

Sanger Yöntemi ile küçük genomların dizilenmesi

Prof. Dr. Kahraman Gürcan

UYGULAMALI DNA DİZİ ANALİZİ KURSU

09-11 ARALIK 2024



BİLİMSEL KOMİTE

PROF. DR. SERPİL TAHERİ
PROF. DR. ZUHAL HAMURCU
PROF.DR. CEM VURAL
PROF. DR. ELİF FUNDA ŞENER
PROF. DR. KAHRAMAN GÜRCAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ MÜGE GÜLCİHAN
ÖNAL

ORGANİZASYON KOMİTESİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ ÖZGE AL
MUSTAFA AKKUŞ
FATMA DAL
REYHAN TAHTASAKAL
MERVE BAŞAR
SEMA ÇIKIN
ZEYNEP YILMAZ ŞÜKRANLI
BEGÜM ER
VERA AVCI
ÖZGENUR YILMAZ
MAİ R S ABUSALIM
DOĞA KARİPÇİN
FİLİZ BEYZA EKİCİ

KONTENJAN: 40 Kişi

KURS ÜCRETİ: 8000 TL

İLETİŞİM: 0352 4379315

HESAP NO (IBAN):

TR23 0001 0014 3964 6023

1550 01



BAŞVURU FORMU İÇİN KARE KODU OKUTUNUZ

09.12.2024

1.GÜN PROGRAM

09.00-09.30: KAYIT
09.30-10.00: AÇILIŞ VE TANIŞMA
10.00-11.00: DNA'NIN MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ VE DNA
İZOLASYON YÖNTEMLERİ - PROF. DR. ELİF FUNDA ŞENER
11.00-11.15: ÇAY-KAHVE ARASI
11.15-12.15: PCR'İN TEMEL PRENSİPLERİ VE PCR YÖNTEMLERİ -
PROF. DR. ELİF FUNDA ŞENER
12.30-13.30: ÖĞLE ARASI
13.30-15.00: DNA DİZİ ANALİZİ ve YENİ NESİL DİZİLEME
YÖNTEMLERİ - DR. ÖĞR. ÜYESİ MÜGE GÜLCİHAN ÖNAL
15.00-15.30: UYGULAMALI DNA İZOLASYONU
15.30-15.45: ÇAY-KAHVE ARASI
15.45-17.30: DNA'NIN SPEKTROFOTOMETRİK VE FLORİMETRİK
ÖLÇÜMLERİNİN YAPILMASI

10.12.2024

2.GÜN PROGRAM

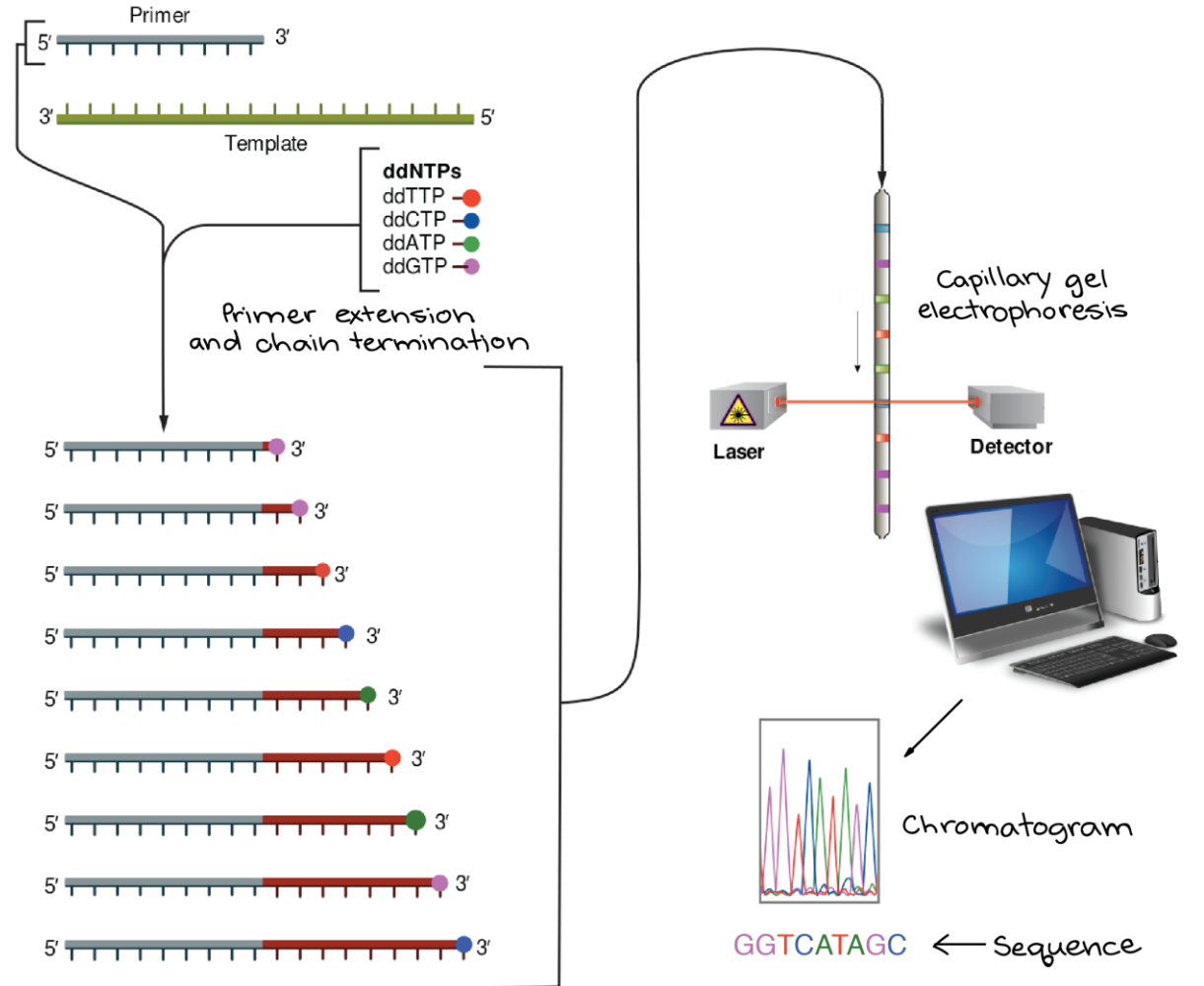
09.30-10.45: DNA BARKODLAMA PROF.DR. CEM VURAL
10.45-11.00: ÇAY-KAHVE ARASI
11.00-12.15: SANGER YÖNTEMİ İLE KÜÇÜK GENOMLARIN (Virüs
vb.) DİZİLENMESİ - PROF. DR. KAHRAMAN GÜRCAN
12.30-13.30: ÖĞLE ARASI
13.30-15.30: UYGULAMALI PCR
15.30-15.45: ÇAY-KAHVE ARASI
15.45-17.00: PCR ÜRÜNLERİNİN ELEKTROFOREZDE
DEĞERLENDİRİLMESİ

11.12.2024

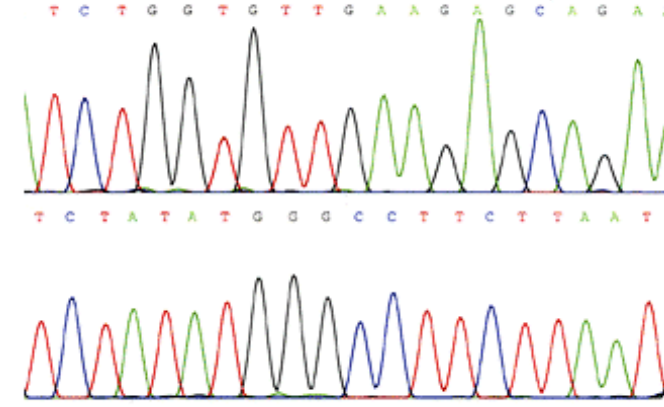
3.GÜN PROGRAM

09.00-09.45: SEKANS PCR UYGULAMASI
09.45-10.30: ACMG KRİTERLERİ VE PATOJENİTE SINIFLAMASI
DR. ÖĞR. ÜYESİ MÜGE GÜLCİHAN ÖNAL
10.30-10.45: ÇAY-KAHVE ARASI
10.45-12.00: SEQSCAPE PROGRAMININ KULLANIMI VE
UYGULAMALI VERİ ANALİZİ
12.00-12.30: KAPANIŞ / SERTİFİKA TÖRENİ

- Prensipde, Sanger ve yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin arkasındaki kavramlar benzerdir. Hem NGS hem de Sanger dizilemesinde (**dideoksi** veya kapiler elektroforez dizilemesi olarak da bilinir), DNA polimeraz büyüyen bir DNA şablon ipliğine birer birer floresan nükleotidler ekler. Eklenen her nükleotid floresan etiketi ile tanımlanır.
- **Sanger dizileme ile NGS arasındaki kritik fark dizileme hacmidir.**
- Sanger yöntemi bir seferde yalnızca tek bir DNA parçasını dizilerken, NGS büyük ölçüde paraleldir, yani çalışma başına milyonlarca parçayı aynı anda diziler.
- Bu işlem, bir seferde yüzlerce ila binlerce genin dizilenmesi anlamına gelir.
- NGS ayrıca derin dizileme ile yeni veya nadir varyantları tespit etmek için daha fazla keşif gücü sunar.



