

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI KLİNİK DERMATOFİT İZOLATLARINI ENFEKTE EDEN
MİKOVİRÜSLERİN BELİRLENMESİ, MOLEKÜLER OLARAK
NİTELENDİRİLMESİ VE KONAĞLARI İLE OLAN ETKİLEŞİMLERİNİN
İNCELENMESİ

Gülce EDİŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI KLİNİK DERMATOFİT İZOLATLARINI ENFEKTE EDEN MİKOVİRÜSLERİN BELİRLENMESİ, MOLEKÜLER OLARAK NİTELENDİRİLMESİ VE KONAKLARI İLE OLAN ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Gülce EDİŞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

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

Dermatofitlerden sorumlu en yaygın patojen *Trichophyton rubrum* (%53,1) olup, bunu *T. mentagrophytes* (%7,5), *Microsporum canis* (%6,9), *T. tonsurans* (%5,6), *T. interdigitale* (%5,0) ve *T. violaceum* (%3,8) takip etmektedir. Bu tez çalışmasında klinik dermatofit izolatlarını enfekte eden mikovirüslerin tespit edilmesi, genom dizilerinin tüm veya tüme yakın halde belirlenmesi, moleküler ve filogenetik özelliklerinin ortaya çıkartılması ve konakları ile olan etkileşimleri araştırılmıştır. Dermatofit izolatlarının genomik DNA'ları CTAB yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. ITS gen bölgeleri için polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve sanger dideoksi zincir sonlanma yöntemi ile diziler belirlenmiştir. Ardından, diziler BLASTn ile analiz edilerek dermatofitlerin moleküler tür teşhisleri gerçekleştirilmiştir. Dermatofit izolatlarından dsRNA ekstraksiyonu yapılarak virüs ile enfekte örnekler belirlenmiş, cDNA'ya çevrilmiş ve rastgele polimeraz zincir reaksiyonu ile diziler çoğaltılarak, yeni nesil dizileme ile dermatofit fungusu enfekte eden virüslerin dizileri elde edilmiştir. Virüs ile ilişkili dizilerin tüm genomunun elde edilmesi için RNA ligasyonu ve ardından RACE yöntemi kullanılmıştır. Biyoinformatik ve filogenetik olarak analiz edilen diziler sonucunda; *Lecanicillium aphanocladii*'yi enfekte eden iki yeni mikovirüsün tüm genomu ortaya çıkartılmıştır (*Lecanicillium aphanocladii* polynucovirus 1 ve *Lecanicillium aphanocladii* negative-stranded RNA virus 1). Morfolojik ve moleküler tür teşhisi çalışmaları sonucunda *Lecanicillium aphanocladii*'nin neden olduğu ilk dermatofitozun vaka takdimi rapor edilmiştir.

Haziran 2024, 80 sayfa

Anahtar Kelimeler: Mikovirüs, dsRNA, mikoviral biyoçeşitlilik, dermatofit, enfeksiyon

ABSTRACT

Master Thesis

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MYCOVIRUSES INFECTING SPECIFIC CLINICAL DERMATOPHYTE ISOLATES, AND INVESTIGATION OF THEIR INTERACTIONS WITH HOST ORGANISM

Gülce EDİŞ

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

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

The most common pathogen responsible for dermatophytosis is *Trichophyton rubrum* (53.1%), followed by *T. mentagrophytes* (7.5%), *Microsporum canis* (6.9%), *T. tonsurans* (5.6%), *T. interdigitale* (5.0%) and *T. violaceum* (3.8%). In this thesis, mycoviruses infecting clinical dermatophyte isolates were identified, their complete or near-complete genome sequences were determined, their molecular and phylogenetic characteristics were revealed and their interactions with their hosts were investigated. The genomic DNA of dermatophyte isolates was obtained using the CTAB method. Polymerase chain reaction was performed for ITS gene regions and sequences were determined by Sanger dideoxy chain termination method. Then, the sequences were analyzed by BLASTn, and molecular species identification of dermatophytes was performed. Virus-infected samples were identified by dsRNA extraction from dermatophyte isolates, translated into cDNA, and sequences were amplified by random polymerase chain reaction, and sequences of viruses infecting dermatophyte fungi were obtained by next-generation sequencing. RNA ligation followed by the RACE method obtained the whole genome of virus-associated sequences. Bioinformatics and phylogenetic analysis of the sequences revealed the whole genome of two new mycoviruses infecting the fungus *Lecanicillium aphanocladii* (*Lecanicillium aphanocladii* polymycovirus 1 and *Lecanicillium aphanocladii* negative-stranded RNA virus 1). As a result of morphological and molecular species identification studies, the first case report of dermatophytosis caused by the fungus *Lecanicillium aphanocladii* is reported.

June 2024, 80 page

Key Words: Mycovirus, dsRNA, mycoviral biodiversity, dermatophyte, infection

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca hayatıma ufacık bile olsa bir dokunuşu olan, hem akademik hem de duygusal yönden beni destekleyen, yanımda olan herkese derin bir minnettarlıkla teşekkür etmek istiyorum.

Değerli danışmanım Prof. Dr. Ilgaz AKATA'ya (Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı), lisans eğitimimin başlangıcında beni mantarların heyecan verici dünyasıyla tanıştıran ve içindeki sonsuz mikoloji tutkusu ile beni motive eden, her zorluğun üstesinden gelebileceğimi gösteren, lisanstan itibaren tüm çalışmalarımda her zaman destekleyici ve yol gösterici olan canım hocama içten bir şekilde minnettarlık duygusuyla teşekkür ederim.

Eş danışmanım olan değerli hocam Doç. Dr. Ergin ŞAHİN'e (Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı), laboratuvar çalışmalarına başladığım andan itibaren tüm deneyim ve tecrübelerini benimle paylaşan, hazır bilgi vermekle kalmayıp; o bilgiyi nasıl işleyeceğimi öğrenmeme olanak sağlayan, 4 yıl boyunca her sohbetimizde ufkumu genişleten, çalışmalarım ve bana olan güvenini her zaman hissettiğim, üzerimde çok büyük emeği olan değerli hocama içten bir teşekkür ederim.

En değerli arkadaşım Çağla DUMAN, aramıza kıtalar girmiş olmasına rağmen hayatıma her zaman en yakından tanık oldu. Cansel TAŞKIN, lisanstan itibaren gerek akademik gerek özel hayatımda her zaman yanımda oldu. Ahmetcan İMBATESEN, tez dönemimde beni her zaman motive etti. Şule DURUR ve Furkan Kutalmış DOĞAN, akademik hayallerime başından beri desteklerini esirgemediler. Değerli ekip ve yol arkadaşım Eda KUMRU bana her zaman bir telefon uzaktaydı. Tez döneminde tanıştığım dert ortağım Ezgi ALACA YILDIRIM, hep yanımda oldu.

Bu hayattaki en kıymetlim, doğduğum günden itibaren karşılaştığım her şeyle savaşmayı öğreten, tüm zorlukların üstesinden gelmemde beni cesaretlendiren ve yönlendiren, varlığı ve sevgisiyle bana güç veren canım annem Nimet Filiz AKBELEN'e içtenlikle teşekkür etmek isterim. Onun sevgi dolu desteği ve rehberliği, benim kişisel ve akademik

gelişmemde en önemli etken olmuştur. Dünya'ya geldiği an itibariyle en yakın arkadaşım olan biricik kardeşim Görkem EDİŞ'e tüm desteklerinden dolayı minnettarım. Sevgili kedim Turşu'ya hayatıma girdiği günden itibaren bana şans getirdiği için çok teşekkür ederim. Son olarak, mutlu bir çocukluk geçirmemi sağlayan ve şu an aramızda olmayan anneannem Güngör AKBELLEN'e teşekkür eder saygılarımı sunarım, şu an burada olmamdaki emeğini göz ardı edemem.

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca 2210/A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında beni maddi açıdan destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'na teşekkür ederim.

Bu tez çalışması; "Dermatofitoz Etmeni *Trichophyton rubrum*'u Enfekte Eden Mikovirüslerin Tanımlanması, Genomik Olarak Nitelendirilmesi Ve Konaklarında Meydana Getirdikleri Fenotipik Etkilerin Araştırılması" başlıklı ve 122Z630 numaralı, TÜBİTAK 3501-Kariyer Geliştirme Projesi tarafından desteklenmiştir.

Gülce EDİŞ
Ankara, Haziran 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETİ.....	4
2.1 Dermatofitler	4
2.2 <i>Trichophyton rubrum</i>	5
2.3 <i>Lecanicillium aphanocladii</i>	6
2.3 İnsan Patojeni Mantarlarda Yapılan Mikovirüs Çalışmaları	6
2.4 <i>Polymycoviridae</i>	7
2.5 <i>Mymonaviridae</i>	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	12
3.1 Materyal.....	12
3.1.1 Dermatofit izolatlarının temin edilmesi	12
3.1.2 Dermatofit örneklerinin hastalardan izole edilmesi, saf kültürlerinin elde edilmesi ve saklanması	12
3.2 Yöntem	12
3.2.1 Dermatofit örneklerinin mikroskopik değerlendirilmeleri.....	12
3.2.2 Dermatofit izolatlarından genomik DNA izolasyonu.....	13
3.2.3 Dermatofit izolatlarının moleküler teşhisi için ribozomal RNA içerisindeki ITS gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve nükleotit dizilerinin elektroforetik olarak belirlenmesi	15
3.2.4 PCR ile çoğaltılan dizilerin moleküler teşhisi için BLASTn kullanılması ve filogenetik analizlerin yapılması.....	16
3.2.5 Dermatofit İzolatlarından Viral Çift İplikçikli RNA (dsRNA) Ekstraksiyonu	18
3.2.6 Viral dsRNA içeriklerinin elektroforetik olarak belirlenmesi	20
3.2.7 Agaroz jel elektroforezinde dsRNA+ örneklerin cDNA'ya çevrilmesi ve rPCR tepkimesi.....	21
3.2.8 NGS sonucunda ham okumaların yeni baştan (de novo) birleştirme yaklaşımı ile birleştirilmesi.....	22
3.2.9 Tanımlanan dsRNA segmentlerinden tüm genom dizilerin elde edilmesi amacıyla RNA ligasyonu, RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) için cDNA hazırlanması ve primer tasarlanması	23
3.2.10 TA klonlama yönteminin uygulanması.....	24
3.2.11 Elde edilen dsRNA dizilerinin birleştirilerek tüm viral genom dizilerinin elde edilmesi	27
3.2.12 Tüm viral genomlara ait dsRNA dizilerinin biyoinformatik ve filogenetik olarak analiz edilmesi.....	27
3.2.13 Virüs içermeyen dermatofit izolatlarının elde edilmesi.....	28

3.2.14 Virüs ile enfekte olan ve virüs içermeyen dermatofit izolatlarının kültürlerinin morfolojik farklılıklarının gözlemlenmesi	29
3.2.15 Virüs ile enfekte olan ve virüs içermeyen dermatofit izolatlarına antifungal duyarlılık testi yapılması	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	31
4.1 Dermatofit İzolatlarının Temin Edilmesi Ve Detaylı Bilgileri.....	31
4.2 Dermatofit Örneklerinin Morfolojik Teknikler ile Değerlendirilmeleri.....	33
4.3 Dermatofit Örneklerin Moleküler Değerlendirilmeleri.....	38
4.4 DNA Dizi Analizi Sonuçları	40
4.5 Viral dsRNA İçeriklerinin İncelenmesi	43
4.6 dsRNA+ Örneklerin cDNA ve rPCR Yöntemleri ile Değerlendirilmesi	45
4.7 NGS Analizleri Sonucunda Virüs ile İlişkili Contiglerin Belirlenmesi	46
4.8 Genomu Tüme Yakın Olan Virüs İlişkili Contiglere RACE Yöntemi Uygulanması	50
4.9 TA Klonlama İle Terminal Bölgelerin Sekanslanması.....	52
4.10 TA Klonlama ile Lecanicillium aphanocladii polymycovirus 1'in Orijinal Genomik Segmentinin Sekanslanması	53
4.11 Lecanicillium aphanocladii polymycovirus 1 (LaPMV1)	54
4.12 Lecanicillium aphanocladii negative-stranded RNA virus 1 (LaNSRV1).....	58
4.13 Virüs İçermeyen Dermatofit İzolatları.....	60
4.14 Virüs İçeren Tr247 Numaralı Örneğin Virüs İçermeyen Örnekler İle Morfolojik Karşılaştırılması	62
4.15 Antifungal Duyarlılık Testi Sonuçları.....	64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	66
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	79

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat (Celcius) derece
~	Yaklaşık
Gr	Gram
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
pmol	Pikomol
Rpm	Dakikada Devir
α	Alfa
β	Beta
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ M	Mikromolar

Kısaltmalar

ATP	Adenozin trifosfat
BbPmV	Beauveria bassiana polymycovirus
BLAST	Basic Local Alignmet Search Tool
cDNA	Complementary DNA (Komplementer DNA)
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromür
dH ₂ O	Distile su
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozit trifosfat
dsRNA	Çift İplikçikli RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtOH	Etanol
HCl	Hidroklorik Asit
ICTV	Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi
ITS	Internal transcribed spacer
kbp	Kilobaz çifti
LaNSRV	Lecanicillium aphanocladii negative-stranded RNA virus
LaPmV	Lecanicillium aphanocladii polymycovirus
LB	Luria-Bertani
LSU	Large subunit (Büyük alt ünite)
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MgCl ₂ .6H ₂ O	Magnezyum klorür hegzahidrat
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyon

NaCl	Sodyum Klorür
NGS	Next generation sequencing (Yeni nesil dizileme)
NP	Nükleoprotein
ORF	Açık okuma çerçevesi
PASrp	Prolin-alanin-serince zengin protein
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PEG	Polietilen Glikol
PVP	Polivinilpirolidon
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RdRp	RNA bağımlı RNA polimeraz
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonükleoprotein
rPCR	Rastgele (random) polimeraz zincir reaksiyonu
SDA	Sabouraud Dekstroz Agar
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SPAT	Tekli primer amplifikasyon tekniği
SSU	Small subunit (Küçük alt birim)
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TM	Melting temperature
TSS	Transformasyon ve saklama çözeltisi
UTR	Untranslated region (Translasyonu yapılmayan bölgeler)
WHO	Dünya sağlık örgütü
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galakto-piranosid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 İnsanlarda dermatofitozun anatomik konuma göre sınıflandırılması.....	5
Şekil 3.1 Genomik DNA izolasyonunun şematik gösterimi.....	14
Şekil 3.2 ITS gen bölgesi ve ITS1-ITS4 primerlerinin gösterimi.....	16
Şekil 3.3 Dermatofit izolatlarından viral dsRNA ekstraksiyonunun şematik gösterimi.....	20
Şekil 4.1 İzolasyon kaynağına göre dermatofit izolatlarının grafiği.....	31
Şekil 4.2 Tr295, Tr163, Tr165, Tr300, Tr97, Tr214 numaralı <i>T. rubrum</i> izolatlarının sikloheksimitli SDA besiyerindeki ön ve arka yüzeylerinin görüntüsü.....	34
Şekil 4.3 Tr159 numaralı <i>T. rubrum</i> örneğinin binoküler mikroskop görüntüsü.....	35
Şekil 4.4 Tr159 numaralı <i>T. rubrum</i> örneğinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü.....	36
Şekil 4.5 Tr247 örnek numaralı <i>L. aphanocladii</i> izolatının sikloheksimitli SDA besiyerindeki ön ve arka yüzeyinin görüntüsü.....	37
Şekil 4.6 Tr247 numaralı <i>L. aphanocladii</i> örneğinin binoküler mikroskop görüntüsü.....	37
Şekil 4.7 Tr247 numaralı <i>L. aphanocladii</i> örneğinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü.....	38
Şekil 4.8 ITS PCR ürünlerinin elektroforetik olarak belirlenmesi.....	38
Şekil 4.9 ITS PCR ürünlerinin elektroforetik olarak belirlenmesi.....	39
Şekil 4.10 ITS PCR ürünlerinin elektroforetik olarak belirlenmesi.....	39
Şekil 4.11 <i>T. rubrum</i> ve <i>T. rubrum</i> kompleksi üyelerinin dizilerine dayanarak oluşturulan maksimum olasılık filogenetik ağacı.....	42
Şekil 4.12 <i>L. aphanocladii</i> ve <i>Lecanicillium</i> cinsinin diğer üyelerinin dizilerine dayanarak oluşturulan maksimum olasılık filogenetik ağacı.....	43
Şekil 4.13 Viral dsRNA jel elektroforezi	44
Şekil 4.14 Viral dsRNA jel elektroforezi.....	44
Şekil 4.15 Viral dsRNA jel elektroforezi.....	45
Şekil 4.16 Tr247 numaralı örneğin rPCR ürününün agaroz jel elektroforezi.....	46
Şekil 4.17 Polimikovirüs için yapılan RACE PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	51
Şekil 4.18 Negative-Stranded RNA virus için yapılan RACE PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	51
Şekil 4.19 Negative-Stranded RNA virus için yapılan koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	52
Şekil 4.20 LaPmV1'in segmentlerinin gösterimi.....	53
Şekil 4.21 SPAT PCR ürününün agaroz jel elektroforezi.....	54
Şekil 4.22 5. segment için yapılan koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	54
Şekil 4.23 LaPMV1'in dsRNA genomunun şematik gösterimi.....	56
Şekil 4.24 LaPMV1'e ait dsRNA'ların 5'- ve 3'- terminal bölgelerinin hizalanması.....	57
Şekil 4.25 LaPMV1 ve ilişkili polimikovirüslerin RdRp dizilerine dayanarak oluşturulan maksimum olasılık filogenetik ağacı.....	57
Şekil 4.26 LaPMV1'in RdRp katalitik palmiye alt domain dizilerinin benzer virüsler ile hizalanması.....	58
Şekil 4.27 LaNSRV1'in dsRNA genomunun şematik gösterimi.....	59
Şekil 4.28 LaNSRV1 ve ilişkili Mymonaviridae familyasının diğer üyelerinin RdRp'lerinin amino asit dizilerine dayalı maksimum olasılık filogenetik ağacı.....	59
Şekil 4.29 LaNSRV1'in RdRp katalitik palmiye alt domain dizilerinin benzer virüsler ile hizalanması.....	60
Şekil 4.30 Virüs içeren ve virüs içermeyen <i>L. aphanocladii</i> izolatının viral dsRNA jel elektroforezi.....	61
Şekil 4.31 LaPMV1 için yapılan RT-PCR ürününün agaroz jel elektroforezi.....	61
Şekil 4.32 +Tr247 ve -Tr247 kültürlerinin ön ve arka yüzeyleri.....	62
Şekil 4.33 +Tr247 ve -Tr247 örneklerinin kültür çap ölçümlerinin karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.34 +Tr247 ve -Tr247 örneklerinin konidium sayılarının karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.35 Virüs ile enfekte <i>L. aphanocladii</i> örneğinin (+Tr247) antifungal duyarlılık testi plakası.....	64
Şekil 4.36 Virüsten arındırılmış <i>L. aphanocladii</i> örneğinin (-Tr247) antifungal duyarlılık testi plakası.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 dsRNA ekstraksiyonunda kullanılan tamponların içerikleri.....	19
Çizelge 4.1 Temin edilen dermatofit örneklerine ait bilgiler.....	31
Çizelge 4.2 Dermatofit izolatlarının adları, erişim numaraları ve BLASTn analizi sonuçları.....	41
Çizelge 4.3 Tr247 örnek numaralı <i>L. aphanocladii</i> 'de tanımlanan virüs ilişkili contigler.....	47
Çizelge 4.4 Contiglere özgü tasarlanan primerlerin listesi.....	50
Çizelge 4.5 LaPMV1'in özellikleri.....	56
Çizelge 4.6 Antifungal duyarlılık testi sonucunda MIC sonuçları.....	65

1. GİRİŞ

Mantarlar, spor üreten, hifleri olan ve hücre duvarlarında karmaşık karbonhidratlar içeren canlılardır. Klorofil içermedikleri için bitkiler gibi fotosentez yapmazlar. Dışsal enzimler salgılayarak organik maddelerin parçalanmasını sağlar ve doğadaki besin döngüsüne katkıda bulunurlar. Hayatta kalmak için diğer organizmaların ürettiği organik besinlere ihtiyaç duyarlar. Parazit olanlar canlı organizmalardan, ayrıştırıcılar ise ölü organik maddelerden beslenirler. Ayrıştırıcı mantarlar, ölü organik maddelerin parçalanmasına yardımcı olurken, parazitler özellikle bitki ve hayvanlara zarar vererek ekonomik kayıplara yol açabilirler. Mikorizal mantarlar bitkilerin su ve mineral alımına yardımcı olurken, liken oluşturanlar, algler veya mavi-yeşil bakterilerle simbiyotik bir ilişki kurarak tek bir yapı oluştururlar (Webster ve Weber 2007).

Mantar patojenleri ve enfeksiyonları, dünya çapında giderek artan ve önemli bir küresel halk sağlığı sorununu oluşturmaktadır (Anonymous 2022). Özellikle, tüberküloz geçmişi, kronik solunum yolu rahatsızlıkları, insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV) enfeksiyonu, diyabet ve kanser gibi sağlık sorunlarına sahip olanlar veya bağışıklık sistemi zayıf olan bireyler, yüksek risk altındaki grupları oluşturmaktadır (Bongomin vd. 2017).

Dermatofitler (*Arthrodermataceae* familyası), *Onygenales* takımı, *Eurotiomycetes* sınıfı, *Ascomycota* bölümünde yer alan ve neredeyse yalnızca memeli konakçılarla evrimleşen bir mantar grubudur (de Hoog vd. 2017). Dermatofit türleri yaşam alanlarına göre üç farklı gruba ayrılabilir: antropofilik (insanlar üzerinde yaşayan), zoofilik (hayvanlar üzerinde yaşayan) ve jeofilik (toprakta yaşayan) (Baert vd. 2020). Dermatofitler saç, deri, tırnaklar ve tüyler dahil keratinize dokuları istila eden ve yapıyı bozan mantarlardır (Weitzman ve Summerbell 1995). Deri ve tırnaklardaki mantar enfeksiyonları, mikozlar içinde en sık görülen ve yaygın olan türdür. Son yıllarda, yüzeysel mikotik enfeksiyonlar önemli ölçüde artmıştır ve en sık rastlanan enfeksiyon türlerinden biri haline gelmiştir (Havlickova vd. 2008). Dermatofitlerin yayılışı, etkenleri ve baskın anatomik enfeksiyon desenleri coğrafi konuma ve çeşitli çevresel ve kültürel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Dermatofitler 25-28 °C arasında değişen yüzey sıcaklıklarında ürerler.

İnsan derisinin sıcak ve nemli olması enfeksiyon ortamı için uygun koşulları sağlamaktadır. Dermatomikozlar, düşük sosyoekonomik statüye sahip topluluklarda daha sık görülmektedir; kalabalık yaşam koşulları, insan ve hayvanlarla yakın temas, hijyen eksikliği gibi faktörler etkili olmaktadır. Yüzeysel deri enfeksiyonlarında tıbbi bakımın hiç olmaması veya yetersizliği deri mantar enfeksiyonlarının salgın şeklinde yayılmasını daha da artırmaktadır (Seth vd. 2017).

Virüsler, diğer konak organizmalarda olduğu gibi mantarlarda da mevcuttur (Watanabe vd. 2019). Mantarları enfekte eden virüslere fungal virüs ya da mikovirüs olarak isimlendirilirler. Mikovirüsler üzerine yapılan çalışmalarla genom organizasyonu, yaşam tarzları ve replikasyon döngüleri açısından virüslerin çeşitliliği ortaya çıkartılmıştır. 1962'de yenilebilir bir kültür mantarı olan *Agaricus bisporus*'ta ilk mikovirüs rapor edilmiştir (Hollings 1962). Mikovirüsler patojenik mantarları da enfekte etmektedir ve virülansı azaltırsa, virokontrol (virüsler kullanılarak biyolojik kontrol) ajanları olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Heiniger ve Rigling 1994, García-Pedrajas vd. 2019, Rodriguez Coy vd. 2022, Tonka vd. 2022). Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV), en son yayınlanan resmi rapora göre mikovirüsleri genom yapılarına göre 23 familya ve 1 sınıflandırılmamış cins olarak tanımlamaktadır (Anonymous 2023). Mikovirüslerin çoğunluğu çift iplikçikli RNA (dsRNA) veya pozitif anlamlı tek iplikçikli RNA (+ssRNA) genomlarına sahiptir (Ghabrial vd. 2015). dsRNA genomuna sahip mikovirüsler *Megabirnaviridae*, *Amalgaviridae*, *Partitiviridae*, *Quadriviridae*, *Polymycoviridae*, *Chrysoviridae*, *Reoviridae*, *Totiviridae* aileleri ve sınıflandırılmamış *Botybirnavirus* cinsi olarak sınıflandırılmaktadır (Ghabrial vd. 2015, Walker vd. 2020, Kotta-Loizou 2021). +ssRNA genomuna sahip mikovirüsler *Endornaviridae*, *Alphaflexiviridae*, *Barnaviridae*, *Deltaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Hypoviridae*, *Narnaviridae*, *Mitoviridae*, *Hadakaviridae*, *Yadokariviridae* ve ters transkripsiyon (RT) aileleri *Metaviridae* ve *Pseudoviridae* olarak gruplandırılmaktadır (Walker vd. 2020, Kotta-Loizou 2021, Sato vd. 2023a, b). *Mymonaviridae* ailesinde negatif anlamlı tek iplikçikli RNA (-ssRNA) genomuna sahip mikovirüsler de keşfedilmiştir (Ghabrial vd. 2015, Walker vd. 2020, Guo vd. 2021, Kotta-Loizou 2021). Yalnızca iki adet ssDNA mikovirüsü resmi olarak mikoviral aileye aittir; *Genomoviridae* ailesinde bulunan *Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence-associated DNA virus 1* ve *Fusarium*

graminearum gemytripvirus 1 (Yu vd. 2010, Krupovic vd. 2016, Varsani ve Krupovic 2021).

Bu çalışmada, klinik dermatofit izolatlarını enfekte eden mikovirüslerin tespit edilmesi, genom dizilerinin tüm veya tüme yakın halde belirlenmesi, moleküler ve filogenetik özelliklerinin ortaya çıkartılması ve konakları ile olan etkileşimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

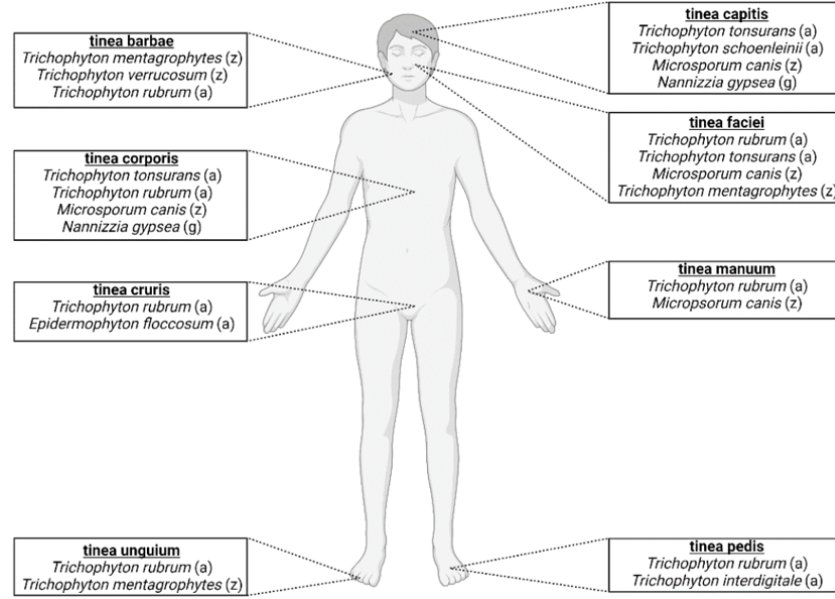
Bu çalışma kapsamında yapılan araştırmanın ulaşmayı hedeflediği sonuçlar doğrultusunda; *Lecanicillium aphanocladii*'nin neden olduğu ilk dermatofitozun vaka takdimi rapor edilmiştir. *Lecanicillium aphanocladii*'yi enfekte eden iki yeni mikovirüsün tüm genomu ortaya çıkartılmıştır; *Lecanicillium aphanocladii* polymycovirus 1 ve *Lecanicillium aphanocladii* negative-stranded RNA virus 1. Dermatofit mantarlardaki mikovirüsler üzerine yeterince çalışma yapılmamıştır, bu çalışma ile dermatofit mantarı enfekte eden iki virüsün tüm genomunu ortaya çıkartılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETİ

2.1 Dermatofitler

Dermatofitler, özellikle *Trichophyton* ve *Microsporum* cinslerine ait olan türler, deri enfeksiyonlarının ana nedenidir. Dermatofitlerden sorumlu en yaygın patojen *Trichophyton rubrum* (%53,1) olup, bunu *T. mentagrophytes* (%7,5), *Microsporum canis* (%6,9), *T. tonsurans* (%5,6), *T. interdigitale* (%5,0) ve *T. violaceum* (%3,8) takip etmektedir (Wang vd. 2021). Yüzeysel mikozlara neden olan *T. rubrum*, *T. mentagrophytes var. interdigitale* ve *M. canis* gibi bazı dermatofit türleri dünya çapında dağılım göstermektedir. *T. soudanense* (Afrika), *T. schoenleinii* (Avrasya ve Afrika), *T. violaceum* (Asya, Afrika ve Avrupa) ve *T. concentricum* (Pasifik Adaları, Hindistan ve Uzak Doğu) gibi diğer türler ise belirli coğrafi bölgelerle sınırlıdır (Ameen 2010). *T. rubrum*, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki kentsel alanlarda en yaygın bildirilen dermatofit türüdür (Borman vd. 2007). *Trichophyton rubrum* (Castell.) Sabour 1911 ve *Trichophyton violaceum* Sabour. ex E. Bodin 1902, günümüzde *Trichophyton rubrum* kompleksi içinde yer alan iki temel türdür. 1902 yılında Sudan'dan dönen bir hastadan alınan örnek üzerinden *Trichophyton violaceum* ilk kez tanımlanarak *T. rubrum* kompleksi altında değerlendirilmektedir (Bouchara vd. 2021).

Antropofilik mantarlar, insan vücuduyla uyum sağladıkça belirli bölgeleri tercih etme eğilimi gösterirler (Moskaluk ve VandeWoude 2022). Örneğin, en yaygın olarak bilinen tinea pedis (ayak enfeksiyonu), atlet ayağı olarak adlandırılmaktadır (Hay 2000, White vd. 2014). Diğer bölgeye özgü dermatofitoz funguslar arasında tinea capitis (saç derisi enfeksiyonu), tinea unguium (tırnak enfeksiyonu), tinea barbae (sakal enfeksiyonu), tinea faciei (yüz enfeksiyonu), tinea corporis (vücut enfeksiyonu), tinea manuum (el enfeksiyonu) ve tinea cruris (kasık bölgesi enfeksiyonu) bulunmaktadır (Weitzman ve Summerbell 1995) (Şekil 2.1). *Trichophyton rubrum*, dünya genelinde insanları enfekte eden en yaygın dermatofit türü ve tinea pedis vakalarının çoğundan sorumludur (Seebacher vd. 2008, Achterman vd. 2011, White vd. 2014, Martínez-Herrera vd. 2023).



