



Yeni Nesil Dizileme Teknolojilerinin Mikovirolojide Uygulanması^A

Sahra HOSSEINALIZADEH^{1*}, Serap AÇIKGÖZ²

Öz: Yeni nesil yüksek verimli DNA dizileme analizleri 21. yüzyılın başlarında kullanılabilir hale gelmiştir. Bu dizileme teknolojisi genom karakterizasyonu, metagenetik, metilasyon analizi, kromatinlerin analizi, mRNA'ların profillenmesi gibi birçok amaç için kullanılmaktadır. 2009 yılından sonra, yeni nesil dizileme (YND) teknolojileri, virüs /viroid genom dizilemesi, keşfi ve tanısı, ekoloji ve epidemiyoloji, replikasyon ve transkripsiyon dahil olmak üzere çeşitli bitki virüslerinde uygulanmıştır. Son yıllarda bu teknoloji sayesinde araştırmacılar birçok yeni mikovirüsün tanımlanmasını yapmışlardır. Bu derlemede, bazı yeni mikovirüslerin karakterizasyonu ve tanımlanmasında yeni nesil dizileme teknolojisi (YND) nin kullanılmasıyla ilgili konular ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: DNA dizileme, Virüs, Mikovirüs.

Application of Next Generation Sequencing Technologies in Mycovirology

Abstract: High-throughput next generation DNA sequencing analysis became available at the onset of the 21st century. The sequencing technologies offer novel and rapid ways for genome-wide characterization and profiling of mRNAs, small RNAs, transcription factor regions, structure of chromatin and DNA methylation patterns, microbiology and metagenomics. After 2009, new generation sequencing (YND) technologies have been applied

^A Yapılan bu çalışma etik kurul izni gerektirmemektedir.

* **Sorumlu yazar/Corresponding Author:** ¹ Sahra HOSSEINALIZADEH, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Aydın, Türkiye, sahraalizadeh88@yahoo.com, [OrcID 0000-0002-7491-242X](https://orcid.org/0000-0002-7491-242X)

² Serap AÇIKGÖZ, Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Aydın, Türkiye, sacikgoz@adu.edu.tr, [OrcID 0000-0002-7970-1648](https://orcid.org/0000-0002-7970-1648)

Atf/Citation: Hosseinalizadeh, S. ve Açıköz, S. 2021. Yeni Nesil Dizileme Teknolojilerinin Mikovirolojide Uygulanması. *Bursa Uludağ Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 35(1), 247 - 263.

in various plant virology, including virus/viroid genome sequencing, discovery and diagnosis, ecology and epidemiology, replication and transcription. In recent years, researchers have identified many new mycoviruses through this technology. In this review, topics related to the use of new generation sequencing technology (YND) in characterization and identification of some new mycoviruses are discussed.

Keywords: DNA sequencing, Virus, Mycovirus.

Giriş

Virüsler taşıdıkları genetik şifre ile konukçu hücrelerde canlılıklarını sürdürebilirler ancak çoğalabilmeleri için canlı konakçılarda hücresel mekanizmasına ihtiyaçları vardır (Gergerich ve Dolja 2006). Hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve bakteriler dahil olmak üzere tüm canlı organizma türleri virüsler için konakçıdır (Gergerich ve Dolja, 2006). Fungal konukçularda bulunan viral yapılara mikovirüs olarak isimlendirilmekte (Son ve ark., 2015). Mikovirüsler enfekte ettikleri fungal hücrelerde replike olan ve hücreler arasında yayılış gösteren obligat parazitlerdir. Mikovirüslerin genomları, DNA ya da RNA' dan oluşan tek sarmallı (ss-single-stranded) ya da çift-sarmallı (ds-double-stranded) nükleik asitlerden oluşmaktadır (Özkan Kahraman ve Yıldız, 2019; Nuss, 2011).

Mikovirüsler, hücreler arası yayılış gösteren obligat parazitlerdir. Bitkide fungusun neden olduğu hastalık belirtisi ile doğrudan ilişkili değil, ancak konukçularında bazı fenotipik değişikliklere yol açtıkları bilinmektedir (Aday Kaya ark., 2015). Mikovirüsleri fungal konukçularda büyüme ve gelişme, sporülasyon, pigmentasyon ve enzim aktivitelerinde değişikliklere yol açmakta ve mikovirüsleri ile enfekteli fungal izolatların virülensliğinin arttığına (hipervirülenslik) ya da azaldığına (hipovirülenslik) dair pek çok rapor bulunmaktadır (Dawe ve Nuss, 2001; Nuss, 2005).

İlk mikovirüs 1962 yılında *Agaricus bisporus*'da A.B.D.'nin Pensilvanya (Pennsylvania) eyaletinde La France kardeşlerin mantar çiftliğinde ortaya çıkarılmış (Ghabrial ve ark., 2015) ve 1962 yılından bugüne kadar bazı bitki fungal hastalıklarda çok sayıda mikovirüs araştırmacılar taraflarından saptanmış olup bunların bazıları bitki fungal hastalıklarına karşı biyolojik ajan olarak kullanılmaktadır (Ghabrial ve ark., 2015). Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi'nin (ICTV) onuncu raporuna göre, bugüne kadar 250'den fazla mikovirüs genomunun tanısı yapılmış ve 17 aileye ayrılmıştır (Li ve ark., 2019). Her geçen gün mikovirüslerin sayısı artmakta ve bunların tanımlanmasının hızlı ve güvenilir yöntemlerle yapılması gerekmektedir. Geçmiş yıllarda mikovirüslerin tanısında, fungal virüsler ya da virüs benzeri partiküller (VPLs), transmission elektron mikroskobu (TEM) ile gözlemlenmekteydi (Buck, 1986). Ancak virüsün konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda virüs partiküllerinin tanımlanmasında TEM ile sorunlar yaşanmaktaydı. Ayrıca, hücrede virüs parçalarına benzer diğer yapıların tanımlanmalarında yanlışlığa neden oluyordu. Bu nedenle artık günümüzde bitki fungal etmenlerin misellerindeki mikovirüslerin genomları izole edilerek Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) teknikleri gibi yöntemler ile mikoviral genomlar çoğaltılarak tanımlanması yapılmaktadır. Ancak bunun

yapılabilmesi için öncelikle mikovirüsün DNA sekans analizinin yapılması ardından primerinin oluşturulması gerekmektedir.

İlk DNA sekans analiz yöntemlerinden bugüne kadar çok farklı DNA sekans teknikleri bulunmuştur. Son yıllarda DNA sekansı için yeni DNA sekanslama teknolojileri ve teknikleri araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir (Wu ve ark., 2015). Bu DNA dizi analizi, bir DNA parçasında bulunan A, C, G, T nükleotid sıralarının belirlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Elde edilen DNA dizileri genlerin yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinilmesine imkân sağlamaktadır. Günümüze kadar birçok canlı türünün tüm genom haritaları tanımlanmış, genlerinin yapısı ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir (Heather ve Chain, 2016; Kızmaz ve ark., 2017).

İlk olarak 1970'li yılların başında DNA dizi analizi ile ilgili araştırmalar başlatılmıştır. 1977 yılında birinci nesil dizileme olarak ifade edilen DNA dizileme yöntemlerinden, zincir sonlandırma yöntemini Fredrick Sanger (Sanger ve ark., 1977) ardından kimyasal yöntemi ise Allan M. Maxam ve Walter Gilbert (Maxam ve Gilbert, 1977) geliştirmişlerdir. Bunu yarı otomatik, tam otomatik (Smith ve ark., 1986; Ansorge ve ark., 1987) ve kapillar DNA sekanslama (Ruiz-Martinez ve ark., 1993) teknikleri takip etmiştir.

