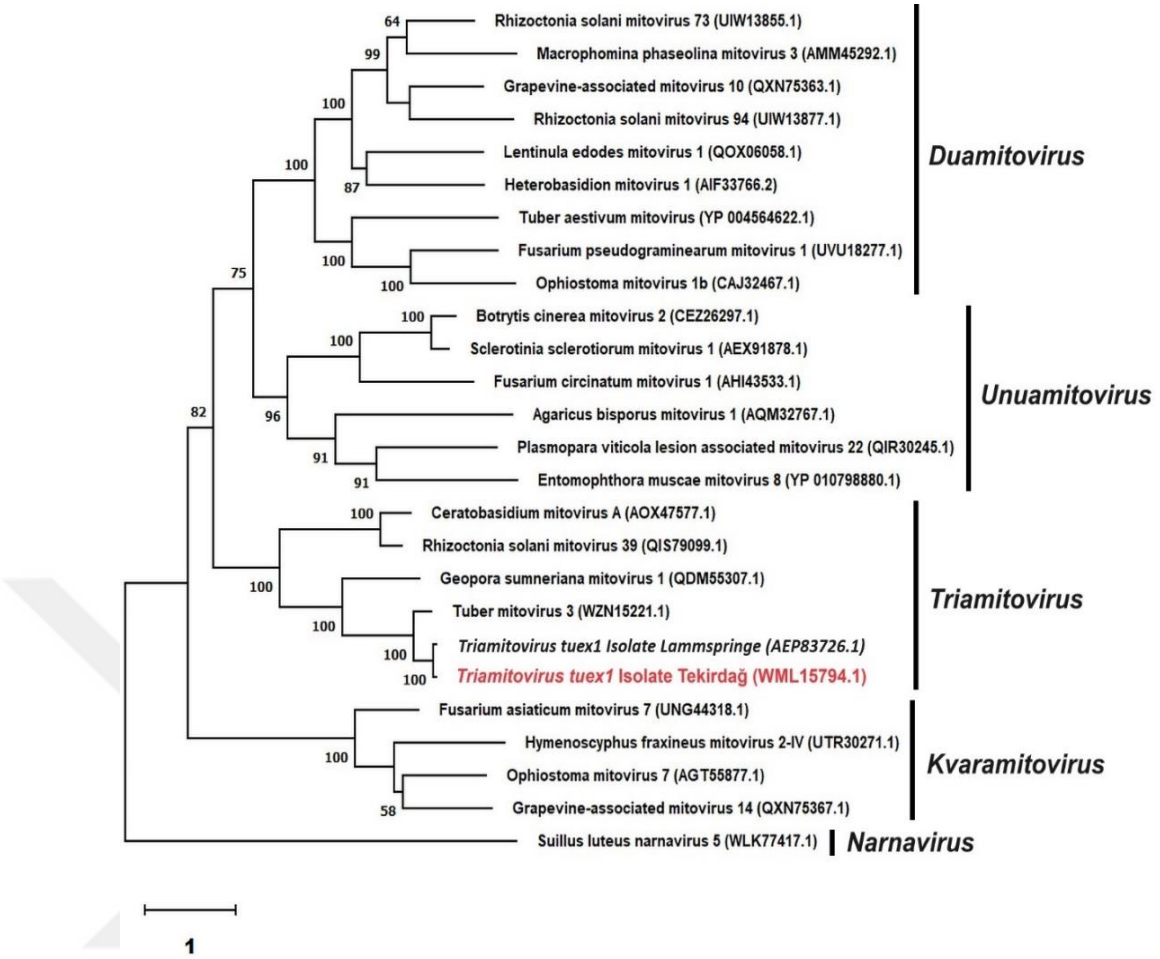
Sarı ile vurgulanmış olan diziler RACE PCR'da kullanılan primerlerin dizileridir. Dizinin başındaki ve sonundaki kırmızı ile gösterilen diziler yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla 5' UTR ve 3' UTR dizileridir. Kalın olarak vurgulanan ATG ve TAG dizileri açık okuma çerçevesini (ORF) göstermektedir.

Primerler: TeV-5RACE1: 5'-ATCCTGTTGCGTCTCACATG-3'
TeV-3RACE1: 5'-TCAGTTGGGTTGGGTAGAGG-3'

TeV isolate Tekirdag'ın genomunun açık okuma çerçevesinden kodlanan RNA bağımlı RNA polimerazın amino asit dizisi (translasyon için küf mitokondriyal genetik şifre kullanılmıştır.):