Şekil 2.1 İnsanlarda dermatofitozun anatomik konuma göre sınıflandırılması (Moskaluk ve VandeWoude 2022)

2.2 *Trichophyton rubrum*

Trichophyton rubrum; mantar alemi, *Ascomycota* bölümü, *Eurotiomycetes* sınıfı, *Onygenales* takımı ve *Arthrodermataceae* familyasında yer almaktadır (Pacceu vd. 2021). Deri ve tırnak enfeksiyonlarına neden olan *T. rubrum*, çoğunlukla tinea capitis ile ilişkili olan *T. violaceum* ve *T. soudanense*, *Trichophyton rubrum* kompleksini oluşturmaktadır (Pacceu vd. 2020). Yakın genetik benzerliklerine rağmen yapılan çalışmalar *T. rubrum*, *T. soudanense* ve *T. violaceum*'un bağımsız türler olduğunu doğrulamaktadır (de Hoog vd. 2017, Su vd. 2019, Pacceu vd. 2020). Üç yakın akraba türün sınıflandırılması ribozomal DNA'nın ITS (internal transcribed spacer) gen bölgelerinin sekanslanması ile yapılmaktadır (Schoch vd. 2012). Birçok çalışma ITS bölgelerinin *Trichophyton* cinsindeki farklı türleri desteklemek için yeterli filogenetik ayırım sağladığını doğrulamıştır (Kong vd. 2008, Irinyi vd. 2016, de Hoog vd. 2017, Zhan vd. 2018, Pacceu vd. 2020). Filogenetik ağaç ve haplotip analizi yapılarak birkaç tek nükleotit polimorfizmi ile farklılık gösteren üç ana grup ortaya çıkartılmıştır; *T. violaceum* grup 1, *T. soudanense* grup 2 ve *T. rubrum* grup 3'te yer almaktadır (Su vd. 2019).

2.3 *Lecanicillium aphanocladii*

Lecanicillium W. Gams & Zare, *Hypocreales* takımına ait ve anamorfik *Cordycipitaceae* ailesinin bir parçası olarak sınıflandırılmaktadır (Zare ve Gams 2008). Bu mantar cinsi, çeşitli mantar türlerini enfekte etme ve birçok böcek türünde parazit özelliğiyle entomopatojenik bir mantar olarak da bilinmektedir (Donka vd. 2008, Berendsen vd. 2010, Meng vd. 2022, Liu vd. 2023, Nguyen vd. 2023). Bu cins, önceden *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas olarak adlandırılmıştır. *Lecanicillium* cinsi üyelerinin keratinaz aktivitesi ile sağlanan keratinofilik özellikleri daha önce çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Deshmukh ve Rai 2005, Hamm vd. 2020, Günyar vd. 2020). *L. aphanocladii*, ilk olarak 2001 yılında Zare ve Gams tarafından kültür mantarı *Agaricus bisporus*'ta örümcek ağı ve lekelenmeye neden olan bir fungicolous (diğer mantarlar üzerinde büyüyen mantar) mantarı olarak tanımlanmıştır (Zare ve Gams 2001). Daha sonraki çalışmalar, *L. aphanocladii*'nin farklı mantar konaklarını parazitleyen doğasını doğrulamıştır (Lv vd. 2022, Lin vd. 2024). Bir çalışma bu mantarın hem prokaryotik, hem de fungal topluluklardan oluşan ve "Tengu no Mugimeshi" olarak bilinen mikrobiyal bir agregatın (toprak benzeri granüler mikroorganizma kütlesi) bileşeni olduğunu bildirmiştir (Higo vd. 2021). Çeşitli çalışmalar *L. aphanocladii*'nin entomopatojenik özelliklerini de göstermiştir (Pečiulytė ve Kačergius 2012, El-Debaiky 2017, Gharsallah vd. 2020). Bu bulgular, türün çeşitli yaşam alanlarında var olma ve farklı yaşam tarzlarını benimseme yeteneğini vurgulamaktadır.

2.3 İnsan Patojeni Mantarlarda Yapılan Mikovirüs Çalışmaları

Mikovirüs çalışmalarında kullanılan mantarlar genellikle *Ascomycota* ve *Basidiomycota* bölümlerine aittir. Mantarlar aleminde henüz keşfedilmemiş birçok virüsün olduğunu düşünülmektedir. Fungal viroloji, virüslerin çeşitliliği ve evriminin daha iyi anlaşılmasına ve hızla büyüyen mikovirüs literatürüne büyük katkılar sağlamıştır.

İnsan patojeni mantarlarda mikovirüs araştırmaları, *Aspergillus* cinsi üzerinden çalışılmaya başlanılmıştır (Kotta-Loizou ve Coutts 2017). *Aspergillus* türlerinde

Partitiviridae, *Chrysoviridae* ve *Totiviridae* gibi viral ailelerden mikovirüsler rapor edilmiştir (Liu vd. 2008, Jamal vd. 2010, Bhatti vd. 2011, Bhatti vd. 2012, Refos vd. 2013, Kanhayuwa vd. 2015, Jiang vd. 2022b, Wu vd. 2023). *Aspergillus* türleri ile çalışmaların yapılmış olması *Polymycoviridae*, *Alternaviridae* ve *Exartaviridae* gibi aileler önerilmesine olanak sağlamıştır (Nerva vd. 2016, Zoll vd. 2018, Sass vd. 2023). Güneydoğu Asya'da önemli bir termal dimorfik mantar olan *Talaromyces marneffe*, HIV ile enfekte olan ve bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda ölümcül enfeksiyona yol açabilen bir mantardır (Vong ve Lee 1998). Lau ve ekibi (2018), *T. marneffe*'de yeni bir partitivirüsü rapor etmişlerdir; *Talaromyces marneffe* partitivirus-1 (TmPV1). Bu çalışmada yapılan transkriptomik analizler, TmPV1'in *T. marneffe*'de potansiyel virülans faktörlerin atipik regülasyonu ve RNA interferansı (RNAi) ile ilgili genlerin bastırılmasına neden olduğunu göstermektedir (Lau vd 2018).

Malassezia, deri mikrobiyomunun bir parçası olup dermatolojik hastalıklar ile ilişkilendirilen bir *basidiomycetous* mayadır (Theelen vd. 2018). *Malassezia* türleri memeli deri mikrobiyomunun en yaygın mantarlarından biridir. *Malassezia* türlerini enfekte eden mikovirüslerin ortaya çıkartılmasının yanı sıra, virüs-konak etkileşimleri de oldukça çalışılmıştır. *Malassezia*'da *Totiviridae* ailesine ait virüsler yaygın olarak bulunmakta ve konak transkriptomunu etkilemektedir (Applen Clancey vd. 2020, Park vd. 2020). *Malassezia restricta*'da bulunan mikovirüslerin koful boyutunu artırdığı gösterilmiştir. Applen Clancey ve ekibi (2020), ilk kez *Malassezia sympodialis* türünde bir mikovirüs keşfetmişlerdir; *Malassezia sympodialis* mycovirus 1 (MsMV1). *Malassezia sympodialis*'in patojenitesi üzerinde epikütanöz fare modelinde çalışmalar yapılmış fakat mikovirüs aracılı bir etki gözlemlenmemiştir (Applen Clancey vd. 2020).

2.4 *Polymycoviridae*

Riboviria alemindeki *Polymycoviridae* familyasında yalnızca *Polymycovirus* cinsi bulunmaktadır. *Polymycovirus* adı, Yunanca "poly" (çok) ve "myco" (mantar) kelimelerinden gelir. Bu cins ismi, mantarları enfekte eden virüslerin çok sayıda genomik dsRNA segmentine sahip olmasından dolayı verilmiştir. 2022 yılına kadar literatürde yer

alan polimikovirüs türleri ICTV tarafından yapılan çalışmada değerlendirilmiş ve resmileştirilmiştir, bu çalışmada *Polymycoviridae* familyasına dair bilinen genel bilgiler özetlenerek rapor edilmiştir (Kotta-Loizou vd. 2022). Filogenisinin daha önce tanımlanan riboviridlerden çok farklı olması sebebiyle bu familya için henüz bir takım ve sınıf tanımlanmamıştır.

Polymycoviridae familyasının üyeleri, çok segmentli ve alışılmamış şekilde kapsitlendiği düşünülen dsRNA genomlarına sahip görece küçük virüslerdir. Tipik olarak, polimikovirüs türleri dört ila sekiz genomik segmente sahip olmakta ve uzunlukları 7,5-12,5 kbp arasında değişmektedir (Mahillon vd. 2019, Sato vd. 2020, Takahashi-Nakaguchi vd. 2020). Segmentler korunmuş terminallere sahip uzun translasyonu yapılmayan bölgeler (UTR) ile çevrelenmiş tek bir açık okuma çerçevesi (ORF) içermektedir. dsRNA 1'in ORF'si, RdRp_1 (Pfam PF00680) protein ailesine ait bir RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) kodlamaktadır ve üç korunmuş motife sahiptir (Motif A, Motif B ve Motif C). *Polymycoviridae* familyasında; çift iplikçikli RNA ve pozitif anlamlı tek iplikçikli RNA virüslerinde bulunan GDD motifi yerine, *Mononegavirales* takımına ait negatif anlamlı tek iplikçikli RNA virüslerinde bulunan GDNQ motifi (motif c) bulunmaktadır (He vd. 2023, Wang vd. 2023, Zheng vd. 2023). dsRNA 2'nin ORF'si, korunmuş N-terminus ve sistein bakımından zengin, çinko parmak benzeri (zinc finger-like) bir motif içeren, işlevi bilinmeyen bir proteini kodlamaktadır. dsRNA 3'ün ORF'si, viral dsRNA'ların pozitif anlamlı iplikçiklerinin 5'-uçlarına bir başlık (kep) yapısı eklemekten sorumlu bir metil transferaz kodlamaktadır (Kanhayuwa vd. 2015, Kotta-Loizou vd. 2017a). dsRNA 4'ün ORF'si prolin-alanin-serince zengin proteini (PASrp) kodlamaktadır. dsRNA sayısı 8'e kadar çıkabilmektedir, ancak dsRNA 1-4 hariç geri kalan segmentlerin kodladıkları proteinlerin işlevleri mevcut literatüre göre henüz bilinmemektedir. İzolasyonun yapıldığı konağın değişkenliği, nükleotit ve amino asit dizisi verileri (RdRp'de \leq %70 amino asit dizisi özdeşliği), dsRNA genom segmentlerinin sayısı ve uzunluğu ve gerçek kapsitin varlığı gibi özellikler bir araya getirilerek bir kombinasyon oluşturulur. Bu kombinasyon, tür ayırımında değerlendirilen kriterleri oluşturmakta ve polimikovirüs türlerinin taksonomik sınıflandırmasında önemli bir rol oynamaktadır.

Çoğu polimikovirüs, genomik dsRNA'nın viral bir protein tarafından kaplandığı alışlagelmemiş viryonlar oluşturmaktadır (Kanhayuwa vd. 2015, Kotta-Loizou ve Coutts 2017, Niu vd. 2018). Viryonlar sitoplazmada birikmektedir.

Polymycoviridae familyası yalnızca saflaştırılmış yapılar olarak değil, aynı zamanda çıplak dsRNA olarak da enfeksiyöz olduğu tespit edilen ilk dsRNA virüsleridir (Jia vd. 2017). Polimikovirüslerin yaşam döngüsünde hücre dışı bir faz bulunmamaktadır, hücre içinde bulunurlar. Hücre bölünmesi ve sporogenez sırasında (dikey geçiş) ve vejetatif olarak uyumlu mantar türleri arasında hifal anastomozu sonrasında hücre füzyonu yoluyla (yatay geçiş) hücre içinde girmektedirler (Zhai vd. 2016, Filippou vd. 2018).

Pigmentasyon, konak büyümesinde azalma, konak virülansında değişiklikler, artan sporülasyon, konak büyümesi ve konak virülansı gibi etkiler *Polymycoviridae* familyasının konakları ile etkileşimi çalışmalarında rapor edilmiştir (Kanhayuwa vd. 2017, Kotta-Loizou vd. 2017b, Jia vd. 2017, Filippou vd. 2021). Niu ve ekibi 2018'de yayınladıkları çalışmada *Penicillium digitatum* polymycovirus 1'i karakterize etmiş ve fungusit direncinde polimikovirüs kaynaklı azalmayı ortaya koymuştur (Niu vd. 2018).

Polymycoviridae familyasındaki virüsler, pozitif tek iplikçikli (+ss) RNA virüsleri olan *Hadakaviridae* familyasına mensup Hadakavirus 1 izolatları ile yakın ilişkilidir (Sato vd. 2020). Kanhayuwa ve ekibi 2015'te yaptıkları çalışmada, polimikovirüslerin dsRNA ve +ssRNA virüslerinin yanı sıra kapsüllü ve kapsülsüz RNA virüsleri arasında bir ara grup olarak değerlendirilebileceğini rapor etmişlerdir (Kanhayuwa vd. 2015).

2.5 Mymonaviridae

Mymonaviridae familyası, *Riboviria* alemi, *Negarnaviricota* şubesi, *Haploviricotina* alt şubesi, *Monjiviricetes* sınıfı, *Mononegavirales* takımı içerisinde yer almaktadır.

Liu ve ekibi 2014'te yaptıkları çalışmada, şu an *Mymonaviridae* familyasının tipik bir üyesi haline gelmiş *Sclerotinia sclerotiorum* negative-stranded RNA virus 1'in (SsNSRV-1) morfolojisini incelemişlerdir. *Sclerotinia sclerotiorum* negative-stranded RNA virus 1'in (SsNSRV-1) viryonlarının filamentöz yapıda, 25-50 nm çapında, yaklaşık 1000 nm uzunluğunda, dış yüzeyi sivri uçlarla kaplı olmayan bir zarla sarılı olduğu rapor edilmiştir. SsNSRV-1 viryonlardan salınan polimerize nükleoprotein (NP) monomerlerinden oluşan nükleokapsitlerin; sola doğru, tek, sıkı sarmal 20-22 nm çapında ve 200-2.000 nm uzunluğunda olan helikal yapılar olduğu rapor edilmiştir (Liu vd. 2014). Familyanın diğer üyelerinin viryon üretip üretmediği bilinmemektedir (Jiang vd. 2022a). Tipik bir mymonaviryon (*Mymonaviridae* familya üyesinin viryonu), yaklaşık 10 kb'lik doğrusal, negatif anlamlı RNA nükleik asidinin tek bir molekülünü içermektedir. Mymonaviridler bir veya daha fazla protein ifade eder, örnek olarak SsNSRV-1'in en az altı protein ifade ettiği rapor edilmiştir (Liu vd. 2014). Nükleoproteinler virüs genomunu kapsit içine almaktadır. Büyük proteinin (large protein/L) domaini olan RdRp, virüs genom replikasyonunu ve transkripsiyonu sağlamaktadır. Geri kalan proteinlerin işlevleri mevcut literatüre göre henüz bilinmemektedir. SsNSRV-1 genomu birbiriyle örtüşmeyen altı ORF'ye sahiptir. Bu ORF'ler yüksek oranda korunmuş gen bağlama (gene-junction) dizileri içeren kodlamayan intergenik bölgelerle ayrılarak özgün transkripsiyon birimleri olarak ifade edilmektedir. ORF2-3-4-5-6 ikinci (-2) açık okuma çerçevesinde yer alırken, ORF1 birinci (-1) açık okuma çerçevesinde yer almaktadır. ORF2 NP'yi (nükleoprotein) ve ORF5 L proteinini kodlamaktadır.

Diğer mymonavirüs genomlarının dört ila yedi ORF içerdiği gözlemlenmiştir (Lin vd. 2019, Ruiz-Padilla vd. 2021). Genomları tam olarak sıralanmamış virüslerin ORF'lerinin tam boyutu ve sayısı bilinmemektedir; Penicillimonavirus'da her iki iplikçikte de ORF'ler bulunmaktadır, burada NP pozitif anlamlı iplikçikte kodlanmaktadır (Nerva vd. 2019).

Mymonaviridlerin konak hücrelerin sitoplazmasında replike olduğuna inanılmaktadır, ancak replikasyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ribonükleoprotein (RNP) kompleksleri replikasyon ve transkripsiyon için doğrudan kalıp olarak kullanılabilir. Replikasyon genellikle RNP kompleksleri içinde gerçekleşmektedir. Replikasyon, tam uzunlukta pozitif anlamlı antijenomları sentezlemek için L proteinine ihtiyaç duyar, bunlar daha sonra negatif-anlamlı nesil (progeny) genomların sentezi için kalıp görevi görmektedir (Jiang vd. 2022b).

Myomonaviridler; bitki patojeni, yenilebilir ve endofitik (bitki içinde parazit olarak yaşayan) mantarlar dahil olmak üzere farklı türlere ait mantarlarda karakterize edilmiştir (Kondo vd. 2013, Liu vd. 2014, Marzano vd. 2016, Mu vd. 2017, Hao vd. 2018, Wang vd. 2018, Lin vd. 2019, Nerva vd. 2019, Ruiz-Padilla vd. 2021, Wang vd. 2022, Zhong vd. 2022, Morán vd. 2023, Ye vd. 2023); böceklerden (Shi vd. 2016, Medd vd. 2018, Pettersson vd. 2019, Xu vd. 2024), oomisetlerden (Chiapello vd. 2020), bitkilerden (Marzano ve Domier 2016, Wright vd. 2020) ve topraktan (Starr vd. 2019) elde edilen RNA'lardan NGS ile oluşturulan dizilerde de bulunmuşlardır. Tüm bu metatranskriptom verilerine rağmen mevcut literatürde myomonaviridlerin gerçek konakçıları belirsizdir. Virüs, hifal füzyon yoluyla yatay olarak bulaşabilir.

Liu ve ekibi, *Sclerotinia sclerotiorum* kök çürüklüğü mantarından izole ettikleri SsNSRV-1'in bu mantarda hipovirülansa neden olduğunu rapor etmişlerdir. Saflaştırılmış SsNSRV-1 viryonları, virüs içermeyen bir *S. sclerotiorum* suşuna transfekte edilmiş ve hipovirülans sağlamıştır. SsNSRV-1 enfeksiyonu, konukçusunun yavaş büyümesine, sklerotia (mantar miselyumundan oluşan sert kompakt kütle) üretme yeteneğini kaybetmesine ve mantarın bazı bitkilerde hastalık yapıcı etkisini kaybetmesine neden olduğunu bildirmişlerdir (Liu vd., 2014).

Morán ve ekibi, yapraklarda yukarı doğru kıvrılma ve erken büyümede genel bir azalış olduğunu gösteren asma bitkilerinde mantarlarla ilişkili bir myomonavirüs olan Plasmopara-viticola-lesion-associated mononegambi virus 3'ün (yakın zamanda *Penicillimonavirus gammaplasmodiparae* olarak sınıflandırılmıştır) tüm genomunu belirlemişlerdir. *P. gammaplasmodiparae* genomunun iki segmentli olduğunu, yaklaşık 6150 ve 4560 nükleotitlik iki RNA molekülünden oluştuğu rapor edilmiştir (Morán vd. 2023).

Xu ve ekibi, biyolojik böcekkıran entomopatojenik fungus *Beauveria bassiana*'yı enfekte eden *Beauveria bassiana* negative-strand RNA virus 1'in (BbNSRV1) tüm genomunu rapor etmişlerdir. BbNSRV1'in genomu, 6169 nükleotit uzunluğunda, 1949 amino asit ile varsayılan RdRp kodlayan tek bir ORF içeren, negatif anlamlı tek iplikçikli RNA segmentinden oluşmaktadır. Bu çalışma, *B. bassiana*'yı enfekte eden -ssRNA mikovirüsünün ilk raporudur (Xu vd. 2024).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Dermatofit izolatlarının temin edilmesi

Bu çalışma kapsamında İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen, farklı yaş gruplarındaki hastalara ait keratinize klinik örneklerden izole edilen dermatofit izolatları kullanılmıştır.

3.1.2 Dermatofit örneklerinin hastalardan izole edilmesi, saf kültürlerinin elde edilmesi ve saklanması

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen deri, saç ve tırnak örnekleri, mikolojik analiz için işleme tabi tutulmuştur. Bu örnekler, steril bir bistüri ile küçük parçalara ayrılarak bazıları sikloheksimit (saprofit mantar kontaminasyonunu engellemek için) içeren, bazıları ise içermeyen Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyerlerine ekilmiştir. Ekimler, 27 ila 30°C arasında uygun sıcaklıkta inkübe edilmiş ve gün aşırı olarak incelenmiştir. Üreme olan petrielerde makroskopik ve mikroskopik inceleme sonucunda dermatofit olarak tanımlanan izolatların konidyumlar tıraşlanarak steril distile su içeren flakonlarda stoklanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Dermatofit örneklerinin mikroskopik değerlendirilmeleri

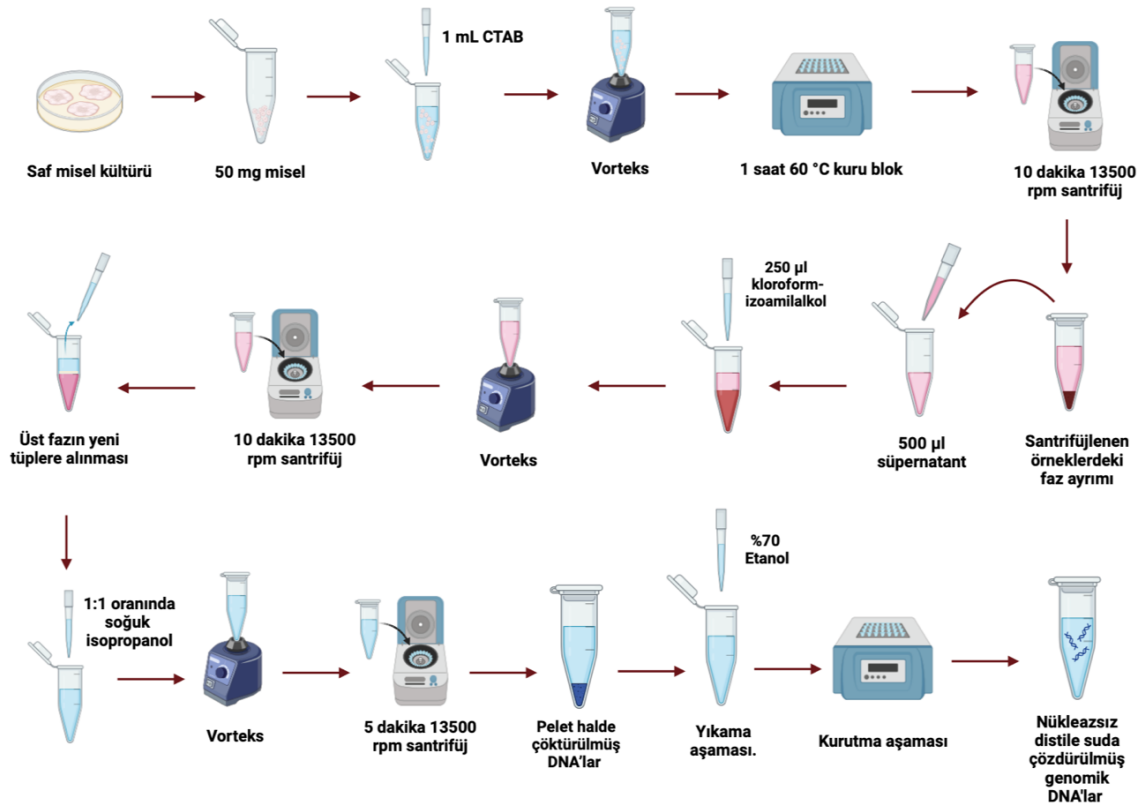
Dermatofit örnekleri; stereo, binoküler ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Dermatofit örneklerinin hifleri, başlangıçta stereo mikroskop altında

incelenmiştir. Sonrasında, daha ayrıntılı bir inceleme için binoküler mikroskop kullanılmıştır. Binoküler mikroskop altında hiflerin yapıları, mikrokonidya ve makrokonidyalı detaylı bir şekilde değerlendirilmiştir. Dermatofitlerin mikroskobik yapılarının boyutlarını belirlemek amacıyla, her bir yapı için ortalama 30 ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümler sonucunda, yapıların en küçük ve en büyük değerleri arasındaki aralık hesaplanarak boyutları belirlenmiştir. İncelenen yapıların farklı büyütme oranlarında (10x10, 10x40 ve 10x100) fotoğrafları çekilmiş ve bu fotoğraflar, yapıların daha ayrıntılı bir şekilde analiz edilmesi için kullanılmıştır. Dermatofit örneklerinin hif yapıları, mikrokonidya ve makrokonidyalı, daha ayrıntılı bir şekilde incelenmek üzere taramalı elektron mikroskobu kullanılarak analiz edilmiştir. Bu analiz için örnekler, numune tutucusu (stub) üzerine çift taraflı yapışkan bant kullanılarak yerleştirilmiş ve ardından altın kaplama tekniği ile kaplanmıştır. ZEISS marka EVO 40 model taramalı elektron mikroskobuyla yapılan incelemede, dermatofit örneklerinin detayları gözlemlenmiş ve ilgili yapıların fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.2 Dermatofit izolatlarından genomik DNA izolasyonu

Dermatofit izolatların moleküler teşhisi için saf misel kültürlerinden genomik deoksiriboz nükleik asit (DNA) izolasyonunda setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) yöntemi kullanılacaktır (Rogers ve Bendich 1994, Akata vd. 2023b, Akata vd. 2024). Genomik DNA izolasyonu yönteminde saf misel örneklerinden yaklaşık 50 mg kadar alınıp 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine eklenmiştir. Üzerlerine 1 mL CTAB lizis tamponu (1,5 gr %3 w/v CTAB, 4,091 gr 1,4 M sodyum klorür (NaCl), 0,2923 gr 20 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 0,6055 gr 100 mM Tris, 1,5 gr %3 w/v Polivinilpirolidon (PVP), 100 µL %0,2 v/v β-Merkaptoetanol, pH: 8,0) ilave edilmiştir. Tüpler 1,5 dakika kadar vortekse tabi tutularak homojen hale getirilmiştir. Örnekler daha sonra 60 °C kuru blok ısıtıcısında 1 saat kadar bekletilerek lizis aşaması tamamlanmıştır. Bu aşamadan sonra örnekler 10 dakika kadar 13500 dakikada devir (rpm)'de santrifüjlenmiş ve ortaya çıkan üst fazdan 500 µL kadar süpernatant kısımlar yeni tüplere alınmıştır. Süpernatantların üzerine 250 µL kadar kloroform-izoamilalkol (24:1 oranda) çözeltisi ilave edilmiştir. Örnekler homojenize olana kadar vorteks ile karıştırıldıktan

sonra 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve 10 dakika 13500 rpm’de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda oluşan üst fazlar dikkatli bir şekilde yeni tüplere alınmış ve üzerlerine eşit hacimde (1:1) soğuk isopropanol ilave edildikten sonra tüpler alt-üst edilmiştir. Örnekler 13500 rpm’de 5 dakika santrifüjlenmiş ve böylelikle genomik DNA’lar pelet halde çöktürülmüştür. Santrifüj sonunda tüplerdeki süpernatantlar uzaklaştırılmış ve DNA peletleri iki sefer %70’lik EtOH ile yıkandıktan sonra DNA peletleri 60 °C’de bekletilerek kalıntı etanol uzaklaştırılmıştır. Etanolden arındırılmış ve kısmen kurutulmuş olan DNA peletleri boyutlarına göre nükleazsız distile suda çözdürülmüştür. Genomik DNA izolasyonunun şematik gösterimi Şekil 3.1’de verilmiştir. İzole edilen genomik DNA örneklerinin miktarları ve saflık dereceleri NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) cihazında spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1 Genomik DNA izolasyonunun şematik gösterimi (BioRender programı ile çizilmiştir)

3.2.3 Dermatofit izolatlarının moleküler teşhisi için ribozomal RNA içerisindeki ITS gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve nükleotit dizilerinin elektroforetik olarak belirlenmesi

CTAB yöntemi ile dermatofit izolatlarına ait saf misel örneklerinden izole edilen genomik DNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak moleküler filogeni çalışmaları için ribozomal deoksiriboz nükleik asit (rDNA) içerisindeki internal transcribed spacer (ITS) gen bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. ITS gen bölgesinin şematik gösterimi ve ITS1-ITS4 evrensel primerlerinin bağlanma bölgeleri Şekil 3.2'de verilmiştir. PCR'da tepkimede istenmeyen primer dimerin oluşumunun önüne geçmek için hot start Taq DNA Polymerases (Invitrogen) enzimi kullanılmıştır. PCR tepkimesi, 200 µL'lik polipropilen tüplerde toplam 50 µL'lik hacimde gerçekleştirilmiştir. Tepkime çözeltisi, 5 µL Taq DNA polimeraz tamponu (10x), 3 µL MgCl₂ (50 mM), 1µL deoksiribonükleozit trifosfat (dNTP) karışımı (her bir nükleotit yapıtaşından 10 mM), 1 µL genomik DNA kalıbından (500-600 ng), 1 µL ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ve 1 µL ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3 (10 µM) oligonükleotit primerlerinden (Stielow vd. 2015), 0,25 µL Taq DNA polimeraz enziminden (5 ünite) ve toplam hacmi 50 µL'ye tamamlayacak kadar nükleazlardan arındırılmış dH₂O içermektedir. PCR ısıl döngü koşullarında istenmeyen primer dimeri oluşumunu en az seviyede tutmak için "İniş" (Touchdown) yaklaşımı kullanılmıştır. PCR ısıl döngü protokolü şu şekildedir: 5 dakikalık başlangıç denatürasyon aşamasını takiben toplam 35 döngü halinde 95 °C'de 30 saniye, 65-50 °C'de (iniş yaklaşımı ile) 15 saniye ve 72 °C'de 2 dakika bekleme süreleri uygulanmış ve son olarak 72 °C'de 3 dakikalık son uzama aşaması gerçekleştirilerek tepkime sonlandırılmıştır. Tepkimenin ısıl döngü işlemi MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems) cihazında yapılmıştır.