2000 yılında tamamlanan insan genom projesinde zincir sonlandırma yöntemi kullanılmıştır. Sanger dizileme tekniği ile her ne kadar farklı boyutlardaki DNA fragmanlarının dizilenmesi yapılsa da yüksek maliyetler karşılığında uzun sürelerde düşük çıktılar vermesi nedeniyle (Taşar ve ark., 2018), son yıllarda Pirodizileme (Pyrosequencing) (Eriksson ve ark., 2004) yöntemi ile başlayan ve günümüzde birçok araştırmacı tarafından kullanılan yeni nesil DNA dizileme teknolojilerine yönelik uygulamalar başlatılmıştır. 2005 yılında Solexa / Illumina tarafından öne sürülmüş olan yeni nesil dizileme yöntemleri yüksek verimlilik, çok sayıda analiz ve düşük maliyetler gibi avantajları beraberlerinde getirmişlerdir. DNA dizileme teknolojiler sayesinde yüksek doğrulukla, ultra hızlı olarak, dizileme yapabilme kapasiteleri sayesinde transkriptom analizi, ploidi seviyesinin belirlenmesi, moleküler markır geliştirme ve mRNA profilinin belirlenmesi gibi birçok çalışma da yapılabilmektedir (Dönmez ve ark., 2015). Prensip olarak Sanger dizilemede kapiller elektroforezi uygulanarak genomik DNA parçalara ayrılır ve her bir parçadaki bazlar, parçalar kalıp DNA zincirine bağlandığında yayılan sinyallere göre tanımlama yapılmaktadır. Yeni nesil dizileme (YND) tekniği Sanger dizilemeye göre daha ucuz ve doğruluk oranı daha yüksek olup kısa sürede daha fazla dizileme yapılabilme kapasitesine sahiptir (Prabha ve ark., 2013). Günümüzde pek çok araştırmacı YND tekniklerini kullanarak hızlı ve kolayca yeni bitki virüs hastalık etmeni genomlarının tanımlanmasını yapmışlardır (Kehoe ve ark., 2014).

YND veri ve analiz teknikleri, viral evrim, ekoloji, epidemiyoloji, genomik çeşitlilik ve virüsler ile konukçuların arasındaki ilişkiler gibi alanlarda araştırmalar yapılmasına imkan tanımıştır (Zhang ve ark., 2018).

Son yıllarda araştırmacılar dsRNA, total RNA veya küçük RNA'lar gibi farklı genom şablonlarını kullanarak YND teknikleri sayesinde bazı bitki fungal hastalık etmenlerinde bulunan yeni mikovirüslerin tanımlanması ve karakterizasyonunu güvenilir ve hızlı bir şekilde yapabilmişlerdir (Bartholomaeus ve ark., 2016; Donaire ve ark., 2016; Khalifa ve ark., 2016; Marzano ve ark., 2016; Khalifa ve MacDiarmid, 2019). Mikovirüsler ile ilgili böylesi hızlı ve güvenilir tanı yöntemlerine gerek duyulmasının bir nedeni de bazı mikovirüslerin fungal

etmenlerin biyolojik mücadelesinde kullanılabilir olmasından kaynaklanmaktadır. Buna en iyi örnek ise Kestane kanserine neden olan *Cryphonectria parasitica* ya karşı biyolojik ajan olarak hypovirüslerin kullanılmasıdır (Milgroom ve Cortesi, 2004). Günümüzde yoğun kimyasal kullanımı sonucunda doğal denge tahrip olmuş, çevre ve insan sağlığı her geçen gün biraz daha tehdit altına girmiştir (Akbulak ve Tezcan, 2006). Uzun süredir uygulanan kimyasal mücadele sonucu ortaya çıkan ciddi sorunlardan dolayı alternatif yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Tüm bu sorunlar karşısında doğal dengenin korunmasını sağlayan ve çevre dostu biyolojik mücadele uygulamalarına insan sağlığı yönünden çok önem verilmektedir. Yakın bir gelecekte pek çok bitki fungal hastalığının kontrolünde mikovirüslerin kullanımının daha da yaygınlaşması beklenmektedir. Bu derlemede YND ile yeni mikovirüslerin tanılanmasıyla ilgili bazı çalışmalar ele alınıp anlatılmıştır.

Yeni Nesil DNA Dizileme Teknikleri (YND)

2000 yılında Lynx Therapeutics (USA) firması Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS) yöntemini kullanarak ilk Yeni Nesil Dizileme teknolojisi-YND (Next Generation Sequencing- NGS) başlatan firma olmuş ve daha sonra bu firma Illumina (USA) tarafından satın alınmıştır. 2004 yılında 454 Life Sciences Roche (Basel, Switzerland) firması pirodizileme kimyasına dayalı YND teknolojilerinin ikincisi kullanmaya sunmuştur. Bu teknoloji baz başına maliyet ve dizin okuma uzunluğu açısından Sanger'e göre daha avantajlıdır ve diğer YND teknolojileri (Illumina ve SOLID) ile karşılaştırıldığında bu özellikler yönünden birbirine benzerlik göstermektedir (Cock ve ark., 2010 ve Kulski, 2015). 2007 yılında Solexa GA firması tarafından geliştirilen Illumina'nın genom sentez dizileme (<http://www.illumina.com>) sistemi her çalışmada 50 milyar baza (Bbp) kadar okuma yapılabilen ve en son modeli her çalışmada 85 bp'e ulaşabilmiştir (Kulski, 2015). 21. Yüzyılın en önemli moleküler biyoloji araçlarından biri olan YND yüksek verim ve düşük maliyeti sayesinde geleneksel Sanger dizileme yönteminin yerini almıştır. Yeni nesil DNA dizileme teknolojisi 2000 yılının ikinci yarısından itibaren yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Son yıllarda geliştirilen diğer YND sistemleri arasında yer alan; Helicos sequencer (<http://www.helicosbio.com/>), Life Technologies Ion Torrent PGM sequencer (<http://www.iontorrent.com>), Pacific Biosciences (<http://www.pacificbiosciences.com/>) single molecule real-time (smrt) sequencer ve Oxford Technologies Nanopore (Oxford, UK) single molecule sequencer sistemleri kullanıma sunulmuştur (Ion-Torrent, 2017; PacBio, 2017; Nanopore, 2017; Kızmaz ve ark., 2017).

YND Teknolojilerinin Virüslerin ve Mikovirüslerin Tanınmasında Kullanımı

YND ile bitki tüm viral genom dizilemesi 2009 yılında Adams ve ark. (2009), tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar Pepino mosaic potexvirus (PepMV) enfekteli domates bitkisinden elde ettikleri total RNA kullanılarak yöntemi uygulamışlardır. Daha sonra *Liatris spicata* bitkisinden izole edilen bilinmeyen bir patojen *Gomphrena globosa*'ya aktarılmış ve bu bitkinin 'Gayfeather mild mottle virus' olarak adlandırılan yeni bir Cucumovirus ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Adams ve ark., 2009). Adams ve ark., (2013), 'Maize chlorotic

mottle virus (MCMV) ve Sugarcane mosaic virus (SCMV)'unun genomlarının tanılanması ve karakterizasyonu için YND uygulanmış ve yöntemin viral etmenlerin hızlı tanılanması için uygun bir teknik olduğunu ifade etmişlerdir. Kreuze ve ark. (2009), YND ile virüs enfekteli simptomsuz tatlı patateslerden küçük RNA' ların deep sequencing'i ile tüm genom dizilemesini yapmışlardır.

