

Derleme/Research Article (Original Paper)

Bitkilerde Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile miRNA Analizi

Abdil Hakan EREN¹, Emre İLHAN^{2*}, Behçet İNAL³

¹Gençlik Hizmetleri ve Spor Bakanlığı, Kırıkhan Gençlik Hizmetleri ve Spor İlçe Müdürlüğü, Hatay, Türkiye

²Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye

³Siirt Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Siirt, Türkiye

*e-posta:emre.ilhan@erzurum.edu.tr; Tel: 0442 6662530/2387; Fax: 0442 2300033

Özet: miRNA'lar (mikroRNA), genlerin intron bölgelerinde buldukları için proteine dönüşemezler ve kendi gen bölgelerinden üretilirler. Bitkilerde 21-24 nükleotitten oluşan miRNA üretimi çekirdekte başlar ve sitoplazmada koordineli bir şekilde devam eder. Bitkilerde gelişim ve stres ile ilişkili genlerin ifade seviyelerinin belirlenmesinden dolayı genom bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur ve böylelikle ökaryotik genomların %30'unu kontrol ettiği savunulur. Bitkilerde küçük RNA'lar: miRNA; siRNA'lar, phasiRNA'lar ve NAT-siRNA gibi birçok ana sınıfa ayrılır. Bunları belirlemek ve fonksiyonlarını ortaya çıkarmak için çeşitli analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler Northern Blot, Flow Sitometri, Klonlama, qRT-PCR, Sekanslama ve Mikroarray analizleri ve RNA-seq (transkriptom profillemesi) şeklinde gruplandırılabilir. miRNA-Seq olarak adlandırılan ve Yeni Nesil Dizileme (YND) yöntemlerinden olan bu metotla türe ve dokuya spesifik miRNA'lar kolayca saptanabilmektedir. miRNA çalışmalarında; miRDeep-Seq, miRanalyzer, miRCat, miRExpress, miRTRAP gibi belirli algoritmalar kullanılabilir. Bu derlemede bitkilerde yeni nesil dizileme teknolojilerinin miRNA dizileme (miRNA-seq) çalışmalarındaki uygulama alanı ile ilgili güncel çalışmalar irdelenmiştir.

Anahtar kelimeler: RNA-Seq, qRT-PCR, miRNA biyogenez, Yeni Nesil Dizileme

Analysis of miRNA in plants by Next Generation Sequencing Technology

Abstract: miRNAs (microRNAs) find in the intron sites of the genes. miRNAs are produced from their gene region and non-coding RNAs. In plants, the production of miRNAs that consist of 21–24 nucleotides in length starts in nucleus and continues coordinately in cytoplasm. miRNAs help to protect the integrity of genome duo to define expression levels of genes related to development and stress in plant. In this way, miRNAs are considered to defend 30% of eukaryotic genomes. There are a few types of small RNAs such as miRNAs, siRNAs, phasiRNAs and NAT – siRNAs in plants. Various methods such as Northern Blotting, Flow cytometer, cloning, qRT – PCR, Microarray, sequencing and RNA-seq (transcriptome profiling) were developed to detect and discover functions of these small RNAs. Species and tissue specific miRNAs can be easily identified with this method called as miRNA-seq, one of the Next Generation Sequencing methods. In miRNA studies, the algorithms such as miRDeep-Seq, miRanalyzer, miRCat, miRExpress, miRTRAP can be used. This review summarizes about up to date applications of next generation sequencing technologies in miRNA-seq studies.