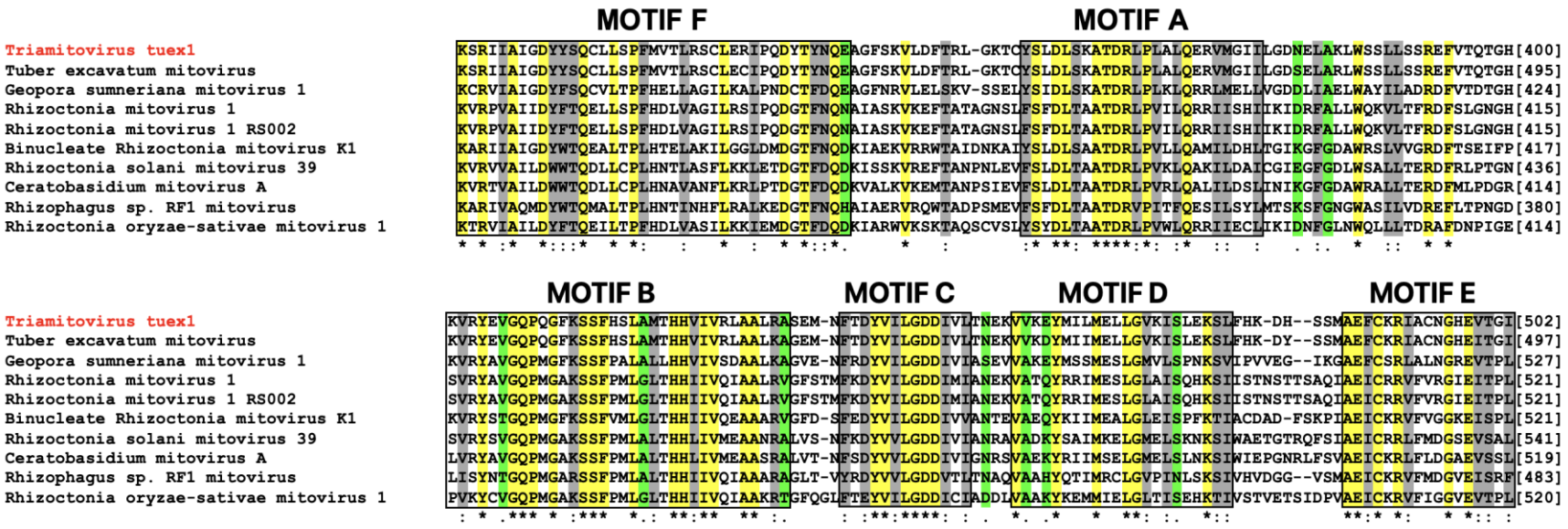
MSYEIMRESMIRFAKISSPATTVAPFVIPSTNNARNSKRYGLASSTLRKWLMEMLEPQFLGLSQSLVPLMSYSDT
KDINAQEVLVVSLGTVKIWFLEYLVSGKKIQGIIPNAFWDRSNNCPVSVVDFFKWVDSTGRDLRDMRPVIRFMMS
WLDLGKVYTIPKNPSLSPIVSKFSGVDPLLKDYNISEAIESLGILVSDSKVAFKSACENFSFHESSAAGPNGHAL
WASHMDGAAIDNDPKLLKIITSLADKTGLTQVTEMASNSSLIMTDISPMREGKLQSAIHSRLHLIFEKGIKSRII
AIGDYYSQCLLSPFMVTLRSCLERIPQDYTYNQEAGFSKVLDFTRLGKTCYSLDLSKATDRLPLALQERVMGIIL
GDNELAKLWSSLLSSREFVTQTGHKVRYEVGQPQGFKSSFHSLAMTHHVIVRLAALRASEMNFTDYVILGDDIVL
TNEKVVKEYMILMELLGVKISLEKSLFHKDHSSMAEFCKRIACNGHEVTGIPMHLLANTIIDPQYTMELWEYMAS
RSICKGFDLYEFFGLFLGDLDFERLGLLNVLPVTVTGMRSRVILEDSPLYSTSKFEEAFGFSLQDVENYYYYCLV
SDQIAKVDGIIKKASSFLSIALETSKLGYTDGTELVGTGIPLTVAIQDKLSKKDSELQVMHPVQSAARTLGVKVI
SILNAFAADVSKLPVLLKSGALNALGVSLDALPQFLQMDKTIYGNRRVLDKAIRMLEESVMDDSKTSRNFIGKVT
GVSQAWSVSVGLGRGLVVSPQNSVIKGVIGTSKSRLMKMKGASSSSVMRGRK

Her iki izolatın RdRp alanları %96,02 amino asit dizisi örtüşmesine sahiptir. TeV isolate Tekirdag'ın diğer mikovirüslerle olan dizi benzerlik ilişkisini anlamak için, izolatın ve diğer mitovirüslerin RdRp dizileri kullanılarak bir moleküler filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Ağaç, izolatın *Triamitovirus* cinsi içinde Tuber mitovirus 3, Geopor umneriana mitovirus 1, Rhizictonia solani mitovirus 39 ve Ceratobasidium mitovirus A gibi çeşitli üyelerle birlikte kümelendiğini göstermiştir (Şekil 4.6).