Coetzee ve ark. (2010), Güney Afrika bağ alanlarından toplanan asma virüs örneklerinden dsRNA analizi yaparak dsRNA virüslerini izole etmişler ve deep sequencing (Illumina Genome Analyzer II sentezleme) analiz yöntemi ile dsRNA virüslerinin tüm genom dizilemesini yapmışlardır. Sekans sonucunda Closteroviridae ve Betaflexiviridae familyalarında yer alan Grapevine leafroll-associated virus 3, Grapevine rupestris stem pitting-associated virüs, Grapevine virus A ve Grapevine virus E virüslerini tespit etmişlerdir. Ayrıca Chrysoviridae familyasından olan ve Penicillium chrysogenum virus'a benzer bir virüs daha saptamışlardır. Devam eden süreçte YND yöntemi kısa sürede bitki virüs genomlarının dizilemesi için popüler bir yöntem haline gelmiştir. Nitekim bağlarda düşük miktarda virüs enfeksiyonları da dahil olmak üzere agronomik önemdeki virüslerin saptanmasında standart biyolojik testlerin yerine yeni nesil dizileme analizinin kullanılmasının daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir (Al Rwahnih ve ark., 2015). Hadidi ve ark. (2016), 2009 yılından beri bitki virojisinde uygulanmakta olan YND' nin küçük RNAs, RNA-DNA bitki virus ve viroid genomlarını hızlı, güvenli ve düşük maliyetle sekanslama olanağını sunduğunu vurgulamışlardır. Bu yöntem hızlı ve güvenilir olması nedeniyle kısa sürede daha önce bilinmeyen patojenlerin ve viral genomların dizilenmesine olanak vermiş ve genom dizileme sürecinin hızlandırılmasını da sağlamıştır (Hadidi ve ark., 2016). Maize chlorotic mottle virus (MCMV) ve Sugarcane mosaic virus (SCMV)' unun genomlarının tanılanması ve karakterizasyonu için YND uygulanmış ve yöntemin viral etmenlerin hızlı tanılanması için uygun bir teknik olduğu ifade edilmiştir (Adams ve ark., 2013).

Daha sonra birçok araştırmacı YND teknolojilerini kullanarak farklı bitki fungal hastalık etmenlerinde bulunan bazı mikovirüsleri güvenilir ve hızlı bir şekilde tanılanmasını yapmışlar (Marvelli ve ark., 2014; Bartholomaeus ve ark., 2016; Pandey ve ark., 2018; Wang ve ark., 2019; Li ve ark., 2020; Yao ve ark., 2020) ve bunlar kronolojik sıra ile Tablo 1'de listelenmiştir.

Al Rwahnih ve ark. (2011), asma sürgün örneklerinden elde edilen dsRNA'ların 454 high-throughput sekanslarını karakterize etmişler ve fungal virüslere benzeyen dizi setleri elde etmişlerdir. Asma örneklerinden bilinen tüm mikoviral familyaların yarısını temsil eden 26 fungal virüs grubu tanımlamışlardır. Bu mikovirüslerin üçünün asmalarda yaygın olarak görülen Botrytis cinerea ile ilişkili olduğu tesbit edilmiş ancak diğerlerinin çoğu tanımlanmamıştır (Tablo 1).

Espach (2013), asma bitkisinde kök çürüklüğü hastalığı etmenlerinden Chalara elegans ve Sclerotinia sclerotiorum izolatlarından Valverde ve ark. (1990)'nin yöntemine göre dsRNA izole etmişler ve ScriptSeq™ v2 RNA-Seq cDNA kiti (Epicenter) ile random hexamer primeri kullanılarak cDNA kütüphanesi sentezlemişler ve bunu takiben YND (Illumina HiScanSQ) yöntemi ile dizi analizi yapmışlardır. Ardından bu mikovirüslerin NCBI'da Endornavirus cinsinde Chalara elegans endornavirus 1-(CeEV-1) ve Sclerotinia sclerotiorum partitivirus S-like olduklarını belirlemişlerdir (Tablo 1). Ayrıca bu mikovirüslerin ORF (ORF finder) tanısı ve protein alanı belirlemek için NCBI programı kullanılmıştır. Bu yeni Endornavirus'un RdRp sekansları, sekans

bilgisi diğer bilinen 15 Endornavirus ile karşılaştırılarak 1000 bootstrap yinelemeli olarak UPGMA yöntemi ile filogenetik ağacını oluşturmuşlardır.

Bartholomäus ve ark. (2016), şeker pancarında kök çürüklüğü hastalığına neden olan *Rhizoctonia solani* izolatından izole edilen dsRNA'nın cDNA kütüphanesi oluşturularak Deep Sequencing analiz yöntemleri ile dizi sekanslaması yapmışlardır. Dizi sekanslama yaklaşık 500 bp mesafe aralığına sahip bir çift uçlu sekanslama çalışması (2 x 300 bp) ile Illumina MiSeq sistemi üzerinde kurulmuştur. Elde edilen veriler European Nucleotide Archive (ENA) sistemine ve NCBI'a kaydedilmiş ve çalışma sonucunda Narnaviridae, Endornaviridae, Partitiviridae, Megabirnaviridae ve Tymovirales familyalarına ait 17 farklı mikovirüs saptanmıştır.

Çizelge 1. Yeni nesil dizileme (YND) teknolojileri ile tanımlanan bazı yeni mikovirüsler ve fungal konukçuları