İzole edilen genomik DNA'ların bütünlükleri agaroz jel elektroforezi Sambrook vd. (1989) tanımladığı şekilde yapılmış ve böylece amplifikasyonun başarısı ve kalitesi (jelde tek bant elde edilmesi yani özgün olmayan amplifikasyonların olmaması) belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforezinde, jel ve tank tamponu olarak Tris-borik asit-EDTA (TBE) tamponu (3,03 gr Tris-base (1 M), 185 mg EDTA (20 mM), 1,55 gr Borik asit (1 M) pH: 8,3) kullanılmıştır. Jel elektroforezinde agaroz konsantrasyonu %1,75 (0,61 gr agaroz x

35 mL TBE tamponu) olarak kullanılmıştır. Elektroforez işleminde, standart olarak elektrotlar arası her cm için voltajı 5 volt olarak uygulanmıştır. Genomik DNA örneklerinin görüntülenmesinde standart olarak güvenli mavi ışık transillüminatör ve interkalatör Safe-Green boyası kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforezinde DNA ampliconlarının büyüklüklerinin belirlenebilmesinde DNA belirteci olarak GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforezinde her kuyuya 7 µL PCR ürünü ile 0,5 µL yükleme boyası karıştırılarak yüklenmiştir.

Tek bant elde edilen ve kalitesi belirlenmiş ampliconlar, daha sonra dizi analizi için GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak yıkanmış ve saflaştırılmıştır. Kitin kullanım talimatları doğrultusunda yıkama ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yıkanan ampliconların miktarları ve saflık dereceleri, NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve dizi analizi için hazır hale getirilmiştir. Ampliconların dizilemesi için PCR aşamasında kullanılan oligonükleotit primerler, sekans primerleri olarak kullanılmıştır. Ampliconların nükleotit dizileri, standart sanger dideoksi zincir sonlanma yöntemi ile belirlenmiştir. Sanger DNA dizi analizi dışarıdan hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2 ITS gen bölgesi ve ITS1-ITS4 primerlerinin gösterimi

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

Tür teşhisi için elde edilen amplicon diziler, öncelikle NCBI'nin Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) çevrimiçi dizi haritalama ve benzerlik analizi aracıyla analizler gerçekleştirilmiştir.

Moleküler tür teşhisinde BLASTn analizleri, NCBI GenBank veritabanı kullanılarak, incelenen DNA diziliminin benzerliklerini tanımlanmış diziler ile karşılaştırılmıştır. Analiz edilen amplicona ait dizilere en yüksek yüzde benzerliği gösteren dizilere ait türler teşhis için dikkate alınmıştır. En yüksek benzerliğe sahip olan GenBank'a girilen dizinin herhangi bir yayında kullanılıp kullanılmaması durumu ve yakın bir zaman içerisinde GenBank'a girilmiş olması dizinin doğruluğu için önem teşkil etmektedir. Bu yöntem, türlerin belirlenmesi veya sınıflandırılması için yaygın olarak kullanılan bir araçtır. Geleneksel makro mantar teşhis yöntemlerinin sonuçları ile desteklenmesi kaydıyla, BLASTn ile yapılan analizler sonucunda dermatofit izolatlarına ait misel örneklerinin yeni bir tür kaydı veya yeni bir türe/cinse ait olup olmadığının belirlenmesinde BLAST nükleotit dizi benzerlik oranları ve dizi kapsanma yüzdeleri dikkate alınmıştır. Mantar türleri için genellikle ITS1-5.8S-ITS2 rDNA bölgesi gibi 500-600 nükleotit uzunluğundaki dizilerde, tür sınırlaması için yüzde dizi benzerlikleri <math><98-99</math> aralığında dikkate alınır (Bonito vd. 2010, Hawksworth ve Lücking 2017, Lücking vd. 2020). NCBI GenBank veritabanında bulunan rDNA dizileri içinde, small subunit (küçük alt ünite) (SSU) bölgesi yavaş evrimleşir ve bu nedenle familya ve takım gibi yüksek taksonomik düzeylerde sınıflandırmalarda tercih edilir, large subunit (büyük alt ünite) (LSU) bölgesi daha hızlı evrimleşir ve cins seviyesinde sınıflandırmaya izin verir (Raja vd. 2017). Diğer yandan, en hızlı evrimleşen rDNA bölgesi olan ITS bölgesi, genellikle tür seviyesinde tanımlamalar için kullanılmaktadır (Raja vd. 2017). Dermatofit izolatlarının moleküler analizlerinde, BLASTn sonuçlarını doğrulamak için filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. BLASTn analizlerinde, NCBI GenBank veritabanında önceden tanımlanmış diziler arasında, analiz edilen ampliconlara en yakın dizi benzerliğine sahip ve son zamanlarda rapor edilen türlere ait diziler, filogenetik analizler için iç grup olarak belirlenmiştir. NCBI GenBank veri bankasından elde edilen ancak incelenen amplicona benzemeyen uzak akraba dermatofit mantarlarına ait diziler de filogenetik analizlerde dış grup olarak kullanılmıştır. Filogenetik ağaç oluşturulurken öncelikle elde edilen diziler, MEGA11 (Tamura vd. 2021) programında ClustalW algoritması kullanılarak iç grup ve dış gruba ait diziler ile alt alta sıralanmıştır (Edgar vd. 2004). Daha sonra, en uygun nükleotit ikame (substitution) modeli belirlenecek ve Neighbour Joining algoritması ve 1000 önyükleme yinelemesi (bootstrap replicate) kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

Geleneksel dermatofit teşhis yöntemlerinin sonuçlarıyla birlikte değerlendirilerek dermatofit izolatlarının gen bölgelerine ait nükleotit dizileriyle yapılan filogenetik analizler, dermatofit örneklerinin yeni bir tür kaydına veya yeni bir türe/cinse ait olup olmadığını belirlemek için kullanılmıştır. Analizlerde, BLASTn nükleotit dizi benzerlik oranları ve örneğe ait dizilerin ağaçta iç gruba ait dizilerle aynı veya farklı gruplarda toplanma durumuna göre değerlendirilmiştir.

3.2.5 Dermatofit İzolatlarından Viral Çift İplikçikli RNA (dsRNA) Ekstraksiyonu

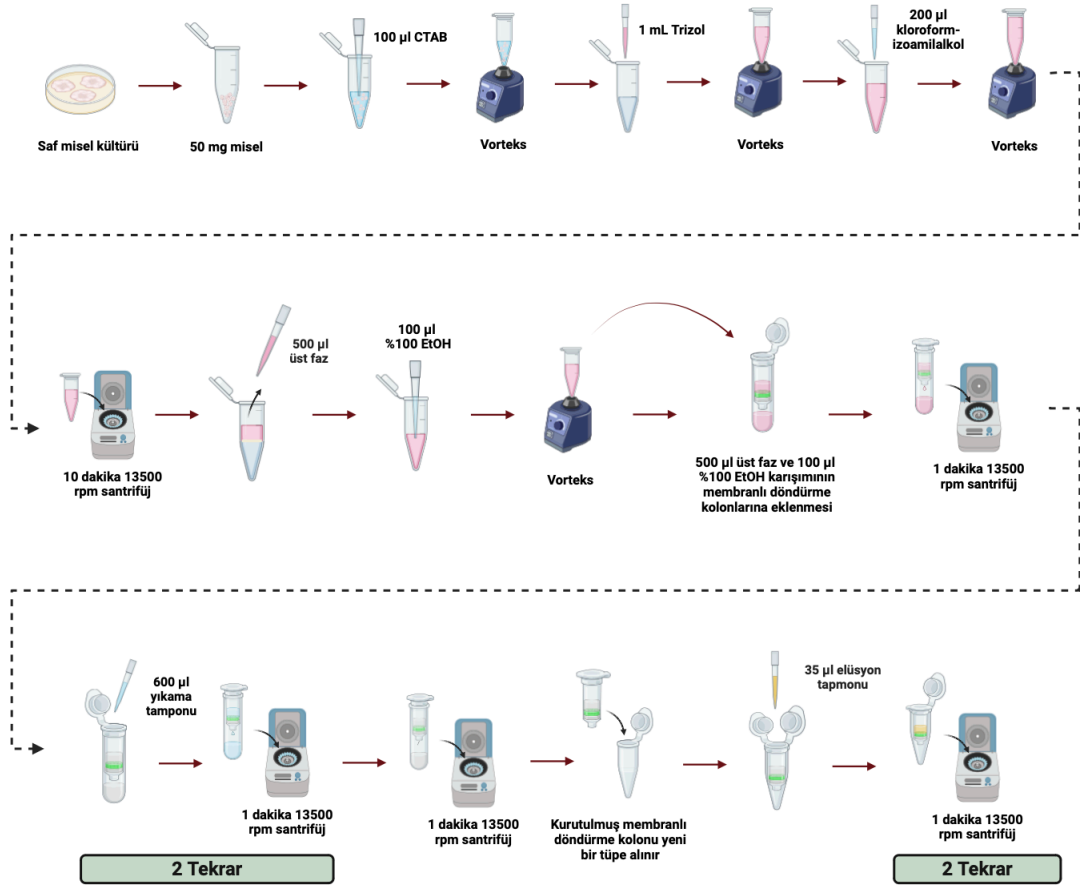
Dermatofit izolatlarından viral dsRNA ekstraksiyonu, Darissa vd. (2010) çalışmasında önerilen selüloz kolonlarla afinite kromatografisi yöntemine dayanarak gerçekleştirilmiştir. Referans alınan çalışmada CF11 selüloz yerine Sigmacell Cellulose Type 101 (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Nükleazsız steril boş döndürme kolonları (spin column) şu şekilde hazırlanmıştır; boş döndürme kolonları steril forseps ile alınıp toplama tüpüne (collection tube) yerleştirilmiştir. Döndürme kolonlarını içerisine filtrelemek için membran diskler yerleştirilmiş, üzerlerine yaklaşık 0,075 gr Sigmacell Cellulose Type 101 eklenip tüplerin ağızları kapatılmıştır.

dsRNA izolasyonu yönteminde saf misel örneklerinden yaklaşık 30-35 mg'lık alınıp 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine eklenmiştir. Üzerlerine ön tampon (pre-buffer) olarak 100 µL CTAB lizis tamponu (1,5 gr %3 w/v CTAB, 4,091 gr 1,4 M sodyum klorür (NaCl), 0,2923 gr 20 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 0,6055 gr 100 mM Tris, 1,5 gr %3 w/v Polivinilpirolidon (PVP), 100 µL %0,2 v/v β-Merkaptoetanol, pH: 8,0) ilave edilmiştir. Tüpler 1 dakika kadar vortekse tabi tutularak CTAB tamponunun örnekler nüfuz etmesi sağlanmıştır. Örneklerin üzerlerine 1 mL Trizol eklenmiş ve hemen ardından 2 dakika vortekse tabi tutularak homojen hale getirilmiştir. Tüpler 5 dakika oda sıcaklığında bekletilerek örnekler lize edilmiştir. Lize edilmiş örneklerin üzerlerine 200 µL kloroform-izoamilalkol eklenmiştir. Örnekler homojenize olana kadar vorteks ile karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve 10 dakika 13500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda oluşan üst fazdan 500 µL yeni tüplere alınmış ve üzerlerine 100 µL %100 EtOH eklenerek homojenize olması için vortekse tabi

tutulmuştur. Bu aşamada dsRNA'ların membrana bağlanabilmesi için %16.6 etanol oranına sahip olmaları gerekmektedir. Önceden hazırlanmış nükleazsız steril döndürme kolonlarına membran aktifleştirilmesi için 600 µL yıkama tamponu (Çizelge 3.1) eklenerek 1 dakika 13500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında membrandan geçerek toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırılır. 500 µL süpernatant ve 100 µL EtOH karışımı aktifleştirilmesi gerçekleştirilmiş olan membranlı tüplere eklenerek 1 dakika 13500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırılmıştır. Tüplere 600 µL yıkama tamponu (Çizelge 3.1) eklenerek 1 dakika 13500 rpm'de santrifüjlenmiş ve membran yıkama işlemine tabi tutulmuştur, bu işlem 2 tekrar halinde yapılmıştır. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, membranlı tüpler hiçbir şey eklenmeden 1 dakika 13500 rpm'de santrifüjlenerek membran iyice kurutulmuştur. Membranlı döndürme kolonları yeni 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Membranlara 35 µL elüsyon tamponu (Çizelge 3.1) eklenmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 dakika 13500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında tüpte biriken sıvı pipetlenerek bir kez daha membrana eklenmiş ve 1 dakika 13500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Dermatofit izolatlarından viral dsRNA ekstraksiyonunun şematik gösterimi Şekil 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.1 dsRNA ekstraksiyonunda kullanılan tamponların içerikleri

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



Şekil 3.3 Dermatofit izolatlarından viral dsRNA ekstraksiyonunun şematik gösterimi (BioRender programı ile çizilmiştir)

3.2.6 Viral dsRNA içeriklerinin elektroforetik olarak belirlenmesi

dsRNA taraması sonucunda %0,65'lik agaroz jel kullanılmış (0,23 gr agaroz x 35 mL TBE tamponu), dsRNA ekstraktları elektroforetik yöntemle incelenmiş ve içerikleri ile boyutları belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforezi, standart olarak Sambrook ve diğerlerinin tanımladığı şekilde yapılmıştır (Sambrook vd, 1989). Agaroz jel elektroforezinde her kuyuya 20 µL dsRNA ile 4 µL yükleme boyası karıştırılarak yüklenmiş, jel ve tank tamponu olarak TBE tamponu kullanılmıştır. Elektroforez işleminde, standart olarak elektrotlar arası her cm için voltajı 5 volt olarak uygulanmıştır. dsRNA örneklerinin görüntülenmesinde standart olarak güvenli mavi ışık transillüminatör ve interkalatör Safe-Green boyası kullanılmıştır. Agaroz jel

elektroforezinde dsRNA'ların büyüklüklerinin belirlenebilmesinde GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) DNA belirteci kullanılmıştır.

3.2.7 Agaroz jel elektroforezinde dsRNA+ örneklerin cDNA'ya çevrilmesi ve rPCR tepkimesi

dsRNA taraması sonucunda agaroz jel elektroforezi ile belirgin bantlaşmalar gözlemlenen ve dsRNA+ yani virüs varlığı olan dsRNA'lar, Primer-dN6: 5'-CCTGAATTCGGATCCTCCNNNNNN-3' oligonükleotit primeri kullanılarak ters transkripsiyonla komplementer DNA'ya (complementary DNA) (cDNA) dönüştürülmüştür. cDNA sentezi, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılarak yapılmıştır. cDNA tepkimesi için, 200 µL'lik polipropilen tüpte, 12 µL dsRNA örneği, 1 µL dN6 oligonükleotit primer (100 pmol) ve 2 µL Dimetilsülfoksit (DMSO) ile karıştırılmıştır. dsRNA örnekleri, denatürasyon amacıyla 97 °C'de 2 dakika bekletilmiş ve ardından tüpler buz üzerinde 1,5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüplere 1 µL dNTP (100 µM), 2 µL enzim tepkime tamponu (10x) ve 1 µL ters transkriptaz enzimi (MultiScribe Reverse Transcriptase) (50 U/µL) eklenerek çözelti iyice karıştırılmıştır. Tüpler 25 °C'de 10 dakika ve daha sonra 37 °C'de 2 saat bekletilmiştir ve tüpler 85 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra tepkime sonlandırılmıştır. Agaroz jel elektroforezi ile varlıkları tespit edilen dsRNA'lar cDNA'ya çevrilip, rastgele (random) polimeraz zincir tepkimesi (rPCR) yöntemi ile çoğaltılmıştır (Darissa vd. 2010, Akata vd. 2023a, Sahin vd. 2024). PCR için DNA polimeraz olarak Taq DNA Polymerases (Invitrogen) kullanılmıştır. Tepkime, 200 µL'lik polipropilen tüplerde toplam 50 µL'lik hacimde gerçekleştirilmiştir; 5 µL Taq DNA polimeraz tamponu (10x), 3 µL rPCR Primer: 5'-CCTGAATTCGGATCCTCC-3' (10 µM) oligonükleotit primeri, 3 µL MgCl₂ (50 mM), 1 µL deoksiribonükleozit trifosfat (dNTP) karışımı (her bir nükleotit yapıtaşından 10 mM), 1 µL elde edilen cDNA kalıbı, 0,25 µL Taq DNA polimeraz enzimi (5 ünite) ve toplam hacmi 50 µL'ye tamamlayacak kadar nükleazlardan arındırılmış dH₂O içermektedir. PCR ısıl döngü koşulları ise şu şekildedir: 5 dakikalık başlangıç denatürasyon aşamasını takiben 35 döngü halinde 94 °C'de 18 saniye, 52 °C'de 15 saniye ve 72 °C'de 40 saniye bekleme süreleri uygulanmış ve son

olarak 72 °C'de 5 dakikalık son uzama aşaması gerçekleştirilerek tepkime sonlandırılmıştır. Tepkimenin ısı döngü işlemi MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems) cihazında yapılmıştır. PCR sonunda elde edilen ampliconlar, yöntem 3.2.3'te belirtildiği gibi agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. rPCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi analizi sonucunda kalitesi belirlenmiş ampliconlar, dizi analizi için GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak yıkanmış ve saflaştırılmıştır. Kitin kullanım talimatları doğrultusunda yıkama ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yıkanan ampliconların miktarları ve saflık dereceleri, NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve yeni nesil dizileme (NGS) için en az 1000 ng örnek hazır hale getirilmiştir. NGS analizi hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.8 NGS sonucunda ham okumaların yeni baştan (de novo) birleştirme yaklaşımı ile birleştirilmesi

Yeni nesil dizilemeden gelen ham okumalar, yeni baştan (de novo) birleştirme yöntemiyle viral genomların tüm veya tüme yakın dizileri oluşturmak için yeniden birleştirilmiştir. Bu amaç için CLC Genomics Workbench biyoinformatik yazılımının 20.0.4 sürümü kullanılmıştır. De novo birleştirme işlemi için öncelikle ham okumalardan, yeni nesil dizilemede kütüphane oluşturmak için kullanılan nükleotit etiketleri ve rPCR protokolü ile örnek hazırlama sırasında kullanılan rPCR primeri 3 nükleotit uyumsuzluğuna (mismatch) kadar ayıklanmıştır. Daha sonra de novo birleştirme işleminde kullanılan parametrelerde otomatik eşleştirilmiş mesafe tahmini (paired distance estimation) ile kelime büyüklüğü (word size) 26, kabarcık büyüklüğü (bubble size) 50 ve minimum birleştirilmiş dizi uzunluğu (minimum contig size) 200 nükleotit olarak belirlenmiştir. De novo birleştirme ile elde edilmiş olan diziler (contigler) ve kodladıkları amino asit dizileri ile, sırasıyla BLASTx ve BLASTp analizleri yapılarak virüs ilişkili diziler belirlenmiştir.

3.2.9 Tanımlanan dsRNA segmentlerinden tüm genom dizilerin elde edilmesi amacıyla RNA ligasyonu, RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) için cDNA hazırlanması ve primer tasarlanması

De novo birleştirme ile elde edilmiş olan contiglerin biyoinformatik analizleri yapılarak virüs ilişkili diziler belirlenmiştir. Tüme yakın segment dizilerinin tüm genomunun ortaya çıkartılması için yöntem 3.2.5'te belirtildiği gibi enfekte olan dermatofit örneklerinin viral dsRNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Viral dsRNA ekstraksiyonunun kontrolü için yöntem 3.2.6'da belirtildiği gibi agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Jel elektroforezi sonrasında viral dsRNA ürünlerinin terminal bölgelerinin dizilerinin belirlenmesinde molekülün 3' uçlarına, T4 RNA Ligase 1 enzimi (New England Biolab) yardımıyla 5' ucundan fosfatlanmış ve 3' ucundan amin grubu ile bloke edilmiş olan RLO: 5'-P-CATGGTGGCGACCGGTAG-NH₂-3' oligonükleotit primer etiketi takılmıştır (Akata vd. 2023a, Darissa vd. 2010, Sahin vd. 2024, Sahin ve Akata 2019). Ligasyon işlemi, 200 µL'lik polipropilen tüpler içerisinde; 20 µL PEG (polietilen glikol) 8000 (%50), 10 µL dsRNA (yaklaşık 20 pmol), 5 µL ATP (adenozin trifosfat) (son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde), 5 µL T4 RNA Ligaz tamponu (10x) (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT), 4 µL DMSO (%10), 2 µL RLO primer (120 pmol), 1 µL RNaz inhibitörü ve 3 µL T4 RNA Ligaz enzimi (20 ünite) ile karıştırılarak toplam hacim 50 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Ligasyon tepkimesi 37 °C'de 6 saat, 18 °C'de 2 saat, 16 °C'de 2 saat ve 14 °C'de 2 saat inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir. Bu tepkime sonunda artakalan fazlalık oligonükleotitler yöntem 3.2.3'te belirtildiği gibi saflaştırılmıştır. cDNA sentezi, yöntem 3.2.7'de belirtildiği gibi yapılmıştır. Ancak, cDNA işleminde kullanılan primer dN6: 5'-CCTGAATTCGGATCCTCCNNNNNN-3' yerine, dsRNA'nın 3' uçlarında bulunan etiketlere komplementer olan RTP: 5'-CTACCGGTCGCCACCATG-3' oligonükleotit primeri kullanılarak yöntem 3.2.7'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. RACE PCR için cDNA sentezlenmesinde, yöntem 3.2.7'de belirtildiği gibi tüplerin 25 °C'de 10 dakika bekletilme aşaması atlanmıştır. RACE PCR'da kullanılmak üzere, yöntem 3.2.7'de açıklanan dizi analizi sonucunda elde edilen ve tüm genomu yakın dizi bilgisine dayanarak Primer3 4.1.0 sürümlü (<https://primer3.ut.ee>) çevrim içi aracı ile sekans spesifik oligonükleotit primerler (5' uç için geri primer, 3' uç için ileri primer) tasarlanmıştır. Ligasyon tepkimesi ve saflaştırma sonunda elde edilen cDNA ürününden

1 µL kullanılarak, RTP primeri ve sekans spesifik primer kullanılarak RACE PCR gerçekleştirilmiş ve böylelikle dsRNA segmentlerinin 5' ve 3' uç bölgeleri amplifiye edilmiştir. PCR, 200 µL'lik polipropilen tüplerde toplam 50 µL'lik hacimde gerçekleştirilmiştir; 5 µL Taq DNA polimeraz tamponu (10x), 1 µL RTP: 5'-CTACCGGTCGCCACCATG-3' (10 µM) oligonükleotit primeri, 1 µL tasarlanan sekans spesifik (10 µM) oligonükleotit primeri, 3 µL MgCl₂ (50 mM), 1µL deoksiribonükleozit trifosfat (dNTP) karışımı (her bir nükleotit yapıtaşından 10 mM), 1 µL elde edilen cDNA kalıbı, 0,25 µL Taq DNA polimeraz enzimi (5 ünite) ve toplam hacmi 50 µL'ye tamamlayacak kadar nükleazlardan arındırılmış dH₂O içermektedir. PCR aşamasında kullanılacak olan RTP primerinin ve tasarlanan sekans spesifik primerlerin Tm'leri (melting temperature) NEB Tm Calculator (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>) çevrim içi aracı kullanılarak hesaplanmıştır. PCR protokolü bu hesaplamalar sonucunda düzenlenmiş ve tepkime gerçekleştirilmiştir. PCR sonunda elde edilen ampliconlar, yöntem 3.2.3'te belirtildiği gibi agaroz jel elektorforezi ile doğrulanmış ve yöntem 3.2.3'te belirtildiği gibi yapılan haritalamalar sonucunda beklenen yerlerde belirgin bantlaşmalar gözlemlenen örnekler yöntem 3.2.3'te belirtildiği gibi yıkanarak saflaştırılmıştır. Yıkanan ampliconların miktarları ve saflık dereceleri, NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve dizi analizi için hazır hale getirilmiştir. Ampliconların dizilemesi için RACE aşamasında kullanılan oligonükleotit primerler, sekans primerleri olarak kullanılmıştır. Ampliconların nükleotit dizileri, standart sanger dideoksi zincir sonlanma yöntemi ile belirlenmiştir. Sanger DNA dizi analizi dışarıdan hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.10 TA klonlama yönteminin uygulanması

RACE aşaması sonrasında yapılan agaroz jel elektorforezi sonucuna göre tek bant elde edilemeyen veya kalitesi belirlenememiş olan ampliconları sekanslamak için TA klonlama yöntemi kullanılmıştır. TA klonlama yönteminde pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) kullanılmıştır. Bu vektör, β-galaktosidaz enzimini kodlayan lacZ geni ve X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galakto-piranosid) içeren besiyeri sayesinde, transformasyon sonrası bakteri kolonilerinin mavi veya beyaz renk almasını sağlar. Bu özellik, girdi pozitif klonların seçilmesini kolaylaştırır.

Bu yöntem için öncelikle klonlanmak istenen PCR ürünleri DNA ligasyonuna tabii tutulmuştur. DNA ligasyon işlemi 200 µL'lik polipropilen tüpte toplam 10 µL'lik hacimde gerçekleştirilmiştir; 5 µL ligasyon tamponu (2x), 1 µL pGEM-T easy vektörü, 1 µL T4 DNA Ligaz enzimi, 1 µL PCR ürünü (0,6 pmol) ve 2 µL dH₂O. Ligasyon işlemi 1,5 saat 22 °C'de ve 12-14 saat 4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Ligasyon işlemi tamamlandıktan sonra, 1 µL ligasyon ürünü kompetent ve mavi/beyaz koloni taraması için uygun olan *Escherichia coli* bakterisinin dh5α suşuna transformasyon ile aktarılmıştır. *E. coli* dh5α suşunun kompetent hale getirilmesi ve transformasyon aşaması Chung vd. (1989) çalışmasına göre yapılmıştır. Bu aşamada kullanılan transformasyon ve saklama çözeltisi (TSS) şu şekilde hazırlanmıştır: 5 gr PEG600, 0,5083 gr MgCl₂.6H₂O (Magnezyum klorür heksahidrat), 2,5 mL DMSO ve çözeltiyi 50 mL'ye tamamlayacak kadar otoklavlanmış LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri (10 g/L NaCl, 10 g/L tripton ve 5 g/L maya ekstraktı) eklenmiş ve hazırlanan çözelti, 0,22 µL por çaplı membran filtreden geçirilerek steril edilip -20 °C'de saklanmıştır. *E. coli* dh5α suşunun kompetent hale getirilmesi ve plazmit ile transformasyonu için aşağıdaki talimatlar uygulanmıştır: 25 mL steril LB sıvı besiyerine, *E. coli* (dh5α) aktif kültüründen 25 µL ekilerek, OD600 değeri 0,3 - 0,5'e ulaşana kadar kontrollü bir şekilde 37 °C'de takriben 16-18 saat boyunca inkübe edilerek birinci aktifleştirme tamamlanmıştır. Birinci aktifleştirmeden alınan 25 µL *E. coli* (dh5α) aktif kültürü 25 mL steril LB sıvı besiyerine ekilmiştir. *E. coli* (dh5α) kültürü, OD600 değeri 0,3 - 0,5'e ulaşana kadar kontrollü bir şekilde 33 °C'de takriben 5-6 saat boyunca inkübe edilerek ikinci aktifleştirme tamamlanmıştır. İkinci aktifleştirme tamamlandıktan sonra *E. coli* (dh5α) kültürü 12 dakika 4500 rpm'de santrifüjlenerek pelet haline getirilmiştir. Bakteri peleti, kültür hacminin 1/10'u kadar (~700 µL) TSS çözeltisinde süspansiyon edilmiş ve 30 dakika boyunca buz üzerinde bekletilerek kompetent hale getirilmiştir. Buz üzerinde 1,5 mL'lik steril santrifüj tüplerine 1 µL ligasyon ürünü koyulmuştur. Üzerlerine 100 µL kompetent hale gelmiş bakteri ilave edilmiş ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 45 °C'deki kuru blok ısıtıcısında, 1,5 dakika bekletilmiş ve bakterilere ısı şoku uygulaması yapılmıştır. Isı şokundan sonra tüpler 1 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra, bakterilerin üzerine 150 µL LB sıvı besiyeri ilave edilmiş ve hücreler 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Yarım saatlik inkübasyondan sonra, 250 µL kadar bakteri süspansiyonu, 20 µL Ampisilin (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich) ve 40 µL X-Gal stok solüsyonu (20 mg/mL) (200 mg X-Gal ve

10 mL N,N-Dimetilformamid (DMF)) içeren LB agar besiyerine (15 g/L agar, 10 g/L NaCl, 10 g/L tripton ve 5 g/L maya ekstraktı) yayma ekim yöntemiyle ekilmiş ve besiyerleri 37 °C'de 16 saat ve takiben 4 °C'de 2 saat inkübasyon sonunda mavi-beyaz koloni taramasına hazır hale getirilmişlerdir. İnkübasyon sonunda, girdi pozitif sonuç veren koloniler, RACE PCR ürünü içeren vektörde lacZ geninin kapalı olması nedeniyle kolonide beyaz renk gözlemlenmiştir. Negatif sonuç veren koloniler ise vektörde lacZ geninin aktif olması sebebiyle X-Gal'ın β-galaktosidaz enzimi tarafından parçalanmasıyla mavi renkte gözlemlenmiştir. Girdi pozitif kolonilerden 25-30 tanesiyle, vektör üzerindeki girdi DNA'nın varlığı ve boyutunun doğrulanması için M13F: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' ve M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' oligonükleotit primer çifti kullanılarak koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR'da kalıp DNA yerine, 10 µL'lik beyaz pipet ucu ile kolonilere dokunularak alınan bakteri örnekleri kullanılmıştır. Tepkime, 200 µL'lik polipropilen tüplerde toplam 50 µL'lik hacimde gerçekleştirilmiştir; 5 µL Taq DNA polimeraz tamponu (10x), 3 µL MgCl₂ (50 mM), 1 µL M13F (10 µM) oligonükleotit primeri, 1 µL M13R (10 µM) oligonükleotit primeri, 1µL deoksiribonükleozit trifosfat (dNTP) karışımı (her bir nükleotit yapıtaşından 10 mM), kalıp olarak pipet ucu ile kolonilere dokunularak alınan bakteri, 0,25 µL Taq DNA polimeraz enzimi (5 ünite) ve toplam hacmi 50 µL'ye tamamlayacak kadar nükleazlardan arındırılmış dH₂O içermektedir. PCR ısıl döngü protokolü şu şekildedir: 3 dakikalık başlangıç denatürasyon aşamasını takiben toplam 30 döngü halinde 95 °C'de 15 saniye, 60 °C'de (iniş yaklaşımı ile) 15 saniye ve 72 °C'de 15 dakika bekleme süreleri uygulanmış ve son olarak 72 °C'de 1 dakikalık son uzama aşaması gerçekleştirilerek tepkime sonlandırılmıştır. Girdi DNA'nın varlığı ve büyüklüğü doğrulandıktan sonra, 25-30 koloni ampisilinli sıvı LB besiyerinde üretilmiş ve girdi DNA'nın dizisinin belirlenmesi için plazmit vektörü izole edilmiştir. Plazmit izolasyonunda WizPrep Plasmid DNA Mini Kit (Wizbiosolutions) kullanılmıştır. Plazmit izolasyonu kitin kullanım talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Seçilen plazmit vektöründeki dsRNA dizisinin cDNA'sının dizisi, M13F ve M13R primerleri sekans primerleri olarak kullanılarak standart sanger dideoksi zincir sonlanma yöntemiyle belirlenmiştir. Sanger DNA dizi analizi dış hizmet alımıyla gerçekleştirilmiştir.