Keywords: RNA-Seq, qRT-PCR, miRNA biogenesis, Next Generation Sequencing

Giriş

miRNA (mikroRNA)'lar bitki ve hayvanlarda, gen ifadesinin çok yönlü düzenleyicileridir (Yang ve ark. 2015). Bitkilerde gelişim ve stresle ilişkili genlerin ifade seviyelerini kontrol ettiği bilinmektedir. miRNA'lar bitki genomlarında yaygın endojen gen düzenleyiciler olarak büyüme, gelişme, sinyal iletiminde ve yanıtta önemli rol oynamaktadır (Han ve ark. 2015). Bitkilerde gelişmeyi düzenlemenin yanında miRNA ve diğer küçük RNA'lar aynı zamanda transpozon, retrotranspozon ve virüsler gibi genetik materyali baskılamak sureti ile genom bütünlüğünün korunmasına yardımcı olmaktadır (Tomari ve ark. 2004). Dolayısı ile ökaryotik genomların %30'unu miRNA'ların kontrol ettiği düşünülmektedir (Vaziri ve ark. 2012). miRNA molekülleri nükleotidlerden oluşan ve hücrede protein sentezini üstlenerek genin ifade edilmesini sağlayan işlevsel moleküller (Khraiwesh ve ark. 2012) olup,

genlerin intron bölgelerinde bulunurlar (Kidner ve Martienssen 2005). Bu nedenle proteine dönüşmezler ve kendi gen bölgelerinden üretilirler (Eldem ve ark. 2013). Bitkilerde miRNA üretimi çekirdekte başlayıp sitoplazmada koordineli bir şekilde devam etmektedir.

Son birkaç yıl içinde, küçük RNA analizi ile birlikte, bitkilerde geniş bir genom dizileme sonucu, birçok yeni küçük RNA tarif edilmiştir (Fei ve ark. 2013). Yeni Nesil Dizileme teknolojileri ile transkriptom dizilemede cDNA yerine genomik DNA referans olarak kullanılarak transkript analizi yapılmaktadır. Yüksek verim derecesine sahip Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri (YND) olgun miRNA uzunluğu, miRNA değişiklikleri ve yeni miRNA'ları keşfetmede mikroarray yöntemine göre çeşitli avantajlar sağlamaktadır (Morozova ve Marra 2008). Bu çalışmasının amacı bitkilerde Yeni Nesil Dizileme Teknolojilerinin miRNA dizileme (miRNA-seq) çalışmalarındaki uygulama alanı ile ilgili güncel çalışmalara değinmektedir.

Bitkilerde miRNA Analiz Teknikleri

Bitkilerde miRNA tanımlama ve karakterizasyon çalışmaları her geçen gün artarak devam etmektedir. miRNA'nın tanımlaması ve kantitatif olarak ölçme metotları bu moleküllerin işlevlerinin anlaşılması için çok önemlidir. miRNA'ların belirlenmesi ve ölçülebilmesi için hürelere yönelik birçok metot geliştirilmiştir (Park ve ark. 2002). Bu yöntemler Northern blot, Flow Sitometri, Klonlama, qRT-PCR, Dizileme ve Mikroarray analizleridir (Kang ve ark. 2012). Bu yöntemlerden Northern blot tekniği ile doku veya organlardaki mRNA seviyesini belirlemede kullanılmaktadır. Yani genlerin transkripsiyon düzeyinde analizini yapmaya olanak sağlamaktadır. Mikroarray yöntemi ise hücre ve dokulardaki gen ifade profillerindeki bütünsel değişikliklerin incelenmesinde kullanılan hibridizasyona dayalı bir teknolojidir. Bu yöntemde bir mikroorganizmanın tüm genleri ve binlerce genin ifade seviyeleri tek bir deneyde eş zamanlı olarak çalışılabilir (Choi 2004). qRT-PCR yöntemi sayesinde, DNA ve RNA örnekleri kantitatif ve kantitatif olarak kısa bir zaman diliminde analiz edilmekte, kontaminasyon riski son derece az ve çok sayıda örnek ile güvenli bir şekilde çalışılabilmektedir (Mekkes ve Feberwee 2005). Fakat yöntem sınırlı sayıda genin incelenmesine olanak vermektedir. YND teknolojisi ise transkript profillerinin çıkarılması şeklinde yürütülmektedir (Alagna ve ark. 2009). RNA-seq (RNA-Dizileme) yönteminden faydalanarak streslere dayanıklılık, çeşitli metabolik yolların aydınlatılması ve meyve gelişimi gibi ıslah çalışmaları da yapılmaktadır (Wang ve ark. 2011; Shi ve ark. 2011; Sarıkamış 2014). Tespit edilen bazı miRNA'lar miRBase v21 (<http://www.mirbase.org>) ve PMRD (Zhang ve ark. 2010)'de verilmiştir. Belirlenen bu miRNA'lardan bazıları tamamen biyoinformatik yöntemlerle bazıları ise deneysel metotlardan yararlanılarak saptanmıştır. Biyoinformatik yöntem, miRNA'lardaki dizi ve yapı korunmuşluğunu (conservation) arama ve bu homolojileri saptama üzerine kuruludur. Bugüne kadar Reinhart ve ark. (2002), Jonnes-Rhoades ve ark. (2004) ve Sammanani ve ark. (2004) bitki miRNA'larının belirlenmesinde biyoinformatik yolla birçok miRNA tespit etmişlerdir (Eren ve ark. 2014).