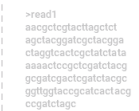
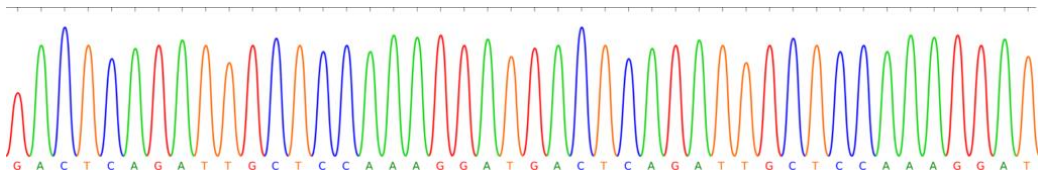
Sanger sekanslama ve NGS arasında seçim yapma



- % 99'un üzerinde doğruluk oranıyla Sanger dizileme yöntemi, temel ve klinik araştırma uygulamaları için “**altın standart**” olmaya devam etmektedir.
- Sanger dizileme **1975** yılında tanıtılmasından bu yana, yalnızca daha yeni ve otomatik yaklaşımların temelini oluşturmakla kalmaz, **aynı zamanda dizi doğrulama**, **testleme** ve **birçok filogenetik analizde** en yaygın dizileme yaklaşımı olmaya devam etmektedir.
- Sanger yöntemi, bir seferde bir DNA parçasının dizilenmesine izin verir. Bu nedenle, yeni nesil ve Sanger arasında seçim yapmak söz konusu olduğunda, **örnek sayısı** birincil ayırt edici faktör olmaya devam etmektedir.
- Çok sayıda genin (örn. 100'den fazla gen hedefi) sekanslanmasında NGS hem maliyet hem de geri dönüş süresi açısından avantajlı olacaktır.

Sanger dizileme ve NGS karşılaştırması

	Sanger dizileme	Hedefli NGS
	Sanger dizilimi, ilgilenilen bir geni sorgular.	Hedefli NGS, yüzlerce ila binlerce geni eş zamanlı olarak dizilemede kullanılır
Faydaları	Düşük hedef sayısı için hızlı ve uygun maliyetli Yerleşik iş akışı Basit veri analizi Daha uzun okumalar (500-700 bps)	Daha yüksek hassasiyet için daha yüksek sekanslama derinliği (%1'e kadar) Daha yüksek keşif gücü Daha yüksek mutasyon çözünürlüğü Aynı DNA miktarı ile daha fazla veri üretilir Daha yüksek verim
Zorlukları	20'den fazla hedef için maliyet etkin değil	Düşük hedef sayısı (1-20 hedef) için pahalı Düşük hedef sayısı için zaman alıcı (1-20 hedef) Kısa okumalar (150-300 bps)



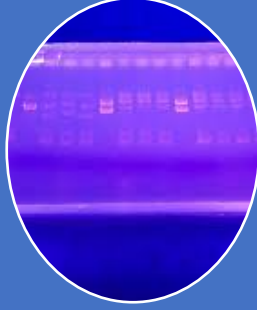
Sanger dizilemenin aşamaları



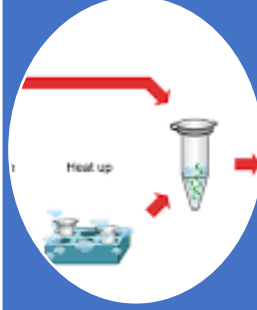
1)
Örneklerin
muhafazası
ve
DNA/RNA
izolasyonu



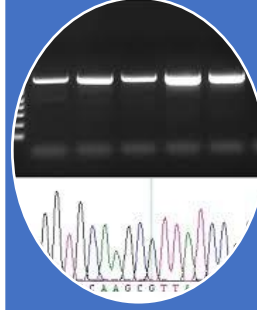
2) PCR



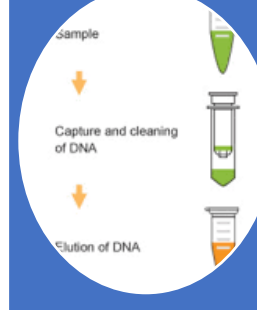
3) PCR
ürünlerinin
agaroj jelde
kontrol
edilmesi



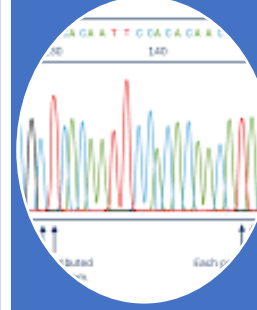
4) PCR
ürünlerinin
saflaştırılma
sı



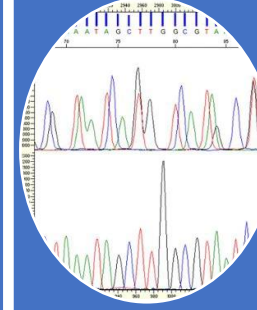
5) Sekans
PCR'ı



6) Sekans
PCR
ürünün
saflaştırılma
sı



7)
Sekanslama
işlemi



8) kalite
kontrolü/kro
matogramla
rın
yorumlanma
sı



Örneklerin Muhafazası

NA dizilemesinin başarılı olabilmesi için uzun, bozulmamış ampikon (hedef, şablon) DNA iplikçiklerine ihtiyaç vardır.

Çok sayıda yayın ve ticari ürün el kitapçıları doku tiplerinde yüksek kaliteli DNA ve RNA ekstraksiyon protokolleri sunmaktadır.

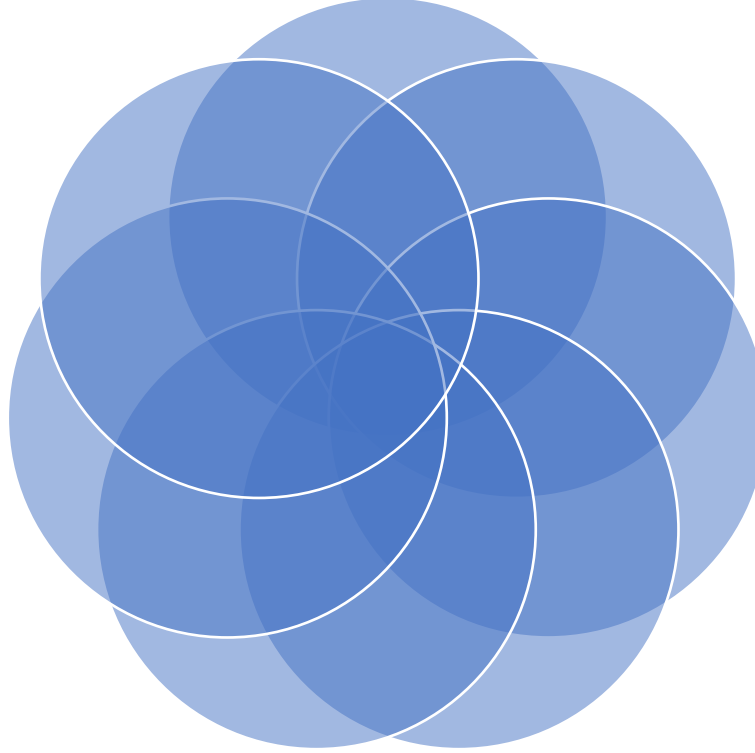
Özellikle bozulmaya daha yatkın olan RNA hedefleri için kaçınılmalıdır.

Çürümüş veya aşırı ısıya maruz kalmış materyallerinden veya NA'ları bozar.

DNA'nın veya RNA'nın ekstraksiyonu ve cDNA'ya dönüştürülmesi, dizi analizi için zorunlu olan yüksek kaliteli DNA şablonunun sağlanmasında kritik öneme sahiptir.

Bu nedenle, süreç boyunca örneğin uygun muhafazası, bozulmamış DNA ve RNA'nın korunmasını ve ekstraksiyonunu hedeflemelidir.

Örnekleri saklama süresi ve sıcaklığı, geri kazanılabilecek DNA ve RNA'nın stabilitesi ve kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir.



Benzer şekilde, primer tasarımı sekans analizi için üretilen hedefin (DNA veya cDNA amplikonu) kalitesini ve miktarını önemli ölçüde etkileyeceğini akılda tutmak önemlidir.

Çevrimiçi açık erişimli primer tasarım araçları

NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>;

IDT, idtdna.com;

Primer3, <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>;

Primer3plus, <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) ve

ticari primer tasarım araçları

Geneious, <https://geneious.com>;

DNASTAR, <https://dnastar.com>;

CLC Main Workbench, <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-main-workbench/>

PCR ve amplikon kalitesi

Sanger sekanslama için gönderilen hedef DNA genellikle PCR veya rtPCR ile elde edilen bir amplikondur.

Optimum sekanslama sonuçları için, hedef, jel elektroforez prosedürü ile doğrulandığı üzere tek bir ürün veya bant sergilemelidir.

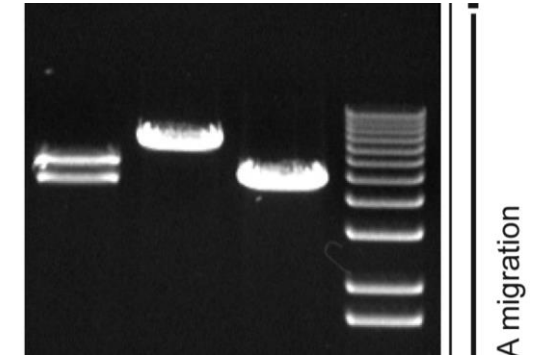
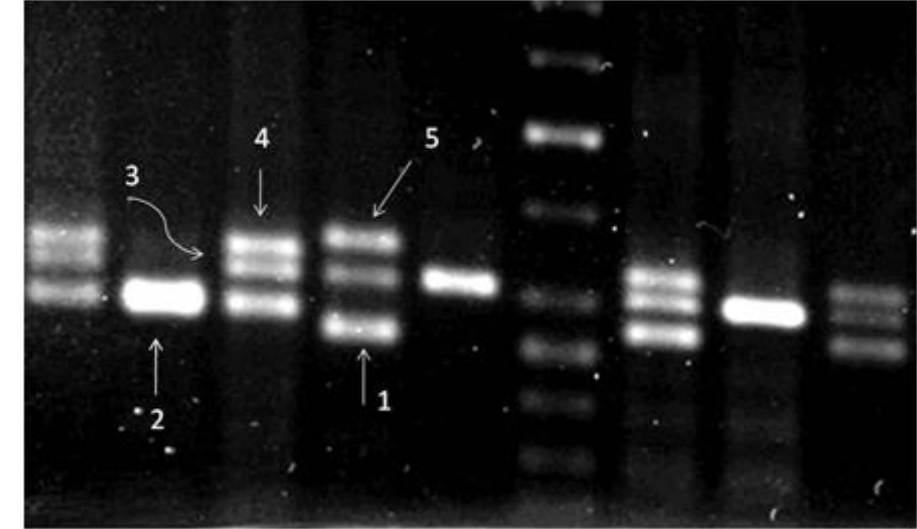
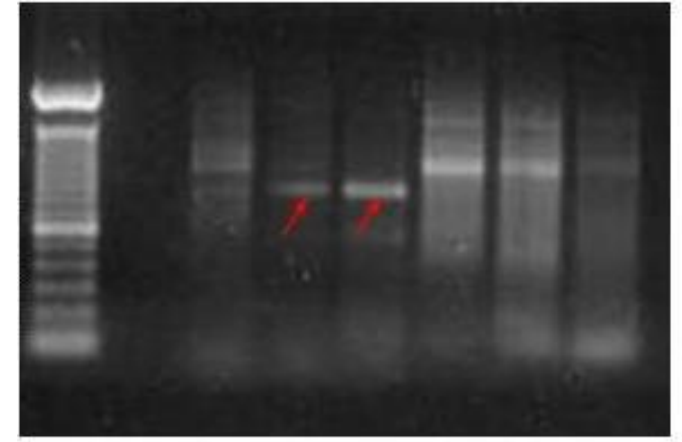
Homojen bir ürünü gösteren tek bir “bant” mevcutsa, amplikon saflaştırılabilir ve sekanslama için kullanılabilir.