3.2.11 Elde edilen dsRNA dizilerinin birleştirilerek tüm viral genom dizilerinin elde edilmesi

NGS sonucu elde edilen contigler ile rPCR, RACE ve TA klonlama sonucunda elde edilen dizilerle birleştirilmiş ve dsRNA viral genomlara ait tüm dizi bilgisi elde edilmiştir. Dizi birleştirmeleri sonucunda ortaya çıkan olası boşluklar, sekans spesifik oligonükleotit primerleri kullanılarak yöntem 3.2.9’da belirtildiği gibi PCR ile çoğaltılmış ve dizileri belirlenerek tüm genom dizi birleştirmeleri yapılmıştır.

3.2.12 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), ORFfinder çevrim içi aracı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 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 regülasyon bölgeleri (untranslated region) (translasyonu yapılmayan bölgeler) (UTR) belirlenmiştir. Özellikle segmentli genomlara sahip (örn: bipartit virüsler) virüslerin çoklu enfeksiyon yapmış olduğu durumlarda tanımlanan UTR’ler, bu bölgelerin kendi aralarındaki dizi benzerlikleri dikkate alınarak genom segmentlerinin eşleştirilmesinde kullanılmıştır. Elde edilen dsRNA dizilerinin filogenetik analizi hem nükleotit dizileri ile hem de kodladığı proteinlerin (RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp), Nükleokapsit gibi) aminoasit dizileri esas alınarak, MEGA11 yazılımı kullanılarak yapılmıştır (Tamura vd. 2021). Bunun için öncelikle dsRNA dizileri, NCBI’nin BLASTn 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 önyüklemeye yinelemesi (bootstrap replicate) kullanılmıştır. Filogenetik analizlerde en doğru amino asit yer değiştirme/substitüsyon modelinin seçiminde MEGA11 yazılımının “en iyi protein modelinin belirlenmesi” modülü kullanılmıştır. dsRNA’ların nükleotit dizileri ve 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 ailesine ait olup olmadığının belirlenmesinde iç gruba ait dizilerle aynı veya farklı grupta toplanmaları göz önünde bulundurulmuştur.

Virüslerde tür sınırı için belirlenen yüzde dizi benzerlik eşik değerleri her virüs familyası için farklılık göstermekte ve bu sınırlar Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi’ndeki (ICTV) çalışma grupları tarafından, çalışılan virüs familyasındaki varyasyon düzeyleri dikkate alınarak tayin edilmiştir. Örneğin konakları mantarlar, bitkiler ve muhtemelen böcekler olan *Chrysoviridae* familyası için cins ayırma kriterleri: filogenetik analiz, nükleotit ve amino asit dizisi verileri (örneğin, RdRP hariç, viral proteinler cinsler arasında homolog değildir) ve dsRNA genom segmentlerinin sayısı dikkate alınmaktadır (Kotta-Loizou vd. 2020). ICTV'nin son raporuna göre *Fusariviridae* familyası için tür sınırı RNA bağımlı RNA polimeraz dizileri için <math><80\%</math> dizi benzerliği olarak önerilmektedir (Chiba vd. 2024). Tez çalışması kapsamında tanımlanmış olan aynı familya ve cinse mensup virüslerin birbirlerinin suşları, genotipleri veya varyantları mı, yoksa ayrı türlerin üyeleri mi olduklarının belirlenmesinde virüs familyaları için tanımlanmış olan tür sınır ölçütleri dikkate alınmıştır.

3.2.13 Virüs içermeyen dermatofit izolatlarının elde edilmesi

Virüs içermeyen dermatofit izolatlarının eldesi için hifal uç kesme, termoterapi ve fungusit ile antibiyotik tedavisinden oluşan karma bir yaklaşım yöntemi kullanılmıştır (Shafik vd. 2021, Khan vd. 2023). Bu amaç için dermatofit izolatlarının 27 °C'de bir hafta inkübe edilmiş SDA besiyerleri üzerindeki taze kültürleri ile çalışılmış olup, koloni sınırındaki hiflerin uçları (~ 1 mm) stereo mikroskop altında, en son dallanma noktasının hemen üzerinden ince bir iğne kullanılarak ayrı ayrı kesilmiştir. Kesilen hifal uçlar yeni

petri kaplarındaki (petri başına bir hifal uç) SDA besiyerlerine tekrar aktarılmış ve karanlık koşulda, 37 °C'de 1 gün, daha sonra, 27 °C'de 7-10 gün boyunca inkübe edilmiştir. Çalışılan dermatofitlerin optimal büyüme sıcaklıklarının (27 °C) üzerinde çalışıldığında, dermatofit izolatlarını enfekte eden virüslerin replikasyonlarının ve kalıcılığının azalacağı düşünülmektedir (Khan vd. 2023). SDA besiyerinde yeterince büyüklüğe ulaşan hiflerin uçları kesilmiş ve sulu agar (%1,5) (water agar) 27 °C'de 7-10 gün boyunca inkübe edilmiştir. Sulu agar, besin bakımından yetersiz olduğundan mantarlar için bir stres koşulu oluşturmaktadır, bu da mantarların besin aramak için genişleyerek yayılmasına ve hifal uç kesme işleminin kolaylaşmasına olanak tanımaktadır (Khan vd. 2023). Sulu agardan alınan hiflerin uçları sikloheksimit (fungisit), ampisilin ve kanamisin (antibiyotik) içeren SDA besiyerine alınarak 27 °C'de 7-10 gün boyunca inkübe edilmiştir. Son aşama olarak bu besiyerleri 37 °C'de 1 gün inkübe edilmiştir. Bu işlem virüssüz izojenik hatlar elde edilene kadar tekrarlanmıştır. En son elde edilen hifal uç alt kültürünün herhangi bir mikovirüs içerip içermemesi, yöntem 3.2.5 ve 3.2.6'da belirtildiği gibi kültürden elde edilen dsRNA ekstraktlarının agaroz jel elektroforez analizi ile belirlenmiştir.

3.2.14 Virüs ile enfekte olan ve virüs içermeyen dermatofit izolatlarının kültürlerinin morfolojik farklılıklarının gözlemlenmesi

Virüs ile enfekte Tr247 numaralı örnek ve virüsten arındırılmış izojenik *L. aphanocladii* izolatlarının SDA besiyerindeki kültürlerin çap ölçümleri, konidium sayıları ve morfolojik değişimleri karşılaştırılmıştır. 5 adet +Tr247 ve 5 adet -Tr247 dermatofit örneği SDA besiyerlerinde 27 °C'de inkübe edilmiş ve kültür örneklerinin çap ölçümleri üç günde bir olacak şekilde 24 gün boyunca ölçülmüştür. Konidium izolasyonu şu şekilde gerçekleştirilmiştir; besiyerlerinin üzerinden konidium tıraşlanarak steril distile su içeren flakonlara alınarak gerçekleştirilmiştir. İnokulum 0,5 McFarland'a göre standardize edilmiştir. 0.5 McFarland değerindeki örnekler, 2 dakika boyunca elde çalkalanmış ve hiflerin parçalanması kabaca sağlanmıştır. Bu örnekler 4 dakika vortekse tabii tutulup, 3 dakika hiflerin dibe çökmesi beklenilmiş ve üst kısımdan 1 mL örnek alınarak 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplere aktarılmıştır. Daha sonra bu örnekler 2500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. 5 µL santrifüjlenen örneklerin süpernatantları ile 2 µL laktofenol

pamuk mavisi (lactophenol cotton blue) karıştırılarak FAST READ 102 (Biosigma) lama yüklenmiş ve mikroskop altında konidium sayımı yapılmıştır.

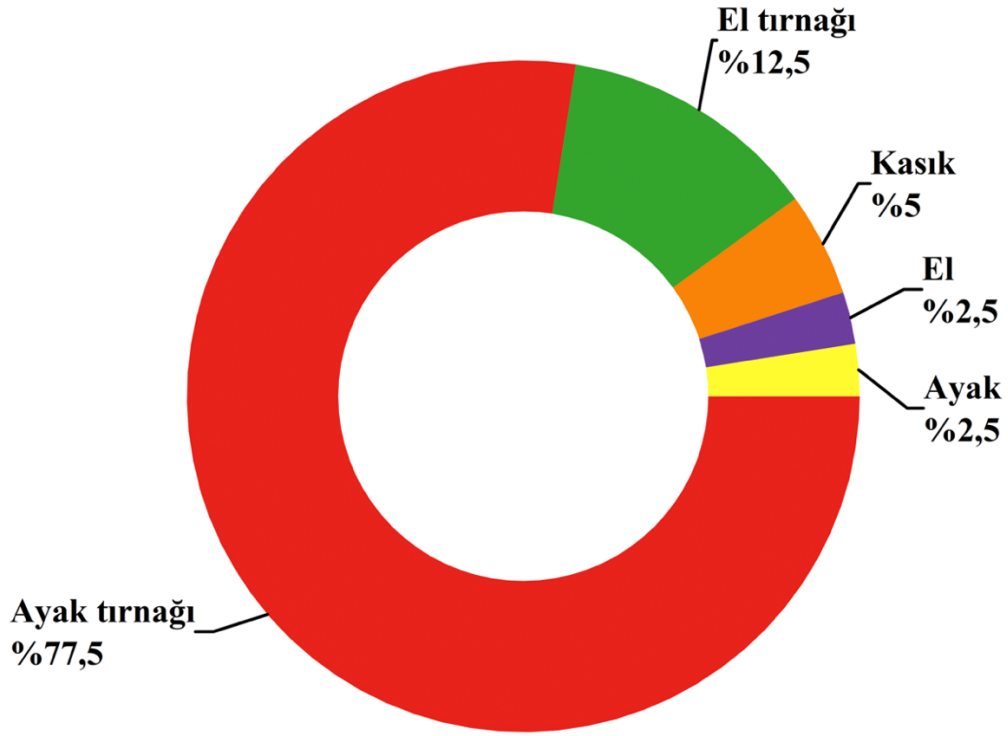
3.2.15 Virüs ile enfekte olan ve virüs içermeyen dermatofit izolatlarına antifungal duyarlılık testi yapılması

Dermatofit izolatların antifungal ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemek için misel büyümesinin pH değişim takibi temeline dayanan Sensititre YeastOne YO10 AST Plate (Thermo Fisher Scientific) antifungal duyarlılık testi yapılmıştır. Test kitin talimatında belirtildiği gibi yapılmıştır. Sensititre YeastOne duyarlılık plakası, *in vitro* tanı amacıyla kullanılan mikrobroth dilüsyon yöntemine dayanan, kurutulmuş 96 kuyulu mikrolaka formatında kantitatif minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) sonuçlarının değerlendirilmesini sağlamıştır. Sonuçlar, büyüme göstermeyen en düşük antifungal konsantrasyonun okunmasıyla belirlenmiştir. Okuma yapılırken kırmızı kuyuların varlığı, misel büyümesinin göstergesidir. Bu durum, antifungallere karşı dirençli fungusların kuyuda geliştiğini ve kuyunun kırmızı-pembe bir renk aldığını belirtmektedir. Ancak kuyuların mavi renk alması miselin büyümediğini ve antifungallere direnç göstermediğini işaret etmektedir. Anidulafungin, amphotericin b, mikafungin, kaspofungin, flusitozin, posakonazol, vorikonazol, itrakonazol ve flukonazol antifungal ilaçlar ile dermatofitlerin antifungallere olan duyarlılıkları test edilmiştir. Bu analiz sonucunda virüs ile enfekte olan ve virüs içermeyen dermatofit izolatlarının antifungallere olan duyarlılığı karşılaştırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Dermatofit İzolatlarının Temin Edilmesi Ve Detaylı Bilgileri

Tez çalışması kapsamında toplam 40 adet dermatofit örneği temin edilmiştir. Örneklerin %77,5'i ayak tırnağından, %12,5'i el tırnağından, %5'i kasıktan, %2,5'i elden ve %2,5'i ayaktan izole edilmiştir (Şekil 4.1). Temin edilen dermatofit örneklerinin adı, izolasyon kaynağı ve izole edilme tarihleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 İzolasyon kaynağına göre dermatofit izolatlarının grafiği

Çizelge 4.1 Temin edilen dermatofit örneklerine ait bilgiler

İzolant adı	İzolasyon kaynağı	İzole edilme tarihi
TrH	Ayak tırnağı	Temmuz 2023
Tr2	El tırnağı	Ekim 2022
Tr3	Ayak tırnağı	Ocak 2019
Tr65	El tırnağı	Şubat 2019
Tr92	Ayak tırnağı	Haziran 2019

Çizelge 4.1 Temin edilen dermatofit örneklerine ait bilgiler (devam)

Tr94	Ayak tırnağı	Mart 2019
Tr97	Ayak tırnağı	Mart 2019
Tr101	Ayak tırnağı	Mart 2018
Tr103	El	Şubat 2019
Tr116	Ayak tırnağı	Nisan 2019
Tr159	Ayak tırnağı	Ekim 2019
Tr163	Ayak tırnağı	Ekim 2019
Tr165	Ayak tırnağı	Ekim 2019
Tr171	El tırnağı	Kasım 2019
Tr214	Ayak tırnağı	Aralık 2019
Tr224	Ayak tırnağı	Şubat 2024
Tr247	Ayak tırnağı	Ocak 2020
Tr289	Ayak	Şubat 2020
Tr290	Ayak tırnağı	Şubat 2020
Tr292	Ayak tırnağı	Haziran 2020
Tr294	Ayak tırnağı	Eylül 2020
Tr295	Ayak tırnağı	Eylül 2020
Tr298	Ayak tırnağı	Şubat 2024
Tr300	Ayak tırnağı	Eylül 2020
Tr302	Ayak tırnağı	Ekim 2020
Tr304	Ayak tırnağı	Kasım 2020
Tr308	Ayak tırnağı	Aralık 2020
Tr324	Ayak tırnağı	Mart 2021
Tr335	El tırnağı	Nisan 2021
Tr336	Ayak tırnağı	Ekim 2021
Tr348	Kasık	Ekim 2022
Tr360	El tırnağı	Şubat 2023
Tr362	Ayak tırnağı	Haziran 2023
Tr374	Ayak tırnağı	Aralık 2023
Tr378	Kasık	Ocak 2024
Tr379	Ayak tırnağı	Ocak 2024
Tr380	Ayak tırnağı	Ocak 2024
Tr382	Ayak tırnağı	Ocak 2024
Tr388	Ayak tırnağı	Ocak 2024
Tr398	Ayak tırnağı	Temmuz 2023

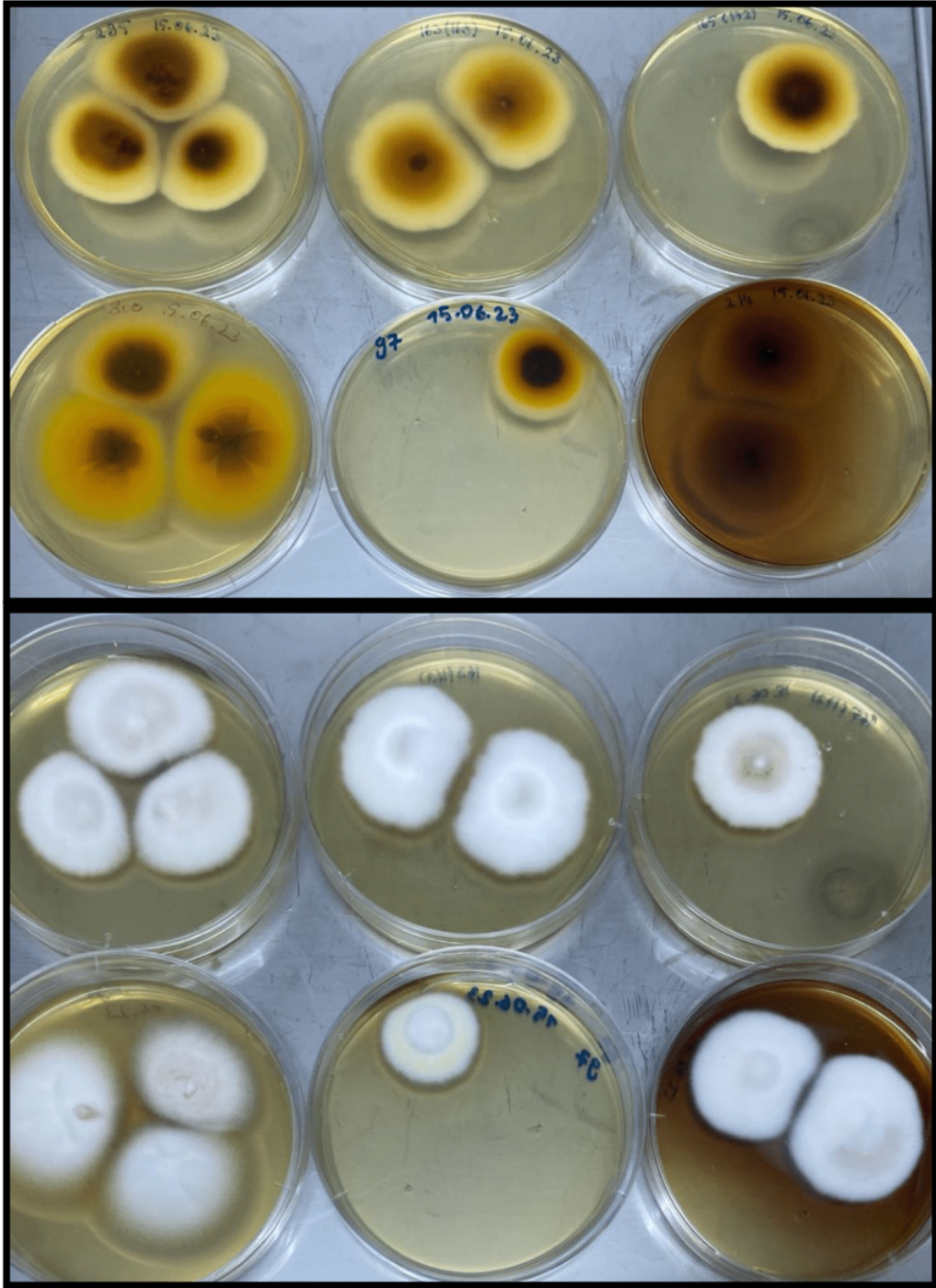
4.2 Dermatofit Örneklerinin Morfolojik Teknikler ile Değerlendirilmeleri

Dermatofit örnekleri stoklardan sikloheksimitli SDA besiyerlerine ekilerek kültüre alınmıştır. Tr295, Tr163, Tr165, Tr300, Tr97, Tr214 numaralı *T. rubrum* izolatlarının 14 günlük inkübasyonu sonucunda, yoğun, krem-beyaz, ipliksi bir görünümle karakterize edilen kolonilerin (mantar misel ağı) büyümesi gözlemlenmiştir. Kültürün arka yüzeyinde sarı-koyu kahverengi bir renk gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).

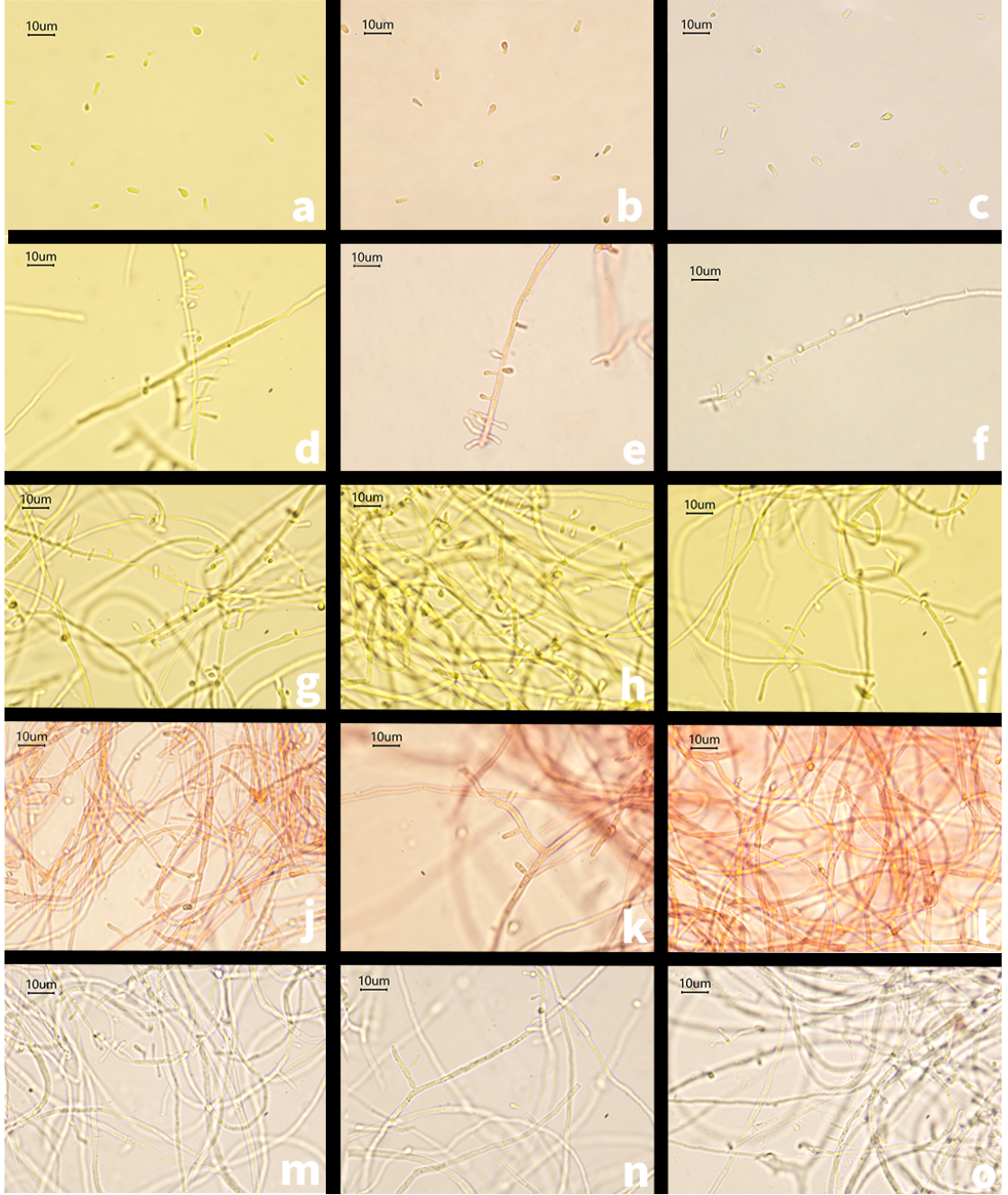
T. rubrum, 21 günlük inkübasyonu sonucunda, 50 mm, beyaz, pamuksu bir yüzey sergiler. Koloninin alt tarafı genellikle kırmızıdır, ancak bazı izolatlar daha sarımsı veya kahverengimsi görünebilir. *T. rubrum* kültürde yavaş büyür ve fertil hifler üzerinde yanal olarak seyrek gözyaşı damlası veya çivi şeklinde mikrokonidiler üretir. Makrokonidiler genellikle yoktur, mevcut olduğunda, makrokonidiler düz duvarlı ve dar çomak şeklindedir. Saf kültür elde edilen dermatofit örneklerinden Tr159 numaralı *T. rubrum*'un binoküler mikroskobu ve SEM görüntüleri verilmiştir. (Şekil 4.3; %5 KOH içinde (a,d,g,h,i), kongo kırmızısı içinde (b,c,e,f,j,k,l), bir ayraç kullanılmadan (m,n,o) (ölçek çubukları: 10 µm), Şekil 4.4; *T. rubrum*'un konidiosporları ve konidiyoforları).

Tr247 örnek numaralı *L. aphanocladii* izolatının 7 günlük inkübasyonu sonucunda, 29-34 mm çapında, yoğun, beyaz, ipliksi bir görünümle karakterize edilen kolonilerin (mantar misel ağı) büyümesi gözlemlenmiştir. Kültürün arka yüzeyinde turuncu-kahverengi bir renk gözlemlenmiştir. Ayrıca, agar plaklarında soluk pembemsi veya lila-pembe renk tonuna yayılan bir pigment salgısı gözlemlenmiştir. Saf kültür elde edilen dermatofit örneklerinden Tr247 numaralı *L. aphanocladii*'nin binoküler mikroskobu ve SEM görüntüleri verilmiştir. (Şekil 4.6; %5 KOH içinde (a,b), kongo kırmızısı içinde (c), melzer ayırıcı içinde (d) (ölçek çubukları: 10 µm), Şekil 4.7; *L. aphanocladii*'nin konidiosporları ve konidiyoforları).

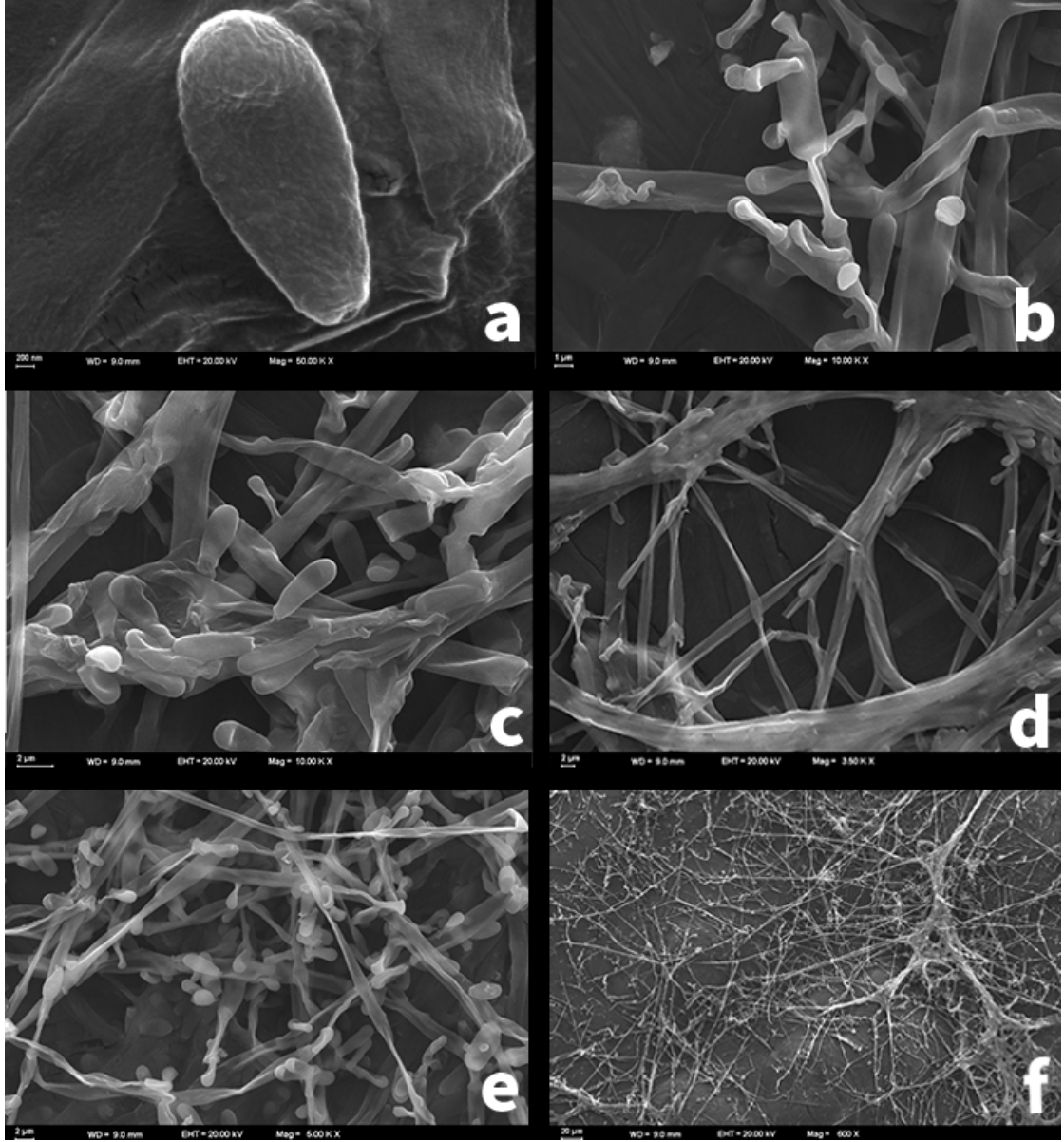
Mikromorfolojik incelemelerden elde edilen bulgular, konidyojen hücrelerin ya izole birimler, çiftler halinde, vertikillat bir düzende düzenlenmiş ya da düz hifler üzerinde düzensiz kümeler halinde sıkıca gruplanmış olarak geliştiği gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin $4,6-9,3 \times 0,9-2,2$ µm boyutlarında dar, filamentli boyun şeklinde sivrilen şişe şeklinde olduğu gözlemlenmiştir. Konidium, hem ışık hem de elektron mikroskobunda $3,1-4,2 \times 1,9-2,8$ µm boyut aralığında oval ila elipsoidal bir şekle sahiptir.