Yeni Nesil Dizileme ile RNA-seq

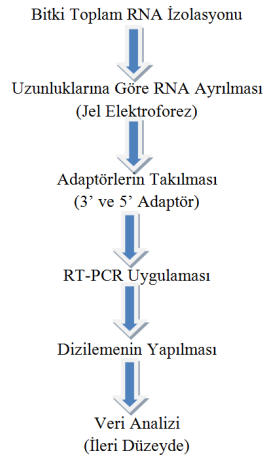
Son yıllarda geliştirilen en önemli teknolojilerden biri olan Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojileri yüksek doğrulukla, transkriptom analizi, ploidi seviyeleri, moleküler markör ve mRNA profilinin belirlenmesi gibi birçok çalışmada kullanılabilmekte (Dönmez ve ark. 2015) olup bu teknolojiler, bütün miRNA dizilerinin ortaya çıkartılmasında kolaylık sağlamaktadır. Düşük seviyede bile ifade olanları ve yeni miRNA'ları Yeni Nesil Dizileme teknolojisi ile tanımlanabilmektedir. Ayrıca yaklaşık son on yıldır, miRNA ifade profilini çalışmak için yüksek hacimli metotların kullanılması miRNA'lar ile ilgili üssel olacak şekilde bir veri artışına neden olmuştur. Mikroarray ya da gerçek zamanlı PCR tabanlı miRNA ifade profillemeye teknikleri ile karşılaştırıldığında, Yeni Nesil Dizilemenin, geniş dinamik bir alanda hassas bir miRNA ölçümü yapması, yeni miRNA belirleme kabiliyeti ve tüm genomu henüz olmayan türlerde de miRNA ifade seviyesini belirleyebilmesi özellikleri ile oldukça avantajlı bir metot olduğu kabullenilmektedir. Ayrıca, Yeni Nesil Dizileme teknolojisi, sadece tek bir nükleotid farkı ile miRNA'ları birbirinden ayırt edebilecek duyarlılığa sahiptir (Pritchard ve ark. 2012). Son olarak, hiç azımsanmayacak bir özellik olan, birden çok miRNA kütüphanesinin farklı adaptörlerle etiketleyip barkodlandıktan sonra multiplex yaklaşımı ile dizileme işlemi yapabilmektedir. Yeni Nesil DNA Dizileme üç ana gruba ayrılır. Bunlar; Sentez Aracılığıyla Dizileme, Ligasyon ile Dizileme ve Tek Nükleotid Dizilemedir. Sentez aracılığıyla dizileme metodunu Roche 454, (pirodizileme), Illumina ve Ion Torrent platformları kullanmaktadır (Egan ve ark. 2012). Ligasyon aracılığıyla dizileme metodunu ise ABI/Solid ve Polonator

platformları kullanmaktadır. Tek Nükleotid Dizileme ise 'Üçüncü Nesil Dizileme' olarak adlandırılır. Bu dizileme metodunu HeliScope, Nanopor Dizileme, Pasific Biosciences, Life Technologies — VisiGen/Starlight, Optik Dizileme ve Haritalama, Tek Molekül Real-Time DNA dizileme (SMRT) ve RNAP platformları kullanmaktadır. Bu dizileme metodu, nükleotid birleşmesini algılamak için floresan görüntüleme kullanmaktadır (Dönmez ve ark. 2015).