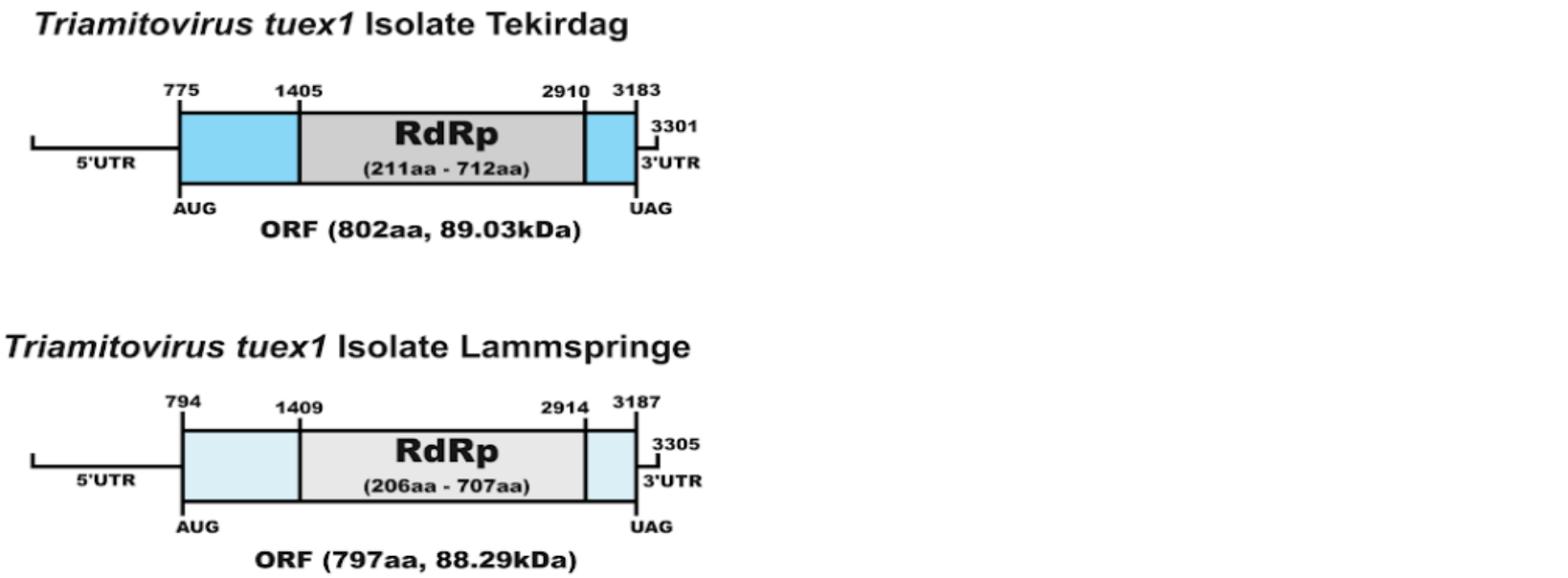


Şekil 4.6 Triamitovirus tuex1 Isolate Tekirdag ve diğer mitovirüslerin RdRp dizilerinin çoklu hizalamasına dayalı maksimum olasılıklı filogenetik ağaç. Düğümlerdeki değerler, 1000 kopyadan elde edilen yüzde önyükleme değerlerini gösterir. Erişim numaraları parantez içinde verilmiştir. Sol alttaki ölçek çubuğu 1'lik genetik mesafeyi temsil eder. Suillus luteus narnavirus 5, filogenetik ağaçta dış grup dizisi olarak seçilmiştir.

8 *Triamitovirus* cinsinden on farklı üyenin RdRp alanlarının çoklu dizi hizalama analizi yoluyla, TeV izolatları Tekirdag ve Lammspringe'nin RdRp alanlarının, yüksek oranda korunmuş A, B ve C motifleri dahil olmak üzere, altı korunmuş motifin (N-terminalden C-terminaline doğru F, A, B, C, D ve E) tümünü içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.7).

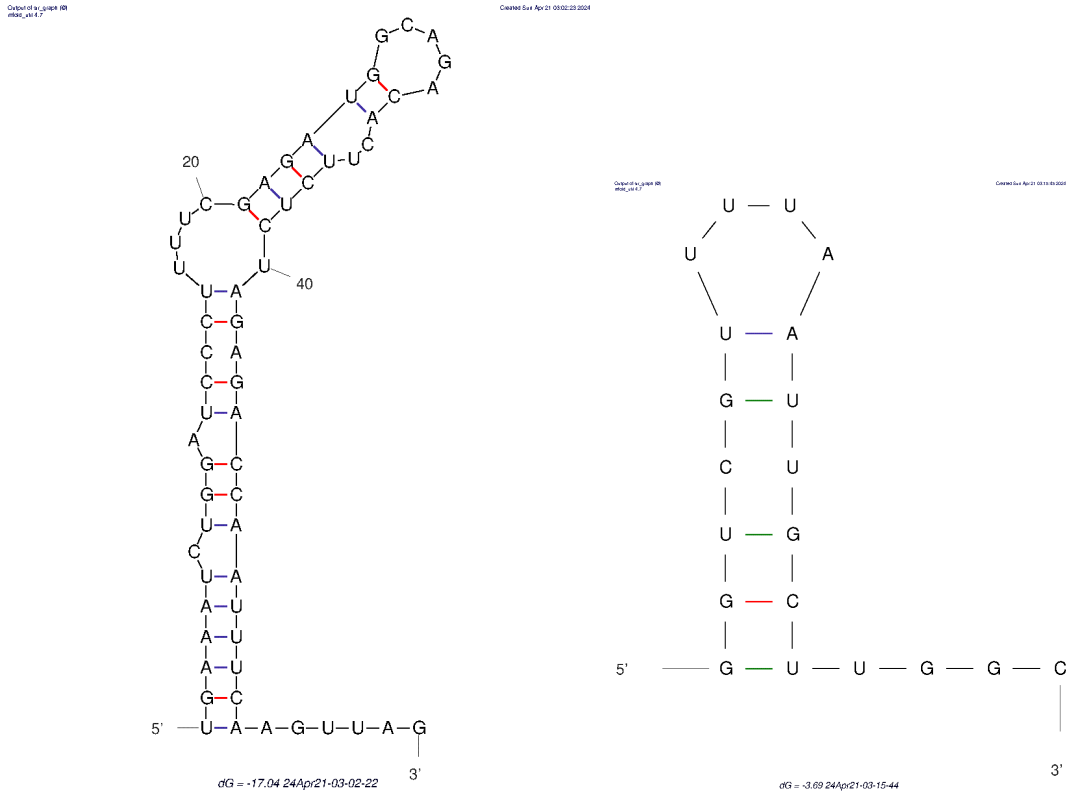


Şekil 4.7 Triamitovirus tuex 1 izolatı ve Triamitovirus cinsi içindeki yakın akraba virüsler arasında RdRp korunmuş motiflerinin (N-terminalinden C- terminaline sırayla F, A, B, C, D ve E) karşılaştırılması gösterilmektedir. Eşleşen amino asit kalıntıları sarı kutularda vurgulanırken, benzer kimyasal özellikleri paylaşan amino asit kalıntıları gri ve yeşil kutularda gösterilmiştir.