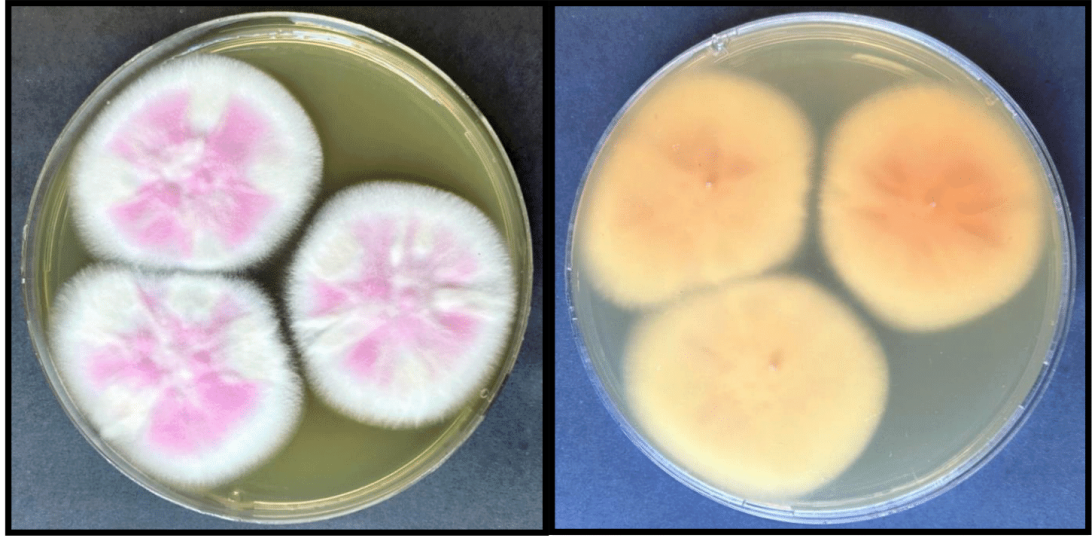
Şekil 4.2 Tr295, Tr163, Tr165, Tr300, Tr97, Tr214 numaralı *T. rubrum* izolatlarının sikloheksimitli SDA besiyerindeki ön ve arka yüzeylerinin görüntüsü



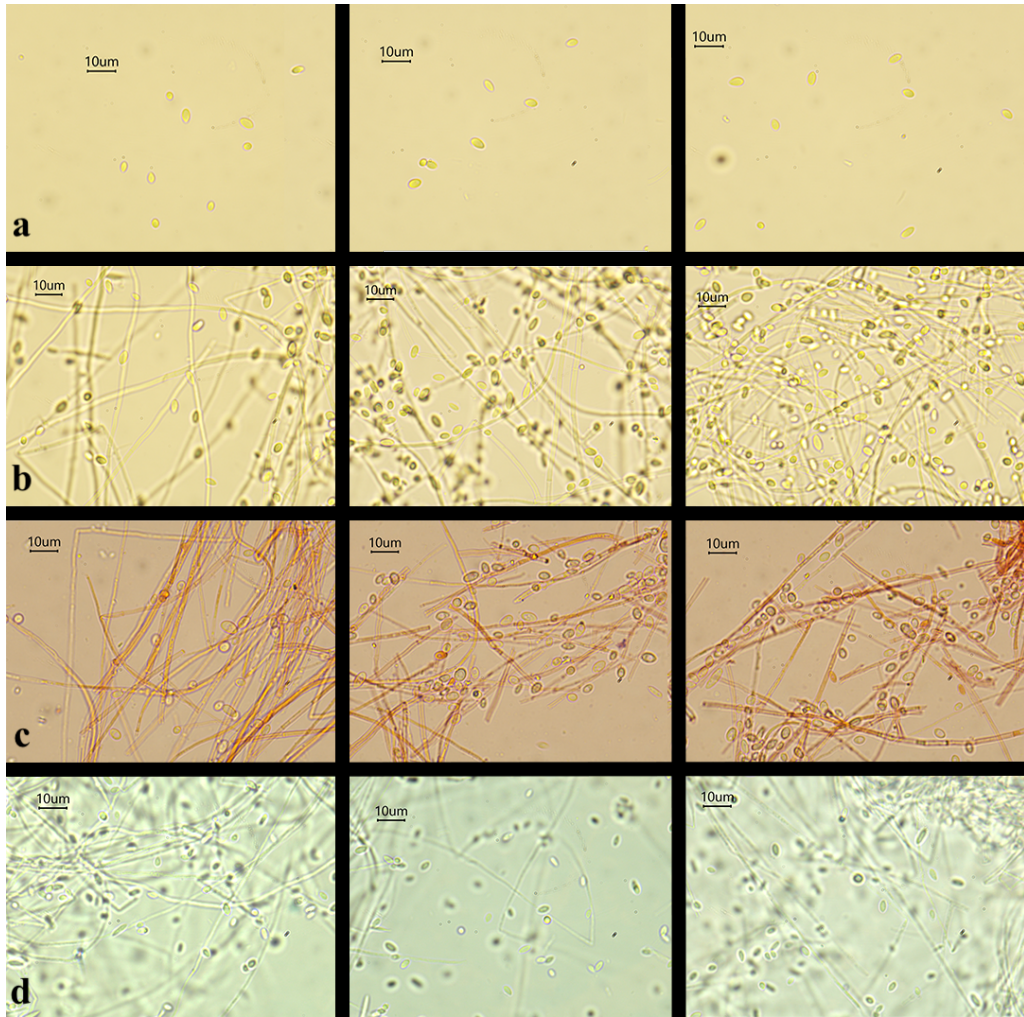
Şekil 4.3 Tr159 numaralı *T. rubrum* örneğinin binoküler mikroskop görüntüsü



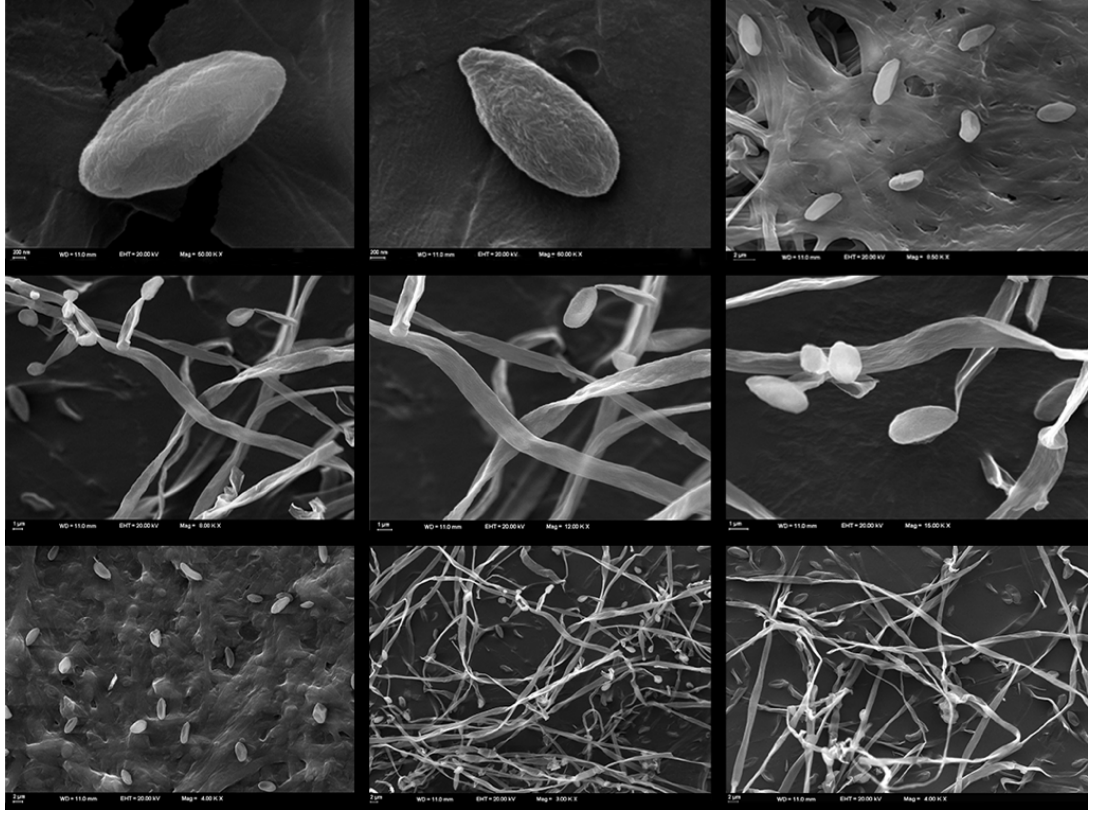
Şekil 4.4 Tr159 numaralı *T. rubrum* örneğinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü



Şekil 4.5 Tr247 örnek numaralı *L. aphanocladii* izolatının sikloheksimitli SDA besiyerindeki ön ve arka yüzeyinin görüntüsü



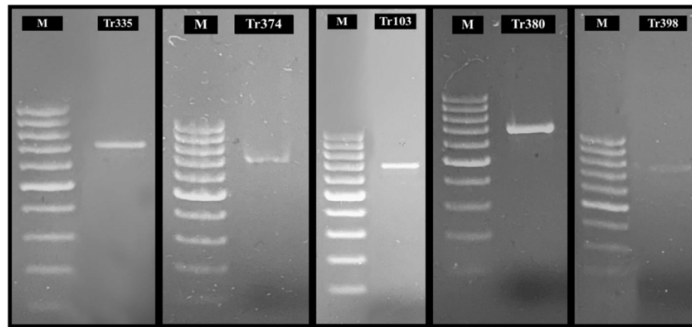
Şekil 4.6 Tr247 numaralı *L. aphanocladii* örneğinin binoküler mikroskop görüntüsü



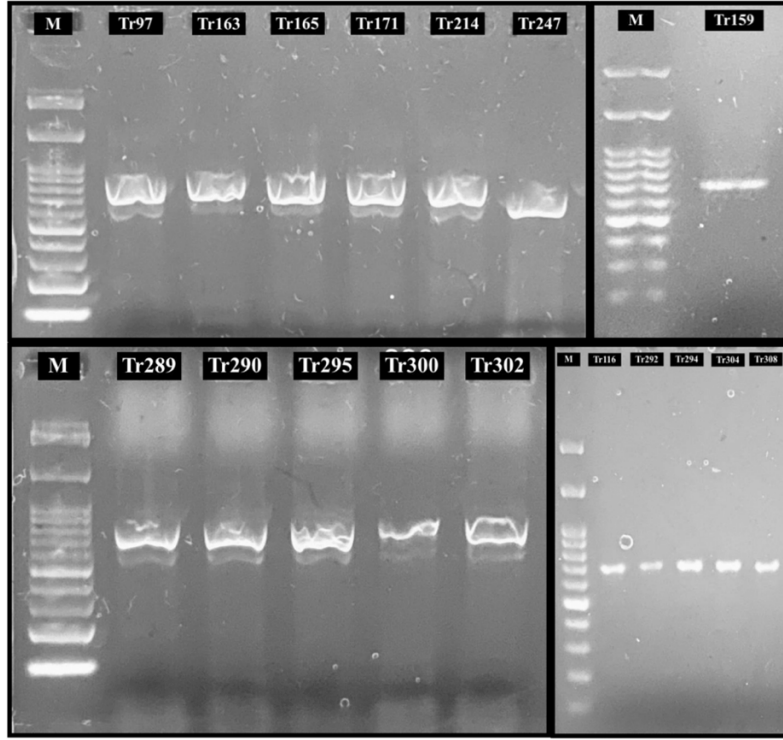
Şekil 4.7 Tr247 numaralı *L. aphanocladii* örneğinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü

4.3 Dermatofit Örneklerin Moleküler Değerlendirilmeleri

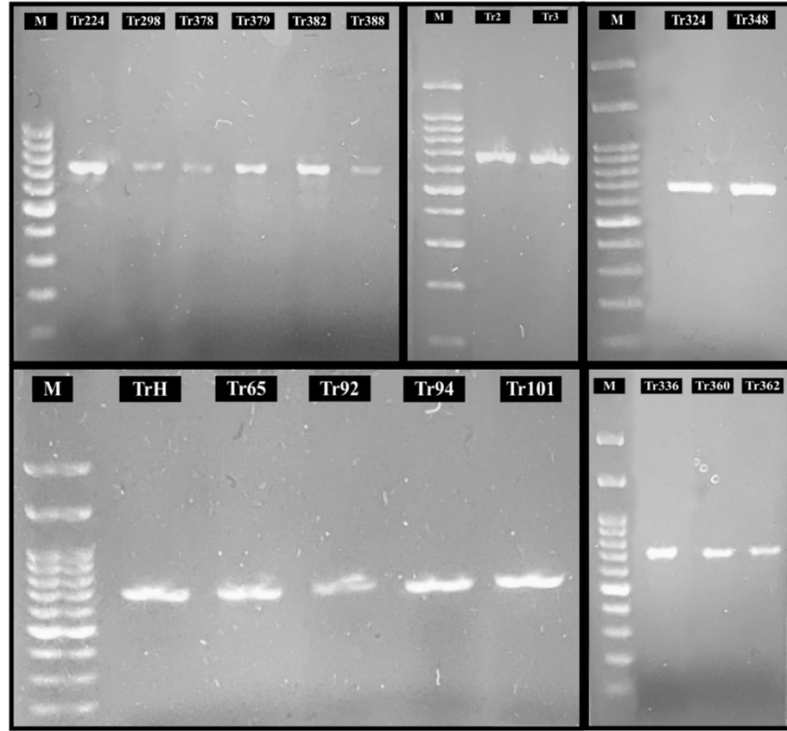
Dermatofit örneklerinin genomik DNA ekstraksiyonları yapıldıktan sonra ITS1 ve ITS4 oligonükleotit primerleri ile PCR'ı kurulmuştur. Yapılan ITS PCR sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.8 ITS PCR ürünlerinin elektroforetik olarak belirlenmesi (M: 100 bp DNA belirteci)



Şekil 4.9 ITS PCR ürünlerinin elektroforetik olarak belirlenmesi (M: 100 bp DNA belirteci)



Şekil 4.10 ITS PCR ürünlerinin elektroforetik olarak belirlenmesi (M: 100 bp DNA belirteci)

4.4 DNA Dizi Analizi Sonuçları

Sanger dideoksi zincir sonlanma yöntemi ile 40 dermatofite ait diziler elde edilmiştir. Elde edilen dizilerin NCBI GenBank veritabanı kullanılarak BLASTn analizleri yapılmıştır. BLAST analizleri sonucunda 39 dermatofit fungus *Trichophyton rubrum*, 1 fungusun *Lecanicillium aphanocladii* olarak tür teşhisi yapılmıştır. İzolat isimleri, GenBank erişim numaraları ve BLAST nükleotit dizi benzerlik oranları (PI) ve sorgu kapsamı (QC) yüzdeleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

T. rubrum örnekleri için nrITS rDNA bölgesi ve maksimum olasılık (ML) yöntemi kullanılarak 39 mantar örneği arasındaki evrimsel bağlantıları gösteren bir filogenetik ağaç sunulmuştur (Şekil 4.11). *T. rubrum* kompleksinin oluşturduğu haplotipler filogenetik ağaçta belirtilmiştir. En uygun nükleotit ikame (substitution) modeli JC+G olarak belirlenmiş ve güven düzeyini göstermek amacıyla her dal için 1000 önyükleme yinelemesi (bootstrap replicate) kullanılmıştır. Ağacın oluşturulmasında kullanılan tüm diziler, Tr kodlu diziler hariç, NCBI GenBank'tan temin edilmiştir. Ayrıca, *Trichophyton tonsurans* dış grup temsilcisi olarak filogenetik ağaca dahil edilmiştir. Her dizi için GenBank erişim numaraları parantez içinde verilmiştir. Sol alttaki ölçek çubuğu 0,20'lik bir genetik mesafeyi ifade etmektedir.

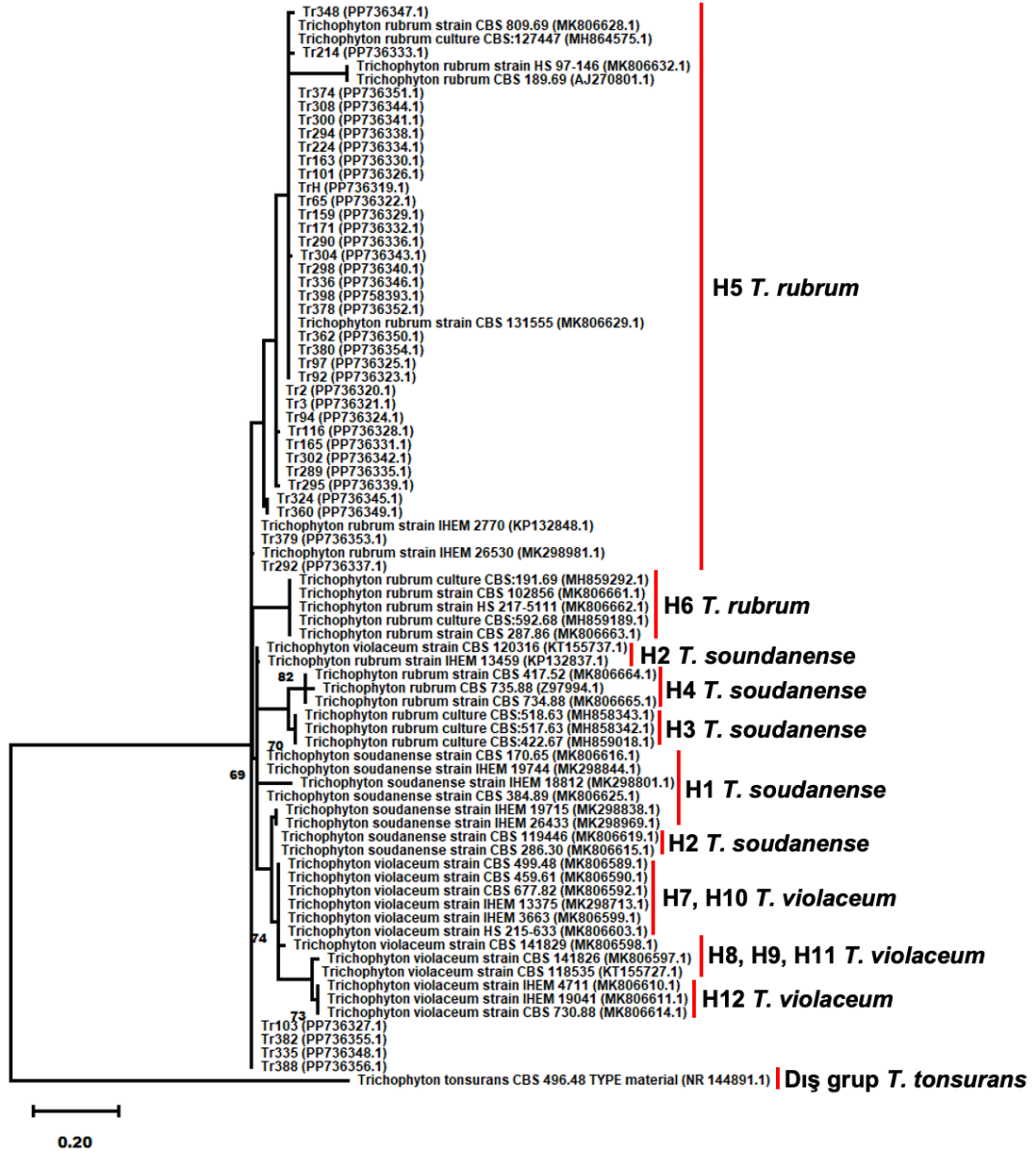
L. aphanocladii örneği için nrITS rDNA bölgesi ve maksimum olasılık (ML) yöntemi kullanılarak 45 mantar örneği arasındaki evrimsel bağlantıları gösteren bir filogenetik ağaç sunulmuştur (Şekil 4.12). En uygun nükleotit ikame (substitution) modeli T92+G olarak belirlenmiş ve güven düzeyini göstermek amacıyla her dal için 1000 önyükleme yinelemesi (bootstrap replicate) kullanılmıştır. Ağacın oluşturulmasında kullanılan tüm diziler, Tr247 dizisi hariç, NCBI GenBank'tan temin edilmiştir. Ayrıca, *Microsporum canis* dış grup temsilcisi olarak filogenetik ağaca dahil edilmiştir. Her dizi için GenBank erişim numaraları parantez içinde verilmiştir. Sol alttaki ölçek çubuğu 0,20'lik bir genetik mesafeyi ifade etmektedir.

Çizelge 4.2 Dermatofit izolatlarının adları, erişim numaraları ve BLASTn analizi sonuçları

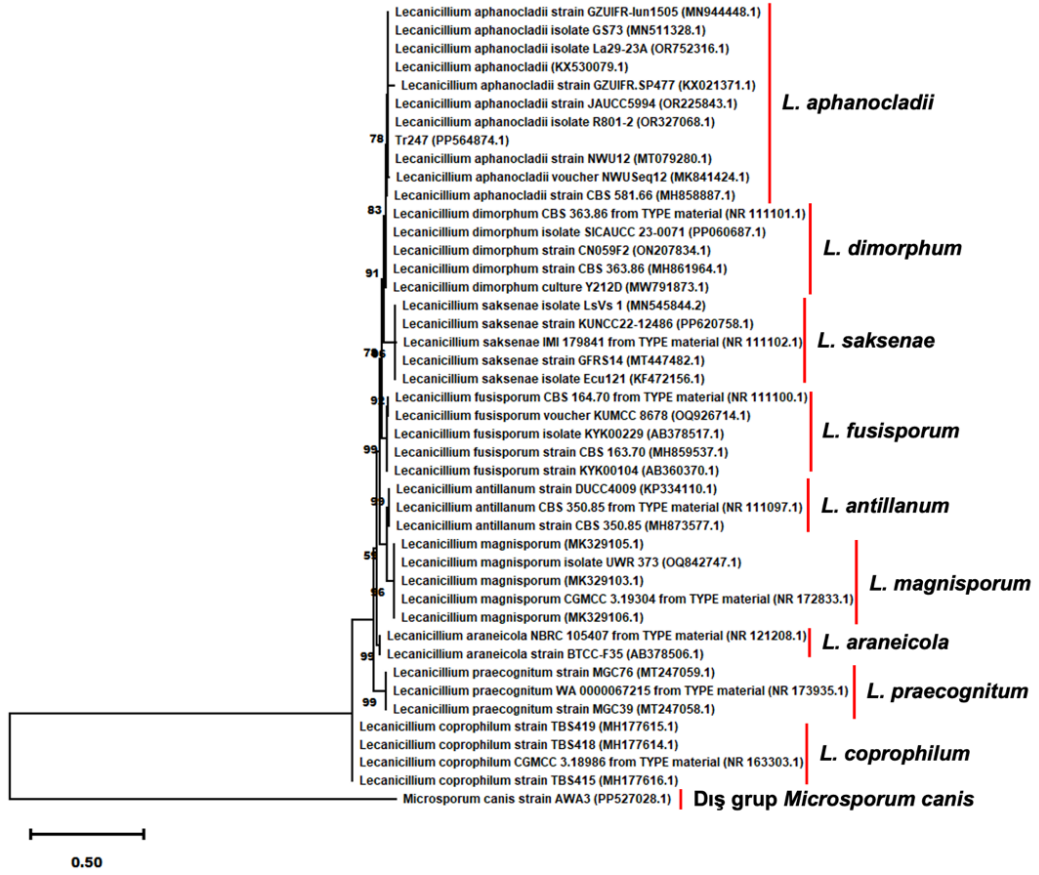
İzolat Adı	GenBank Erişim Numarası	Sorgu Kapsamı (QC), Dizi Benzerlik Oranı (PI), En iyi BLASTn eşleşmesi
TrH	PP736319.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr2	PP736320.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr3	PP736321.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr65	PP736322.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr92	PP736323.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr94	PP736324.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr97	PP736325.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr101	PP736326.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr103	PP736327.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr116	PP736328.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr159	PP736329.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr163	PP736330.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr165	PP736331.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr171	PP736332.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr214	PP736333.1	QC %100, PI %99.81 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr224	PP736334.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr247	PP564874.1	QC %100, PI %100 <i>Lecanicillium aphanocladii</i>
Tr289	PP736335.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr290	PP736336.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr292	PP736337.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr294	PP736338.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr295	PP736339.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr298	PP736340.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr300	PP736341.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr302	PP736342.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr304	PP736343.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr308	PP736344.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr324	PP736345.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr335	PP736348.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr336	PP736346.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr348	PP736347.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr360	PP736349.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr362	PP736350.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr374	PP736351.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr378	PP736352.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>

Çizelge 4.2 Dermatofit izolatlarının adları, erişim numaraları ve BLASTn analizi sonuçları (devam)

Tr379	PP736353.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr380	PP736354.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr382	PP736355.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr388	PP736356.1	QC %100, PI %99.80 <i>Trichophyton rubrum</i>
Tr398	PP758393.1	QC %100, PI %100 <i>Trichophyton rubrum</i>



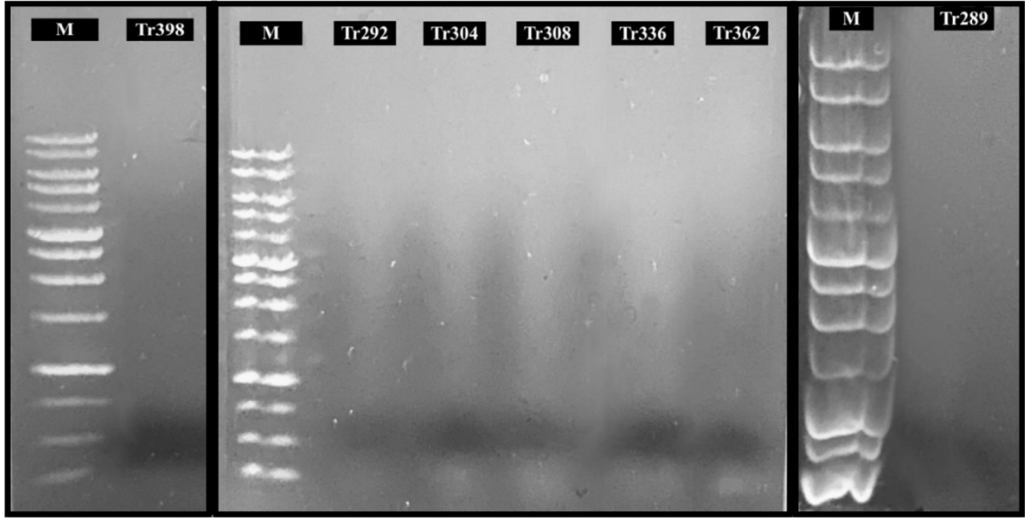
Şekil 4.11 *T. rubrum* ve *T. rubrum* kompleksi üyelerinin dizilerine dayanarak oluşturulan maksimum olasılık filogenetik ağacı



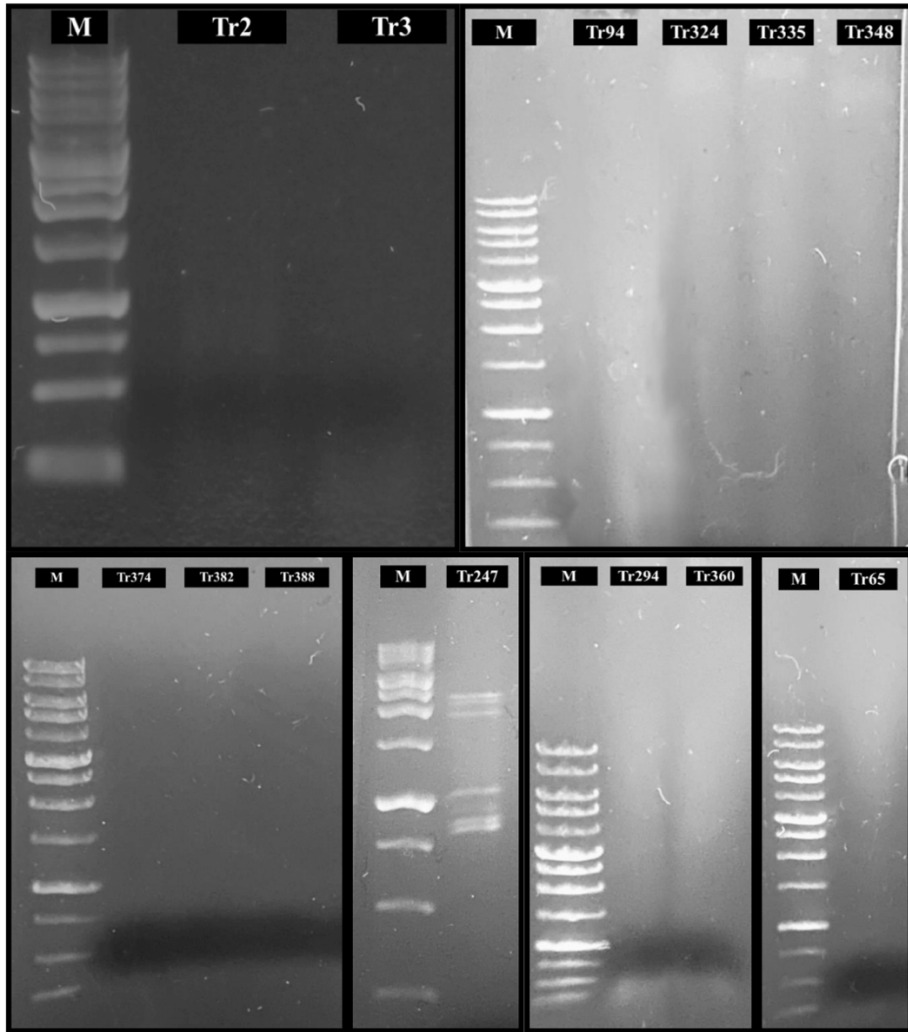
Şekil 4.12 *L. aphanocladii* ve *Lecanicillium* cinsinin diğer üyelerinin dizilerine dayanarak oluşturulan maksimum olasılık filogenetik ağacı

4.5 Viral dsRNA İçeriklerinin İncelenmesi

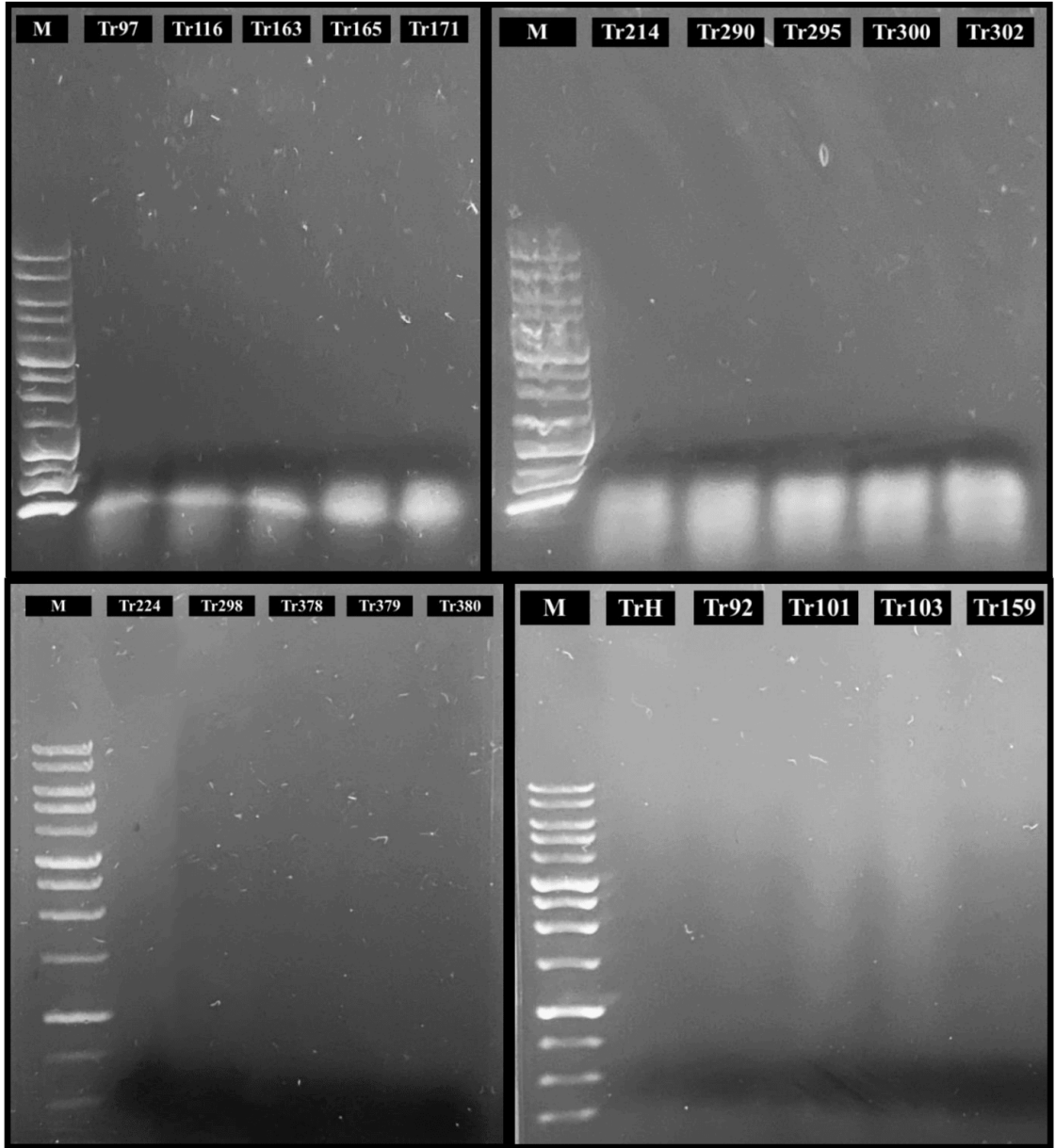
40 dermatofit izolatından viral dsRNA ekstraksiyonu, selüloz kolonlarla afinite kromatografisi yöntemine dayanarak gerçekleştirilmiş ve %0,65'lik agaroz jel kullanılarak dsRNA içerikleri elektroforetik yöntemle incelenmiştir (Şekil 4.13, 4.14, 4.15) Viral dsRNA taraması yapılan 40 örnek içerisinde, ITS rDNA analizleri ile *L. aphanocladii* (Tr247 numaralı dermatofit) olarak teşhis edilen bir dermatofit kalitatif gözlem ile viral dsRNA pozitif olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.13 Viral dsRNA jel elektroforezi (M: 1 kb DNA belirteci)



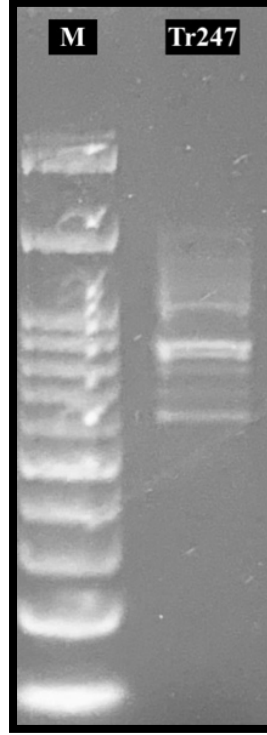
Şekil 4.14 Viral dsRNA jel elektroforezi (M: 1 kb DNA belirteci)



Şekil 4.15 Viral dsRNA jel elektroforezi (M: 1 kb DNA belirteci)

4.6 dsRNA+ Örneklerin cDNA ve rPCR Yöntemleri ile Değerlendirilmesi

Kalitatif gözlem ile viral dsRNA pozitif olarak belirlenen *L. aphanocladii* (Tr247 numaralı dermatofit) örneğinin viral RNA'ları cDNA'larına dönüştürülerek rPCR ile çoğaltılmıştır. rPCR ürününün agaroz jel elektroforezi şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16 Tr247 numaralı örneğin rPCR ürününün agaroz jel elektroforezi (M: 100 bp DNA belirteci)

4.7 NGS Analizleri Sonucunda Virüs ile İlişkili Contiglerin Belirlenmesi

Tr247 numaralı örnekten elde edilen rPCR ürünleri, köprü amplifikasyonu yöntemi kullanılarak Illumina MiSeq yeni nesil dizileme platformunda 2 gigabaytlık kısa okumalar elde edilmiştir. Bu kısa okumalar, CLC Genomics Workbench biyoinformatik yazılımının 20.0.4 sürümü ile de novo olarak birleştirilmiş ve contigler elde edilmiştir. Elde edilen contigler, NCBI BLASTx çevrimiçi aracı kullanılarak GenBank'te bulunan dizilere benzerlikleri analiz edilmiş ve virüsle ilişkilendirilen contigler belirlenmiştir. Virüsle ilişkilendirilen dizilere ait en iyi BLAST eşleşmeleri Çizelge 4.3'te sunulmuştur. Çizelge Cp, RdRp, contig numaraları ve sekans uzunluklarını (nt), e-değeri ve yüzde benzerliği ile en iyi BLASTx eşleşmesini ve önerilen familya bilgisini göstermektedir.