Bitkilerde Yeni Nesil DNA Dizileme çalışmalarında Roche 454 ile *A. thaliana*'nın genomunda 340,000 özgün dizi belirlenirken (Rajagopalan ve ark. 2006), kavunun (*Cucumis melo* L.) 480 Mbp'lik genomu dizilenmiştir (Garcia-Mas 2010). Yine mısırdaki aday SNP'ler Roche 454 tespit edilirken *Aegilops tauschii* AL8/78 genotipinin genomik DNA'sı dizilenmiştir (You ve ark. 2011).

Transkriptom dizileme kodlanmayan RNA keşfi ve gen ifadesinin profillenmesi, genomun açıklaması ve yeniden düzenlenmesini algılama uygulamaları için kullanılır. Önceki yapılan çalışmalarda, Roche 454 teknoloji transkriptom belirleme uygulamalarında söz sahibi iken, bir çalışmada miRNA profilinin belirlenmesi için Illumina dizilemesi kullanılmıştır (Morozova ve Marra 2008). 2008 yılından sonra güncellenen Illumina Genome Analyzer II daha geniş alanlara yayılan DNA kümelerinin etkili görüntülenmesine olanak sağlamıştır (Ansorge 2009). Illumina dizi datasındaki hataları minimize ederek piyasaya sürülmüş NextSeq, MiSeq, HiSeq ve HiSeqX olmak üzere günümüzde dört farklı yazılımı bulunmaktadır (<http://www.illumina.com/>). Illumina Yeni Nesil Dizileme ile domatesten 60 bp'lik okuma sayesinde domateslerin 32.5 Mbp transkriptom dizilemesi gerçekleştirilmiştir (Francis 2010). Çeltiğin 150 rekombinant kendilenmiş (Recombinant Inbreed Line) hattında SNP'ler belirlenmiş ve kendilenmiş hatlarda toplam 1.493.461 SNP tespit edilmiştir (Azam ve ark. 2012; Dönmez ve ark. 2015). Araştırmacıları şimdilerde Yeni Nesil Dizileme ile derinlik ve tüm transkriptom değişimini ölçebilmektedir.

Yukarıda verilen dizileme yöntemleri sonucu oluşan veriler miRNA ifade profilinin çıkartılması, miRNA tanımlanması, yeni miRNA'ların keşfedilmesi ve potansiyel miRNA hedef genlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Sarıkamış 2014). miRNA-seq olarak adlandırılan ve Yeni Nesil Dizileme yöntemlerinden olan bu metotla türe ve dokuya spesifik miRNA'lar kolayca saptanabilmektedir (Malone ve ark. 2011). miRNA-seq temelde iki aşamada gerçekleştirilir. Önce bitki dokusundaki toplam RNA izolasyonu yapılır, sonra jel elektroforez ile küçük RNA'lar ve RNA'lar büyüklüklerine göre ayrılır ve adaptörlerin takılması yapıldıktan sonra geri -transkripsiyon ve PCR ile çoğaltıma işlemi gerçekleştirilir. Dizileme işleminden sonra ileri düzeyde veri analizi yapılır (Şekil 1).



Şekil 1. miRNA-seq yönteminde sRNA'ların belirlenmesi

Dizileme metodu ve yaklaşımı olarak, farklı dizileme platformlarının farklı protokol ve adaptör/primer gerektirmesine rağmen, benzer adımları takip ederler (Şekil 1). İlk adım, miRNA kütüphanesini üretmek için spesifik adaptörler kullanılarak, miRNA'lar toplam RNA'dan izole edilir. Drosha ve Dicer'in RNase III aktivitesi sonucunda, miRNA'lar 5' fosfat ve 3' hidroksil gruplarına sahiptirler. Adaptör ligasyonu esnasında miRNA'ların halkasallaşmasını ve kendi kendine ligasyona uğramasını engellemek için 3' önceden adeninleştirilmiş adaptörler, ile ATP gerektirmeyen kesilmiş (truncated) T4 RNA ligaz 2