Konukçu Funguslar	Konukçu Bitkiler	Mikovirüsler ve ait oldukları familyalar	Familya/cins	Kaynaklar
<i>Botrytis cinerea</i>	Asma	<i>Botrytis cinerea debilitation-related virus s</i> <i>Botrytis virus F</i> <i>Botrytis virus x</i>	<i>Narnaviridae</i> <i>Gammalflexiviridae</i> <i>Alphaflexiviridae</i>	Al Rwahnih ve ark., 2011
<i>Chalara elegans</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Fusarium virguliforme</i>	Asma	<i>Chalara elegans endomavirus 1</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum partitiivirüs S-like</i> <i>Fusarium virguliforme dsRNA mycovirus 1 ve 2</i>	<i>Endornaviridae</i> <i>Partitiviridae</i> <i>Totiviridae</i>	Espach, 2013
<i>Rhizoctonia solani</i>	Şeker pancar	<i>Rhizoctonia solani mitovirus 9 DC17 / Rhizoctonia solani mitovirus 16, 17, 18, 19, 20</i> <i>Rhizoctonia solani endomavirus 3</i> <i>Rhizoctonia solani flexivirus 1, 2</i> <i>Rhizoctonia solani RNA virus 1, 2, 3</i> <i>Rhizoctonia solani partitiivirüs 1</i> <i>Rhizoctonia solani mycovirus 1, 2, 3</i> <i>Rhizoctonia solani megabimavirus 1</i>	<i>Narnaviridae</i> <i>Endornaviridae</i> <i>Tymoviridae</i> <i>Hepeviridae</i> <i>Partitiviridae</i> <i>Megabimaviridae</i>	Marvelli ve ark., 2014 Bartholomaeus ve ark., 2016
<i>S. sclerotiorum</i>	-	<i>Rhizoctonia cerealis endomavirus 1 / Sclerotinia sclerotiorum endomavirus 1</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum hypovirus 2</i> <i>Sclerotinia Sclerotiorum mitovirus 2, 3, 4, 5, 6 ve 7</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum negative sense RNA virus 1</i>	<i>Endornaviridae</i> <i>Hypoviridae</i> <i>Mitoviridae</i> <i>Mycomononegaviridae</i>	Khalifa ve ark., 2016
<i>Botrytis cinerea</i>	Asma	<i>Botrytis cinerea negative-stranded RNA virus 1</i>	<i>Bunyaviridae</i>	Donaire ve ark., 2016
<i>Sclerotinia Sclerotiorum</i>	Kereviz Kolza Karnabahar Lahana Beyaz hindiba Fasulye Marul Patates Yabani havuç Mavi Acı Bakla	<i>Sclerotinia sclerotiorum victorivirüs 1</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum partitiivirüs 2, 3</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum hypovirus 3 ve 4</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum endomavirus 3, 4, 5 ve 6</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum umbra-like virus 2 ve 3</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum ourmia-like virus 2 ve 3</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum tymo-like RNA virus 2, 3, 4, 5 ve 6</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum negative-stranded RNA virus 1-A, 2-A, 3-A ve 4-A</i> <i>Botrytis porri RNA virus 1</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum tetramycovirus 1</i> <i>Sclerotinia gemycircular virus 1</i>	<i>Totiviridae</i> <i>Partitiviridae</i> <i>Hypoviridae</i> <i>Endornaviridae</i> <i>Narnaviridae</i> <i>Tombusviridae</i> <i>Ourniaviridae</i> <i>Tymoviridae</i> <i>Mononegavirales</i> <i>Unclassified</i> <i>Genomoviridae</i>	Donaire ve ark., 2016 Mu ve ark., 2018
<i>Rosellinia necatrix</i>	Avokado, Elma Avokado Avokado Kiraz Avokado Avokado Avokado	<i>Rosellinia necatrix hypovirus 1 ve 2</i> <i>Rosellinia necatrix megabimavirus 3</i> <i>Rosellinia necatrix fusagavirüs 1, 2 ve 3</i> <i>Rosellinia necatrix partitiivirüs 8, 9 ve 10</i> <i>Rosellinia necatrix megatotivirüs 1 yado-kari virus 2, 3 ve 4</i> <i>Rosellinia necatrix fusarivirüs 2</i>	<i>Hypoviridae</i> <i>Megabimaviridae</i> <i>Fusagaviridae</i> <i>Partitiviridae</i> <i>Megatotiviridae</i> <i>Yadokariviridae</i> <i>Fusarividae</i>	Arjona-Lopez ve ark., 2018
<i>Erysiphe necator</i>	Asma	<i>Erysiphe necator partitiivirüs 1, 2 ve 3</i> <i>Erysiphe necator mitovirus 1, 2 ve 3</i>	<i>Partitiviridae</i> <i>Narnaviridae</i>	Pandey ve ark., 2018
<i>Pythium polare</i>	Kara yosunu	<i>Pythium polare RNA virus 1</i>	<i>Totiviridae</i>	Sasai ve ark., 2018
<i>Podosphaera prunicola</i>	Tatlı Kiraz	<i>Podosphaera prunicola virus sequence 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7</i> <i>Podosphaera prunicola virus sequence 8</i>	<i>Partitiviridae</i> <i>Virgaviridae</i>	Pandey ve ark., 2018
<i>Penicillium digitatum</i>	Turunç	<i>Penicillium digitatum polynycovirus 1</i> <i>Penicillium digitatum Narna-like virus 1</i>	<i>Polynycoviridae</i> <i>Narnaviridae</i>	Niu ve ark., 2018

Çizelge 1. (Devamı)

<i>S. rofsii</i> Strain BLH-1	Tüy Haşhaş	<i>Sclerotinia rofsii</i> beny-like virus 1 <i>Sclerotinia rofsii</i> alphavirus-like virus 1,2 ve 3 <i>Sclerotium rofsii</i> fusarivirus 1 ve 2 <i>Sclerotinia sclerotiorum hypovirus 2</i> <i>Sclerotium rofsii ourmia-like virus 1</i> <i>Sclerotium rofsii endornavirus 1</i> <i>Sclerotium rofsii RNA virus 1 ve 2</i> <i>Sclerotium rofsii mycovirus dsRNA 1</i> <i>Sclerotium rofsii unassigned dsRNA virus 1, 2</i>	Benyviridae "Alphavirus-like" supergrup Fusariviridae <i>Hypoviridae</i> <i>Ourmiavirus</i> <i>Endornaviridae</i> <i>Fusagaviridae</i> Unclassified Unclassified	Zhu ve ark., 2018
<i>T. atroviride</i> NCF394	Şitaki mantarı	<i>Trichoderma atroviride partitivirus 1</i>	<i>Partitiviridae</i>	Chun ve ark., 2018
<i>Trichoderma koningtopsis</i> (Mg10)	Toprak	<i>Trichoderma koningtopsis totivirus 1</i>	<i>Partitiviridae</i>	Khalifa ve MacDiarmid, 2019
<i>Clonostachys rosea</i> (Mg06)	Kolza tohumu	<i>Sclerotinia sclerotiorum botybirnavirus 3</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum mycovirus 1</i>	<i>Botybirnavirus</i> <i>Tymoviridae</i> unclassified	Wang ve ark., 2019
<i>T. harzianum</i> 525	Orman ve Çim alanları	<i>Trichoderma harzianum mycovirus 1</i>	unclassified	Liu ve ark., 2019
<i>Alternaria alternata</i>	Domates	<i>Alternaria alternata botybirnavirus 1</i>	<i>Botybirnavirus</i>	Shamsi ve ark., 2019
<i>Cronartium ribicola</i>	Çam	<i>Cronartium ribicola totivirus 1, 2, 3, 4 ve 5</i>	<i>Totiviridae</i>	Liu ve ark., 2019
<i>S. sclerotiorum</i>	Kanola	<i>Sclerotinia sclerotiorum negative stranded RNA virus 2</i>	<i>Mononegavirales</i>	Marzano ve ark., 2020
	Kanola /Bezelye	<i>Sclerotinia sclerotiorum negative stranded RNA virus 3</i>	<i>Mononegavirales</i>	
	Lahana	<i>Sclerotinia sclerotiorum negative stranded RNA virus 4</i>	<i>Mononegavirales</i>	
	Soya fasulyesi	<i>Sclerotinia sclerotiorum negative stranded RNA virus 5</i>	<i>Bunyaviridae</i>	
	-	<i>Sclerotinia sclerotiorum double-stranded RNA virus 3</i>	<i>Totiviridae</i>	
	Soya fasulyesi	<i>Sclerotinia sclerotiorum double-stranded RNA virus 4</i>	-	
	Marul	<i>Sclerotinia sclerotiorum hypovirus 2</i> <i>Lactuca</i>	<i>Hypoviridae</i>	
	Marul	<i>Sclerotinia sclerotiorum endornavirus 1</i> <i>Lactuca</i>	<i>Endornaviridae</i>	
	-	<i>Sclerotinia sclerotiorum endornavirus 2-IL</i>	<i>Endornaviridae</i>	
	Domates	<i>Sclerotinia sclerotiorum ourmia-like virus 1 RNA I</i>	<i>Ourmiavirus</i>	
	Lahana	<i>Sclerotinia sclerotiorum ourmia-like virus 2 RNA I</i>	<i>Ourmiavirus</i>	
	Mercimek	<i>Sclerotinia sclerotiorum umbra-like virus 1</i>	Unclassified	
	-	<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 7 IL-1</i>	<i>Narnaviridae</i>	
	Sakız kabağı	<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 5</i>	<i>Narnaviridae</i>	
	Kanola	<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 6</i>	<i>Narnaviridae</i>	
	Marul	<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 7, 8</i>	<i>Narnaviridae</i>	
	Maydanoz	<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 9</i>	<i>Narnaviridae</i>	
	Lahana	<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 10</i>	<i>Narnaviridae</i>	
	Soya fasulyesi	<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 11, 22 ve 23</i>	<i>Narnaviridae</i>	
	Domates	<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 12, 14, 16</i>	<i>Narnaviridae</i>	
	Mercimek	<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 13</i>	<i>Narnaviridae</i>	
	Kabak	<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 15</i>	<i>Narnaviridae</i>	
	-	<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 17 ve 18</i>	<i>Narnaviridae</i>	