Tekirdag / Lammspringe	Whole Genome	ORF	RdRp Coding Region	5' UTR	3' UTR	Whole protein	RdRp
Pairwise Identity rate	85.33%	87.51%	88.65%	78.53%	91.53%	94.60%	96.02%

Şekil 4.8 *Triamitovirus tuex1* Isolate Tekirdag'ın Isolate Lammspringe ile genom organizasyonunun şematik gösterimi.



Şekil 4.9 Triamitovirus tuex1 Isolate Tekirdag'ın 5'- (sol) ve 3'-terminallerinin (sağ) tahmin edilen ikincil yapısı. RNA katlanmasını ve hibridizasyonunu tahmin etmek ve Gibbs serbest enerji değerini hesaplamak için Mfold web sunucusu kullanılmıştır. Çizelge 4.3'te tüm genomu elde edilen virüsün özellikleri verilmiştir.

Çizelge 4.3 Tüm genomu elde edilen virüsün özellikleri

Virüs Konağı	*Tuber excavatum* (AKATA&SAHIN TT 002)
Dizilenme Durumu	Tüm
Virüs Adı (nt) Contig Numarası	Tuber excavatum mitovirus strain Tekirdag (3300) Contig 3
BLASTp Eşleşmesi (Erişim numarası, e-değeri, yüzde benzerlik)	Tuber excavatum mitovirus RNA bağımlı RNA polimeraz (AEP83726.1, 0.0, 94.60%)
Önerilen Cins	*Triamitovirus*
5' UTR (nt)	774
ORF (nt)	2406
3' UTR (nt)	118
Protein Uzunluğu (aa) (% tahmin edilen)	802 (%100)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, Trakya Bölgesi'nden toplanmış *Tuber excavatum*'daki RNA mikovirüslerinin varlığı ve genetik özellikleri hakkında bir araştırma sunulmuştur. Moleküler ve morfolojik teşhis ve inceleme yöntemleri, PZR amplifikasyonu ve NGS kombinasyonuyla, bu önemli mantar türündeki viral parçacıklar araştırılmıştır. Bu çalışmada tanımlaması yapılan *Triamitovirus tuex1* Isolate Tekirdag, *Tuber excavatum*'a ait bir mitovirüsün Türkiye'den ilk raporudur.

Stielow vd. (2012), ilk kez Tuber excavatum mitovirus'ü tanımlamışlardır. Bu çalışmada, Türkiye'den ilk kez *Tuber excavatum*'a ait bir mitovirüs kaydı sunulmuştur. Tuber excavatum mitovirus'ün tüm genom uzunluğu 3305 nt uzunluğunda olup %38 G-C konsantrasyonuna sahiptir. Genomda, *Mitovirüs* cinsi üyelerinin ortak karakteristik özelliği olan tek bir açık okuma çerçevesi mevcuttur. 792 nt uzunluğundaki 5 UTR'yi 3183 pozisyonunda biten RdRp kodlayan ORF takip eder.

Tuber aestivum'da tanımlanmış bir mitovirüs olan Tuber aestivum mitovirus'ün tam genomu 3480 nükleotid (nt) uzunluğundadır ve %39 gibi düşük bir G+C içeriğine sahiptir. Mitovirüslerin ortak karakteristik özelliği olan tek bir ORF içerir. 149 nt uzunluğundaki 5′ UTR'yi, RdRp'yi kodlayan ORF takip eder (Stielow vd. 2011).

Bir diğer *Triamitavirus* üyesi olan Geopora sumneriana mitovirus 1'in genomu 3146 nükleotitten (nt) oluşmaktadır ve %40,59 G+C içeriğine sahiptir. 5' RACE ile tanımlanan Geopora sumneriana mitovirus 1 cDNA parçasının 5' UTR'sinin 514 nükleotid uzunluğunda olduğu bulunmuştur ki bu mitovirüsler için ortalama boyutun üzerindedir. Öte yandan, 3' UTR'si 148 nükleotid uzunluğundadır (Sahin ve Akata 2019).

Triamitovirus tuex1 Isolate Tekirdag ile en çok benzerlik gösteren, *Triamitovirus* üyesi olan Rhizoctonia solani mitovirus 39 olarak adlandırılmış virüs, 2805 nt'den oluşmaktadır, cinsinin üyeleri için karakteristik olan %61,9 A+U içeriğine sahiptir ve tek

bir açık okuma çerçevesi (ORF) içerir. 5′- ve 3′- çevrilmemiş bölgelerin (UTR) uzunlukları sırasıyla 145 ve 138 nt'dir (Li vd. 2020).

Mitovirüsler için %70 RdRp dizi özdeşliği eşiğini belirleyen tür ayırma kriterleri olan genom ve protein seviyelerinde sırasıyla %85 ve %94'ü aşan yüksek dizi benzerlik oranları dikkate alındığında, aynı konak *Tuber excavatum*'u enfekte eden iki TeV izolatı, *Triamitovirus tuex1* mitovirüs türünün iki temsili üyesi (suşu, varyantı) olarak kabul edilmiştir. Tek bir konakçı tür içinde, bir virüs türünün farklı genotiplerinin ortaya çıkmasını çeşitli faktörler etkileyebilir.