kullanılır. Daha sonra, miRNA'lar 5' adaptörler ile birleştirilir. Bu adaptörler ayrıca dizileme primerinin bağlanması için uygun bir alan içermektedir. Adaptörler ile bağlanmış miRNA'ların cDNA kütüphanelerini üretmek amacı ile, 3' adaptörüne tamamlayıcı bir primer yardımı ile transkript edilir. Yeterli miktarda dizileme elde etmek için, üretilen bu cDNA kütüphanesinin PCR ile çoğaltılması gerekmektedir. Bunun sonucunda, çoğaltılmış kütüphaneler jelle yüklenir ve jel ekstraksiyonu sonucunda elde edilen DNA dizileme öncesi kalite kontrolü yapılmaktadır (Eminaga ve ark. 2013).

Akıntı hücrelerin bir kuyusuna birden fazla örnek yüklenmek istendiğinde, cDNA kütüphanelerinin üretmesi esnasında, her bir kütüphane, adaptöre ait dizinin bir kısmına denk gelecek şekilde benzersiz etiketlerle barkodlanması gerekmektedir. Ancak daha önceki çalışmalarda rapor ettiklerine göre: adaptör dizisindeki barkodlar ligasyon için önemli engel teşkil oluşturabilmektedir. Örneğin: aynı biyolojik örneklerin farklı şekilde barkodlanması sonucunda farklı miRNA ifade profilinin ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Alon ve ark. 2011; Hafner ve ark. 2011). Bunun bir nedeni olarak da, T4 RNA ligaz bazlı ligasyonun bir çelişkisi olduğu düşünülmektedir (Zhuang ve ark. 2012; Jayaprakash ve ark. 2011). Bazı protokollere bu ligasyon sorununu azaltmak için PCR çoğaltımı esnasında bir adaptör eklenir böylece; bu metot ile Illumina Genome Analyzer/HiSeq ile bir kuyucukta 12 kütüphaneye kadar dizileme işlemi yapılabilmektedir.

miRNA Dizilerini Analiz Etme Basamakları

Günümüze kadar miRNA dizilerini analiz etmek için birçok biyoinformatik araç geliştirilmiştir (Li ve ark. 2012). Bu araçların geneli birkaç değişiklik dışında aynı yolu izlerler. Bu yol genellikle şu şekilde olur: 3' adaptörler uzaklaştırıldıktan sonra geri kalan diziler, annotate edilmiş veya yeni miRNA aday bulmak için bir referans diziye karşı hizalama işlemi yapılır. Bu hizalama kriteri, miRNA analizi için çok önemli kriterlerden biridir. Çünkü şimdiye kadar birçok çalışma grubu, isomiR denilen referansdan farklı olan miRNA'ları belirlemişlerdir. Bunların aslında olgun (mature) miRNA ile genellikle benzemediği de rapor edilmiştir (Morin ve ark. 2008; Wyman ve ark. 2011; Lee ve ark. 2010). IsomiR'ler genelde 3' ucunda 5' uca göre daha fazla farklılık gösterirler. Bu farklılıkta, 3' ucundaki baz sabittüsyonu ya da kalıba bağlı olmadan nükleotid eklenebilme durumundan da kaynaklanabilmektedir (Cloonan ve ark. 2011). İster miRNA ister isomiRNA dizi okumalarındaki sayıyı bulmak için, miRBase veri tabanındaki annotate edilmiş küçük RNA dizilerine karşı BLAST işlemi yapılmaktadır. Yine yeni bir miRNA aday bulmak için okumaların referans bir genomla karşı haritalama işlemi de yapılmaktadır. Ayrıca miRNA çalışmalarında deepBlockAlign, miRanalyzer, miRCat, miRDeep, miRDeep2, miREvo, miRExpress, miRTRAP gibi belirli algoritmalar da kullanılmaktadır (Kang ve Friedländer 2015).