Çizelge 1. (Devamı)

<i>Rhizoctonia solani</i>	Soya fasulyesi Soya fasulyesi Soya fasulyesi - Soya fasulyesi - Soya fasulyesi Soya fasulyesi Soya fasulyesi - - Soya fasulyesi Soya fasulyesi Soya fasulyesi - Soya fasulyesi Soya fasulyesi Soya fasulyesi - Soya fasulyesi Soya fasulyesi Soya fasulyesi - Soya fasulyesi	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> mitovirus 1, 2, 3 ve 4 <i>Rhizoctonia solani</i> negative-stranded RNA virus 1, 2 ve 3 <i>Rhizoctonia solani</i> negative-stranded RNA virus 4 <i>Rhizoctonia solani</i> endornavirus 2 <i>Rhizoctonia solani</i> ourmia-like virus 1 <i>Rhizoctonia solani</i> ourmia-like virus 2 <i>Rhizoctonia solani</i> mitovirus 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ve 15 <i>Rhizoctonia solani</i> barnavirus 1 <i>Rhizoctonia solani</i> partitivirus 1 RNA1 ve 2 <i>Rhizoctonia solani</i> positive-stranded RNA virus 1 <i>Macrophomina phaseolina</i> negative stranded RNA virus 1 <i>Macrophomina phaseolina</i> hypovirus 1 <i>Macrophomina phaseolina</i> mitovirus 1 ve 2 <i>Macrophomina phaseolina</i> mitovirus 3 <i>Macrophomina phaseolina</i> tobamo-like virus 1a <i>Macrophomina phaseolina</i> single-stranded RNA virus 3 <i>Macrophomina phaseolina</i> chrysovirus 1 <i>Macrophomina phaseolina</i> double-stranded RNA virus 2 <i>Macrophomina phaseolina</i> single-stranded RNA virus 1	- Ophioviridae Bunyaviridae Endornaviridae Ourmiavirus Narnaviridae Barnaviridae Partitviridae Tymoviridae Bunyaviridae Hypoviridae Narnaviridae Narnaviridae Virgaviridae Tombusviridae Chrysoviridae Unclassified Unclassified Totiviridae	
<i>Diaporthe longicolla</i>	Soya fasulyesi	<i>Diaporthe longicolla</i> totivirus 1	Totiviridae	
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Soya fasulyesi	<i>Colletotrichum partitivirus 1</i> RNA1	Partitviridae	
<i>Bipolaris oryzae</i>	Yabani Pirinç	<i>Bipolaris oryzae</i> hypovirus 1	Hypoviridae	Li ve ark., 2020
<i>Fusarium sacchari</i>	Şeker kamışı	<i>Fusarium sacchari</i> alphavirus-like virus 1	Narnaviridae	Yao ve ark., 2020
<i>Fusarium andiyazi</i>		<i>Fusarium andiyazi</i> mitovirus 1 ve 2	Mitoviridae	
<i>Fusarium sacchari</i>		<i>Fusarium sacchari</i> chrysovirus 1	Hypoviridae	
<i>Fusarium sacchari</i>		<i>Fusarium sacchari</i> hypovirus 1-Defective RNA/ <i>Fusarium sacchari</i> hypovirus1 <i>Fusarium sacchari</i> chrysovirus 1, dsRNA1,2,3 ve 4	Chrysoviridae	

Asma fungal hastalıkları üzerinde yapılan başka bir çalışmada; asmada kurşuni küf hastalığına neden olan *Botrytis cinerea* izolatından total RNA izole edilerek YND dizileme teknikleri (Illumina platformu HiSeq2000) kullanılarak cDNA kütüphanesi ve DNA sekanslaması yapılmış ve biyoinformatik analizler sonrası Emaravirus cinsi ve Bunyaviridae familyasından olan yeni mikovirüs, *Botrytis cinerea* negative-stranded RNA virus 1 sekans verileri Gen bankasına kaydedilmiştir (Donaire ve ark., 2016). *Fusarium virguliforme* soya fasulyesinde ani ölüm sendromuna (Sudden death syndrome (SDS)) neden olmakta ve % 80'e kadar soya verimini azaltılmasına yola açmaktadır. Marvelli ve ark. (2014), *F. virguliforme* dan yeni mikovirüslerin tanınması ve bu mikovirüslerin hastalığa karşı kullanılmasıyla ilgili çalışmalar yapmışlardır. Yapılan çalışmada ABD'nin Ohio eyaletinden izole edilen 44 fungal izolattan dsRNA lar elde edilmiş ve Illumina HiSeq 2000 (Illumina, Inc., San Diego, CA) ile sekanslama yapılarak *Fusarium virguliforme* dsRNA mycovirus 1 ve *Fusarium virguliforme* dsRNA mycovirus 2 tespit edilmiştir (Tablo 1). Çalışma sonucunda bu yeni mikovirüslerin *F. virguliforme*'a karşı biyolojik ajan olarak kullanılabilirliğini bildirmişlerdir (Marvelli ve ark., 2014).

Khalifa ve ark. (2016), beyaz çürüklük hastalığı etmeni *Sclerotinia sclerotiorum*'un beş izolatından dsRNA mikoviral genomunu izole ederek tüm genom sekanslaması için Illumina sekanslama tekniğini kullanmışlar ve elde edilen sonuçları Sanger sekanslama ile karşılaştırmışlardır. Aynı örneklerden Sanger sekanslaması ile dokuz mikoviral (Tablo 1) genom tespit ederken, Illumina sekanslaması ile aynı dokuz virüse ilave olarak bir virüs daha tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda Illumina sekanslaması ile elde edilen genom sekansların % 99.3-100 oranında Sanger sekanslaması ile aynı olduğunu ve bu nedenle, YND yöntemi ile elde edilen sekanslama sonuçlarının güvenilir ve doğru olduğunu ifade etmişlerdir (Khalifa ve ark., 2016).

Australya'nın farklı tarım bölgelerinde çeşitli tarım ürünlerinin yetiştiriciliği yapılan alanlardan, Mu ve ark. (2018), toplam 84 adet *S. sclerotiorum* izolatından elde edilen total RNA'lardan cDNA kütüphanesini TruSeq™ RNA Sample Prep Kit (Illumina, RS-122-2001) kullanarak oluşturmuşlar ve ardından Shanghai Biotechnology Corporation tarafından Illumina MiSeq 2000/2500'de teknikleri ile sekanslama yapmışlardır. Sekans sonuçlarını NCBI veri tabanı kullanılarak BLASTp analizi etmişler ve 10 farklı mikovirüs familyasına ait 57 mikovirüsün tüm genomlarını çıkartmışlardır. Bu 57 mikovirüsün (Tablo 1) 34'ünü (%59,6) yeni mikovirüsler olarak kayıt etmişlerdir (Mu ve ark., 2018). Turunçlarda hasat sonrası ürün kayıplarına neden olan *Penicillium digitatum* ve *Penicillium italicum* 'a karşı mikovirüslerin biyolojik ajanı olarak kullanılması ile ilgili Niu ve ark. (2018), Çin'de çalışma yapmışlardır. Çalışmada YND yöntemlerinde Illumina platformlarını kullanarak *P. digitatum* fungal etmeninden *Penicillium digitatum* polmycovirus 1 (PdPmV1) ve *Penicillium digitatum* Narnalike virus 1 (PdNLV1) iki yeni mikovirüslerini saptamışlardır (Tablo 1). Bu yeni mikovirüsler biyolojik ajanı olarak fungal etmenin virülensliğini azalttığını bildirmişlerdir (Niu ve ark., 2018). Asmalarda külemeye neden olan *Erysiphe necator* mikovirüs varlığı yönünden Pandey ve ark. (2018), ABD de araştırma yapmışlar ve *E. necator* izolatlarından elde ettikleri dsRNA'ları Illumina Hi Seq 2000 platformu kullanarak yüksek verimli sekanslama (high-throughput sequencing) ile dizi analizi yapmışlar ve *Erysiphe necator* partitivirus 1, 2 ve 3 (EnPV 1-3) ve *Erysiphe necator* mitovirus 1, 2, ve 3 (EnMV 1-3) diye adlandırdıkları yeni 6 mikovirüs (Tablo 1) saptamışlardır (Pandey ve ark., 2018).