Çizelge 4.3 Tr247 örnek numaralı *L. aphanocladii*'de tanımlanan virüs ilişkili contigler

Virüs Konağı	Cp, RdRp (kısaltma) (nt) Contig numarası (okuma sayısı)	BLASTx Eşleşmesi (Erişim numarası; e-değeri; yüzde benzerlik)	Önerilen Familya
<i>Lecanicillium aphanocladii</i>	Lecanicillium aphanocladii polmycovirus 1 RdRp (LaPMV1-RdRp) (2404) Contig 5 (1317)	Beauveria bassiana polmycovirus 4 (QRF54813.1; 0.0; 85.29%)	<i>Polmycoviridae</i>
	Lecanicillium aphanocladii polmycovirus 1 hypothetical protein (LaPMV1-HP) (2256) Contig 6 (1329)	Beauveria bassiana polmycovirus 4 (QRF54814.1; 0.0; 87.09%)	<i>Polmycoviridae</i>
	Lecanicillium aphanocladii polmycovirus 1 methyl transferase (LaPMV1-MT) (2017) Contig 3 (1518)	Beauveria bassiana polmycovirus 4 (QRF54815.1; 0.0; 80.71%)	<i>Polmycoviridae</i>
	Lecanicillium aphanocladii polmycovirus 1 proline-alanine-serine-rich protein (LaMV1-PAS) (1107) Contig 10 (810)	proline-alanine-serine-rich protein (UXC94315.1; 2e-171; 91.76%)	<i>Polmycoviridae</i>
	Lecanicillium aphanocladii polmycovirus 1 hypothetical protein (LaMV1-HP) (866) Contig 80 (330)	Beauveria bassiana polmycovirus 4 (QRF54817.1; 4e-73; 85.15%)	<i>Polmycoviridae</i>
	Lecanicillium aphanocladii narnavirus 1 RdRp (LaNV1-RdRp) (1894) Contig 28 (489)	Narnaviridae sp. (WAK75300.1; 0.0; 85.87%)	<i>Narnaviridae</i>

Çizelge 4.3 Tr247 örnek numaralı *L. aphanocladii*'de tanımlanan virüs ilişkili contigler
(devam)

<i>Lecanicillium aphanocladii</i>	Lecanicillium aphanocladii negative-stranded RNA virus 1 RdRp (LaNSRV1-RdRp) (6152) Contig 1 (2969)	Penicillium glabrum negative-stranded RNA virus 1 (YP_010798256.1; 0.0; 63.16%)	<i>Mymonaviridae</i>
<i>Lecanicillium aphanocladii</i>	Lecanicillium aphanocladii ourmia-like virus 1 RdRp (LaOLV1-RdRp) (2224) Contig 1 (2969)	Plasmopara viticola lesion associated ourmia-like virus 81 (YP_010800275.1; 6e-161; 56.99%)	<i>Botourmiaviridae</i>
<i>Lecanicillium aphanocladii</i>	Lecanicillium aphanocladii mononegaambi virus 1 hypothetical protein (LaMV1 HP) (2841) Contig 17 (643)	Plasmopara viticola lesion associated mononegaambi virus 9 (WKE35292.1; 1e-36; 44.03%)	<i>Mymonaviridae</i>
<i>Lecanicillium aphanocladii</i>	Lecanicillium aphanocladii mononegaambi virus 2 hypothetical protein (LaMV2 HP) (2819) Contig 7 (1142)	Plasmopara viticola lesion associated mononegaambi virus 2 (WKE35260.1; 4e-101; 64.17%)	<i>Mymonaviridae</i>
<i>Lecanicillium aphanocladii</i>	Lecanicillium aphanocladii mononegaambi virus 3 hypothetical protein (LaMV3 HP) (1924) Contig 13 (748)	Plasmopara viticola lesion associated mononegaambi virus 2 (WKE35260.1; 2e-69; 50.88%)	<i>Mymonaviridae</i>
<i>Lecanicillium aphanocladii</i>	Lecanicillium aphanocladii partitivirus 1 capsid protein (LaPV1 CP) (1740) Contig 67 (359)	Caloscypha fulgens partitivirus 8 (QOI17261.1; 8e-69; 40.91%)	Partitiviridae
<i>Lecanicillium aphanocladii</i>	Lecanicillium aphanocladii betapartitivirus 1 RdRp (LaPV1 RdRp) (1555) Contig 142 (259)	Betapartitivirus sp. (UDL14333.1; 4e-78; 79.22%)	Partitiviridae

Çizelge 4.3 Tr247 örnek numaralı *L. aphanocladii*'de tanımlanan virüs ilişkili contigler
(devam)

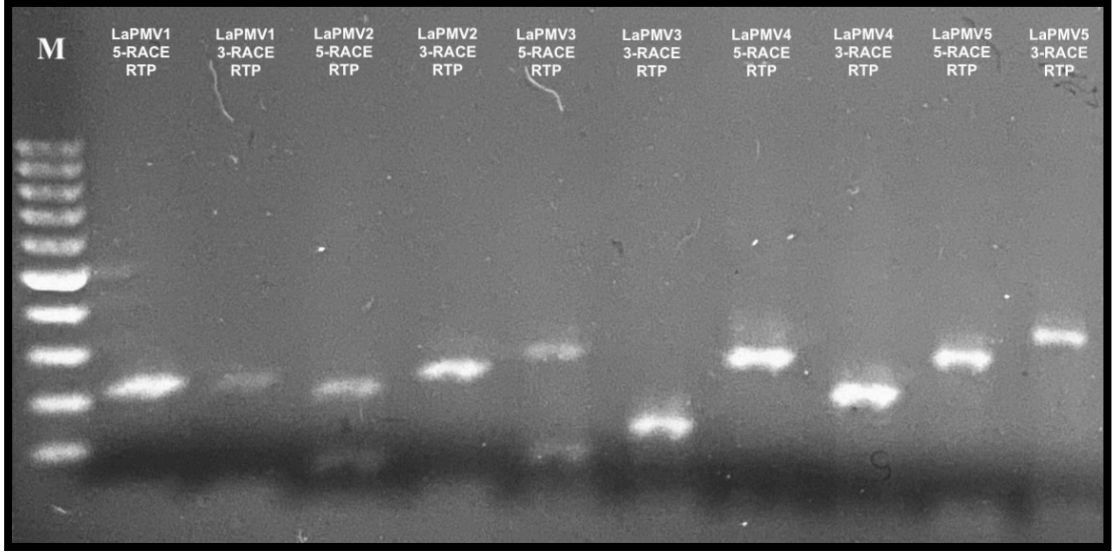
<i>Lecanicillium aphanocladii</i>	Lecanicillium aphanocladii mononegaambi virus 4 hypothetical protein (LaMV4 HP) (4529) Contig 4 (1429)	Plasmopara viticola lesion associated mononegaambi virus 2 (WKE35260.1; 1e-145; 58.01%)	<i>Mymonaviridae</i>
	Lecanicillium aphanocladii mononegaambi virus 5 hypothetical protein (LaMV5 HP) (2421) Contig 8 (1057)	Plasmopara viticola lesion associated mononegaambi virus 2 (WKE35260.1; 6e-141; 57.82%)	<i>Mymonaviridae</i>
	Lecanicillium aphanocladii narnavirus 1 RdRp (LaNV1 RdRp) (1989) Contig 15 (713)	Aspergillus tennesseensis narnavirus 1 (BDB16251.1; 0.0; 80.38%)	Narnaviridae
	Lecanicillium aphanocladii mononegaambi virus 6 hypothetical protein (LaMV6 HP) (1967) Contig 30 (567)	Plasmopara viticola lesion associated mononegaambi virus 9 (WKE35292.1; 4e-37; 44.03%)	<i>Mymonaviridae</i>
	Lecanicillium aphanocladii mononegaambi virus 7 RdRp (LaMV7 RdRp) (1553) Contig 170 (323)	Plasmopara viticola lesion associated mononegaambi virus 2 (QHD64771.1; 2e-20; 79.01%)	<i>Mymonaviridae</i>
	Lecanicillium aphanocladii nucleopolyhedrovirus 1 hypothetical protein (LaMV1 RdRp) (1542) Contig 55 (464)	Autographa californica nucleopolyhedrovirus (NP_054068.1; 2e-179; 100.00%)	Baculoviridae
	Lecanicillium aphanocladii mononegaambi virus 8 hypothetical protein (LaMV8 HP) (1519) Contig 497 (188)	Plasmopara viticola lesion associated mononegaambi virus 2 (WKE35260.1; 2e-04; 35.80%)	<i>Mymonaviridae</i>

4.8 Genomu Tüme Yakın Olan Virüs İlişkili Contiglere RACE Yöntemi Uygulanması

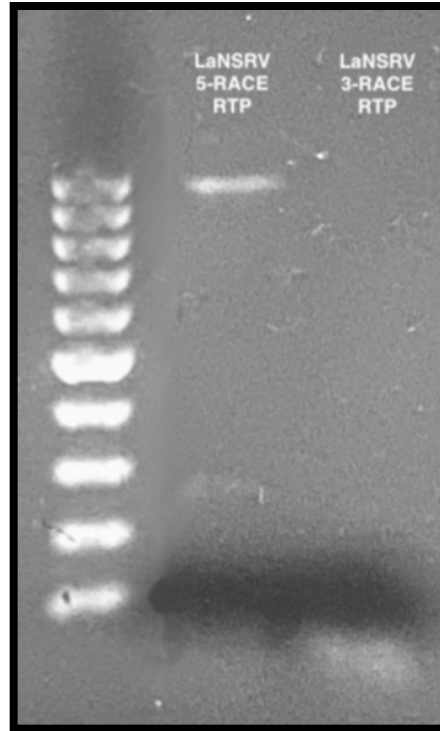
BLASTx ve haritalama analizlerinden sonra virüsle ilişkilendirilen dizilerin genomunun tamamını ortaya çıkarmak için RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) yöntemi kullanılmıştır. RACE PCR için primerler tasarlanırken, viral genomu tüme yakın olan dizilerin Polymycovirus ve Negative-Stranded RNA virus ile benzerlik gösterdiği contigler dikkate alınmış ve bu contiglere özgü primerler tasarlanmıştır. Primerler Primer3 çevrim içi aracı ile tasarlanmıştır. Contig numarası, primer adı ve primer dizileri Çizelge 4.4'te verilmiştir. Diziye özgü tasarlanan primerler ile RTP primeri eşlenerek Tm hesaplamaları yapılmıştır. PCR ısı döngü koşulları hesaplanan Tm'lere göre ayarlanarak, RTP ile sekans spesifik primerler eşlenerek RACE PCR yapılmıştır. Polymycovirus için RACE PCR ürünleri agaroz jel elektrofezi ile incelenmiş ve direkt sekansa gönderilmiştir (Şekil 4.17). Negative-Stranded RNA virus için yapılan RACE çalışmalarında belirgin bantlar gözlemlenmemiştir (Şekil 4.18).

Çizelge 4.4 Contiglere özgü tasarlanan primerlerin listesi

Virüs Adı	Contig Numarası	Primer Adı	Primer Dizisi
<i>Polymycovirus</i>	Contig 5	LaPMV1-3RACE	5'-CATCTCCAAAACGACCCAGC-3'
	Contig 5	LaPMV1-5RACE	5'-GACCACCTGACACGACTGAG-3'
	Contig 6	LaPMV2-3RACE	5'-ATGAGTATGACGAGCCGCC-3'
	Contig 6	LaPMV2-5RACE	5'-CCATTCCAGAGTTAACC GGC-3'
	Contig 3	LaPMV3-3RACE	5'-GTTGAGGGCACTGTT CAGAG-3'
	Contig 3	LaPMV3-5RACE	5'-ATCAGTGGTGGT GAGGACG-3'
	Contig 10	LaPMV4-3RACE	5'-AAAAGCAGTGTCCA AAGCCG-3'
	Contig 10	LaPMV4-5RACE	5'-CATT AATCGTGATGGGGCGC-3'
	Contig 80	LaPMV5-3RACE	5'-CTCTACTGTGGACCGTCTCG-3'
	Contig 80	LaPMV5-5RACE	5'-CCTCGCTTTCCTCATCAACG-3'
<i>Negative-Stranded RNA Virus</i>	Contig 1	LaNSRV-3RACE	5'-CCCACGATGTAGCTCTGTAGG-3'
	Contig 1	LaNSRV-5RACE	5'-ATCATCCGCCTTGTAGCATC-3'



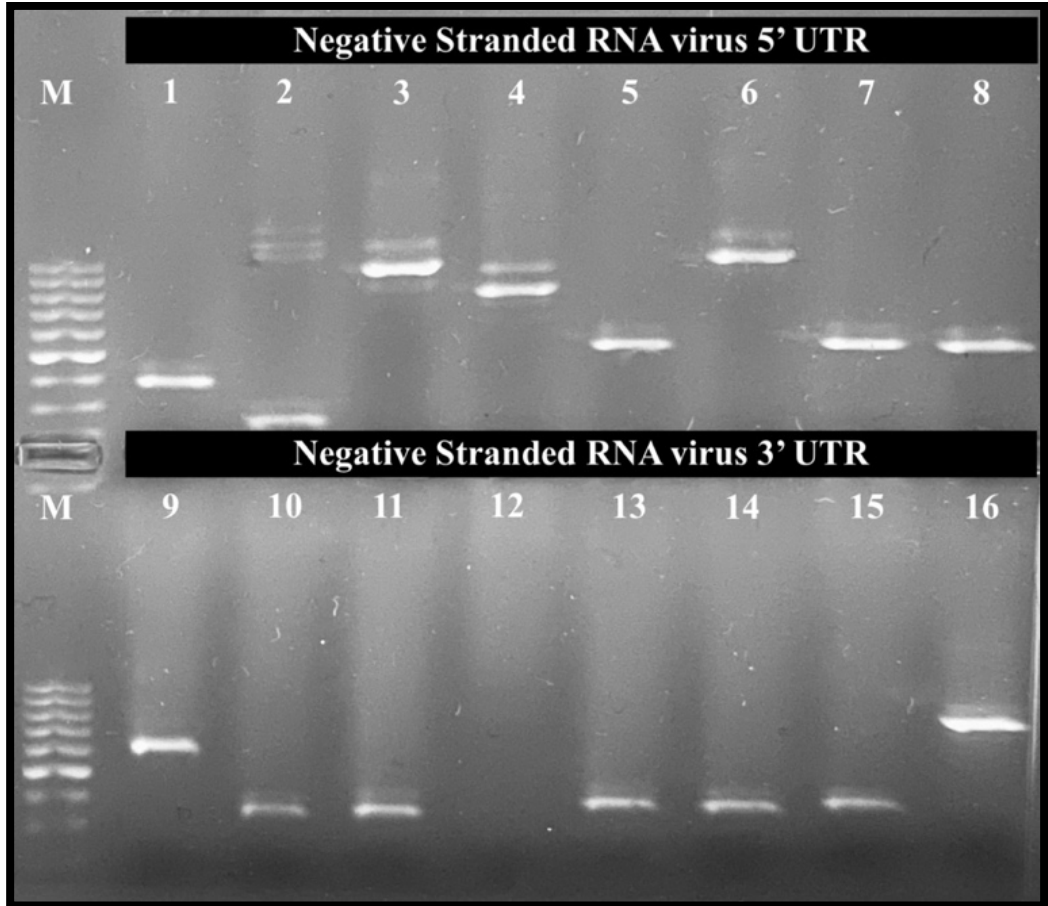
Şekil 4.17 Polimikovirüs için yapılan RACE PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (M:100 bp DNA belirteci)



Şekil 4.18 Negative-Stranded RNA virus için yapılan RACE PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (M:100 bp DNA belirteci)

4.9 TA Klonlama İle Terminal Bölgelerin Sekanslanması

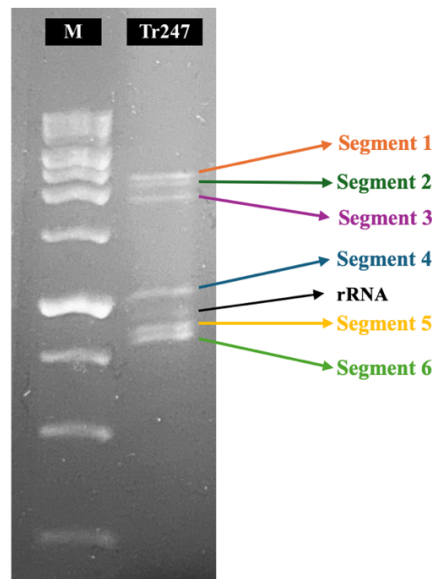
Negative-Stranded RNA virus için yapılan RACE çalışmalarında belirgin bantlaşmalar meydana gelmediği için Negative-Stranded RNA virus ile ilişkili dizinin 5' UTR ve 3' UTR bölgelerini sekanslayabilmek amacıyla TA klonlama yöntemi uygulanmıştır. TA klonlama yönteminde yapılan koloni PCR ürünleri jel elektroforezi ile incelenmiştir (Şekil 4.19). Yapılan koloni PCR elektroforezi sonucunda 1, 7, 9, 11 ve 16 numaralı örnekler sekanslamak için seçilmiştir. Örneklerin plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra diziler standart sanger dideoksi zincir sonlanma yöntemi ile belirlenmiştir.



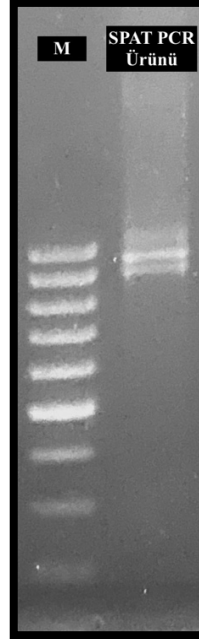
Şekil 4.19 Negative-Stranded RNA virus için yapılan koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (M:100 bp DNA belirteci)

4.10 TA Klonlama ile *Lecanicillium aphanocladii* polmycovirus 1'in Orijinal Genomik Segmentinin Sekanslanması

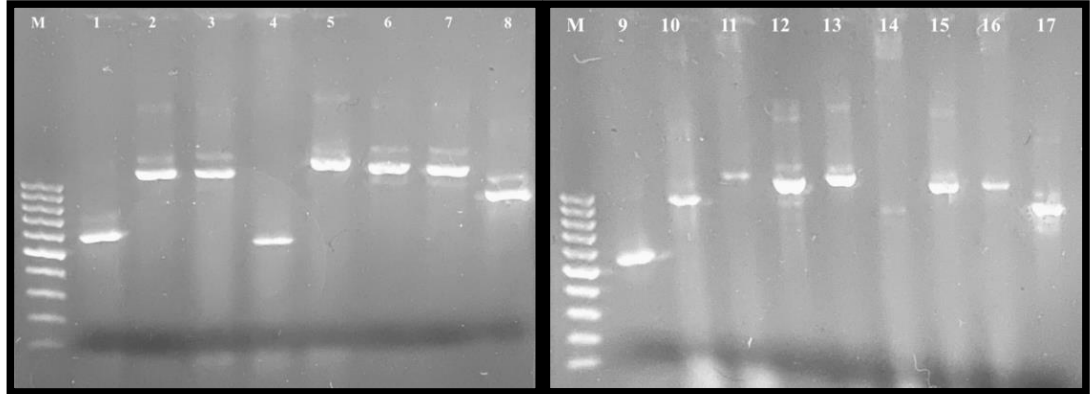
dsRNA taraması jel çalışmaları sonucu *Lecanicillium aphanocladii* polmycovirus (LaPmV) 1'in 6 genomik segmentinin olduğunu değerlendirmesi yapılmıştır. Fakat NGS analizleri ile segment eşi olarak değerlendirilen 5 dizi bulunabilmiştir. Bu dizilerin tüm genomu RACE yöntemi ile sekanslanmış ve aynı virüse ait 5 farklı genomik segmentin tüm dizisi ortaya çıkartılmıştır. Genomik segmenti tam olarak sekanslanmış diziler ile jel görüntüsü karşılaştırılmış ve şekil 4.20'de gösterilen Segment 5'in dizisinin ortaya çıkartılmadığı değerlendirilmesi yapılmıştır. Segment 5'in dizisini ortaya çıkartılması için tekli primer amplifikasyon tekniği (SPAT, Single Primer Amplification Technique) ve TA klonlama yöntemi uygulanmıştır. RACE için hazırlanan cDNA ile yalnızca RTP primeri kullanılarak PCR kurulmuştur. Bu PCR ürününün agaroz jel elektroforezi şekil 4.21'de verilmiştir. Çoklu bantlar gözlemlenen bu PCR ürününe TA klonlama yöntemi uygulanmıştır. TA klonlama yönteminde yapılan koloni PCR ürünleri jel elektroforezi ile incelenmiştir (Şekil 4.22). Yapılan koloni PCR elektroforezi sonucunda 1, 4 ve 9 numaralı örnekler hariç geri kalan 14 örnek sekanslamak için seçilmiştir. Örneklerin plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra diziler standart sanger dideoksi zincir sonlanma yöntemi ile belirlenmiştir.



Şekil 4.20 LaPmV1'in segmentlerinin gösterimi



Şekil 4.21 SPAT PCR ürününün agaroz jel elektroforezi (M:100 bp DNA belirteci)



Şekil 4.22 5. segment için yapılan koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (M:100 bp DNA belirteci)

4.11 *Lecanicillium aphanocladii* polymycovirus 1 (LaPMV1)

LaPMV1, uzunlukları 2,5 ila 0,9 kilobaz çifti (kbp) arasında değişen altı segmentli bir mikovirüstür. Her segment 3' ve 5' UTR'lerden ve bir ORF'den oluşmaktadır. LaMPV1'in her segmentinin özellikleri çizelge 4.5'te detaylı olarak sunulmuştur. Genom organizasyonunda her segment şematik olarak gösterilmiştir (Şekil 4.23). Sarı ile

vurgulanan kutular bilinen motifleri göstermektedir. dsRNA1'de Viral RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRP_1, InterPro'nun Classification of protein families çevirim içi aracı erişim numarası: PF00680), dsRNA3'te S-adenozilmetiyonine bağımlı metiltransferaz (AdoMet_MTases, NCBI'nin Conserved Protein Domain Family çevirim içi aracı erişim numarası: cd02440) motifleri gösterilmektedir. dsRNA1, virüs replikasyonundan sorumlu RdRp'yi kodlayan en büyük genomik segmenti oluşturmaktadır. dsRNA2, henüz işlevi tam olarak bilinmeyen, iskele proteini olarak işlev gördüğü düşünülen bir proteini kodlamaktadır. dsRNA3, viral çift iplikli RNA'ların pozitif anlamlı ipliklerinin 5' uçlarına başlık (cap) eklemekle görevli olan bir metil transferazı kodlamaktadır. dsRNA4, prolin- alanin-serince zengin protein (PASrp) kodlamaktadır. dsRNA5 ve dsRNA6 mevcut literatüre göre henüz işlevi belirlenememiş proteinleri kodlamaktadır.

UTR analizi, *Polymycoviridae* ailesine benzer olarak 5' ve 3' UTR'lerin korunmuş olduğunu göstermektedir (Şekil 4.24). Terminal uçlarda korunmuş bölgelerin varlığı, ortaya çıkartılan altı segmentin tek bir virüs genomuna ait olduğunu desteklemektedir. 5' UTR'nin ilk 26 nükleotidi alt alta hizalandığında %76,92, 3' UTR'nin son 21 nükleotidi alt alta hizalandığında %38,09 oranında korunduğu görülmüştür. Yıldız işaretleri aynı nükleotitleri, noktalar ise korunmuş pürin veya pirimidinleri göstermektedir.

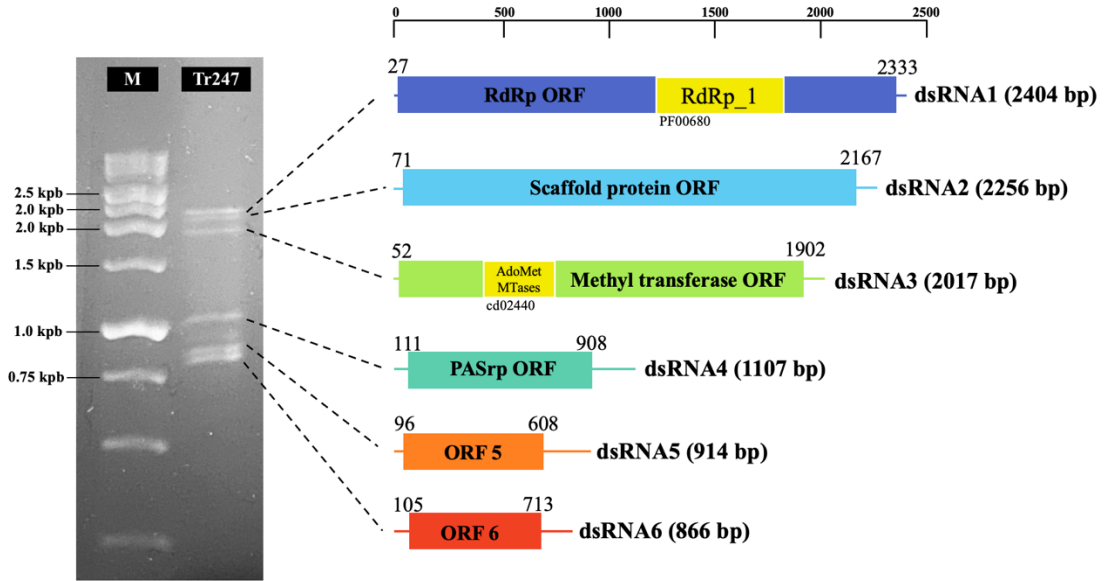
LaPMV1 ve ilişkili *Polymycoviridae* familyasının diğer üyelerinin RdRp'lerinin amino asit dizilerine dayalı filogenetik analizi. RdRp amino asit dizilerinin çoklu hizalaması ClustalW kullanılarak üretilmiş, LG+G+I+F yer değiştirme/substitüsyon modeli kullanılmış ve MEGA11 (Tamura vd. 2021) programı ile maksimum olasılık filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Dalların doğruluğunu değerlendirmek için 100 önyükleme yinelemesi (bootstrap replicate) yaklaşımı kullanılmıştır. 70'ten yüksek önyükleme yinelemesi oranları dallarda gösterilmiştir. Ağacı oluşturmak için kullanılan her dizinin GenBank erişim numaraları parantez içinde verilmiştir. Hadaka virus 1'in RdRp'si filogenetik ağaçta dış grup dizisi olarak kullanılmıştır. Ölçek çubuğu (sol alt) 0,50'lik bir genetik mesafeyi temsil etmektedir. LaPMV1 ve ilişkili *Polymycoviridae* familyasının diğer üyelerinin RdRp'lerinin amino asit dizilerine dayalı maksimum olasılık filogenetik ağacı şekil 4.25'te verilmiştir.