miRNA Dizilemesinde Önemli Parametreler ve Olası Sorunların Çözüm Yolları

Yeni Nesil Dizileme teknolojisi ile kaliteli bir miRNA dizilemenin en önemli kriteri kaliteli bir RNA (RIN= RNA integrated değeri >8) elde etmekten geçmektedir. Bunun için RNA izolasyonu ve kütüphane hazırlama aşamaları için tamamen RNase kontaminasyonundan uzak bir çalışma alanı oluşturulmalıdır. Diğer bir önemli kriter ise çoğaltılmış RNA ile çoğaltılmamış RNA'ların birbirine karışmasıdır. Bu durum sonraki reaksiyonları inhibe etmede önemli bir etken olabilmektedir. Bunun çözümü RNA kütüphane hazırlama öncesi ve sonrası için; yani her reaksiyon safhası için, ayrı ekipman, malzeme ve çalışma alanı kullanılmalıdır. Ayrıca herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığını belirlemek için, cDNA reaksiyonlarında bir tane "no-ligase" yani T4 DNA ligaz içermeyen kontrol grubu oluşturulmalıdır. Ayrıca kütüphane oluşturma aşamasında, oldukça fazla sayıda miRNA tutmak ve kendi üzerinde halkasallaşmayı engellemek için 3' ve 5' adaptörler çok fazla sayıda kullanılmaktadır. Ancak kendi üzerine bağlanan adaptörlerden kurtulmak için, DNA agaroz jel üzerinde yürütüldükten sonra birbirine bağlanan adaptörler varsa onlar ayrı bir bant oluşturmakta ve sonraki aşamada bu bant dışında kalan ve DNA kütüphanesini temsil eden bant kesilerek reaksiyona devam edilmektedir. Başka bir önemli nokta ise dizilemeye gitmeden hemen önce, DNA miktarının yeterli olup olmadığı kantitatif bir şekilde ölçülmelidir. Aksi takdirde düşük miktardaki DNA, Illumina Genome Analyzer II ile yapılacak dizileme kümesinin oluşumunda başarısız olacaktır. Düşük miktarda oluşan DNA kütüphaneleri olursa çözüm olarak, PCR döngüleri artırılabilir. Son olarak elde edilen miRNA verilerinin stem-loop qPCR primerleri kullanılarak eş zamanlı PCR ile teyit edilmesi gerekmektedir (Eminaga ve ark. 2013; Motameny ve ark. 2010).

Farklı canlı türlerinde, çeşitli biyotik ve abiyotik strese dayanıklılık, bitki büyümesinde metabolik yolların belirlenmesi, meyve verim sürecindeki değişim gibi ayrıca bitki ıslah çalışmalarına yönelik olarak RNA-seq yönteminden faydalanılmaktadır (Alagna ve ark. 2009; Sarıkamış 2014). RNA-seq aynı zamanda gen bölgelerinin ekzon / intron sınırlarının belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Wang ve ark. 2011). Transkriptom analizinde kullanılan RNA-seq tekniği ile DNA fragmentleri hassas ve güvenli bir şekilde birden fazla okunabilmektedir (Malone ve ark. 2011).

Sonuç

Watson ve Crick tarafından DNA molekülünün yapısı açıklandıktan sonra DNA ile ilgili çalışmalar hızla artmıştır. miRNA'ların keşfi ile birlikte yeni metot çalışmaları hız kazanmış ve son dönemde bitkilerde RNA-seq (transkriptom profillemesi) şeklinde yürütülmektedir. RNA-seq ile sadece miRNA değil bütün RNA çeşitlerinin tespitine olanak vermesi ve yöntemin hassas ve güvenli bir şekilde birden fazla okuma yapması RNA-seq'e olan ilgiyi artırmaktadır. Bu yeni dizileme yöntemi ile türler arasında miRNA duplikasyonunun ve miRNA homologlarının filogenetik incelenmelerin belirlenmesi gibi geliştirilecek analizler için araç olacağı tahmin edilmektedir.