Bu faktörler arasında mutasyon oranları ve genetik rekombinasyon, antiviral durum veya genetik arka plan gibi konak faktörleri ve iklim değişikliği veya habitat bozulması gibi virüsler üzerinde seçilim baskısı uygulayan ekolojik faktörler de olabilir (Elena ve Sanjuan 2007, Parvez ve Parveen 2017, LaTourrette ve Garcia-Ruiz 2022). Evrimsel açıdan, virüsler ve konakçıları arasındaki etkileşimler karmaşıktır ve çeşitli evrimsel süreçlerden kaynaklanabilir. Bunlar arasında virüslerin ve konakçıların topolojik uyum gösterdiği "kodivergens (birlikte ıraksama)", virüsün filogenetik olarak bir öncekinden uzak olan yeni bir konağa yatay transferini içeren "değişim" ve parazitin aynı konak türü içinde adaptif radyasyona uğrayarak aynı konak aralığına sahip birden fazla parazit grubu oluşmasıyla sonuçlanan “duplikasyon” (konak içi farklılaşma) yer almaktadır (Göker vd. 2011).

Parazitlerin evriminin konaklarının evrimine ne kadar bağlı olduğu evrimsel biyolojideki temel bir sorudur (Klassen 1992, Johnson vd. 2003). Virüsler konaklarına özgüyse ve yalnızca dikey olarak bulaşıyorsa, filogenileri Fahrenholz'un zorunlu birlikte ıraksama kuralına bağlı kalarak konaklarınınkiyle uyumlu olmalıdır (de Vienne vd. 2013). Konak değiştirme, konak içi farklılaşma veya neslinin tükenmesi gibi olayların bir kombinasyonu, virüslerin ve konaklarının filogenileri arasında uyumsuzluğa neden olabilir. Bu bağlamda "değişim", parazitin yatay transferini ve filogenetik olarak bir öncekinden uzak olan yeni bir konakta başarılı bir şekilde yerleşmesini ifade eder. Bu aktarım parazit türleşmesine yol açarsa, "tam değişim" olarak adlandırılır, aksi takdirde "eksik değişim" olur. "Duplikasyon", parazitin aynı konak türü içinde adaptif

radyasyonunu, aynı konak aralığına sahip birden fazla parazit grubu üretilmesini ifade eder (Göker vd. 2011).

Daha önce yapılan bir araştırmada, farklı soylardan gelen mikovirüslerin konaklarıyla birleştiği hipotezini değerlendirmek için gelişmiş istatistiksel yöntemler kullanılmıştır. Mitovirüsle ilgili 25 diziden oluşan sınırlı bir veri kümesi kullanılarak Mitovirüslerin evrimsel modellerinin kodivergens yerine duplikasyon-değişim modeline yakından benzediği gözlemlenmiştir (Göker vd. 2011).

Triamitovirus tuex1 izolatlarının aynı konak tür içinde ortaya çıkması, adaptif radyasyondan kaynaklanan bir duplikasyon olayını yansıtıyor gibi görünmektedir. *Triamitovirus tuex1* üyelerinin çeşitli genomik bölgeleri farklı oranlarda evrimleşmektedir. Karşılaştırmalı analizler her iki izolatın 3' UTR'lerinin yüksek oranda korunduğunu (%91,53 benzerlik), 5' UTR'lerinin ise en fazla çeşitliliği (%78,53) gösterdiğini ortaya koymaktadır. Virüs izolatlarının 3' UTR'lerinde gözlemlenen nispeten yüksek dizi benzerliği, pozitif (+) ssRNA virüslerinin genom replikasyonu sırasında negatif (-) zincirin sentezlenmesindeki önemli rollerine bağlanabilmektedir.

Bu çalışma ile bir mitovirüs izolatının tam genomunu dizileyip karakterize ederek mevcut mikovirüs dizisi veri tabanını genişletmek ve yakın ilişkili mitovirüs izolatları üzerinde karşılaştırmalı genomik analizler gerçekleştirerek mitovirüs genomunu ve protein çeşitliliğini etkileyen evrimsel süreçleri daha iyi anlamak hedeflenmiştir.

KAYNAKLAR

Abbas, A. 2016. A review paper on mycoviruses. J. Plant Pathol. Microbiol, 7(2), 0-13.

Akata, I., Sevindik, M. and Şahin, E. 2020. Tuber fulgens Quél., a new record for Turkish truffles. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 8(11), 2472-2475.

Akata, I., Keskin, E. and Sahin, E. 2021. Molecular characterization of a new mitovirus hosted by the ectomycorrhizal fungus Albatrellopsis flettii. Archives of Virology, 166, 3449-3454.

Akata, I., Edis, G., Keskin, E. and Sahin, E. 2023. 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.

Akata, I., Edis, G., Ozbey, B.G. Keskin, E. and Sahin, E. 2024. Complete Genome Analyses of a Novel Flexivirus with Unique Genome Organization and Three Endornaviruses Hosted by the Mycorrhizal Fungus Terfezia claveryi. Curr Microbiol 81, 210.

Amicarelli, F., Bonfigli, A., Colafarina, S., Cimini, A. M., Pruiti, B., Cesare, P. and Miranda, M. 1999. Glutathione dependent enzymes and antioxidant defences in truffles: organisms living in microaerobic environments. Mycological research, 103(12), 1643-1648.

Amorim, A.O., Orlandelli, R.C. and Pamphile, J.A. 2019. Controle de patógenos do cacaueiro (Theobroma cacao L.) por fungos endofíticos dos gêneros trichoderma e clonostachys. Rev. UNINGÁ Rev. 34, 1–10.

Andika, I. B., Wei, S., Cao, C., Salaipeth, L., Kondo, H. and Sun, L. 2017. Phytopathogenic fungus hosts a plant virus: A naturally occurring cross-kingdom viral infection. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(46), 12267-12272.

Banks, G. T., Buck, K. W., Chain, E. B., Darbyshire, J. E. and Himmelweit, F. 1969. Virus-like particles in penicillin producing strains of Penicillium chrysogenum. Nature, 222(5188), 89-90.