LaPMV1 ve benzerlik gösterdiği virüslerin RdRp katalitik palmiye alt domaininin alt alta hizalanması şekil 4.26'da verilmiştir. Motif C'de görülen GDNQ motifi tipik olarak

Mononegavirales takımına ait negatif anlamlı tek iplikçikli RNA virüslerinde bulunan ve *Polymycoviridae* familyasının tüm üyelerinde korunmuş bir motiftir. *Polymycoviridae* familyasında; çift iplikçikli RNA ve pozitif anlamlı tek iplikçikli RNA virüslerinde bulunan GDD motifi yerine GDNQ motifi bulunmaktadır.

Çizelge 4.5 LaPMV1'in özellikleri

Segment	Uzunluğu (bp)	ORF uzunluğu			UTR uzunluğu (bp)		Varsayılan fonksiyonu
		nt	aa	kDa	5' UTR	3' UTR	
dsRNA1	2404	2307	768	83.92	26	71	RdRp
dsRNA2	2256	2097	698	75.05	70	89	İskele proteini
dsRNA3	2017	1851	616	66.24	51	115	Metil transferaz
dsRNA4	1107	798	265	28.54	110	199	Prolin-alanin-serince zengin protein
dsRNA5	914	513	170	19.18	95	306	Bilinmeyen
dsRNA6	866	609	202	22.10	104	153	Bilinmeyen



Şekil 4.23 LaPMV1'in dsRNA genomunun şematik gösterimi

	MOTIF A	MOTIF B	MOTIF C
Lecanicillium aphanocladii polmycovirus 1	MSDIEKWDASLIEAL [52]	ETMPGSGSYTSLINTNANLL [31]	LLSYGDNQLFSSVLFVFLGLKYE
Beauveria bassiana polmycovirus 4	MSDIEKWDASLIEAL [52]	ETMPGSGSYTSLINTNANLL [31]	LLSYGDNQLFSTVIFRVLGLAYD
Beauveria bassiana polmycovirus 2	MSDILKWDASVVEAL [52]	ETMPGSGSYTSLINTNANLL [31]	LLSYGDNQLFSTVLFKALGLVVD
Beauveria bassiana polmycovirus 3	MSDIQKWDASVVEAL [52]	ETMPGSGSYTSLINTNANLL [31]	LLSYGDNQLFSSALFKVVGRLYD
Setosphaeria turcica polmycovirus 1	MSDIDKWDANMREVI [52]	ETMPGSGSYRTSLDNTNANML [31]	LVSYGDNQLFSAVIFKQFGLRYD
Magnaporthe oryzae polmycovirus 1	MSDIDKWDGNVREAI [52]	GSMPSGSGSYTSLINTNANLL [31]	LASYGDNQLFSEHLFKILGMRVD
Metarhizium brunneum polmycovirus 1	MSDIAKWDANMREVI [52]	GCMPSGSGSYTSLINTEANDLL [31]	LVSYGDNQLFSAKLFKFFGLKYD
Erysiphe necator associated polmycovirus 6	MSDIEKWDANMKEVI [52]	GAMPGSGSYTSLINTNANLL [31]	LVSYGDNQLFSAKIFSRFGLAYD
Plasmopara viticola lesion associated polmycovirus 1	MSDIDKWDASMREVI [52]	ETMAGSGSYHTSVTNTNANLL [31]	LASYGDNQLFSEKLLKHFGRLYD
	**** **..: **	* * **** * **::*	* *****: ** :: .*: **

Şekil 4.26 LaPMV1'in RdRp katalitik palmiye alt domain dizilerinin benzer virüsler ile hizalanması

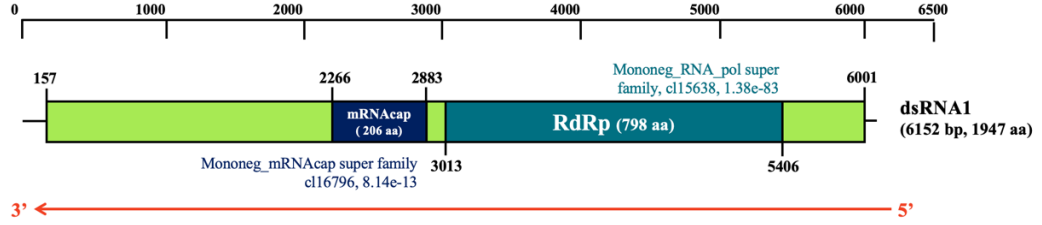
4.12 Lecanicillium aphanocladii negative-stranded RNA virus 1 (LaNSRV1)

LaNSRV1, uzunluğu 6152 bp olan tek segmentli bir mikovirüsdür. 3' UTR'si 156 bp, 5' UTR'si 149 bp uzunluğundadır. Şematik genom organizasyonu şekil 4.27'de verilmiştir. dsRNA1'de mRNA cap (NCBI'nin Conserved Protein Domain Family çevirim içi aracı erişim numarası: c116796) ve RdRp (NCBI'nin Conserved Protein Domain Family çevirim içi aracı erişim numarası: c115638) motifleri gösterilmektedir.

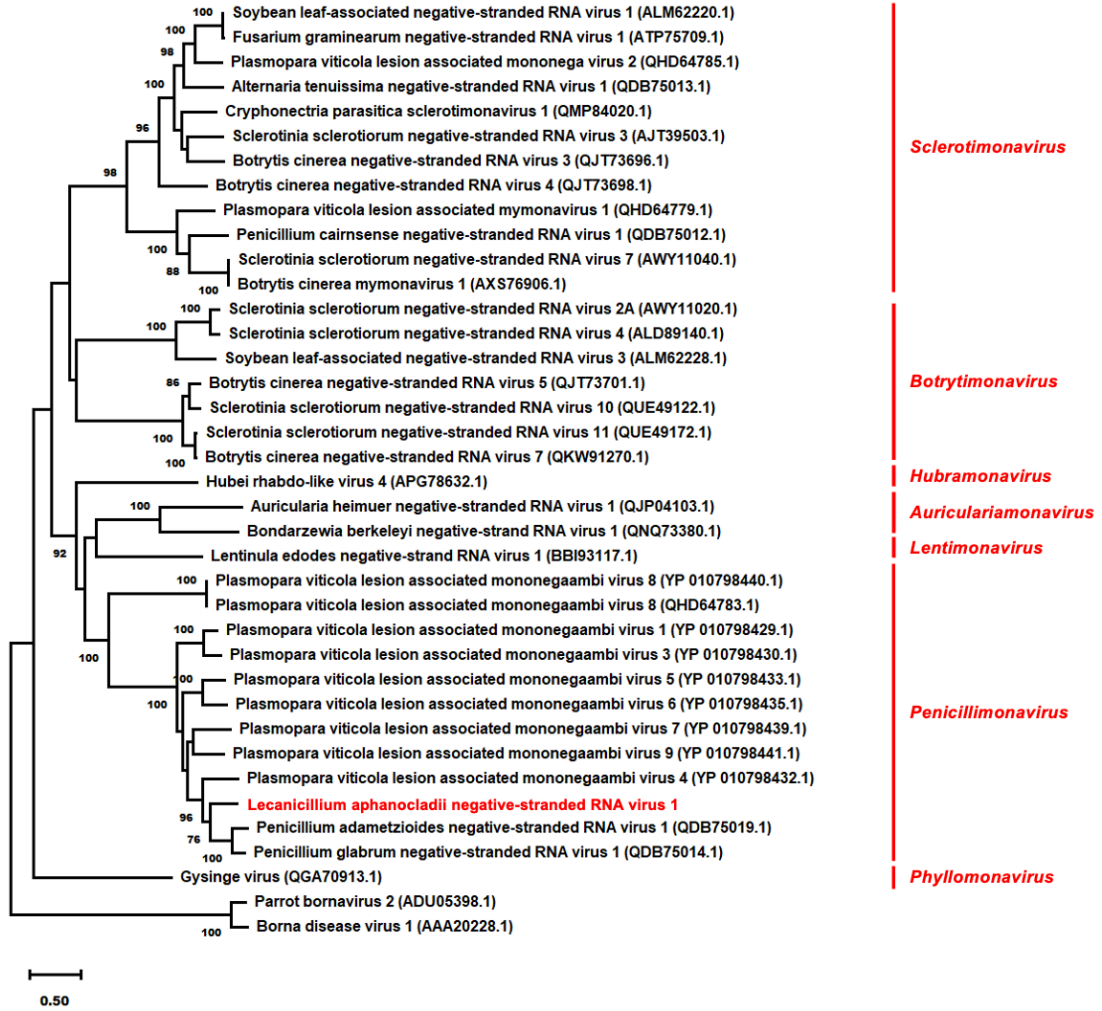
LaNSRV1 ve ilişkili *Mymonaviridae* familyasının diğer üyelerinin RdRp'lerinin amino asit dizilerine dayalı filogenetik analizi. RdRp amino asit dizilerinin çoklu hizalanması ClustalW kullanılarak üretilmiş, cpREV+F yer değiştirme/substitüsyon modeli kullanılmış ve MEGA11 (Tamura vd. 2021) programı ile maksimum olasılık filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Dalların doğruluğunu değerlendirmek için 100 önyükleme yinelemesi (bootstrap replicate) yaklaşımı kullanılmıştır. 70'ten yüksek önyükleme yinelemesi oranları dallarda gösterilmiştir. Ağacı oluşturmak için kullanılan her dizinin GenBank erişim numaraları parantez içinde verilmiştir. Parrot bornavirus 2 ve Borna disease virus 1'in RdRp'leri filogenetik ağaçta dış grup dizileri olarak kullanılmıştır. Ölçek çubuğu (sol alt) 0,50'lik bir genetik mesafeyi temsil etmektedir. LaNSRV1 ve ilişkili *Mymonaviridae* familyasının diğer üyelerinin RdRp'lerinin amino asit dizilerine dayalı maksimum olasılık filogenetik ağacı şekil 4.28'de verilmiştir.

LaNSRV1 ve benzerlik gösterdiği virüslerin RdRp katalitik palmiye alt domaininin alt alta hizalanması şekil 4.29'da verilmiştir. Yıldız işaretleri aynı nükleotitleri, noktalar ise korunmuş pürin veya pirimidinleri göstermektedir. Çift iplikli RNA ve pozitif anlamlı tek iplikli RNA virüslerinde bulunan GDD motifi LaNSRV1'de kısmen GDNQ motifi olarak

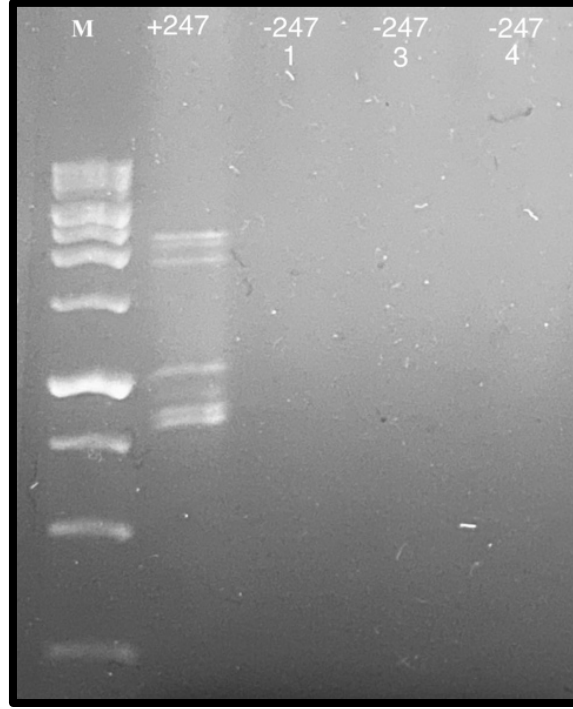
değişim göstermiştir. Motif C'de iki virüs hariç GDNQ motifinin korunduğu gözlemlenmektedir.



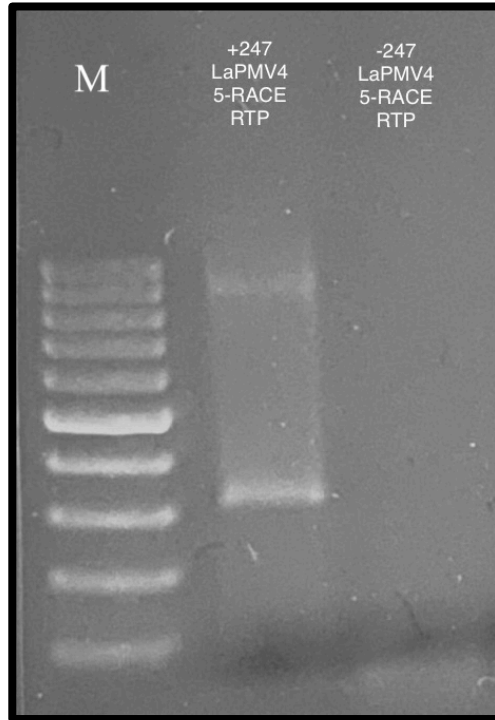
Şekil 4.27 LaNSRV1'in dsRNA genomunun şematik gösterimi



Şekil 4.28 LaNSRV1 ve ilişkili *Mymonaviridae* familyasının diğer üyelerinin RdRp'lerinin amino asit dizilerine dayalı maksimum olasılık filogenetik ağacı



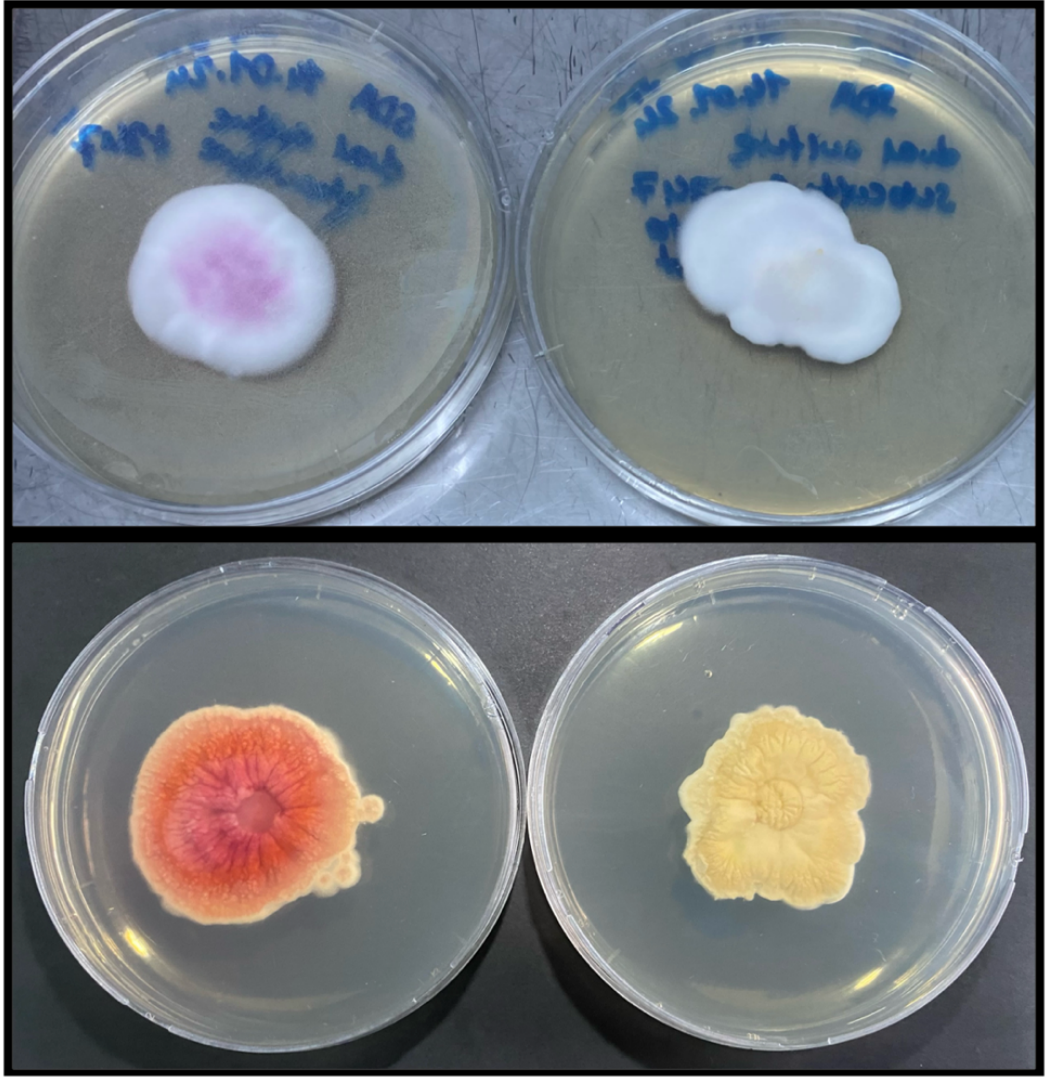
Şekil 4.30 Virüs içeren ve virüs içermeyen *L. aphanocladii* izolatının viral dsRNA jel elektroforezi (M: 1 kb DNA belirteci)



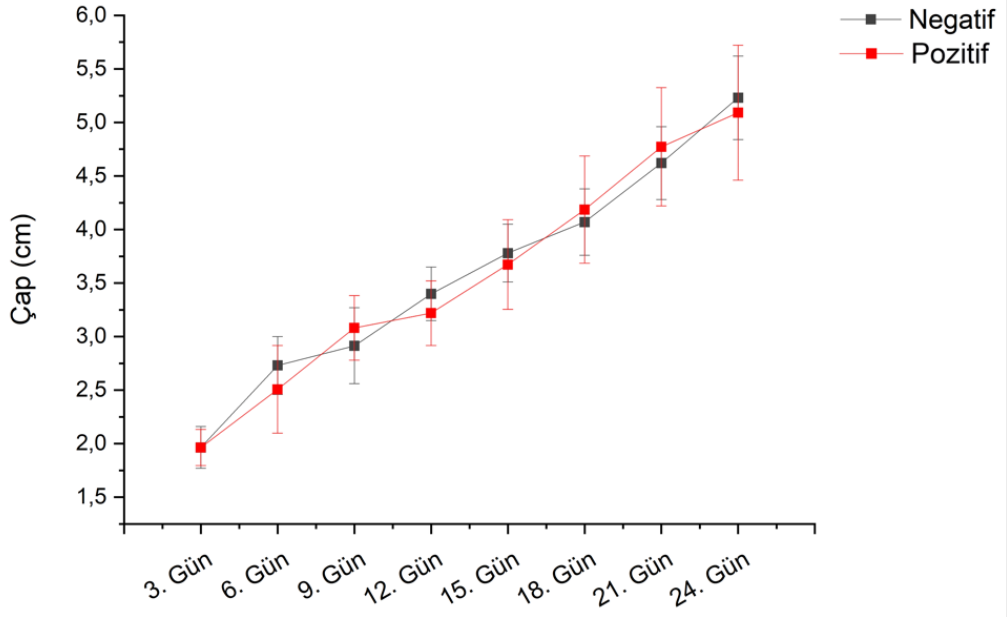
Şekil 4.31 LaPMV1 için yapılan RT-PCR ürününün agaroz jel elektroforezi (M:100 bp DNA belirteci)

4.14 Virüs İçeren Tr247 Numaralı Örneğin Virüs İçermeyen Örnekler İle Morfolojik Karşılaştırılması

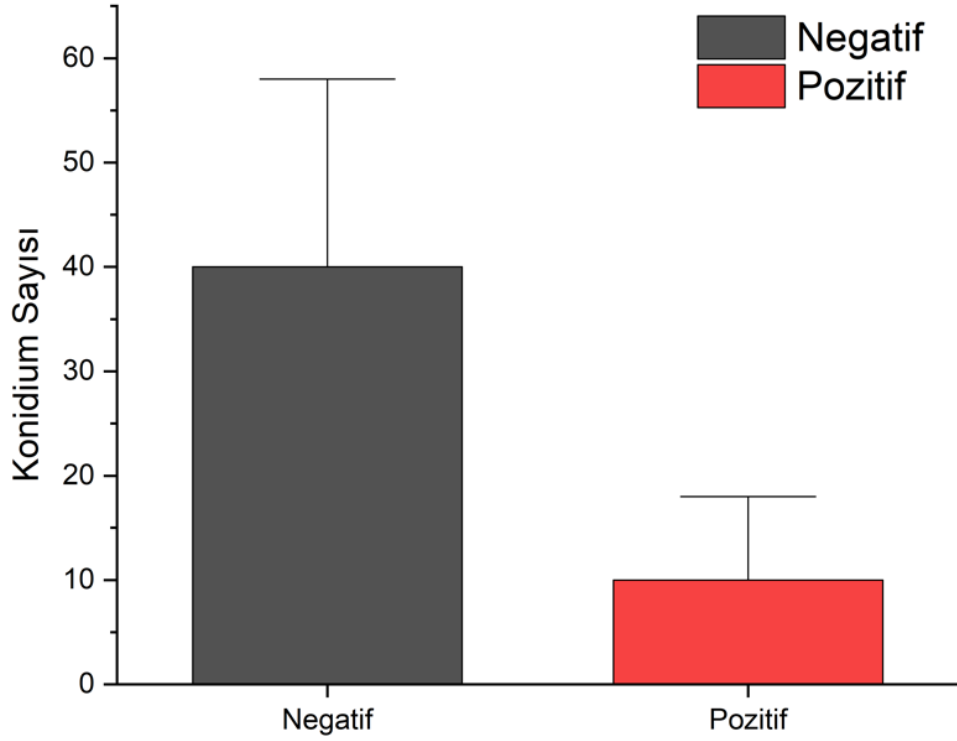
Virüs ile enfekte Tr247 (+Tr247) numaralı izolatının SDA besiyerinde tipik olarak gözlenen kırmızı/magenta pigment üretimi, virüsten arındırılmış izogenik *L. aphanocladii* (-Tr247) izolatında kaybolduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.32). +Tr247 (pozitif) ve -Tr247 (negatif) numaralı örneklerin SDA besiyerindeki kültürlerin çap ölçümleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.33). Konidium sayma işlemi 2 tekrar ile yapılarak ortalama alınmış ve grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.34).



Şekil 4.32 +Tr247 ve -Tr247 kültürlerinin ön ve arka yüzeyleri



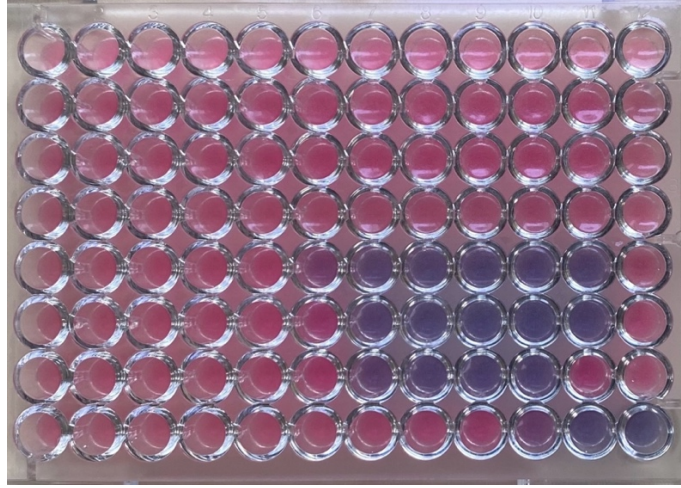
Şekil 4.33 +Tr247 ve -Tr247 örneklerinin kültür çap ölçümlerinin karşılaştırılması



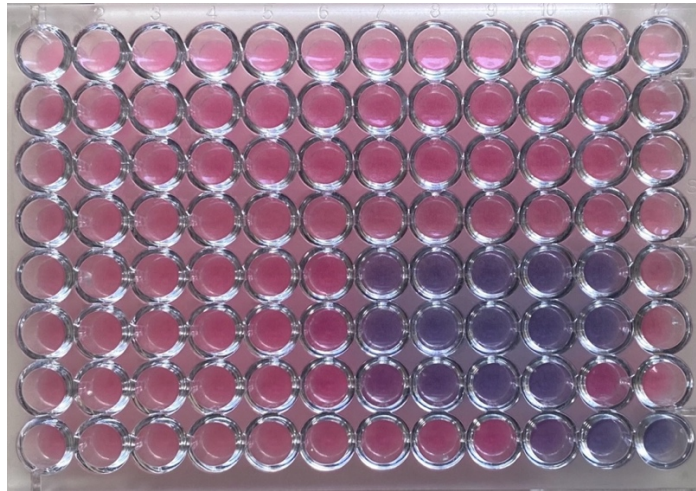
Şekil 4.34 +Tr247 ve -Tr247 örneklerinin konidium sayılarının karşılaştırılması

4.15 Antifungal Duyarlılık Testi Sonuçları

Dermatofit izolatların antifungal ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemek için misel büyümesinin pH değişim takibi temeline dayanan Sensititre YeastOne YO10 AST Plate (Thermo Fisher Scientific) antifungal duyarlılık testi yapılmıştır. Bu test hem virüs ile enfekte Tr247 (+Tr247), hem de virüsten arındırılmış izogenik Tr247 (-Tr247) örneğine uygulanmıştır. Sensititre YeastOne duyarlılık plakaları şekil 4.35 ve şekil 4.36'da verilmiştir. Bu sayede kantitatif bir şekilde minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) sonuçları değerlendirilmiştir (Çizelge 4.6).



Şekil 4.35 Virüs ile enfekte *L. aphanocladii* örneğinin (+Tr247) antifungal duyarlılık testi plakası



Şekil 4.36 Virüsten arındırılmış *L. aphanocladii* örneğinin (-Tr247) antifungal duyarlılık testi plakası

Çizelge 4.6 Antifungal duyarlılık testi sonucunda MIC sonuçları

Antimikrobikler	MIC Sınır Değerleri (µg/mL)	
	+Tr247	-Tr247
Anidulafungin (AND)	8>	8>
Amphotericin B (AB)	4>	4>
Mikafungin (MF)	8>	8>
Kaspofungin (CAS)	8>	8>
Flusitozin (FC)	64>	64>
Posakonazol (PZ)	0,25	0,5
Vorikonazol (VOR)	0,25	0,5
İtrakonazol (IZ)	0,5	1
Flukonazol (FZ)	32	32

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mantar patojenleri ve enfeksiyonları, hızla artan antifungal direnç, sınırlı teşhis ve tedavi imkanlarıyla birleşerek ciddi bir küresel sağlık tehdidi oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2022 yılında öncelikli fungal patojenler için geniş kapsamlı bir rapor yayınlamıştır (Anonymous. 2022). Bu rapor, mantar enfeksiyonları ve antifungal dirence karşı küresel mücadeleyi güçlendirmek amacıyla daha fazla araştırma yapılmasına öncelik verilmesi gerektiğine dikkat çekmiştir.

Mantarlarda henüz keşfedilmemiş birçok virüsün var olduğu düşünülmektedir. Fungal viroloji, virüslerin çeşitliliğini ve evrimini daha iyi anlamamıza yardımcı olmuş ve hızla genişleyen mikovirüs araştırmalarına önemli katkılar yapmıştır (Kondo vd. 2022). Günümüzdeki antifungallerin yetersizliği, dermatofit enfeksiyonlarına karşı mikovirüslerin biyokontrol ajanı olarak kullanılmasını sağlayabilir (Kinsella vd. 2022). Bu çalışmada 40 dermatofit örneği morfolojik ve moleküler seviyelerde çalışılmıştır. 39 dermatofit, dünya genelinde insanları enfekte eden en yaygın dermatofit türü, tinea pedis (ayak enfeksiyonu) ve tinea unguium (tırnak enfeksiyonu) vakalarının çoğundan sorumlu olan *Trichophyton rubrum* olarak teşhis edilmiştir. Diğer bir örnek de, farklı mantar konaklarını ve böcekleri enfekte etmesiyle bilinen *Lecanicillium aphanocladii* olarak tür teşhisi yapılmıştır.

Bu çalışmada 40 dermatofit örneğinin viral dsRNA taraması yapılmıştır. Tr247 numaralı *Lecanicillium aphanocladii* pozitif olarak değerlendirilmiş, cDNA'ya çevrilmiş ve rastgele PCR çalışmaları sonucunda yeni nesil dizileme ile incelenmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda virüs ile ilişkili diziler belirlenerek iki virüsün tüm genom dizisi ortaya çıkartılmıştır. Mevcut literatüre göre bu çalışma ile *L. aphanocladii*'yi enfekte eden ilk mikovirüs çalışmasını gerçekleştirilmiş ve bilim dünyası için iki yeni mikovirüs türünün tüm genomunu ortaya çıkartılmıştır.

L. aphanocladii'yi enfekte eden polimikovirüsün tüm genom dizisi ortaya çıkartılmıştır. *Lecanicillium aphanocladii* polymycovirus 1 (LaPMV1), altı segmentli ve segmentleri 2,5 ila 0,9 kilobaz çifti (kbp) arasında değişen bir mikovirüstür. Her segmentin 3' ve 5' UTR'leri ve bir ORF'si vardır. dsRNA1, virüs replikasyonundan sorumlu RdRp'yi, dsRNA2 iskele proteini, dsRNA3 metil transferaz, dsRNA4 prolin-alanin-serince zengin protein (PASrp) kodlamaktadır. dsRNA5 ve dsRNA6'nın kodladığı proteinlerin işlevi henüz belirlenmemiştir. dsRNA5 segmenti hiçbir polimikovirüs segmenti ile benzerlik

göstermemektedir. Bu nedenle bu segmentin tamamen orjinal olduğu kanısına varmaktayız. Orjinal segmentin sekanslanması viral çeşitliliğe katkı sağlamaktadır. LaPMV1'in RdRp domaininde, çift iplikçikli RNA ve pozitif anlamlı tek iplikçikli RNA virüslerinde bulunan GDD motifi yerine GDNQ motifi bulunmaktadır.

L. aphanocladii'yi enfekte eden diğer bir virüs *Myomonaviridae* familyasında bulunmaktadır. *Lecanicillium aphanocladii* negative-stranded RNA virus 1 (LaNSRV1), uzunluğu 6152 baz çifti (bp) uzunluğunda olan negatif anlamlı tek segmentli bir mikovirüstür. 3' UTR'si 156 bp, 5' UTR'si 149 bp uzunluğundadır. dsRNA1'de mRNA cap ve RdRp motifleri bulunmaktadır. LaPMV1'de olduğu gibi bu virüsün de RdRp domaininde GDNQ motifi bulunmaktadır.

Yeni nesil dizileme ile analiz edilen Tr247 numaralı örnekte bulunan 16 virüs arasında yalnızca LaPMV1'in genom segmentleri agaroz jelde tespit edilebilmiştir, bu da LaPMV1'in diğer virüslere kıyasla baskın olduğunu göstermektedir. LaPMV1'in etkilerini azaltmak ve fenotipik değişiklikleri gözlemlemek amacıyla dermatofit izolatına hifal uç kesme, termoterapi, fungusit ve antibiyotik tedavisi gibi çeşitli yöntemler uygulanmıştır. Termoterapi, virüsle enfekte Tr247 izolatının büyümesinde gecikmeye yol açmıştır. Viral dsRNA analizi ve LaPMV1'e özgü RT-PCR testleri sonucunda, mantarın LaPMV1'den tamamen arındığı belirlenmiştir.