Ayrıca yeni nesil dizileme ile okunan miRNA'ların teknik ve biyolojik tekrarları arasında güçlü bir korelasyonun olması gerektiği kabul edilmektedir. Ayrıca, dizi sayısı olarak da, milyon okumada 10 ile 100000 arası olmalıdır. Okuma sayısı milyonda 10'dan az olan miRNA'ların göz önüne alınmaması gerektiği önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Çünkü böylesi durumların dizileme hatalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Ansorge WJ (2009). Next-generation DNA sequencing techniques, *NewBiotechnology*, 25(4): 195-203.
- Alagna F, D'Agostino N, Torchia L, Servili M, Rao R, Pietrella M, Giuliano G, Chiusano ML, Baldoni L, Perrotta G (2009). Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development. *BMC Genomics*. 10:399.
- Alon S, Vigneault F, Eminaga S, Christodoulou DC, Seidman JG, Church GM, Eisenberg E (2011). Barcoding bias in high-throughput multiplex sequencing of miRNA. *Genome Res*. Sep; 21(9): 1506–1511.
- Azam S, Thakur V, Ruperao P, Shah T, Balaji J, Amindala BP, Farmer AD, Studholme DJ, May GD, Edwards D, Jones JDG, Varshney RK (2012). Coverage-based consensus calling (CbCC) of short sequence reads and comparison of CbCC results for the identification of SNPs in chickpea (*Cicer arietinum*; Fabaceae), a crop species without a reference genome, *American Journal of Botany*, 99 pp. 186-192.
- Choi S (2004). DNA Chips and Microarray Analysis, *Handbook of fungal biotechnology*. Marcel Dekker, Inc. (D. Arora, Ed)
- Cloonan N, Wani S, Xu Q, Gu J, Lea K, Heater S, Krishnan K (2011). MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. *Genome Biol*, 12(12), R126.
- Dönmez D, Şimşek Ö, Kaçar YA (2015). Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojileri ve Bitkilerde Kullanımı *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 8 (1): 30-37.
- Eminaga S, Christodoulou DC, Vigneault F, Church GM, Seidman JG (2013). Quantification of microRNA Expression with Next-Generation Sequencing. *Curr Protoc Mol Biol*. 2013 July ; 0 4: Unit-4.17. doi:10.1002/0471142727.mb0417s103.
- Egan AN, Schlueter J, David M (2012). Spooner Applications of next-generation sequencing in plant biology, *American Journal of Botany*, 99(2) , pp. 175–185.
- Eldem V, Okay S, Ünver T (2013). Plant microRNAs: New players in functional genomics. *Turkish J Agr and Forestry*, 37:1-21.
- Eren AH, İlhan E, Erdoğan C, Erayman M (2014). MikroRNA'lar ve Stres Şartlarındaki İşlevleri *MKU Ziraat Fakültesi Dergisi* 19 (1): 25-35.
- Fei Q, Xia R, Meyers BC (2013). Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *The Plant Cell*, 25(7), 2400-2415.
- Francis D (2010). Next Generation Sequencing of the Tomato Transcriptome, 28th International Horticultural Congress, Abstracts, August 22-27, Lisbon, pp. 10.
- Garcia-Mas J (2010) The Shotgun Sequence of the Melon Genome, a New Tool for Melon Breeding, 28th International Horticultural Congress, Abstracts, August 22-27, Lisbon, pp. 9.