Bartholomäus, A., Wibberg, D., Winkler, A., Pühler, A., Schlüter, A., and Varrelmann, M. 2016. Deep sequencing analysis reveals the mycoviral diversity of the virome of an avirulent isolate of Rhizoctonia solani AG-2-2 IV. PLoS One, 11(11), e0165965.

Berry, E. A., and Bevan, E. A. 1972. A new species of double-stranded RNA from yeast. Nature, 239(5370), 279-280.

Bian, R., Andika, I. B., Pang, T., Lian, Z., Wei, S., Niu, E. and Sun, L. 2020. Facilitative and synergistic interactions between fungal and plant viruses. Proceedings of the National Academy of Sciences, 117(7), 3779-3788.

Bonito, G. M., Gryganskyi, A. P., Trappe, J. M. and Vilgalys, R. 2010. A global meta-analysis of Tuber ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal. *Molecular Ecology*, *19*(22), 4994-5008.

Bonito, G.M. and Smith, M.E. 2016. General Systematic Position of the Truffles: Evolutionary Theories. In: Zambonelli, A., Iotti, M., Murat, C. (eds) True Truffle (Tuber spp.) in the World. Soil Ecology, Systematics and Biochemistry, 3-18.

Breitbart, M. and Rohwer, F. 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? Trends in microbiology, 13(6), 278-284.

Bruenn, J. A., Warner, B. E. and Yerramsetty, P. 2015. Widespread mitovirus sequences in plant genomes. PeerJ, 3, 876.

Bruns, T. D., White, T. J. and Taylor, J. W. 1991. Fungal molecular systematics. Annual Review of Ecology and systematics, 22(1), 525-564.

Cao, X., Liu, J., Pang, J., Kondo, H., Chi, S., Zhang, J. and Andika, I. B. 2022. Common but nonpersistent acquisitions of plant viruses by plant-associated fungi. Viruses, 14(10), 2279.

Castellano, M. A. and Türkoğlu, A. 2012. New records of truffle taxa in Tuber and Terfezia from Turkey. Turkish Journal of Botany, 36(3), 295-298.

Charya, L. S. and Garg, S. 2019. Advances in methods and practices of ectomycorrhizal research. In Advances in Biological Science Research (pp. 303-325). Academic Press.

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

Das, R., Rai, A. and Mishra, DC. 2023. CNN_FunBar: Advanced Learning Technique for Fungi ITS Region Classification. Genes, 14(3):634.

De Vienne, D.M., Refrégier, G., López-Villavicencio, M., Tellier, A., Hood, M.E. and Giraud, T.J.N.P. 2013. Cospeciation vs host-shift speciation: methods for testing, evidence from natural associations and relation to coevolution. New Phytologist, 198(2): 347-385.

Domingo, E. J. J. H. and Holland, J. J. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. Annual review of microbiology, 51(1), 151-178.

Donaire, L., Pagán, I. and Ayllón, M. A. 2016. Characterization of Botrytis cinerea negative-stranded RNA virus 1, a new mycovirus related to plant viruses, and a reconstruction of host pattern evolution in negative-sense ssRNA viruses. Virology, 499, 212-218.

Doyle, J. 1991. DNA protocols for plants. In Molecular techniques in taxonomy. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 283-293.

Elena, S.F. and Sanjuán, R. 2007. Virus evolution: insights from an experimental approach. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 38: 27-52.

Ellis, L. F. and Kleinschmidt, W. J. 1967. Virus-like particles of a fraction of statolon, a mould product. Nature, 215(5101), 649-650.

Erkmen, S., Sahin, E. and Akata, I. 2024. Full-length genome characterization of a novel mitovirus isolated from the root rot fungus Armillaria mellea. Virus genes, 60(1), 65-70.

Falcone, P. M., Baiano, A., Conte, A., Mancini, L., Tromba, G., Zanini, F. and Del Nobile, M. A. 2006. Imaging techniques for the study of food microstructure: a review. Advances in food and nutrition research, 51, 205-263.

Fan, L., Cao, J.Z. and Li, Y. 2013. A reassessment of excavated Tuber species from China based on morphology and ITS rDNA sequence data. Mycotaxon, 124(1): 155-163.

Fazaeli, M., Tahmasebi, M. and Djomeh, Z. E. 2012. Characterization of food texture: application of microscopic technology. Current microscopy contributions to advances in science and technology, 1, 855-871.

Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L. and Gurr, S. J. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. Nature, 484(7393), 186-194.

Wernig, F., Buegger, F., Pritsch, K., and Splivallo, R. (2018). Composition and authentication of commercial and home-made white truffle-flavored oils. Food Control, 87, 9-16.

Fonseca, P., Ferreira, F., da Silva, F., Oliveira, L. S., Marques, J. T., Goes-Neto, A. and Gruber, A. 2020. Characterization of a novel mitovirus of the sand fly Lutzomyia longipalpis using genomic and virus–host interaction signatures. Viruses, 13(1), 9.

García-Pedrajas, M. D., Cañizares, M. C., Sarmiento-Villamil, J. L., Jacquat, A. G. and Dambolena, J. S. 2019. Mycoviruses in biological control: From basic research to field implementation. Phytopathology, 109(11), 1828-1839.

Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L. and Suzuki, N. 2015. 50-plus years of fungal viruses. Virology, 479, 356-368.

Ghannam, M. G., and Varacallo, M. 2023. Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). PMID: 30571074.

Göker, M., Scheuner, C., Klenk, H.P., Stielow, J.B. and Menzel, W. 2011. Codivergence of mycoviruses with their hosts. PLoS One 6(7): e22252.