Podosphaera prunicola birçok tatlı kiraz yetiştirici yapılan bölgelerde küf hastalığına neden olmaktadır. Pandey ve ark. (2018), *P. prunicola* izolatlarından dsRNA mikovirüslerini saptamışlar ve ardından YND (Illumina Hi Seq 2000 platform) tekniği kullanarak sekans analizi yapmışlar ve toplam 8 adet *Podosphaera prunicola* virus sequence 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 (Tablo 1) olarak isimlendirilen yeni mikovirüsleri saptamışlardır. Ayrıca bu yeni mikovirüsleri Sanger sekanslama kullanarak daha önce tanımlanması yapılan diğer mikovirüslerle karşılaştırmışlar ve böylece YND verilerini doğrulamışlardır. Bu çalışma ile aynı zamanda, YND'nin biyoinformatik programlarla kombinasyonu halinde yüksek verimli sekanslama için önce zenginleştirme stratejileri olmadan mikovirüsler ile ilişkili virüsleri tarafsız bir şekilde tanımlanmasının yapılabildiğini ifade etmişlerdir (Pandey ve ark., 2018).

Yeni Zelanda'da 2019 yılında Khalifa ve MacDiarmid (2019), tek bir toprak örneğinden *Trichoderma koningiopsis* (Mg10) ve *Clonostachys rosea* (Mg06) izolatları elde etmişler ve taksonomik olarak farklı bu iki fungal etmeden aynı dsRNA elementini (dsRNA-L ve dsRNA-S) izole etmişlerdir. İzole edilen dsRNA-L'nin tüm genom sekanslaması Illumina HiSeq2000 platformu kullanılarak Macrogen Inc. (Seul, Güney Kore) tarafından sekanslanmıştır. Genom sekanslama sonucunda 4712 nükleotid (nt) uzunluğunda ve Totivirüsler benzer proteinleri kodlayan üst üste gelmeyen iki açık okuma çerçevesi (ORF) içeren, *Trichoderma koningiopsis* totivirus 1 (TkTV1 / Mg10) (Tablo 1) olarak adlandırılan yeni bir mikovirüs saptanmış ve ardından sonuçlar Sanger sekanslama ile doğrulanmıştır (Khalifa ve MacDiarmid, 2019). Chun ve ark. (2019), *Trichoderma atroviride* NFCF394 'dan yeni bir mikovirüsü (dsRNA) YND teknikleri ile tanımlayarak moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. Araştırmacılar izole edilen dsRNA'yı, Illumina HiSeq 2000 platformu (Macrogen Inc., Seoul, Kore) kullanılarak cDNA kütüphanesi ve genom dizilemesi yapmışlar ve filogenetik analiz sonucunda Partitiviridae familyasından Alphapartivirus cinsinden, *Trichoderma atroviride* partivirus 1 (TaPV1) (Tablo 1) isimli yeni bir mikovirüsü saptamışlardır.

Çin'de orman ve çim alanlarından 2014-2016 yılları arasında Liu ve ark. (2019), tarafından toplam 150 *Trichoderma* spp. izole edilerek bu türlerde dsRNA'nın varlığı dsRNA analizleri ile gerçekleştirilmiştir. *T. harzianum* 525 den elde ettikleri 3 kb ağırlığındaki dsRNA profilini jel elektroforezde görüntülemişlerdir. Bu dsRNA lar, yüksek verimli sekanslama (Illumina HiSeq 2000/2500) ile sekanslanmış ve sekans verileri NCBI ve BLAST programı kullanarak kontrol edilmiştir. Ardından Maximum likelihood kullanarak elde edilen filogenetik ağaca bu yeni mikovirüsün *Trichoderma harzianum* mycovirus 1 (ThMV1) (Tablo 1) olarak kaydedilmesini sağlamışlardır (Liu ve ark., 2019).

Shamsi ve ark. (2019), Pakistanda domateslerde erken yanıklık hastalığına neden olan *Alternaria alternata* izolatlarından elde ettikleri dsRNA'yı YND yöntemini kullanarak DNA sekans analizlerini yapmışlardır. Araştırmacılar DNA sekans sonucunda Botybirnavirus cinsine ait olan *Alternaria alternata* botybirnavirus 1 (AaBbV1) (Tablo 1) olarak adlandırılan yeni bir mikovirüsü saptamışlardır (Shamsi ve ark., 2019). Çam ağaçlarında beyaz çam pasına neden olan *Cronartium ribicola* dan yeni bir dsRNA mikovirüsü YND tekniği ile saptanmış ve karakterizasyonu yapılmıştır (Liu ve ark., 2019). Çalışmada, Totiviridae familyasında yer alan *Cronartium ribicola* totivirus 1-5 (CrTV1 ila CrTV5) (Tablo 1) olarak adlandırılan beş yeni dsRNA saptanmışlardır (Liu ve ark., 2019).

Yukarıda anlatılan araştırmalarda da görüleceği üzere YND yöntemleri ile virüs ve mikovirüselere ait daha önce tanımlanan genom verilerine gerek kalmadan yeni viral ve mikoviral genomların tanılanması gerçekleştirilmektedir. Düşük konsantrasyona sahip virüs ve mikovirüslerin kolay ve hızlı bir şekilde tanılanması mümkün olabilmektedir.

Ayrıca YND yöntemleri daha önce tanımlanmış ve yeni tanımlanan mikoviral genomlarda mutasyon, filogeni, evrim ve rekombinasyonlarını takip etmeyi sağlamasının yanısıra mikovirüslerin konukçu veya ekosistem ile etkileşimi gibi bilgi olanaklarını da sağlamaktadırlar. Jo ve ark. (2020), bu yeni tekniklerin diğer tanı tekniklerine göre daha güvenilir bir şekilde gelecekte daha çok kullanılacağını ifade etmiştir.

Sonuç

1950'li yıllardan itibaren DNA ve RNA moleküllerinin canlılarda yaşam fonksiyonlarındaki öneminin anlaşılmasıyla genom çalışmaları ön plana çıkmış ve geçmişten günümüze kadar birçok farklı DNA dizileme teknikleri kullanılarak analizleri yapılmıştır. Ancak geçmişte kullanılan DNA dizileme yöntemleri zaman alıcı, yoğun emek gerektiren ve pahalı yöntemler olduğu için son 10-15 yıl içerisinde araştırmacılar daha ucuz, daha hızlı ve daha duyarlı yöntemler geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Günümüzde ise farklı yeni nesil dizileme platformları ulaşılabilir duruma gelmiştir. 2000'li yılların başından bu yana farklı DNA dizileme teknikleri ve cihazları geliştirilmiştir. Bu sistemlerin sayesinde genomik alanda yapılan çalışmalar hız kazanmış ve nükleotit başına dizileme maliyetini önemli ölçüde düşürmüştür.