Birden fazla ürünün olduğu PCR reaksiyonları için, öncelikle ilgilenilen benzersiz bant izole edilmelidir.

İlgili tek bandı izole etmek için çeşitli jel saflaştırma yöntemleri mevcuttur.

Çoğu durumda, belirli bir primer çifti kullanılarak PCR reaksiyonunun tekrarlanması sorunu çözecektir.

Orijinal şablon konsantrasyonu çok düşük olduğunda, seyreltilmiş multipleks PCR amplikonlarından tek hedefin yeniden çoğaltılması genellikle dizileme için istenen konsantrasyonu sağlayabilir.

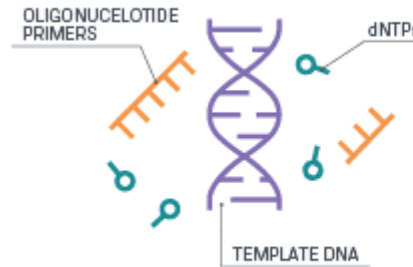
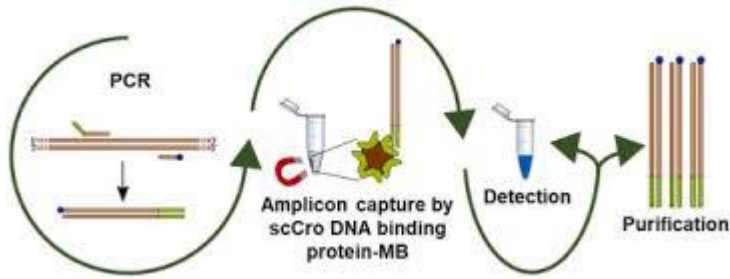
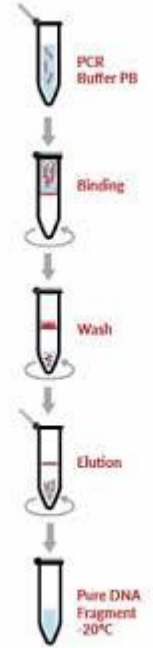


Amplikonların saflaştırılması

Sekans analizinden önce, **dNTP**'leri, **polimeraz enzimini**, **bağlanmamış primerleri**, **tuzları** ortadan kaldırmak için DNA veya cDNA amplikonunun saflaştırılması yapılmalıdır.

Bu PCR ürünü saflaştırma adımı için **boncuk bazlı**, **kolon bazlı** ve **enzimatik yöntemler** dahil olmak üzere çok sayıda seçenek mevcuttur ve bunların tümü ticari olarak mevcuttur.

Temizleme kitleri bir çok ticari şirket tarafından sunulmaktadır.



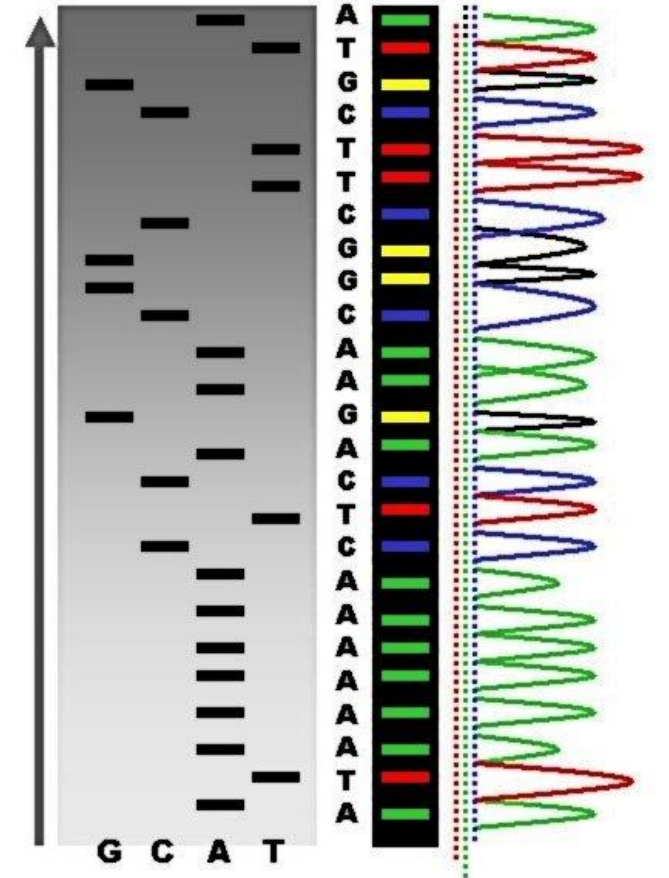
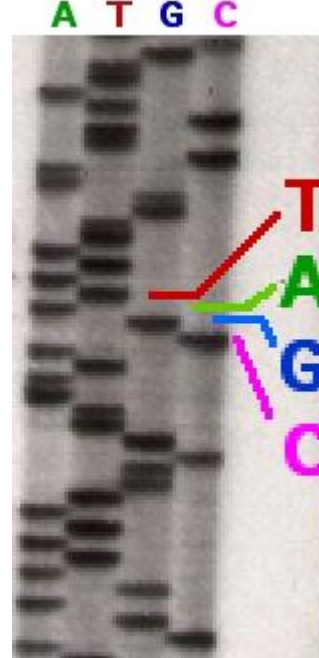
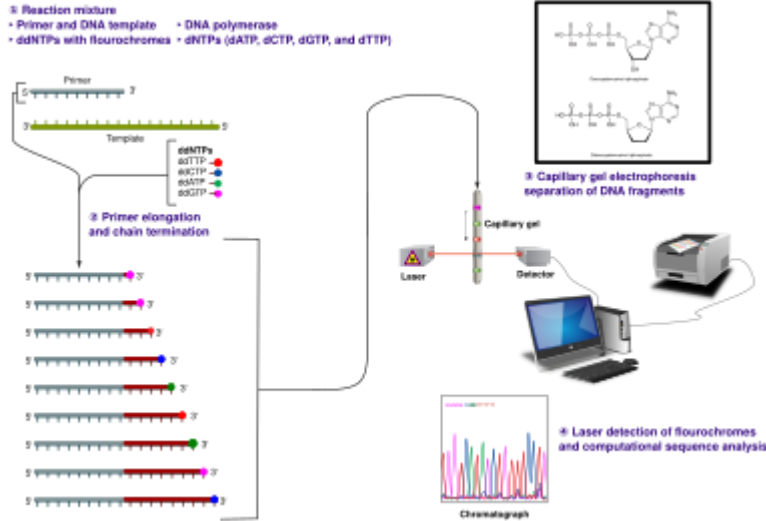
- NA'nın miktar tayini ve saflığı tipik olarak spektrofotometrik analiz veya ultraviyole floresan etiketleme ile değerlendirilir.
- Spektrofotometrik ekipman (örn. **NanoDrop**; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE)
- veya bir indikatör boyanın interkalasyonuna dayanan **florometreler** (örn. Qubit; Thermo Fisher Scientific) yaygın olarak mevcuttur.
- Ultraviyole dalga boyundaki ışığın (260 nm) absorpsiyonu doğrudan örnekteki NA konsantrasyonuyla ilişkilidir.
- Saflık değerlendirmeleri ayrıca kontamine edici proteinlerin varlığını tespit etmek için de kullanılır.
- Proteinler, özellikle de aromatik amino asitler tarafından en yüksek ışık Emilimi 280 nm dalga boyunda gerçekleşir;
- numunenin 260 nm/280 nm absorbans oranının hesaplanması sekanslama hedefinin saflığını sağlayacaktır.
- DNA numuneleri için 1,8 veya üzeri bir oranın optimum olduğu önerilmektedir.
- Örneklerde hesaplanan düşük oranlar, ekstraksiyon işleminden sonra kalan artık proteinin veya optimum olmaya NA konsantrasyonunun bir göstergesidir.
- **260 nm/280** nm oranının hesaplanması bir protein çözeltisindeki NA kontaminasyonunu ölçmek için değerli bir yaklaşım olsa da, bu yaklaşımın NA çözeltilerindeki protein kontaminasyonunu ölçmek için yeterince hassas olmadığı unutulmamalıdır.
- Ayrıca **karbonhidratlar, fenol, guanidin ve glikojen** gibi diğer kontaminantları kontrol etmek için 230 nm dalga boyunda ölçümler yapılması önerilmektedir.
- **260 nm/230** nm oranı hesaplamaları için en uygun değerler 2,0-2,2'dir.