Green, M. R., and Sambrook, J. 2019. Nested polymerase chain reaction (PCR). Cold Spring Harbor Protocols, 2019(2), pdb-prot095182.

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

Helling, R. B., Goodman, H. M. and Boyer, H. W. 1974. Analysis of endonuclease R· Eco RI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. Journal of virology, 14(5), 1235-1244.

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E. and Zhang, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological research, 111(5), 509-547.

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

Hollings, M. 1962. Viruses associated with a die-back disease of cultivated Mush-room.

Johnson, K.P., Adams, R.J., Page, R.D. and Clayton, D.H. 2003. When do parasites fail to speciate in response to host speciation? Systematic Biology, 52(1): 37-47.

Kirk,P. M., Cannon,P. F., David,J. C., Stalpers,J. A., P. M. Kirk, P. F. Cannon, J. C. and David, J. A. Stalperseditors, 20013144931, English, Book, UK, (Ed.9), Wallingford, Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi: 9th edition, (xi + 655 pp.), CABI Publishing, Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi: 9th edition.

Kirkpatrick, F. H., K. Guiseley, R. Provonchee and S. Nochumson. 1991. High gel strength low electroendosmosis agarose. U. S. 4983268.

Klassen, G.J. 1992. Coevolution: a history of the macroevolutionary approach to studying host-parasite associations. The Journal of Parasitology, 78: 573-587.

Koonin, E. V., Senkevich, T. G. and Dolja, V. V. 2006. The ancient Virus World and evolution of cells. Biology direct, 1, 1-27.

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

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular biology and evolution, 35(6), 1547.

LaTourrette, K. and Garcia-Ruiz, H. 2022. Determinants of virus variation, evolution, and host adaptation. Pathogens, 11(9): 1039.

Li, S., Li, and Y. Hu. 2020. Full genome sequence of a new mitovirus from the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Arch Virol* 165, 1719–1723.

Li, Y., Reeves, R. M., Wang, X., Bassat, Q., Brooks, W. A., Cohen, C. and Zar, H. J. 2019. Global patterns in monthly activity of influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and metapneumovirus: a systematic analysis. The Lancet Global Health, 7(8), e1031-e1045.

Lopez-Jimenez, J., Herrera, J. and Alzate, J. F. 2023. Expanding the knowledge frontier of mitoviruses in Cannabis sativa. Infection, Genetics and Evolution, 116, 105523.

Lorenz, T. C. 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. Journal of Visualized Experiments, (63), e3998.

Louten J. 2016. Virus Structure and Classification. Essential Human Virology. 2016:19–29.

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.

Machida, M., Yamada, O. and Gomi, K. 2008. Genomics of Aspergillus oryzae: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. DNA research, 15(4), 173-183.

Magae, Y. and Sunagawa, M. 2010. Characterization of a Mycovirus Associated with the Brown Discoloration of Edible Mushroom, Flammulina velutipes. Virol. J., 7, 342.

Markham, A. F. 1993. The polymerase chain reaction: a tool for molecular medicine. BMJ: British Medical Journal, 306(6875), 441.

Martin, K.J. and Rygiewicz, P.T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiol 5, 28.

Marzano, S. Y. L., Nelson, B. D., Ajayi-Oyetunde, O., Bradley, C. A., Hughes, T. J., Hartman, G. L. and Domier, L. L. 2016. Identification of diverse mycoviruses through metatranscriptomics characterization of the viromes of five major fungal plant pathogens. Journal of virology, 90(15), 6846-6863.

Maske, B. L., Neto, D. P. D. C., da Silva, G. B., Lindner, J. D. D., Soccol, C. R. and de Melo Pereira, G. V. 2022. Yeast viruses and their implications in fermented foods and beverages. Current Opinion in Food Science, 47, 100879.

Mimouni, A., Deeth, H. C., Whittaker, A. K., Gidley, M. J. and Bhandari, B. R. 2010. Investigation of the microstructure of milk protein concentrate powders during rehydration: Alterations during storage. Journal of Dairy Science, 93(2), 463-472.

Mitchell, J. I. and Zuccaro, A. 2006. Sequences, the environment and fungi. Mycologist, 20(2), 62-74.

Muneret, L., Auriol, A., Thiéry, D. and Rusch, A. 2019. Organic farming at local and landscape scales fosters biological pest control in vineyards. Ecological applications, 29(1), e01818.

Neupane, A., Feng, C., Feng, J., Kafle, A., Bücking, H. and Lee Marzano, S. Y. 2018. Metatranscriptomic analysis and in silico approach identified mycoviruses in the arbuscular mycorrhizal fungus Rhizophagus spp. Viruses, 10(12), 707.

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

Nibert, M. L., Vong, M., Fugate, K. K. and Debat, H. J. 2018. Evidence for contemporary plant mitoviruses. Virology, 518, 14-24.

Nibert ML, Debat HJ, Manny AR, Grigoriev IV, De Fine Licht HH. 2019. Mitovirus and Mitochondrial Coding Sequences from Basal Fungus Entomophthora muscae. Viruses. 11(4):351.

Parvez, M.K. and Parveen, S. 2017. Evolution and emergence of pathogenic viruses: past, present, and future. Intervirology, 60(1-2): 1-7.

Patel, S. 2012. Food, health and agricultural importance of truffles: A review of current scientific literature. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 6(1), 15-27.

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

Roossinck, M. J. 2011. The good viruses: viral mutualistic symbioses. Nat Rev Microbiol 9, 99–108.

Roossinck, M. J. 2019. Evolutionary and ecological links between plant and fungal viruses. New Phytologist, 221(1), 86-92.

Sahin, E. and Akata, I. 2018. Viruses infecting macrofungi. Virusdisease, 29, 1-18.