2009 yılından bu yana gelişmiş biyoinformatiklerle birleştirilmiş YND teknolojileri, özellikle genom dizileme, saptama ve tanımlama, transkriptomik, replikasyon, ekoloji ve epidemiyoloji alanlarında bitki virüs/mikovirüs etmenlerinde de başarıyla kullanılmaktadır.

Bilinen ve yeni bitki RNA ve DNA virüsleri ve satellite virüsler, viroid'ler ve fitoplazmalar bu teknolojiler kullanılarak başarıyla incelenmişlerdir.

YND tekniklerin gelişmesiyle birlikte son yıllarda birçok araştırmacı yeni mikovirüslerin tanılanması ve karakterizasyonunu İllumina dizileme platformlarını kullanarak yapmışlardır (Tablo 1). Bu teknolojiler sayesinde birçok yeni mikovirüsün tanılanması güvenilir ve hızlı bir şekilde mümkün olmuş ve mikovirüslerin taksonomisine de katkı sağlamıştır. Gelecek yıllarda hızla gelişen bu teknoloji sayesinde yeni mikovirüsler tanılanarak bunların biyolojik ajan olarak kullanılması ile ilgili yeni çalışmaların yapılması umut vadetmektedir.

Teşekkür Bilgi Notu

Bu derleme yayın etiğine uymakta ve etik kurul onayı gerektirmemektedir. Makalede yazarlar arasında herhangi bir potansiyel çıkar çatışması bulunmamaktadır. Yayında 1. yazar %70 oranında ve 2. yazar %30 oranında katkı sağlamıştır ve yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

- Adams, I. P., Glover, R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M., and Boonham, N. 2009. Next-generation Sequencing and Metagenomic Analysis: A Universal Diagnostic Tool in Plant Virology. *Molecular Plant Pathology*, 10(4): 537-45.
- Adams, I. P., Miano, D. W., Kinyua, Z. M., Wangai, A., Kimani, E., Phiri, N., Reeder, R., Harju, V., Glover, R., Hany, U., Souza-Richards, R., Deb Nath, P., Nixon, T., Fox, A., Barnes, A., Smith, J., Skelton, A., Thwaites, R., Mumford, R., and Boonham, N. 2013. Use of next-generation sequencing for the identification and characterization of Maize chlorotic mottle virus and Sugarcane mosaic virus causing maize lethal necrosis in Kenya. *Plant Pathology*, 62: 741–749.
- Aday Kaya, A. G., Doğmuş-Lehtijarvi, H. T., and Lehtijarvi, A. 2015. Mikovirüslerin orman patojenlerine karşı kullanım olanakları. *Journal of the Faculty of Forestry Istanbul University*, 65(1): 60-71.
- Akbudak, N., Tezcan, H. 2006. Bitkisel Üretimde ve Bitki Korumada Yeni Bir Etken Madde: Harpin. *Bursa Uludag Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 2(21): 39-43.
- Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C., and Zenke, M. 1987. Automated DNA Sequencing: Ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acid Research*, 15: 4593–4602.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., rbez-Torres, J. R. U., Cordero, F., and Rowhani, A. 2011. Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. *Archives Virology*, 156: 397–403.
- Arjona-Lopez, J. M., Telengech, P., Jamal, A., Hisano, S., Kondo, H., Yelin, M. D., Arjona-Girona, I., Kanematsu, S., Lopez-Herrera, K., and Suzuki, N. 2018. Novel diverse RNA viruses from Mediterranean isolates of the phytopathogenic fungus, *Rosellinia necatrix*: insights into evolutionary biology of fungal viruses. *Environmental Microbiology*, 20(4): 1464–1483.
- Bartholomaeus, A., Wibberg, D., Winkler, A., hler, A. P., Schlüter, A., and Varrelmann, M. 2016. Deep Sequencing Analysis Reveals the Mycoviral Diversity of the Virome of an Avirulent Isolate of *Rhizoctonia solani* AG-2-2 IV. *PLOS ONE* 11(11): e0165965.
- Buck, K.W., 1986. Fungal virology – an overview. In: Buck, K.W (Ed.), *Fungal virology*. CRC Press. Boca Raton, FL, pp. 1-84.
- Chun, J., Yang, H., and Kim, D. 2018. Identification and Molecular Characterization of a Novel Partitivirus from *Trichoderma atroviride* NFCF394. *Viruses Journal*, 10: 578.
- Cock, P.J. A., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L., and Rice, P. M. 2010. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research*, 38(6): 1767–1771.
- Coetzee, B., Freeborough, M. J., Maree, H. J., Celton, J. M., Rees, D. J. G., and Burger, J. T. 2010. Deep Sequencing Analysis of Viruses Infecting Grapevines: Virome of a Vineyard. *Virology*, 400(2): 157-63.

- Dawe, A. L., Nuss, D. L. 2001. Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics*, 35: 1 –29.
- Donaire, L., Pagán, I., and Ayllón, M. A. 2016. Characterization of *Botrytis cinerea* negative-stranded RNA virus 1, a new mycovirus related to plant viruses, and a reconstruction of host pattern evolution in negative-sense ssRNA viruses. *National Center for Biotechnology Information*, 499: 212-218.
- Dönmez, D., Şimşek, Ö., ve Aka Kaçar, Y. 2015. Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojileri ve Bitkilerde Kullanımı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8 (1): 30-37.
- Eriksson, J., Gharizadeh, B., Nordström, B. T., and Nyrén, P. 2004. Pyrosequencing technology at elevated temperature Electrophoresis. *National Center for Biotechnology Information*, 25: 20-27.
- Espach, Y. 2013. The detection of mycoviral sequences in grapevine using next-generation sequencing. Thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree Master of Science in Genetics at Stellenbosch University.
- Gergerich, R. C., and Dolja, V. V. 2006. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01.
- Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., and Suzuki, N. 2015. 50-plus years of fungal viruses. *Virology*. 479,: 356–368. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.034.
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, and T., Barba, M. 2016. Next-Generation Sequencing and Genome Editing in Plant Virology. *Front. Microbiol*, 7: 1325.
- Heather, J. M., Chain, B. 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Sponsored Document from Genomics, 107(1): 1-8.
- Ion-Torrent. 2017. Ion-Torrent Next-Generation Sequencing Workflow. İnternet erişim: [http://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/iontorrent-next-generation-sequencing-workflow.html Erişim tarihi: 17.03.2017].
- Jo, Y., Choi, H., Chu, H., Cho, and W. K. 2020. Identification of viruses from 1 fungal transcriptomes. *biological-archive(bioRxiv preprint)*, doi: https://doi.org/10.1101/2020.02.26.966903.
- Kehoe, M. A., Coutts, B. A., Buirchell, B. J., and Jones, R. A. C. 2014. Plant Virology and Next Generation Sequencing: Experiences with a Potyvirus. *PLOS ONE*, 9(8): e104580.
- Khalifa, M. E., MacDiarmid, R. M. 2019. A Novel Totivirus Naturally Occurring in Two Different Fungal Genera. *Front. Microbiology*, 10: 2318.
- Khalifa, M. E., Varsanib, A., Ganleye, A. R. D., and Pearson, M. N. 2016. Comparison of Illumina de novo assembled and Sanger sequenced viral genomes: A case study for RNA viruses recovered from the plantpathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virus Research Journal*, 219: 51-57.
- Kızmaz, M. Z., Paylan, İ. C., ve Erkan, S. 2017. DNA Dizilemenin Tarihsel Gelişimi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 6(2): 47-53.
- Kreuze, J.F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., and Simon, R. 2009. Complete viral

- genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388: 1-7.
- Kulski, J. K. 2015. Next-Generation Sequencing An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications: Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges, Ed: Kulski, J. K., International Technology (InTech), Croatia, pp: 3-60.
- Maxam, A. M. and Gilber, W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2): 560-564.
- Marvelli, R. A., Hobbs, H. A., Li, Sh., McCoppin, N. K., Domier, L., Hartman, G. L., and Eastburn, D. M. 2014. Identification of novel double-stranded RNA mycoviruses of *Fusarium virguliforme* and evidence of their effects on virulence. *Archives of Virology Journal*, 159: 349-352.
- Marzano, S. Y. L. and Domier, L. L. 2016. Novel mycoviruses discovered from metatranscriptomics survey of soybean phyllosphere phytobiomes. *Virus Research*, 213: 332-342.
- Marzano, S. Y. L., and Nelson, B. D., Ajayi-Oyetunde, O., Bradley, C. A., Hughes, T. J., Hartman, G. L., Eastburn, D. M., and Domier, L. 2020. Identification of Diverse Mycoviruses through Metatranscriptomics Characterization of the Viromes of Five Major Fungal Plant Pathogens. *Plant Pathogens Journal Virology*, 90: 6846-6863.
- Milgroom, M. G. and Cortesi, P. 2004. Biological Control of Chestnut Blight with Hypovirulence: A critical analysis. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1): 311-38.
- Mu, F., Xie, J., Cheng, Sh., Pei, M., Barbetti, M. J., Jia, J., Wang, Q., Cheng, J., Fu, Y., Chen, T., and Jiang, D. 2018. Virome Characterization of a Collection of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australia. *Front. Microbiol*, 8: 25-40.
- Nanopore. 2017. Oxford Nanopore Technologies. İnternet erişim: [<https://www.nanoporetech.com/>Erişim tarihi: 17.03.2017.]
- Niu, Y., Yuan, Y., Mao, J., Yang, Z., Cao, Q., Zhang, T., Wang, Sh., and Liu, D. 2018. Characterization of two novel mycoviruses from *Penicillium digitatum* and the related fungicide resistance analysis. *Scientific Reports*, 8: 5513.
- Nuss, D. L. 2011. Mycoviruses, RNA Silencing, and Viral RNA Recombination. *Advances in Virus Research*,80:25-48.
- Nuss, D. L. 2005. Hypovirulence: mycoviruses at the Fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 632 -642.
- Li, P., Bhattacharje, P., Wang, Sh., Zhang, L., Ahmadi, I., and Guo, L. 2019. Mycoviruses in *Fusarium* Species: An Update. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9: 257
- Li, Q., Huang, W., Hai, D., Wang, Y., Xie, J., and Wang, M. 2020. The complete genome sequence of a novel hypovirus infecting *Bipolaris oryzae*. *Archives of Virology*,165: 1027–1031.

- Liu, Ch., Li, M., Redda, E. T., Mei, J., Zhang, J., Wu, B., and Jiang, X. 2019. A novel double-stranded RNA mycovirus isolated from *Trichoderma harzianum*. *Virology Journal*, 16: 113.
- Liu, J., Xiang, Y., Sniezko, R. A., Schoettle, A. W., Williams, H., and Zamany, A. 2019. Characterization of *Cronartium ribicola* dsRNAs reveals novel members of the family Totiviridae and viral association with fungal virulence. *Virology Journal*, 16: 118.
- Özkan Kahraman, Ç., Yıldız, F. 2019. Bitki Fungal Hastalıkları ile Biyolojik Savaşımında Alternatif Yaklaşımlar: Fungal Virüsler. *İzlek*, 2(1): 33-48.
- PacBio. 2017. Pacific Biosciences. İnternet erişim: [<http://www.pacb.com/>] Erişim tarihi: 17.07.2017.
- Pandey, B., Naidu, R. A., and Grove, G. G. 2018. Detection and analysis of mycovirus-related RNA viruses from grape powdery mildew fungus *Erysiphe necator*. *Archives of Virology*, 163: 1019-1030.
- Pandey, B., Naidu, R. A., and Grove, G. G. 2018. Next generation sequencing analysis of double-stranded RNAs from sweet cherry powdery mildew fungus *Podosphaera prunicola*. *Journal of Plant Pathology*, 100: 435-446.
- Prabha, K., Baranwal, V. K., and Jain, R. K. 2013. Applications of Next Generation High Throughput Sequencing Technologies in Characterization, Discovery and Molecular Interaction of Plant Viruses. *Indian Journal Virology*, 24(2): 157-165.
- Ruiz-Martinez, M. C., Berka, J., Belenkii, A., Foret, F., Miller, A. W., and Karger, B. L. 1993. DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and laser-induced fluorescence detection. *Analytical Chemistry*, 65: 2851-2858.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA Sequencing With Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12): 5463-7.
- Sasai, Sh., Tamura, K., Tojo, M., Herrero, M., Hoshino, T., Ohki, S. T., and Mochizuki, T. 2018. A novel non-segmented double-stranded RNA virus from an Arctic isolate of *Pythium polare*. *Virology Journal*, 522: 234-243.
- Shamsia, W., Satoa, Y., Jamala, A., Shahia, S., Kondoa, H., Suzukia, N., and Bhattib, M. F. 2019. Molecular and biological characterization of a novel botybirnavirus identified from a Pakistani isolate of *Alternaria alternata*. *Virus Research*, 263: 119-128.
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, Ch., Connell, Ch. R., Heiner, Ch., Kent, S. B. H., and Hood, L. E. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *A Nature Research Journal*, 321: 674-679.
- Son, M., Yu, J., and Kim, K. H. 2015. Five Questions about Mycoviruses. *Plos Pathogens Journal*, 11(11): e1005172.
- Taşar, O., Çınar, E., ve Onay, H. 2018. Hastalık Tanısı İçin Yeni Nesil Dizileme Verisi Analizi: Gereksinimler ve Bir Çözüm Önerisi. *CERU-WS.org*, 2201: 12.
- Valverde, R., Nameth, S., and Jordan, S., 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virüs Diagnosis. *Plant Disease*, 74(3): 255-258.

- Wang, Q., Cheng, Sh., Xiao, X., Cheng, J., Fu, Y., Chen, T., Jiang, D., and Xie, J. 2019. Discovery of Two Mycoviruses by High-Throughput Sequencing and Assembly of Mycovirus-Derived Small Silencing RNAs From a Hypovirulent Strain of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Microbiology Journal*, 10: 1415.
- Wu, Q., Shou-Wei, D., Zhang, Y., and Zhu, Sh. 2015. Identification of Viruses and Viroids by Next-Generation Sequencing and Homology-Dependent and Homology-Independent Algorithms. *Annual Review Phytopathology*, 53: 425-44.
- Yao, Z., Zou, Ch., Peng, N., Zhu, Y., Bao, Y., Zhou, Q., Wu, Q., Chen, B., and Zhang, M. 2020. Virome Identification and Characterization of *Fusarium sacchari* and *F. andiyazi*: Causative Agents of Pokkah Boeng Disease in Sugarcane. *Frontiers in Microbiology Journal*, 11:240.
- Zhang, Y. Z., Shi, M., and Holmes, E. C. 2018. Using metagenomics to characterize an expanding virosphere. *National Center for Biotechnology Information*, 172: 1168-1172.
- Zhu, J. Z., Zhu, H. J., Gao, B. D., Zhou, Q., and Zhong, J. 2018. Diverse, Novel Mycoviruses From the Virome of a Hypovirulent *Sclerotium rolfsii* Strain. *Frontiers Plant Science Journal*, 9: 1738.