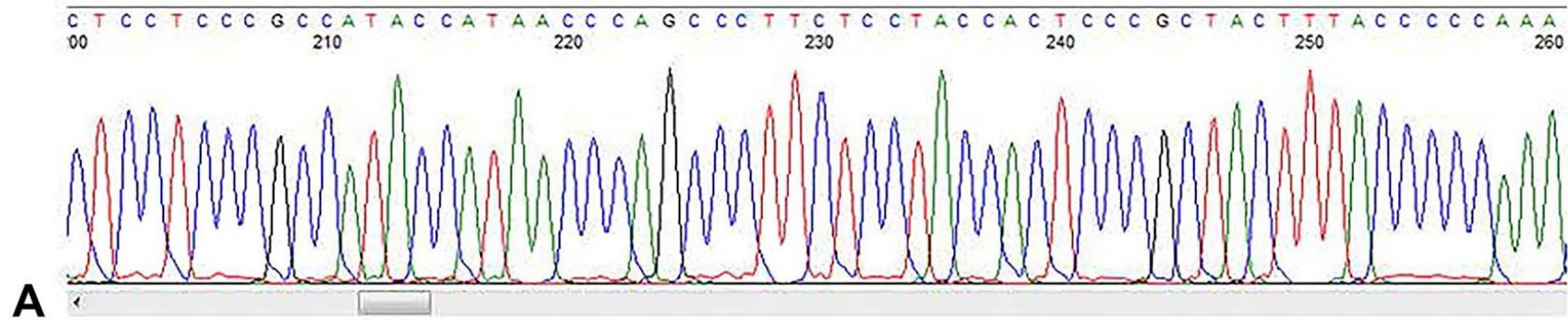


Sekans PCR'ı : kullandığınız kitin el kitabına bakınız

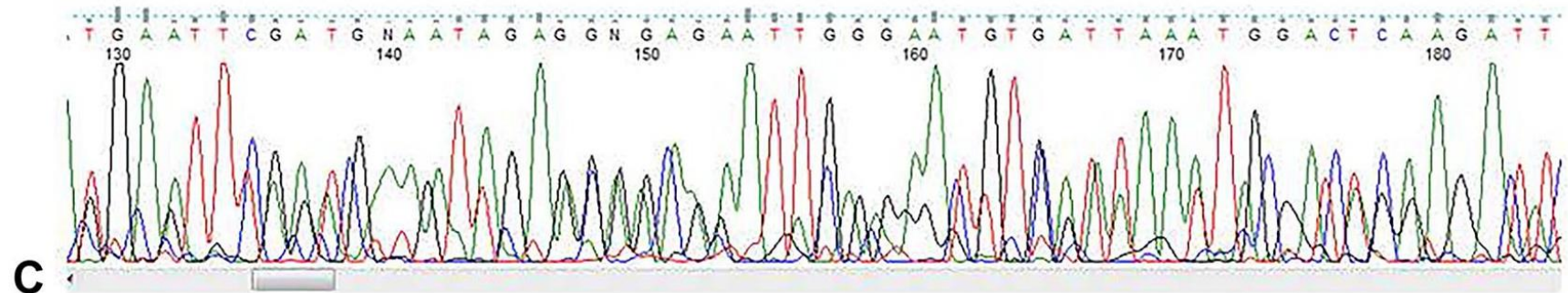
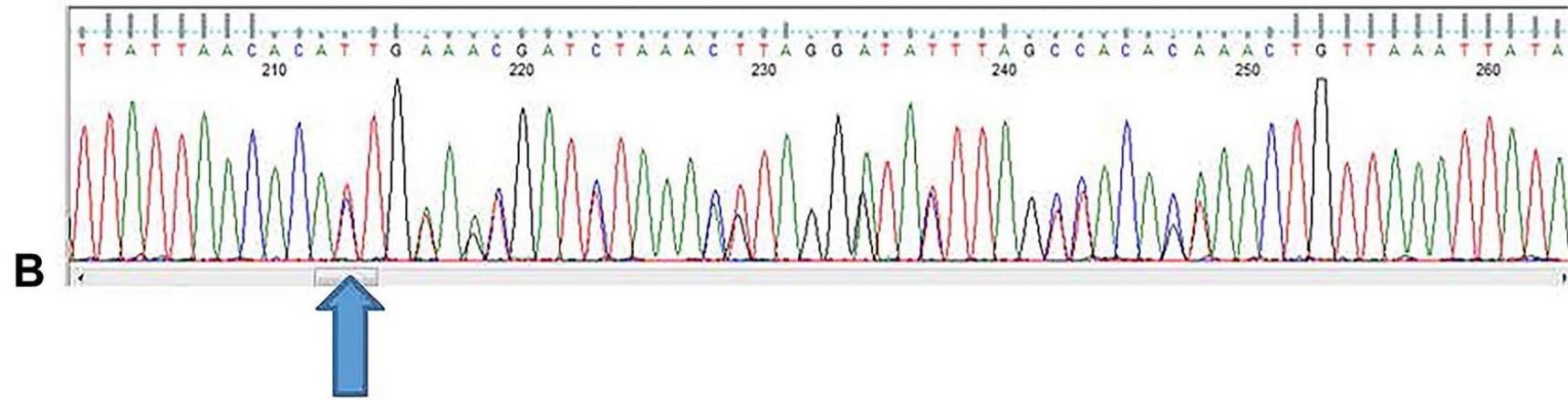
Sekans PCR ürünün temizlenmesi

Sekans cihazına yüklenmesi





Sekansda kalite kontrolü



Çalıştığımız organizmayı tanımamız lazım

Virüsler

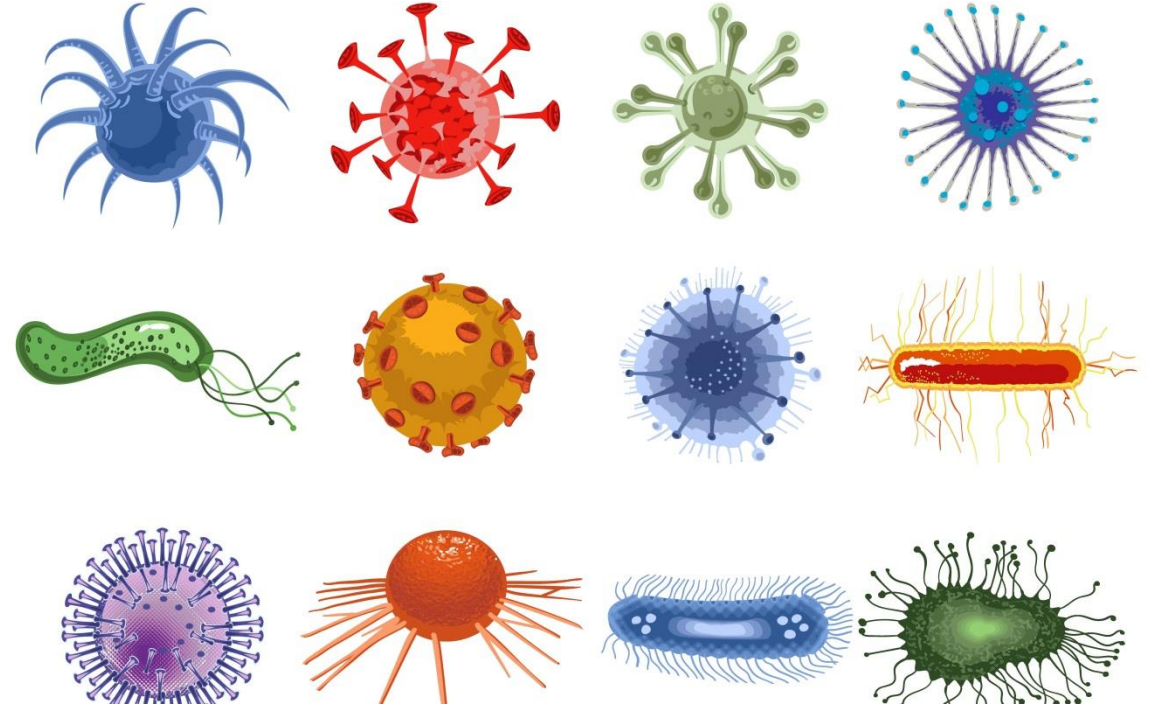
Bir virüsün genomu, tek sarmallı (ss) veya çift sarmallı (ds), doğrusal veya dairesel olabilen DNA veya RNA'dan oluşabilir.

Genomun tamamı ya bir nükleik asit molekülünü (tek parçalı genom) ya da birkaç nükleik asit segmentini (çok parçalı genom) kaplayabilir.

RNA Virüs Genomları

Tüm virüslerin %70'ini oluşturan RNA virüsleri genom yapısı bakımından oldukça çeşitlilik göstermektedir.

RNA replikasyonunda yer alan enzimlerin hata oranı nedeniyle, bu virüsler genellikle DNA virüslerinden çok daha yüksek mutasyon oranları gösterir. 10^{-4} 'lük mutasyon oranları, yeni konakçılara büyük bir uyum yeteneği gösteren virüs varyantlarının sürekli olarak üretilmesine yol açmaktadır.