Sahin, E. and Akata, I. 2019. Complete genome sequence of a novel mitovirus from the ectomycorrhizal fungus Geopora sumneriana. Archives of Virology, 164, 2853-2857.

Sahin, E., Akata, I. and Keskin, E. 2020. Novel and divergent bipartite mycoviruses associated with the ectomycorrhizal fungus Sarcosphaera coronaria. Virus research, 286, 198071.

Sahin, E., Akata, I. and Keskin, E. 2021a. Molecular characterization of a new endornavirus inhabiting the ectomycorrhizal fungus Hygrophorus penarioides. Brazilian Journal of Microbiology, 52(3), 1167-1172.

Sahin, E., Keskin, E. and Akata, I. 2021b. Full-length genome characterization of a new fusagravirus hosted by the spring orange peel fungus Caloscypha fulgens. Acta virologica, 65(3).

Sahin, E., Keskin, E. and Akata, I. 2021c. Molecular characterization of the complete genome of a novel partitivirus hosted by the saprobic mushroom Leucocybe candicans. Archives of Microbiology, 203(9), 5825-5830.

Sahin, E., Keskin, E. and Akata, I. 2021d. Molecular characterization of a novel partitivirus hosted by the false morel mushroom Gyromitra esculenta. Archives of Virology, 166, 1247-1251.

Sahin, E., Keskin, E. and Akata, I. 2021e. The unique genome organization of two novel fusariviruses hosted by the true morel mushroom Morchella esculenta. Virus Research, 302, 198486.

Sahin, E., Ozbey Saridogan, B. G., Keskin, E. and Akata, I. 2023. Identification and complete genome sequencing of a novel betapartitivirus naturally infecting the mycorrhizal desert truffle Terfezia claveryi. Virus Genes, 59(2), 254-259.

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

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Detection of DNA in agarose gels. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (3rd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 5-14.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A. and White, M. M. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the national academy of sciences, 109(16), 6241-6246.

Seifert, K. A., Wingfield, B. D. and Wingfield, M. J. 1995. A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous Ascomycetes and ascomycetous anamorphs. Canadian Journal of Botany, 73(S1), 760-767.

Shi, X., Cordero, T., Garrigues, S., Marcos, J. F., Daròs, J. A. and Coca, M. 2019. Efficient production of antifungal proteins in plants using a new transient expression vector derived from tobacco mosaic virus. Plant biotechnology journal, 17(6), 1069-1080.

Sinden, J. W. and Hauser, E. J. M. S. 1950. Report on two new mushroom diseases. Mushroom Science, 1, 96-100.

Smith, S. B., Aldridge, P. K. and Callis, J. B. 1989. Observation of individual DNA molecules undergoing gel electrophoresis. Science, 243(4888), 203-206.

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

Stielow, B., Klenk, and HP., Winter, S. 2011. A novel *Tuber aestivum* (Vittad.) mitovirus. *Arch Virol* 156, 1107–1110.

Stielow, J. B., Bratek, Z., Klenk, H. P., Winter, S. and Menzel, W. 2012. A novel mitovirus from the hypogeous ectomycorrhizal fungus Tuber excavatum. Archives of virology, 157, 787-790.

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

Van Alfen, N. K., Jaynes, R. A., Anagnostakis, S. L. and Day, P. R. 1975. Chestnut blight: biological control by transmissible hypovirulence in Endothia parasitica. Science, 189(4206), 890-891.

van der Heijden, M.G.A., Martin, F.M., Selosse, M.-A. and Sanders, I.R. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. New Phytol, 205: 1406-1423.

Vilgalys R, Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several Cryptococcus species. J Bacteriol 172:4238–4246.

Villan Larios, D. C., Diaz Reyes, B. M., Pirovani, C. P., Loguercio, L. L., Santos, V. C., Góes-Neto, A. and Aguiar, E. R. G. R. 2023. Exploring the mycovirus universe: Identification, diversity, and biotechnological applications. Journal of Fungi, 9(3), 361.

Voth, P. D., Mairura, L., Lockhart, B. E. and May, G. 2006. Phylogeography of Ustilago maydis virus H1 in the USA and Mexico. Journal of general virology, 87(11), 3433-3441.

Wan, S. P., Yu, F. Q., Tang, L., Wang, R., Wang, Y., Liu, P. G. and Zheng, Y. 2016. Ectomycorrhizae of Tuber huidongense and T. liyuanum with Castanea mollissima and Pinus armandii. Mycorrhiza, 26, 249-256.

Wang, Q., Zou, Q., Dai, Z., Hong, N., Wang, G. and Wang, L. 2022. Four novel mycoviruses from the hypovirulent Botrytis cinerea SZ-2-3y isolate from Paris polyphylla: molecular characterisation and mitoviral sequence transboundary entry into plants. Viruses, 14(1), 151.

Wernig, F., Buegger, F., Pritsch, K. and Splivallo, R. 2018. Composition and authentication of commercial and home-made white truffle-flavored oils. Food Control, 87, 9-16.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1), 315-322.

Wyckhuys, K. A., Lu, Y., Zhou, W., Cock, M. J., Naranjo, S. E., Fereti, A. and Furlong, M. J. 2020. Ecological pest control fortifies agricultural growth in Asia–Pacific economies. Nature Ecology and Evolution, 4(11), 1522-1530.

Xie, J. and Jiang, D. 2014. New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. Annual Review of Phytopathology, 52, 45-68.

Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S. and Nayak S, C. 2016. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. FEMS microbiology reviews, 40(2), 182-207.

Zimmer, C. 2011. A planet of viruses. Journal of Clinical Investigation, 121(11), 4208.