Virüs ile enfekte Tr247 izolatının SDA besiyerinde ürettiği kırmızı/magenta pigment, virüsten arındırılmış izolatta kaybolmuştur. Virüs içeren ve içermeyen mantar örneklerinin 24 gün boyunca kültür çap ölçümleri yapılmış ve bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak konidium sayıları karşılaştırıldığında, virüs ile enfekte Tr247 izolatının konidium sayısının virüs içermeyen örneğe kıyasla daha az olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan deneyler sonucu, LaPMV1'in mantarı enfekte ederek konidium oluşumunu engellediği gözlemlenmiştir.

Virüs içeren ve içermeyen Tr247 izolatları antifungal duyarlılık testlerine tabi tutulmuştur. Dokuz antifungal içerisinde üç tanesinde belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir; minimum inhibitör konsantrasyon değerleri sonucunda virüs içermeyen Tr247 izolatının üç antifungale (itrakonazol, vorikonazol ve posakonazol) karşı daha dirençli olduğu gözlemlenmiştir.

Mart 2019'da İzmir'de bir yurttan kalan 21 yaşındaki erkek lisans öğrencisi, ayak parmakları arasında kaşıntılı ve ağrılı deri döküntüsü şikayetleriyle İzmir Atatürk Eğitim

ve Araştırma Hastanesi'nde bir dermatoloji uzmanından konsültasyon talep etmiştir. Hastaya, dermatofitoz şüphesiyle topikal antifungal naftifin hidroklorür ve antihistaminik bilastin reçete edilmiştir. Aynı kliniğe geçmişte akne ve sırt lezyonları nedeniyle başvurmuş olduğu belirtilmiştir ve Aralık 2018'de topikal izotretinoin, şubat 2019'da ise intradermal triamsinolon asetonid tedavileri uygulanmıştır. İlk tedavi sonrasında hastada geçici bir rahatlama gözlemlenmiştir. Ancak hastalığın nüksetmesi üzerine, Aralık 2019'da, günlük 100 mg dozunda bir aylık oral itrakonazol kürü reçete edilmiş ve tamamlayıcı olarak naftifin hidroklorür, fusidik asit ve betametazon gibi topikal ajanlar önerilmiştir. Enfektif ajanın teşhisi ve antifungal duyarlılık testi için, etkilenen bölgeden alınan keratinize stratum corneum örneği mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Yaş, cinsiyet, iklim, kentsel ortam, sosyoekonomik durum ve kültürel uygulamalar gibi çeşitli faktörler dermatofitoz oluşumunu etkileyebilir. Başarılı tedavinin ardından hasta arıcılık yaptığını ve yurttan kaldığı süre boyunca yurttan çıplak ayakla yürüdüğünü açıklamıştır. Bununla birlikte, *L. aphanocladii*'nin çeşitli habitatlarda ve konakçılarda bulunması nedeniyle, insanlara kesin bulaşma yolu belirsizliğini korumaktadır. Mevcut literatürde, dermatofitoz da dahil olmak üzere *L. aphanocladii*'ye atfedilen insan enfeksiyonları daha önce belgelenmemiştir. Dolayısıyla, bu tez çalışması *L. aphanocladii*'nin neden olduğu ilk dermatofitoz raporudur. Klinisyenler, özellikle de dermatoloji ve mikoloji alanında uzmanlaşmış olanlar, bu nadir mantarın farkında olmalıdır.

KAYNAKLAR

- Achterman, R. R., Smith, A. R., Oliver, B. G., & White, T. C. (2011). Sequenced dermatophyte strains: growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. *Fungal genetics and biology*, 48(3), 335-341.
- Akata, I., Edis, G., Keskin, E., & Sahin, E. 2023a. Diverse partitiviruses hosted by the ectomycorrhizal agaric *Hebeloma mesophaeum* and the natural transmission of a partitivirus between phylogenetically distant, sympatric fungi. *Virology*, 581, 63-70.
- Akata, I., Kumru, E., Edis G., Ozbey, B. G., & Sahin, E. 2023b. Three New Records For Turkish Agaricales Inhabiting Ankara University Beşevler 10th Year Campus Area. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 23(3), 250-263.
- Akata, I., Kumru, E., Sahin, E., Acar, İ., & Kaya, E. 2024. *Amanita vidua*: A new record for Turkish *Amanita* Section Phalloideae based on morphological and molecular data. *Trakya University Journal of Natural Sciences*.
- Ameen, M. 2010. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clinics in dermatology*, 28(2), 197-201.
- Anonymous. 2022 WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Anonymous. 2023. Web Sitesi: <https://ictv.global>, Erişim Tarihi: 17.04.2023
- Applen Clancey, S., Ruchti, F., LeibundGut-Landmann, S., Heitman, J., & Ianiri, G. 2020. A novel mycovirus evokes transcriptional rewiring in the fungus *Malassezia* and stimulates beta interferon production in macrophages. *MBio*, 11(5), 10-1128.
- Baert, F., Stubbe, D., D'hooge, E., Packeu, A., & Hendrickx, M. 2020. Updating the taxonomy of dermatophytes of the BCCM/IHEM collection according to the new standard: a phylogenetic approach. *Mycopathologia*, 185(1), 161-168.
- Berendsen, R. L., Baars, J. J., Kalkhove, S. I., Lugones, L. G., Wösten, H. A., & Bakker, P. A. 2010. *Lecanicillium fungicola*: causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. *Molecular plant pathology*, 11(5), 585-595.
- Bhatti, M. F., Bignell, E. M., & Coutts, R. H. 2011. Complete nucleotide sequences of two dsRNAs associated with a new partitivirus infecting *Aspergillus fumigatus*. *Archives of virology*, 156, 1677-1680.
- Bhatti, M. F., Jamal, A., Bignell, E. M., Petrou, M. A., & Coutts, R. H. 2012. Incidence of dsRNA mycoviruses in a collection of *Aspergillus fumigatus* isolates. *Mycopathologia*, 174, 323-326.
- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. 2017. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of fungi*, 3(4), 57.
- Bonito, G. M., Gryganskyi, A. P., Trappe, J. M., Vilgalys, R. 2010. “A global meta-analysis of Tuber ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal”, *Molecular Ecology*, 19, 4994-5008.

- Borman, A. M., Campbell, C. K., Fraser, M., & Johnson, E. M. 2007. Analysis of the dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of worldwide dermatophyte trends over the last three decades. *Medical mycology*, 45(2), 131-141.
- Bouchara, J. P., Nenoff, P., Gupta, A. K., & Chaturvedi, V. (Eds.). 2021. *Dermatophytes and dermatophytoses*. Springer International Publishing.
- Chiapello, M., Rodríguez-Romero, J., Ayllón, M. A., & Turina, M. 2020. Analysis of the virome associated to grapevine downy mildew lesions reveals new mycovirus lineages. *Virus evolution*, 6(2), veaa058
- Chiba, S., Suzuki, N., Velasco, L., Ayllón, M. A., Lee-Marzano, S. Y., Sun, L., ... & Turina, M. 2024. ICTV Virus Taxonomy Profile: Fusariviridae 2024. *Journal of General Virology*, 105(4), 001973.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(7), 2172-2175.
- Darissa, O., Willingmann, P., Adam, G. 2010. "Optimized approaches for the sequence determination of double-stranded RNA templates", *Journal of Virological Methods*, 169, 397-403.
- de Hoog, G. S., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., ... & Gräser, Y. 2017. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, 182, 5-31.
- Deshmukh, S. K., & Rai, M. K. 2005. *Biodiversity of fungi*. Science Publishers, Inc.: Enfield, UK.
- Donka, A., Sermann, H., & Büttner, C. 2008. Effect of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* on the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* as a non-target organism. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 73(3), 395-403.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
- El-Debaiky, S. A. 2017. New record of *Lecanicillium aphanocladii* family: Cordycipitaceae from Egypt. *J. Bacteriol. Mycol. Open Access*, 5(7), 00161.
- Filippou, C., Diss, R. M., Daudu, J. O., Coutts, R. H., & Kotta-Loizou, I. 2021. The polycovirus-mediated growth enhancement of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* is dependent on carbon and nitrogen metabolism. *Frontiers in microbiology*, 12, 606366.
- Filippou, C., Garrido-Jurado, I., Meyling, N. V., Quesada-Moraga, E., Coutts, R. H., & Kotta-Loizou, I. 2018. Mycoviral population dynamics in Spanish isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Viruses*, 10(12), 665.
- García-Pedrajas, M. D., Cañizares, M. C., Sarmiento-Villamil, J. L., Jacquat, A. G., & Dambolena, J. S. 2019. Mycoviruses in biological control: From basic research to field implementation. *Phytopathology*, 109(11), 1828-1839.

- Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., & Suzuki, N. 2015. 50-plus years of fungal viruses. *Virology*, 479, 356-368.
- Gharsallah, H., Ksentini, I., Naayma, S., Hadj Taieb, K., Abdelhedi, N., Schuster, C., ... & Leclerque, A. 2020. Identification of fungi in Tunisian olive orchards: characterization and biological control potential. *BMC microbiology*, 20, 1-13.
- Guo, M., Shen, G., Wang, J., Liu, M., Bian, Y., & Xu, Z. 2021. Mycoviral diversity and characteristics of a negative-stranded RNA virus LeNSRV1 in the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Virology*, 555, 89-101.
- Günyar, O. A., Kırac, S., Aldı, B., & Ergin, Ç. 2020. Isolation and identification of keratinophilic fungi in soil samples from excavation area of ancient city of Stratonikeia, Turkey and determination of its enzyme potentials py. *Journal of Environmental Biology*.
- Hamm, P. S., Mueller, R. C., Kuske, C. R., & Porras-Alfaro, A. 2020. Keratinophilic fungi: Specialized fungal communities in a desert ecosystem identified using cultured-based and Illumina sequencing approaches. *Microbiological Research*, 239, 126530.
- Hao, F., Wu, M., & Li, G. 2018. Molecular characterization and geographic distribution of a mymonavirus in the population of *Botrytis cinerea*. *Viruses*, 10(8), 432.
- Havlickova, B., Czaika, V. A., & Friedrich, M. 2008. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 51, 2-15.
- Hawksworth, D. L., Lücking, R. 2017. "Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species", *Microbiology spectrum*, 5, 5-4.
- Hay, R. J. 2000. Dermatophytoses and other superficial mycoses. In *Atlas of Infectious Diseases: Fungal Infections* (pp. 191-203). London: Current Medicine Group.
- He, L., Wang, P., Yang, G., Chen, X., & Huang, B. 2023. A novel polymycovirus infecting the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*. *Archives of Virology*, 168(1), 6.
- Heiniger, U., & Rigling, D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual review of phytopathology*, 32(1), 581-599.
- Higo, M., Kojima, H., Iwatsuki, M., Tanabe, T., Yaguchi, T., Okuda, T., ... & Nonaka, K. 2021. *Lecanicillium aphanocladii* isolated from Tengu-no-Mugimeshi found in Mount Kurohime, Nagano Prefecture, central Japan. *日本微生物資源学会誌= Microbial resources and systematics*, 37(1), 1-12.
- Hollings, M. 1962. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature*, 196, 162-166.
- Irinyi, L., Lackner, M., De Hoog, G. S., & Meyer, W. 2016. DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. *Fungal Biology*, 120(2), 125-136.
- Jamal, A., Bignell, E. M., & Coutts, R. H. 2010. Complete nucleotide sequences of four dsRNAs associated with a new chrysovirus infecting *Aspergillus fumigatus*. *Virus research*, 153(1), 64-70.
- Jia, H., Dong, K., Zhou, L., Wang, G., Hong, N., Jiang, D., & Xu, W. 2017. A dsRNA virus with filamentous viral particles. *Nature communications*, 8(1), 168.

- Jiang, D., Ayllón, M. A., Marzano, S. Y. L., Kondō, H., Turina, M., & ICTV Report Consortium. 2022a. ICTV virus taxonomy profile: Mymonaviridae 2022. *Journal of General Virology*, 103(11), 001787.
- Jiang, Y., Liu, X., Yang, B., Tian, X., Liu, J., Wang, Q., ... & Hsiang, T. 2022b. Complete genome sequence of a novel victorivirus infecting *Aspergillus niger*. *Archives of Virology*, 167(6), 1475-1479.
- Kanhayuwa, L., Kotta-Loizou, I., Özkan, S., Gunning, A. P., & Coutts, R. H. 2015. A novel mycovirus from *Aspergillus fumigatus* contains four unique dsRNAs as its genome and is infectious as dsRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(29), 9100-9105.
- Khan, H. A., Baig, D. I., & Bhatti, M. F. 2023. An overview of mycoviral curing strategies used in evaluating fungal host fitness. *Molecular Biotechnology*, 65(10), 1547-1564.
- Kinsella, C. M., Deijns, M., Gittelbauer, H. M., van der Hoek, L., & van Dijk, K. 2022. Human clinical isolates of pathogenic fungi are host to diverse mycoviruses. *Microbiology spectrum*, 10(5), e01610-22.
- Kondo, H., Botella, L., & Suzuki, N. 2022. Mycovirus diversity and evolution revealed/inferred from recent studies. *Annual Review of Phytopathology*, 60, 307-336.
- Kondo, H., Chiba, S., Toyoda, K., & Suzuki, N. 2013. Evidence for negative-strand RNA virus infection in fungi. *Virology*, 435(2), 201-209.
- Kong, F., Tong, Z., Chen, X., Sorrell, T., Wang, B., Wu, Q., ... & Chen, S. 2008. Rapid identification and differentiation of *Trichophyton* species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling-circle amplification. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), 1192-1199.
- Kotta-Loizou, I. 2021. Mycoviruses and their role in fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 63, 10-18.
- Kotta-Loizou, I., & Coutts, R. H. 2017a. Mycoviruses in *Aspergilli*: a comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, 8, 288354.
- Kotta-Loizou, I., & Coutts, R. H. 2017b. Studies on the virome of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reveal novel dsRNA elements and mild hypervirulence. *PLoS pathogens*, 13(1), e1006183.
- Kotta-Loizou, I., Castón, J. R., Coutts, R. H., Hillman, B. I., Jiang, D., Kim, D. H., ... & ICTV Report Consortium. 2020. ICTV virus taxonomy profile: Chrysoviridae. *Journal of General Virology*, 101(2), 143-144.
- Kotta-Loizou, I., Coutts, R. H., & ICTV Report Consortium. 2022. ICTV virus taxonomy profile: Polymycoviridae 2022. *Journal of General Virology*, 103(5), 001747.
- Krupovic, M., Ghabrial, S. A., Jiang, D., & Varsani, A. 2016. Genomoviridae: a new family of widespread single-stranded DNA viruses. *Archives of virology*, 161, 2633-2643.

- Lau, S. K., Lo, G. C., Chow, F. W., Fan, R. Y., Cai, J. J., Yuen, K. Y., & Woo, P. C. 2018. Novel partitivirus enhances virulence of and causes aberrant gene expression in *Talaromyces marneffeii*. *MBio*, 9(3), 10-1128.
- Li, X., Liu, Q., Li, S., Sossah, F. L., Han, X., Zhu, G., ... & Fu, Y. 2022. A novel fungal negative-stranded RNA virus related to mymonaviruses in *Auricularia heimuer*. *Archives of Virology*, 167(11), 2223-2227.
- Lin, J., Gan, Y., Tong, Z., Yan, J., Han, X., Duan, X., ... & Chen, J. 2024. First Report of *Lecanicillium aphanocladii* Causing Rot of *Sparassis latifolia* in China. *Plant Disease*, 108(3), 795.
- Lin, Y. H., Fujita, M., Chiba, S., Hyodo, K., Andika, I. B., Suzuki, N., & Kondo, H. 2019. Two novel fungal negative-strand RNA viruses related to mymonaviruses and phenuiviruses in the shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). *Virology*, 533, 125-136.
- Liu, L., Xie, J., Cheng, J., Fu, Y., Li, G., Yi, X., & Jiang, D. 2014. Fungal negative-stranded RNA virus that is related to bornaviruses and nyaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(33), 12205-12210.
- Liu, S., Li, J., Feng, Q., Chu, L., Tan, Z., Ji, X., & Jin, P. 2023. Insecticidal Effect of the Entomopathogenic Fungus *Lecanicillium araneicola* HK-1 in *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae). *Insects*, 14(11), 860.
- Liu, W., Duns, G., & Chen, J. 2008. Genomic characterization of a novel partitivirus infecting *Aspergillus ochraceus*. *Virus Genes*, 37, 322-327.
- Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Ariyawansa, H. A., Aoki, T., Cardinali, G., Crous, P. W., Druzhinina, I. S., Geiser, D. M., Hawksworth, D. L., Hyde, K. D., Irinyi, L., Jeewon, R., Johnston, P. R., Kirk, P. M., Malosso, E., May, T. W., Meyer, W., Öpik, M., Robert, V., Stadler, M., Thines, M., Vu, D., Yurkov, A. M., Zhang, N., Schoch, C. L. 2020. "Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?", *IMA Fungus*, 11, 1-32.
- Lv, B., Yu, S., Chen, Y., Yu, H., & Mo, Q. 2022. First report of *Lecanicillium aphanocladii* causing rot of *Morchella sextelata* in China. *Plant Disease*, 106(12), 3202.
- Mahillon, M., Decroës, A., Liénard, C., Bragard, C., & Legrève, A. 2019. Full genome sequence of a new polymycovirus infecting *Fusarium redolens*. *Archives of virology*, 164, 2215-2219.
- Martínez-Herrera, E., Moreno-Coutiño, G., Fuentes-Venado, C. E., Hernández-Castro, R., Arenas, R., Pinto-Almazán, R., & Rodríguez-Cerdeira, C. 2023. Main Phenotypic Virulence Factors Identified in *Trichophyton rubrum*. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 37, 2345-2356.
- Marzano, S. Y. L., & Domier, L. L. 2016. Novel mycoviruses discovered from metatranscriptomics survey of soybean phyllosphere phytobiomes. *Virus research*, 213, 332-342.
- Marzano, S. Y. L., Nelson, B. D., Ajayi-Oyetunde, O., Bradley, C. A., Hughes, T. J., Hartman, G. L., ... & 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.
- Medd, N. C., Fellous, S., Waldron, F. M., Xuéreb, A., Nakai, M., Cross, J. V., & Obbard, D. J. 2018. The virome of *Drosophila suzukii*, an invasive pest of soft fruit. *Virus evolution*, 4(1), vey009.
- Meng, Y., Wellabada Hewage Don, P. D., & Wang, D. 2022. A New Strain of *Lecanicillium uredinophilum* isolated from Tibetan Plateau and its insecticidal activity. *Microorganisms*, 10(9), 1832.
- Morán, F., Olmos, A., Candresse, T., & Ruiz-García, A. B. 2023. Complete Genome Characterization of *Penicillimonavirus gammaplasmoparae*, a Bipartite Member of the Family Mymonaviridae. *Plants*, 12(18), 3300.
- Moskaluk, A. E., & VandeWoude, S. 2022. Current topics in dermatophyte classification and clinical diagnosis. *Pathogens*, 11(9), 957.
- Mu, F., Xie, J., Cheng, S., You, M. P., Barbetti, M. J., Jia, J., ... & Jiang, D. 2018. Virome characterization of a collection of *S. sclerotiorum* from Australia. *Frontiers in microbiology*, 8, 2540.
- Nerva, L., Ciuffo, M., Vallino, M., Margaria, P., Varese, G. C., Gnani, G., & Turina, M. 2016. Multiple approaches for the detection and characterization of viral and plasmid symbionts from a collection of marine fungi. *Virus Research*, 219, 22-38.
- Nerva, L., Turina, M., Zanzotto, A., Gardiman, M., Gaiotti, F., Gambino, G., & Chitarra, W. 2019. Isolation, molecular characterization and virome analysis of culturable wood fungal endophytes in esca symptomatic and asymptomatic grapevine plants. *Environmental microbiology*, 21(8), 2886-2904.
- Nguyen, T. T., Le, T. N. G., & Nguyen, T. H. 2023. First report of emerging fungal pathogens of *Cordyceps militaris* in Vietnam. *Scientific Reports*, 13(1), 17669.
- Niu, Y., Yuan, Y., Mao, J., Yang, Z., Cao, Q., Zhang, T., ... & Liu, D. 2018. Characterization of two novel mycoviruses from *Penicillium digitatum* and the related fungicide resistance analysis. *Scientific Reports*, 8(1), 5513.
- Packeu, A., Stubbe, D., & Hendrickx, M. 2021. The *Trichophyton rubrum* Complex. In *Dermatophytes and Dermatophytoses* (pp. 199-210). Cham: Springer International Publishing.
- Packeu, A., Stubbe, D., Roesems, S., Goens, K., Van Rooij, P., de Hoog, S., & Hendrickx, M. 2020. Lineages within the *Trichophyton rubrum* complex. *Mycopathologia*, 185(1), 123-136.
- Park, M., Cho, Y. J., Kim, D., Yang, C. S., Lee, S. M., Dawson Jr, T. L., ... & Jung, W. H. 2020. A novel virus alters gene expression and vacuolar morphology in *Malassezia* cells and induces a TLR3-mediated inflammatory immune response. *Mbio*, 11(5), 10-1128.
- Pečiulytė, D., & Kačergius, A. 2012. *Lecanicillium aphanocladii* – a new species to the mycoflora of Lithuania and a new pathogen of tree leaves mining insects. *Botanica Lithuanica* (1392-1665), 18(2).

- Pettersson, J. H. O., Shi, M., Eden, J. S., Holmes, E. C., & Hesson, J. C. 2019. Meta-transcriptomic comparison of the RNA viromes of the mosquito vectors *Culex pipiens* and *Culex torrentium* in Northern Europe. *Viruses*, 11(11), 1033.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. 2017. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of natural products*, 80(3), 756-770.
- Refos, J. M., Vonk, A. G., Eadie, K., Lo-Ten-Foe, J. R., Verbrugh, H. A., van Diepeningen, A. D., & van de Sande, W. W. 2013. Double-stranded RNA mycovirus infection of *Aspergillus fumigatus* is not dependent on the genetic make-up of the host. *PLoS One*, 8(10), e77381.
- Rodriguez Coy, L., Plummer, K. M., Khalifa, M. E., & MacDiarmid, R. M. 2022. Mycovirus-encoded suppressors of RNA silencing: Possible allies or enemies in the use of RNAi to control fungal disease in crops. *Frontiers in Fungal Biology*, 3, 965781.
- Rogers, S. O., & Bendich, A. J. 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In *Plant molecular biology manual* (pp. 183-190). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Ruiz-Padilla, A., Rodríguez-Romero, J., Gómez-Cid, I., Pacifico, D., & Ayllón, M. A. 2021. Novel mycoviruses discovered in the mycovirome of a necrotrophic fungus. *MBio*, 12(3), 10-1128.
- Sahin, E., Akata, I. 2019. "Complete genome sequence of a novel mitovirus from the ectomycorrhizal fungus *Geopora sumneriana*", *Archives of Virology*, 164, 2853–2857.
- Sahin, E., Edis, G., Keskin, E., & Akata, I. 2024. Molecular characterization of the complete genome of a novel ormycovirus infecting the ectomycorrhizal fungus *Hortiboletus rubellus*. *Archives of Virology*, 169(5), 110.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sass, G., Kotta-Loizou, I., Martinez, M., Larwood, D. J., & Stevens, D. A. 2023. Polymycovirus infection sensitizes *Aspergillus fumigatus* for antifungal effects of nikkomycin Z. *Viruses*, 15(1), 197.
- Sato, Y., Das, S., Velasco, L., Turina, M., Osaki, H., Kotta-Loizou, I., ... & ICTV Report Consortium. 2023a. ICTV virus taxonomy profile: Yadokariviridae 2023. *Journal of General Virology*, 104(1), 001826.
- Sato, Y., Jamal, A., Kondo, H., & Suzuki, N. 2020. Molecular characterization of a novel polymycovirus from *Penicillium janthinellum* with a focus on its genome-associated PASrp. *Frontiers in Microbiology*, 11, 592789.
- Sato, Y., Shamsi, W., Jamal, A., Bhatti, M. F., Kondo, H., & Suzuki, N. 2020. Hadaka virus 1: A capsidless eleven-segmented positive-sense single-stranded RNA virus from a phytopathogenic fungus, *Fusarium oxysporum*. *MBio*, 11(3), 10-1128.
- Sato, Y., Turina, M., Chiba, S., Okada, R., Bhatti, M. F., Kotta-Loizou, I., ... & ICTV Report Consortium. 2023b. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hadakaviridae 2023. *Journal of General Virology*, 104(1), 001820.

- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & 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.
- Seebacher, C., Bouchara, J. P., & Mignon, B. 2008. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*, 166, 335-352.
- Seth, D., Cheldize, K., Brown, D., & Freeman, E. E. 2017. Global burden of skin disease: inequities and innovations. *Current dermatology reports*, 6, 204- 210.
- Shafik, K., Umer, M., You, H., Aboushedida, H., Wang, Z., Ni, D., Xu, W. 2021. "Characterization of a Novel Mitovirus Infecting *Melanconium theae* Isolated From Tea Plants", *Frontiers in Microbiology*, 12, 757556-757556.
- Shi, M., Lin, X. D., Tian, J. H., Chen, L. J., Chen, X., Li, C. X., ... & Zhang, Y. Z. 2016. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*, 540(7634), 539-543.
- Starr, E. P., Nuccio, E. E., Pett-Ridge, J., Banfield, J. F., & Firestone, M. K. 2019. Metatranscriptomic reconstruction reveals RNA viruses with the potential to shape carbon cycling in soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(51), 25900-25908.
- Stielow, J. B., Levesque, C. A., Seifert, K. A., Meyer, W., Irinyi, L., Smits, D., ... & Robert, V. 2015. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35(1), 242-263.
- Su, H., Packeu, A., Ahmed, S. A., Al-Hatmi, A. M., Blechert, O., İlkit, M., ... & de Hoog, S. 2019. Species distinction in the *Trichophyton rubrum* complex. *Journal of clinical microbiology*, 57(9), 10-1128.
- Takahashi-Nakaguchi, A., Shishido, E., Yahara, M., Urayama, S. I., Ninomiya, A., Chiba, Y., ... & Gonoï, T. 2020. Phenotypic and molecular biological analysis of polmycovirus AfuPmV-1M from *Aspergillus fumigatus*: Reduced fungal virulence in a mouse infection model. *Frontiers in Microbiology*, 11, 607795.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Theelen, B., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Bassukas, I. D., Boekhout, T., & Dawson Jr, T. L. 2018. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. *Medical mycology*, 56(suppl_1), S10-S25.
- Tonka, T., Walterová, L., & Čurn, V. 2022. Biological control of pathogenic fungi: Can mycoviruses play an important role?. *Journal of Central European Agriculture*, 23(3), 540-551.
- Varsani, A., & Krupovic, M. 2021. Family Genomoviridae: 2021 taxonomy update. *Archives of virology*, 166, 2911-2926.
- VVong, K. H., & Lee, S. S. 1998. Comparing the first and second hundred AIDS cases in Hong Kong.

- Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adriaenssens, E. M., Dempsey, D. M., ... & Davison, A. J. 2020. Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020).
- Wang, J., Li, C., Song, P., Qiu, R., Song, R., Li, X., ... & Li, S. 2022. Molecular and biological characterization of the first mymonavirus identified in *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 870204.
- Wang, L., He, H., Wang, S., Chen, X., Qiu, D., Kondo, H., & Guo, L. 2018. Evidence for a novel negative-stranded RNA mycovirus isolated from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virology*, 518, 232-240.
- Wang, P., Yang, G., Lu, H., & Huang, B. 2023. Infection with a novel polymycovirus enhances growth, conidiation and sensitivity to UV-B irradiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1214133.
- Wang, R., Huang, C., Zhang, Y., & Li, R. 2021. Invasive dermatophyte infection: a systematic review. *Mycoses*, 64(4), 340-348.
- Watanabe, T., Suzuki, N., Tomonaga, K., Sawa, H., Matsuura, Y., Kawaguchi, Y., ... & Kawaoka, Y. 2019. Neo-virology: The raison d'être of viruses. *Virus research*, 274, 197751.
- Webster, J., & Weber, R. 2007. *Introduction to fungi*. Cambridge university press.
- Weitzman, I., & Summerbell, R. C. 1995. The dermatophytes. *Clinical microbiology reviews*, 8(2), 240-259.
- White, T. C., Findley, K., Dawson, T. L., Scheynius, A., Boekhout, T., Cuomo, C. A., ... & Saunders, C. W. 2014. Fungi on the skin: dermatophytes and *Malassezia*. *Cold spring harbor perspectives in medicine*, 4(8), a019802.
- Wright, A. A., Cross, A. R., & Harper, S. J. 2020. A bushel of viruses: Identification of seventeen novel putative viruses by RNA-seq in six apple trees. *PLoS One*, 15(1), e0227669.
- Wu, Z., Tian, X., Liu, X., Zhou, J., Yu, W., Qi, X., ... & Jiang, Y. 2023. Complete genome sequence of a novel chrysovirus infecting *Aspergillus terreus*. *Archives of Virology*, 168(8), 209.
- Xu, M., Liu, H., Jia, X., Zou, X., Lu, Y., Sui, L., ... & Liu, J. 2024. The complete genome sequences of a negative single-stranded RNA virus and a double-stranded RNA virus coinfecting the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* Vuillemin. *Archives of Virology*, 169(3), 1-5.
- Ye, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Wang, X., Li, H., & Li, P. 2023. Metatranscriptome-based strategy reveals the existence of novel mycoviruses in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1193714.
- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Jiang, D., Ghabrial, S. A., Li, G., ... & Yi, X. 2010. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(18), 8387-8392.
- Zare, R., & Gams, W. 2001. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia*, 73, 1-50.

- Zare, R., & Gams, W. 2008. A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycological research*, 112(7), 811-824.
- Zhai, L., Xiang, J., Zhang, M., Fu, M., Yang, Z., Hong, N., & Wang, G. 2016. Characterization of a novel double-stranded RNA mycovirus conferring hypovirulence from the phytopathogenic fungus *Botryosphaeria dothidea*. *Virology*, 493, 75-85.
- Zhan, P., Dukik, K., Li, D., Sun, J., Stielow, J. B., Gerrits van den Ende, B., ... & de Hoog, G. S. 2018. Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of clinically distinct *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Studies in mycology*, 89(1), 153-175.
- Zheng, Y., Chen, M., Li, X., Dai, F., Gao, Z., Deng, Q., ... & Pan, S. 2023. Four distinct isolates of a novel polymycovirus identified in *Setosphaeria turcica*. *Archives of Virology*, 168(7), 189.
- Zhong, J., Li, P., Gao, B. D., Zhong, S. Y., Li, X. G., Hu, Z., & Zhu, J. Z. 2022. Novel and diverse mycoviruses co-infecting a single strain of the phytopathogenic fungus *Alternaria dianthicola*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 980970.
- Zoll, J., Verweij, P. E., & Melchers, W. J. 2018. Discovery and characterization of novel *Aspergillus fumigatus* mycoviruses. *PloS one*, 13(7), e0200511.