Virüs genomlarının sanger dizileme yöntemi dizilenmesi

VIRUS RESEARCH 290 (2021) 190911

Contents lists available at ScienceDirect

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres

Molecular and biological characterization of a new mulberry idaeovirus

Kahraman Gürcan^{a,*}, Sibel Turan^a, Saffet Teber^a, İlyas Kılınçer^a, İbrahim Uz^a,
Lucie Tamisier^b, Sebastien Massart^b, Kadriye Çağlayan^c

^a Erciyes University, Genome and Stem Cell Research Center, Department of Agricultural Biotechnology Kayseri, 38280, Turkey
^b Plant Pathology Laboratory, TERRA, Gembloux Agro-Bio Tech, ULiège, Belgium
^c Mustafa Kemal University, Plant Protection Department, Hatay, 31034, Turkey

ARTICLE INFO

Keywords:
Morus nigra
Idaeovirus
BMV-1
Mulberry diseases
Seed Transmission

ABSTRACT

A virus-like disease with symptoms including mosaic structure, deformation, vein clearing and necrosis on the leaves and deformation, crumbling, and scab on the fruits was detected in black mulberry trees (*Morus nigra* L.) in Kayseri province of Turkey. A novel positive single-stranded RNA virus with a bipartite genome and the mulberry badnavirus 1 (MBV-1) were detected in the black mulberry trees by high throughput sequencing and bioinformatic analyses. The novel virus RNA1 (5,796/7 nt) encodes a polyprotein (1,808 aa, 204.31 kDa) with three conserved domains, [MTR (aa 294–705), Hel (aa 971–1,226) and RdRp (aa 1,348–1,788)], whereas RNA2 (2,243 nt) encodes two putative proteins, MP (374 aa, 40.98 kDa), and CP (272 aa, 30.59 kDa), separated by an intergenic region of 97 nt. The highest amino acids identities were 70, 57 and 70 % with raspberry bushy dwarf virus (RBDV) for ORF1, MP and CP genes, respectively. The genome organization and phylogenetic analyses suggested that the novel virus is likely a putative new member of the genus *Idaeovirus* and it has been tentatively named black mulberry idaeovirus (BMIV). Virus survey showed both the BMIV and MBV-1 are likely prevalent in the region. Seven complete (six Turkish and one Iranian) and 41 partial genome sequences of the BMIV isolates revealed moderate genetic diversity (0.033 ± 0.001 %, 0.020 ± 0.002 % and 0.016 ± 0.002 % for RNA1, RNA2, and partial genomes, respectively). Both the BMIV and MBV-1 were detected in all tested pollens ($n = 24$, 100 %), in seed-borne black mulberry saplings ($n = 96$, 100 %). This situation clearly revealed the potential spread risk of both viruses in black mulberry plantations and the necessity of taking precautions.

1. Introduction

The genus *Morus* comprises 10–16 species of deciduous trees number $2n = 308$, the highest number recorded for any known species (Basavaiah et al., 1990). Black mulberry is a long-living tree crop (Orwa et al., 2009). In the 1930s, the oldest tree growing in England, UK, was



Türkiye'de asırlık ekşi karadut ağaçları



Ekşi karadut meyveleri



Türkiye'nin ekşi karadut yoğunluk haritası.





Ekşi karadut ağaçlarında görülen bu hastalığın etmeni nedir?



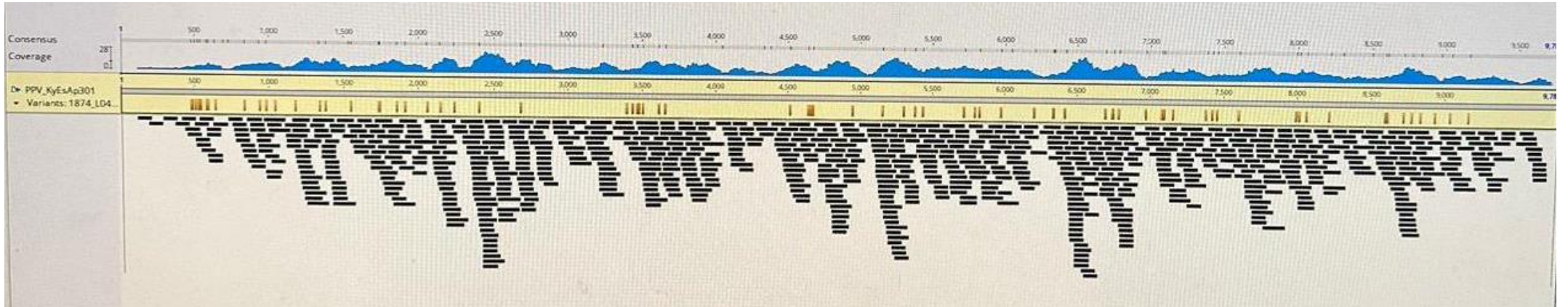
- Tüm genom dizileme için örneklerin alındığı bölgeler.

Hastalık etmenin bulunması ve genom analizi

- 1. Yeni nesil dizileme ile olası etmenin belirlenmesi
- 2. Olası viral etmenin yaygınlığının belirlenmesi
- 3. Altı izolatta tüm genom analizleri

1. Yeni nesil dizileme ile olası etmenin belirlenmesi

- KYS-2 numunesi için HTS kütüphanesi TruSeq ile hazırlanmıştır.RNA Örnek Hazırlama kiti (Illumina, ABD) ve Illumina Hiseq2500 platformu (2 × 150 nt okuma uzunlukları) kullanılarak sekanslanmıştır.
- KYS-2 karadut ağacı için 150 nt uzunluğunda toplam **10.726.136** okuma elde edilmiştir.
- Düşük kaliteli ve yinelenen okumalar çıkarıldıktan sonra, örnek için **5.010.248** benzersiz eşleştirilmiş okuma elde edilmiştir.
- Benzersiz okumaların de novo montajı 250 nt üzerinde **67.948 kontig** vermiştir.
- Genbank Virüs tabanı ile balast edildiğinde, viral homolojilere sahip **21 kontigin** varlığını ortaya koymuştur.
- İki kontig, RBDV'nin RNA1 ve RNA2'si ve diğer bazı Idaeovirus üyeleri ile orta derecede benzerlik göstermiştir ve bu nedenle RNA1 ve RNA2 olarak adlandırılmıştır.



RNA 1 contig (5796 nt), ortalama 4414 × kat kapsama alanı ile 99.763 okumadan oluşturulmuştur.

RNA 2 contig (2443 nt) 147.861 okumadan ortalama 27.776 × kat kapsama alanı ile oluşturulmuştur.

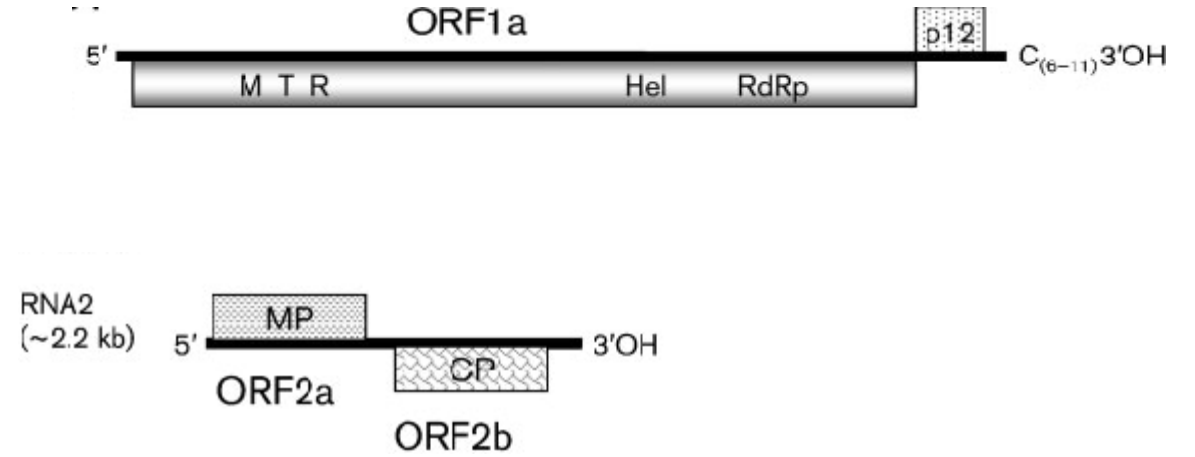
RNA1 ve RNA2 okumaları toplam RNA okumalarının yaklaşık %2,3'ünü oluşturarak genomun tamamının kurtarılmasını sağlamıştır.

Yeni virüs:

RNA1 (5.796 nt), üç korunmuş alana [MTR (aa 294-705), Hel (aa 971-1.226) ve RdRp (aa 1.348-1.788)] sahip bir poliproteini (1.808 aa, 204,31 kDa) kodlarken, RNA2 (2.243 nt) iki varsayılan proteini, MP (374 aa, 40.98 kDa) ve CP (272 aa, 30.59 kDa), 97 nt'lik bir intergenik bölge ile ayrılmıştır.

En yüksek amino asit özdeşlikleri ORF1, MP ve CP genleri için ahududu çalı cücelik virüsü (RBDV) ile sırasıyla %70, 57 ve 70 olarak bulunmuştur.

Genom organizasyonu ve filogenetik analizler, yeni virüsün muhtemelen Idaeovirus cinsinin varsayılan yeni bir üyesi olduğunu göstermiş ve geçici olarak **karadut idaeovirus (black mulberry idaeovirus-BMIV)** olarak adlandırılmıştır.



Karadut ağaçlarında iki parçalı genoma sahip yeni bir pozitif tek sarmallı RNA virüsü yüksek verimli dizileme ve biyoinformatik analizlerle tespit edilmiştir.