- Hafner M, Renwick N, Brown M, Mihailović A, Holoch D, Lin C, Pena JT, Nusbaum JD, Morozov P, Ludwig J, Ojo T, Luo S, Schroth G, Tuschl T (2011). RNA-ligase-dependent biases in miRNA representation in deep-sequenced small RNA cDNA libraries. *RNA*. Sep; 17(9):1697–1712.
- Han J, Fang J, Wang C, Yin Y, Sun X, Leng X, Song C (2015). Grapevine microRNAs responsive to exogenous gibberellin *BMC Genomics* DOI: 0.1186/1471-2164-15-111.
- Illumina (2015). <http://www.illumina.com/> (Erişim tarihi: 5 Haziran 2016).
- Jayaprakash AD, Jabado O, Brown BD, Sachidanandam R (2011). Identification and remediation of biases in the activity of RNA ligases in small-RNA deep sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2011 Nov. 39(21):e141.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 19–53.
- Kang K, Peng X, Luo J, Gou D (2012). Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3:4.
- Kang W, Friedländer MR (2015). Computational Prediction of miRNA Genes from Small RNA Sequencing Data. *Front Bioeng Biotechnol.*, 3:7.
- Khraiweh B, Zhu JK, Zuh J (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819: 137 – 148.
- Kidner CA, Martienssen RA (2005). The developmental role of microRNA in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8; 38-44.
- Lee LW, Zhang S, Etheridge A, Ma L, Martin D, Galas D, Wang K (2010). Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing. *RNA*. Nov; 16(11):2170–2180.
- Li Y, Zhang Z, Liu F, Vongsangnak W, Jing Q, Shen B (2012). Performance comparison and evaluation of software tools for microRNA deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* May 1; 40(10):4298–4305.
- Malone J, Oliver B (2011). Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biology*, 9(1):34.
- Mekkes DR, Feberwee A (2005). Real time polymerase chain reaction for qualitative and quantitative detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathology*, 34, 348-354.
- Mirbase (2015). <http://www.mirbase.org> . (Erişim tarihi: 16 aralık 2015)
- Motameny S, Wolters S, Nurnberg P, Schumacher B (2010). Next Generation Sequencing of miRNAs – Strategies, Resources and Methods. *Genes*. 1(1):70–84.
- Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu AL, Zhao Y, McDonald H, Zeng T, Hirst M, Eaves CJ, Marra MA (2008). Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res.*, 18(4):610–621.
- Morozova O, Marra MA (2008). Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics Volume*, 92 (5), 255- 264.
- Park WJ, Li R, Song J, Messing X, Chen L (2002). Carpel factory, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.*, 12(17): 1848-1495
- Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M (2012). MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* Apr 18; 13(5):358–369.
- Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.*, 20: 3407–3425.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.*, 16(13): 1616-1626.
- Samanani N, Liscombe DK, Facchini PJ (2004). Molecular cloning and characterization of norcochlorogenic synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant J*, 40(2): 302.
- Sarıkamış G (2014). Sebze Islahında Moleküler Yaklaşımlar. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 7 (2): 80-83.
- Shi CY, Yang H, Wei CL, Yu O, Zhang ZZ, Jiang CJ, Sun J, Li YY, Chen Q, Xia T, Wan XC (2011). Deep sequencing of the *Camellia sinensis* transcriptome revealed candidate genes for major metabolic pathways of teaspecific compounds. *BMC Genomics*. 12: 131.
- Tomari Y, Matranga C, Martinez N, Haley B, Zamore PD (2004). A Protein Sensor for siRNA Asymmetry. *Science*, 306:1377-1380:39-46.
- Vaziri PA, Rezaeieh KA (2012). Ökaryot Hücrelerde Korunmuş Mikro RNA'lar ve Hedef Transkripsiyonların Faliyetleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5(2):96-98.

- Wang Y, Zhang H, Li H, Miao X (2011). Second generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PLoS One*. 6(4), e18644.
- Wyman SK, Knouf EC, Parkin RK, Fritz BR, Lin DW, Dennis LM, Krouse MA, Webster PJ, Tewari M (2011). Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. *Genome Res.*, 21(9):1450–1461.
- Yang L, Mu X, Liu C, Cai J, Shi K, Zhu W, Yang Q (2015). "Overexpression of potato miR482e enhanced plant sensitivity to *Verticillium dahliae* infection." *Journal of integrative plant biology*, 57, 12, 1078-1088.
- You FM, Huo N, Deal KR, Gu YQ, Luo M, McGuire P, Dvorak J, Anderson OD (2011). Annotation based genome-wide SNP discovery in the large and complex *Aegilops tauschii* genome using next-generation sequencing without a reference genome sequence, *BMC Genomics*, 12 : 59.
- Zhang Z, Yu J, Li D, Zhang Z, Liu F, Zhou X, Wang T, Ling Y, Su Z (2010). PMRD: plant microRNA database. *Nucleic acids research*, 38(suppl 1): D806-D813.
- Zhuang F, Fuchs RT, Sun Z, Zheng Y, Robb GB (2012). Structural bias in T4 RNA ligase-mediated 3'-adapter ligation. *Nucleic Acids Res.* 40(7):e54.