- ATTGCCCAACTTTACACTTTTAGTTCCTCAAGAGAGTGACGTGTGAAAGTTTCTCCTTGGTAAGTCTACTCGCTACGGACTTTGTGTTTGGAGTTGTTGTGAATGTCGAGTTGTGTGGTGAACGTGAAGTCTACTACTCCGATGTCGGGTTGCTTCATGATTGTGTGGTTTCGAGTCTTGGCTGGTGAGGACCGTGATAC
CTACAGTATTTGGGTGGAGCGCTGTTTAGAGACACGGAGCTTCCCTCAGTGGGACGCAGACTTTGACTCGTTCATCGAGGAGTCTGGTATTATGCTGTGCGGAAAAAGACTTGAAGTCGTAATTTCTCGGGCAATTTCCCCATTAGAGTGGTGAAAAGGATGGGTTAATAGCTCATTTCTTACCCGGAACGTATTCTGGGCAC
GTCAATGCCGATCTCCACGATGATTGGATATTTGGTGATGCTTGGTTGGATTGCGTCGGTGGTGGTTCTGATGCTTCCAATCTTGACTGAAACTGTAGTTTCGGTACCGCAGCAAAAGTGCTATTACGATTGCATAGCCGTTGAGTCCCTGAAGAAGACTCTAAAGCGGTACATGCGGTTTGTGTTGAGCGCTTGAAGAGACT
GTGGCAACCCGAAGTACGTGGTGACAGTGAAGTTGGATTATGTTTGGATTCCGCTAATGCTTTTATGAGCGGTGCTCTATTAAGAGAGCTTTTTTCCCTTGCAATTTCTCTGTGCGACGAATGAATCCGTGCGGCATTATATCTCATTTTACCTGGGACTTGTTGCGGCTCAACCGTAGGTCTACAGAGTATGATCATTTA**TACGGTTTG**
TCCGTTTCTCTGCTGAGTTTGACACTCGTGTACGGAGATTCTGTGAGAGAACTTTAGTTGATCCACCTCAGGTGTGCTCAACTGATTAATGTCAATTCGAGATGAGTTAGACGTTCTACTGTTGAGAGATAACAATTAATTAAGTCTCTGTGCTCAAAAATGCTGTAGTGAAGCATGAGAATTTAGGGGATCATTT
CCACGTTATGAGCTCCGATTTACTCAAAATGTGACCGGTCTCATAATGTCGAGCTGCCCATAGGTTGCTGGAACCCAGCAATTTGTAAGATGGTTTTCCGTCGATGCGGTATGATATCGGTGGGAAGTGGTATTTCACTTTCGTTATGGAAGGTCTAATGTCATAGTTGTTGTGCTTTGTGGATTTCGAGATAACGA
AAGACAGACTCATCGTCTCACTATGTGTGAGACTCTAATGTCTGGTTAAGGAGGAGGTTGCGGGCTACCATAGATGTTGACGCGAATCCCACTCGTCGAGAGCAAAACAGTATGAGAGAGTTGCGGTGCGTTGGGCTGTAGATCCCGTGACCTAACTCGTGCTATAAGCGCATACAGGATGGTCCACGGAACATTCTGT
CACCATGCATTTGGTGAAGAGTTTATCCCGGAGTCTTCTGGGACAAATCCGACTACTGTGCTCTGAGTGAAGTCTCCAAGCCGCGATGGCTTTAAAGCTAAATACGCAATTATGGTTCATCCGTTATGATTACCGGTACAAAACCTTATTGTGGAATGGTCCAGCACGAAGTAATGAATTAC**GAGGTACTATGATTGCT**
GACCGAGCGATGTTAGTCGCTGATGCCGGTTATATTCTGCTTTAAATGCCATTGGCATAAAACCAAACTCGAAATTTGGTTTGCTTTAGAGATGATTGCATATGGGTACAAAGCAGATTGGAATAATACTCTAAGTACTTAACCTCTACTGTTATAAACTTTGGAAGTAATACTTTGTGATGGAAAGAGATAAATACCGTCAT
GGTGTTTGACCTATTCTGTAACTAAGTGTCCGGCTTATAAAGCAAGGGACTCATCTCTATTCCACAATGCTTGGTTCCAAGAAATGTACGATAAGTACATAATGAAAGTTCCTCACGTAAAGTGAAGGACTTAACCGGGGACCCAGGTTCAAGTTGAATGTTCTGAGGAGCGTAGTAACCTCGCGCAAACTAATCGATCG
TGTGATTGAGGTTTGTGTAGGGGGCGTGAAACCGGTTTGTTCATAAATTTGGATGAAACCACTCATATTGAAATCTGAAGATAATCAGAATCATTTGTTAAGCCATCACAACTTTAGTTTGAATGGAGCCACCATAATACGCGAAGAAGCTATCCCTTTAAGGATTTTTCGCTATGTCCGTGACAATTTATTTGAAATAT
TATTGACAGGTTAAGAGCTATGCTCTTTCCGTGGTTTCAACTAGGTTTCGACGTCAATTTAAGCGGCGAGTTGGTGTTCTTCTGTTAAATATGATTTTGGAAAACTTTAGGTTTCTCTGTTGGGCTTTACAAAGTTTACAAAGTTTACAAAGTTTCCCTCATAAGGTTGAAGGATGAAGTGAATTAAGATTTATCAAAACCCGCGGTAG
AAAAAATGACTGTTCTGGAACACGCTCTTTTAAAGACTCATATGTCGACTAGTCTCTACATTAAGAAGTATTAGACACTCAGTTTTCTTCAACATTTAGAGCTATAGGTTCTAAGAAGTCTGAGGAGCGGTCCGAAATGAGAGACAGAGTCTGAACAACTAGATATGGTGTGAGTGAAGCAATCACTACTCGCAGATT
GAGGTGACCGCATAAAGAAAAAATGCGATCGTATCTTGAAGCTTATCTAGCCACTGGTAAGTCTGCGGCGGTTATTGAACGACGCAGAAAACTGGGGCTTTATGATAAGAATAAAAACTCTGGGCTCAAGAACCCGTTGAGTTTTCCCATGAAATGGGTGGAACGGTGAAGAATTCACCGTTTGTGATTGGAACGGCG
CATACCTGACTTTAAAGGTAGGTATTGGTAGTATCCGATAGTACTGCCATTATGACCAATTTAAATTTGGGAAGGAAGTACAACCAACCCGCGGAACACGGTACCTAAGGTATTGTTAGTGGATGGGTTACAGGATGTGTTAAACTACAGAAATCATAAAACGTGTCAAACCTGGAATATTAAATCTCAGTGTGTTGAAGG
CAACGTTTGGAAATGAGAAAGAAGTACCACATTGACAGTTAAGGATATCAGAACCGTAGACTCTTTCTATTGAAACCTCATACTAAGTATAGGAGTGTTCATAGATGAGTATGTTTAGCTCATCCGGATTCTGTTATTGGCTATGCACCTTAGTGGTCTAAGTCAGTAACTTTATTCGGTGATTCTGAACAAATACCT
CTGCAACAGAGTTGCTGACTTCAAATTAATTTTGAAGCATAGATTATGTGATTTCCCTATGAAGGGAATCAGGTGCGTTACTTATAGGTGCTCTCAGGATATAACGTTGATACTACAAAAGTTGATAAACGAAAACCTATTCTGACTGTTTCGACCGTTGAAAAATCTATTACCATCAAATCTATCCGGAGTGAATGTGAC
ATTCTCTCCCAATAGCTTTAGGGTAGCGTATTATACATATGCATGACAAAAATGATGAAGACCTGTAAAGTTAAGATGGGCTAAAGAAAGATGCAGTTCCGAAGTGAGAACGGTTATGCGGCTCAAGGTTTGAGTTATCCGAATGGGTTTACTTCCGCTTAACCTCGAACGGATAATGATTATTACATCCAAGCGAATC
GCTTATCATCTGGTTGCTATCTCAGGACACTAAGTTTAGTTTACTGCTACCTAACCAAGCAGGACCTCAGATTTTCACTAGCTCCCTCAAGGAAGCTTCAAAGTGTCAAAGAGTGTGCTGAAAGTGTGTTTCCGGAAGTCAAACTAAGTCAAGTTCCGCTCAGTGGG
TGAGACTTCTGCTCTGTTAAGGAAGCAGCAGCTAATTAACCTTACTCTAGTGAAGACACTTTACAGTGTCTACTATTCCAGAGTCCGGTGTGGTACCGGAACCAAGGAAAAAGTACTATAACCAAGCAGCATTTAGCTGCCATTGAGAAATTAACCTCTGGTAACCATAGTATTGATCTAGTGTGTTGGATGAAGCGG
TGGAATGGGTCCTATGAGTTTGAATTGGGAAAACTCCGTTGGGATATGTCTAAAATATCACCTCGTTTGTGTCGAATAATAAATTTGCTGTACCACTTTGCCAACCGGAGCTTGCTTAGAAGAAATACCAGCAGCAGGCAAGTAGGTTTGGCTATCGAGAAACGCAACGCAACGCTCTAAATAGTCAAAAAACCTTTGAC
TTAGAAAAGGTTGCGTTGGACGCTGTTGACAAGTTTTTCGAACTTTCTGTGGATAAGAAAAAGTTTTCTCAACTACCTTCAGGTAAGTTGGGATCAACTGAGCAACAAATTCAGTTGTACCAGAATAAACTGGTAATAAGGTAATGATCCCGTCTCGTTGGCGTTAACGCCATTACAAAAATATCATCATATGATAAAAGAGA
CGTTAAATTTGCCTTAACGTATGCCGCACAAAGTGAATACACCAAGCGGTACGATAACTTACCATAAACCGAGATTACCCAAATGCTACTGCAATATTCCGTTCAATTCAGACTCGATTATTAGCTTGCAAAAAGAAGTTGCTAAATATACCTTTGGACCATGATAATGATCTTAGTGGTTATTGTAGTACCTATCATTTGGGTTA
GTGAAAAATAATCTTTCACTGAAATCGATTTTTCAAATTCGATAAGTCTCAGGGTGAAGTACACCGACTTATTCAGGATTATATCTAATAAGATTGGTGTGATCCAGAGTTGTGTCCTCTGGTCCACAGCGCACAGAAGTTCTTATTTACGACCAAAATGTCGGTATTAGTTTAAACAGTATTTCCAAAGAAGAAGTGG
AGATGCGTTTACATTTATGGGAAATCCTTAGTGACTGCAGCTATGTAGCTTATGTCTAAGTAAGGAAGACGAAAAAGAAATTCGTTATATCTCATAGGAGGAGATGACTCTCTCATTTGTTCTTATGGTCTTATCGTCCCATAGAACCATTTGTCTGACATATTAATATGTCTGCAAGTTGATACAACCTGCATGCCCTTAT
TTCGCTCCGAGATCTTATCAGGAGAGGTGCGAAATTTGTGCGTTCCGAGCCATAAGTTACTTGTAAAGATGGTGAGGAAGACATCTCTGACATAAAGCTTCTGTAGAGAAATTAGAACAAGATGGCAGGATGGCAGATTGCCAAATCTTAAAGACGATGAAGTTAAAGAAAAATGAGTATTTCTGTTCAGGCTCGCTA
TAATAAAGCGCGCTAGTTTATATTTCGGCTTATTGTACTACTATGTTGGGCTTATCTAACAACCAAGAAATTTCTCAGTTTATACAGTATGATCGGAAACTTCTAATGAAATTAGAAGGAATAAAAGATATCGGATTTACTGTGAAGTCTTATTAGACTCAAGTTTTCTTAGTAATCTTCTATGATTAATCAATTAATGAGTAITA
TATTGTTTAAATATATAAACTGTCCTCTATTATCCAACCTCAAAAAATGAGCTGGGAGAAAGAGTGTTCAACTATAAAGTTCTGAAATGCTTCAATCAGAGGTAGAGACTATTATGATGCAAACTCTCGTTACGGGATTTTACCCAGTAATTTACTGGGTTAACTAGCTTAAAGCTAGTGTGTTGCTGAGCAAAACCC

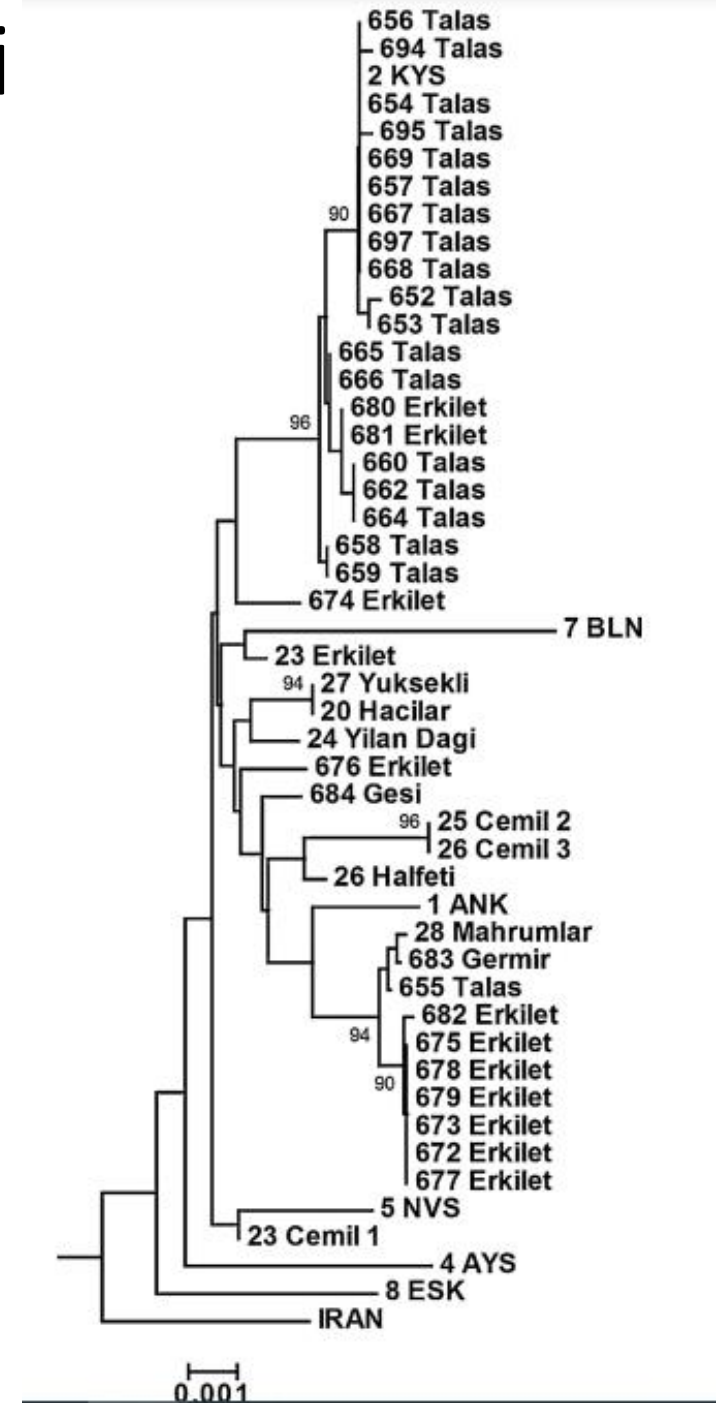
- ATATATTTTTTTCACGGTTAGATCCTTGATAACACGCGCACTCACCCTCGGCCATAGCGTGTTTGTA
- CTTCGCGATCCTTTGGTAGATCGCAAGGGCTCCAGTTTAATGGCGGCTTCGGGTCTGCTAGGAAGAATAAG
- CTGGACTGAGATCCCCCGTTAAGTCTTCCTCAAAATGAGCAACTCATACCTAGATAGGAGGGGTGTTGA
- GATAACACTAGGACTGACTTAATGTATGCGCGCTAAGACGGCACTCAAGGAAGATAAGCTCTTAGAGTCTCA
- TGAGAAACTCATTAGGAAGACTCGCACTGCGATTCACTTTAACAGGCTTTTAATAGCTGTTATCCCCGCT
- ATCTTTTTTGATTGCGGTAATCCGGTAGATTGCGGTACGTATATTGCGTAAACGTAGGGTACTCAGTACC
- ATTTGGGTGAAAACCGCCTTTCATTAGATGATTGCGGCTACCCGATATCCTTGAGGGAACTTATCTA
- TAATTCAAATAGAAAACTTTTTCAGGTGACAACGGTGAGTTAAGGGATAATTTTTTATCCAAGGCACAC
- TTAATCCTCCAGTTTCTCGGTGTTCCGTTTAAACGGAACCTACTGTGATGGGTGATAACCCAGAATATTG
- AGTCAGTGCTTTAATGAGTTCAGAAATTTCTGTTCTTGTATTAATTTCTTTTAAAGTAATCAACATGT
- TAGGAAGCTGAATAGAGCACTAAAAGTGCTGTAATTTAAAGAAGCAAGATGCTTCTTTTAAAGCTTTC
- TTAATACGTGGCTTAAAACTTTGATAGAGAATATTGGAATAATCAATCTCTAACCATATACCTCGCCC
- GACGTCAGAAATCCATTAGACTATTTCTATTGGGTGTGCTCTCCTGAGAATCTTACAAAGAAGATTC
- CGTTGTTTCCATTTTATTGAAAATAAATGTAGTCGGAGGAGCTATAGCCGATAAAGGCCGTGTAGACTATC
- CTGGGGTAAACAGGTTTAATTTAGACTATGAAAGTAAGTCAAGTATCAATCAGTACGCTATTGAATGA
- CAGGAAATTCCTCCGTTCTTCCCATTTGTAAAGGAAACTTCCACTATAAATTTTGACTTAATTTGTCAT
- TGTAACACTTTGCGTTTATAAAAAATATATCCTTGTTGATTAATTTGACCATTGTTTAGCGGTTCCCAATC
- ACGGTCGTGGCCTACTCCCTGGTGAAAGGAGTACCGCGTAGCAGTAGCTGACAATGCTTTGGCTGCTC
- GTTACCTATTGTGAACCAAGGCGGTTTAACTGCTGAAGGTAAAGTCCATTGGTGAGTGTTACTCTTTTG
- ATAAATTCAGAGATTTAAGAAATTTTCCAAGAAAACCAATAGTTTCTTTGGTGAAAGCGAGCTCCTA
- TGCGGGAAGGACACGCCGGGCGACGTACGATTAATAATTCGTGACTCGCGGTTGGAAGGTGTCATGCGCA
- CGCTTCAGAACTGGATTTCGAAATTGATATTAATTCGATGGGGTCCCATCAAAGATGGAAAAATCCCT
- TAGGAGCTGAGATACAAGCTGACTCTCATAAAGAGATGTTGAGTACCTCAGCGTGTGTTACTGAATGAGGT
- CTAGAAGAGATAATGTACAGGATTCGTTTCTCAAGCCGATACTGATAACAGTGGTTTGATGGAGGATT
- GGGCGAGGAAACCTTGGGTGTTCAATCGCCCTCTCTCGCATTTTAAAGAGCTTAGCGCGAGCATTGACTT
- TAAGTTTGTAGTTTTCATGAGCAAGAAAACATAGCCCCCTTTGGTCAAGGCTCAATCAGAGCTTTATAC
- TCTGAGGCTCTTAATCCCGATACGGGGAACCTCATGCTGACAATTCATGCCAGCCAAAGTTAAGCGCG
- AAAACAATTTGAGCGTGGTTTCGCTTCTAGCAGGAAAGTTCCTGCGGAAGAGCGGTCTTTACTCGTAAA
- TCACTAAGGATGAGGATGAGATTGTAGAAATACAATTCACAGAGTGGTTCCGCAAGAGATCGCGGATAC
- TGATAGAAAGAGCGCAGAGGTTAAAAGTGGATTACCTTCTGGGAAGCCCTTATGAGACTATCAACCTTGAT
- CGCTAAGGTTGTATCTTCAGAAGCTCAGAGTCTCTCGCTTTTATCCGAAAGTGGGCGAATTTCCCTT
- TACTTGCTGCTGATAGCGGGCACTCACATGTGAGAGTACCGGCATAGGCGGGTGTGCTGAGCAAA
- CC

2. Olası viral etmenin teyit edilmesi /yaygınlığının belirlenmesi

- Primer çifti geliştirildi

RNA1-821-F	TACGGTTGCTCCGTTTCTCT
RNA1-1662-R	GGGTCAGCAATCATAGTACCTC

- 1) RNA izolasyonu
- 2) cDNA kütüphanenin oluşturulması
- 3) RT-PCR
- 4) Elektroforez ile ampliconların gözlenmesi
- 4) PCR ürünlerinin saflaştırılması (exosap Exonuclease I ve Shrimp Alkaline Phosphatase)
- 5) Sekans PCR'ı
- 6) Sekans PCR ürününün saflaştırılması
- 7) Sekanslama işlemi
- 8) Kalite kontrolü/kromatogramların yorumlanması
- 9) Filogenetik anali

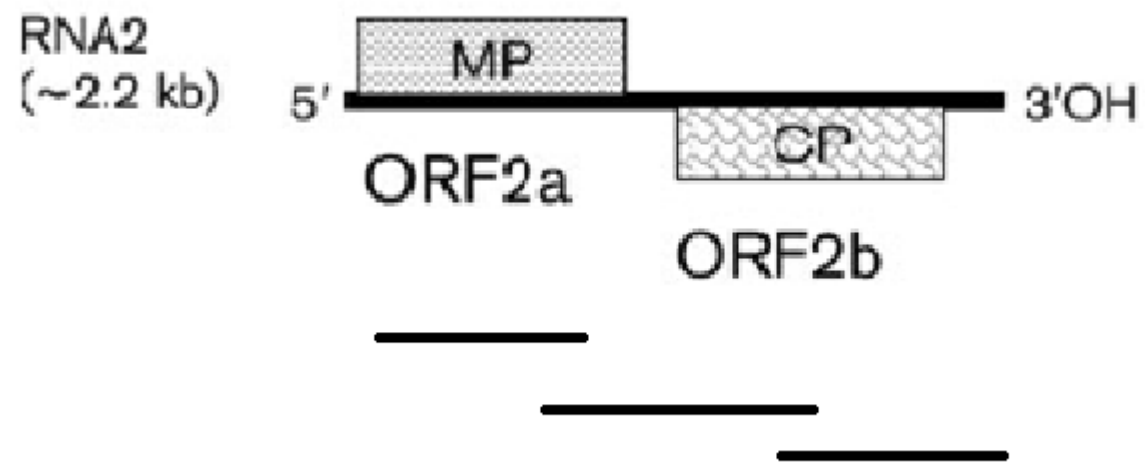
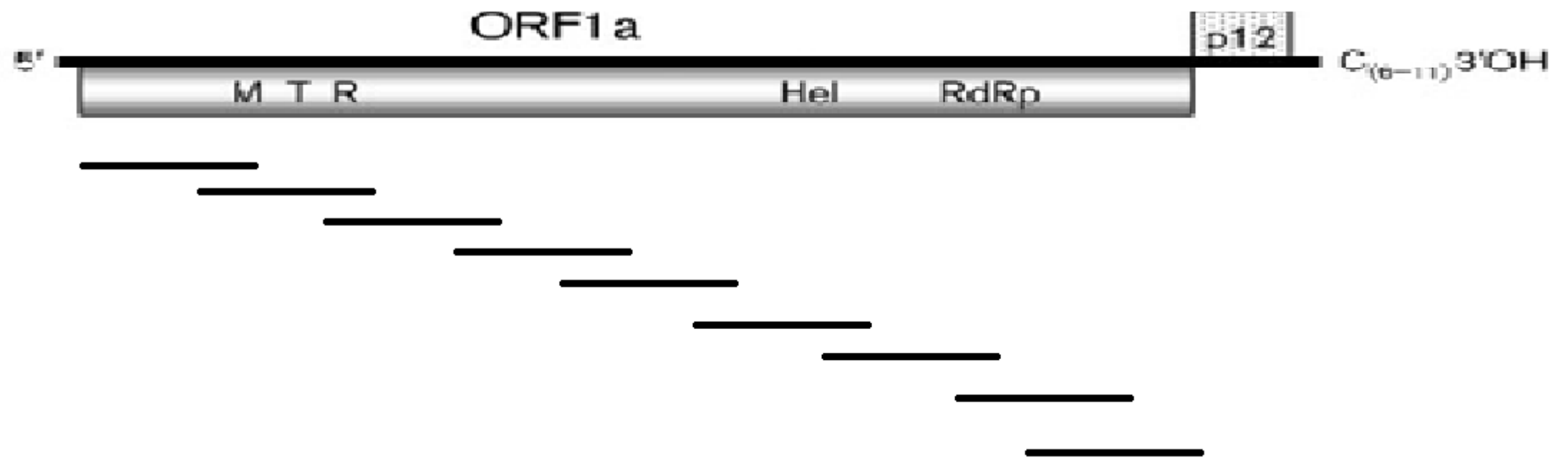


3. Altı izolatta tüm genom analizleri

- 1) RNA izolasyonu
- 2) cDNA kütüphanenin oluşturulması
- 3) RT-PCR
- 4) Elektroforez ile ampliconların gözlenmesi
- 4) PCR ürünlerinin saflaştırılması (exosap Exonuclease I ve Shrimp Alkaline Phosphatase)
- 5) Sekans PCR'ı
- 6) Sekans PCR ürünün saflaştırılması
- 7) Sekanslama işlemi
- 8) Kalite kontrolü/kromatogramların yorumlanması
- 9) Filogenetik anali

Supplementary Table 1. Primers used sequence analysis of genome of black mulberry idaeavirus (BMIV)

	Primer	
RT-PCR	Sequence analysis	Sequence (5' to 3')
RNA1-1-F	RNA1-1-F	ATTGCCCCAACTTTTACACTTT
RNA1-2116-R	RNA1-2116-R	GAAACAAACCGGTTTCAC
	RNA1-458-F	TTGGATTGCGTCGGTGGTTC
	RNA1-1016-R	TCATGTCTTCATCAGACAATT
	RNA1-821-F	TACGGTTGCTCCGTTTTCTCT
	RNA1-1662-R	GGGTCAGCAATCATAGTACCTC
	RNA1-1567-F	GGTTCATTCCGGTTATGATTT
RNA1-1601-F	RNA1-1611-F	GAATGGTCCAGCACGAAGTAA
RNA1-4599-R	RNA1-4599-R	TTGGTGTACTCACTTTGTGC
	RNA1-2583-R	TCGAAGAAAAGTGCATCGCA
	RNA1-2491-F	AAAAATGACTGTTCTGGAACG
	RNA1-3152-R	CCTTAACGTGCAATGTGGGTA
	RNA1-3228-F	TAGCTCATCCCGATTCTTG
	RNA1-3700-R	CGTTCGAGTTAAGCGGAAGT
	RNA1-3863-F	GAAGCTAGTAAGTCCGAAGCTTCG
	RNA1-4290-R	ACTTGCTGCTGCTAGTATTTCTCT
RNA1-4184-F	RNA1-4184-F	TGGGATATGTCTAAAATATCAC
RNA1-5796-R	RNA1-5796-R	GGGGTTTGCTCAGCAACA
	RNA1-4369-F	CGCTGTTGACAAGTTTTTCG
	RNA1-5180-R	AAGGGCATGCAGGTTGTATC
	RNA1-5071-F	AGGAGGAGATGACTCCCTCA
RNA2-1-F	RNA2-1-F	ATATATTTTTTACGGTTAGATCCT
RNA2-2243-R	RNA2-2243-R	GGGTTTGCTCAGCAACACCGGC
	RNA2-587-F	CTGCGATTACCTTAACAGG
	RNA2-633-R	CACAGCGGGGATAACAGCTA
	RNA2-1261-F	AGTCAGTGGTTTAATGAGTTCAGA
	RNA2-1393-R	GCTCTGATTGAGCCTTGACC
	RNA2-1476-F	GGCTCTTAATCCCGATACGG
	RNA2-1626-R	ACGCTCAAATTGTTTTGGGCG



Tüm genomlar ve viral parçaları
gen banka kaydedildi

☐	Black mulberry idaeovirus isolate AYS4 segment RNA1, complete sequence	Black m... NA	2823523	10706	10706	100%	0.0	100.00%	5797	MW017545.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate KYS2 segment RNA1, complete sequence	Black m... NA	2823523	9801	9801	100%	0.0	97.19%	5796	MW017544.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate NVS5 segment RNA1, complete sequence	Black m... NA	2823523	9779	9779	100%	0.0	97.12%	5796	MW017546.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate ANK1 segment RNA1, complete sequence	Black m... NA	2823523	9640	9640	100%	0.0	96.69%	5796	MW017543.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate ESK8 segment RNA1, complete sequence	Black m... NA	2823523	9518	9518	100%	0.0	96.31%	5796	MW017548.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate IRN9 segment RNA1, complete sequence	Black m... NA	2823523	9513	9513	100%	0.0	96.29%	5796	MW017549.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate BLN7 segment RNA1, complete sequence	Black m... NA	2823523	9476	9476	100%	0.0	96.17%	5797	MW017547.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 23_Cemel_1 polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2231	2231	22%	0.0	97.83%	1293	MW017551.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 676_Erkilet polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2220	2220	22%	0.0	97.68%	1293	MW017565.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 658_Talas polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2215	2215	22%	0.0	97.60%	1293	MW017560.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 23_Erkilet polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2215	2215	22%	0.0	97.60%	1293	MW017552.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 684_Gesi polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2209	2209	22%	0.0	97.53%	1293	MW017569.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 674_Erkilet polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2209	2209	22%	0.0	97.53%	1293	MW017563.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 666_Talas polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2209	2209	22%	0.0	97.53%	1293	MW017562.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 662_Talas polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2209	2209	22%	0.0	97.53%	1293	MW017561.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 681_Erkilet polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2204	2204	22%	0.0	97.45%	1293	MW017566.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 24_Yilan_Dagi polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2204	2204	22%	0.0	97.45%	1293	MW017553.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 695_Talas polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2198	2198	22%	0.0	97.37%	1293	MW017571.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 653_Talas polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2198	2198	22%	0.0	97.37%	1293	MW017558.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 20_Hacilar polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2198	2198	22%	0.0	97.37%	1293	MW017550.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 694_Talas polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2196	2196	22%	0.0	97.30%	1296	MW017570.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 652_Talas polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2193	2193	22%	0.0	97.29%	1293	MW017557.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 682_Erkilet polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2176	2176	22%	0.0	97.06%	1293	MW017567.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 655_Talas polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2176	2176	22%	0.0	97.06%	1293	MW017559.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 28_Mahrumlar polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2176	2176	22%	0.0	97.06%	1293	MW017556.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 683_Germir polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2170	2170	22%	0.0	96.98%	1293	MW017568.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 675_Erkilet polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2170	2170	22%	0.0	96.98%	1293	MW017564.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 26_Felahiye polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2170	2170	22%	0.0	96.98%	1293	MW017555.1
☐	Black mulberry idaeovirus isolate 25_Cemel_2 polyprotein gene, partial cds	Black m... NA	2823523	2159	2159	22%	0.0	96.83%	1293	MW017554.1
☐	Raspberry bushy dwarf virus gene for non-structural polyprotein, isolate SE3, genomic RNA	Raspbe... NA	12451	649	649	24%	5e-180	74.95%	5401	FR687353.1

