



Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojileri ve Bitkilerde Kullanımı

Dicle DÖNMEZ¹

Özhan ŞİMŞEK²

Yıldız AKA KAÇAR^{1,2*}

¹Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana

²Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana

*Sorumlu Yazar:

E-posta: ykacar@cu.edu.tr

Geliş Tarihi: 09 Mart 2015

Kabul Tarihi: 28 Nisan 2015

Özet

Yeni nesil yüksek verimli DNA dizileme analizleri, temel biyolojik çalışmalar ve genetik araştırmalarda yüksek potansiyele sahiptir. Bu nedenle günümüzde kullanılan en önemli teknolojilerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu teknolojiler dizileme yöntemine göre; sentez aracılığıyla dizileme, ligasyon aracılığıyla dizileme ve tek molekül dizileme olmak üzere üç gruba ayrılır. Yeni nesil DNA dizileme teknolojisi genom karakterizasyonu, metagenetik, metilasyon analizi, kromatinlerin analizi, mRNA'ların profillemesi gibi birçok amaç için kullanılmaktadır. Bu derlemede yeni nesil DNA dizileme yöntemleri hakkında genel bilgi verilmiş, avantaj ve dezavantajları tartışılmış ve bitkilerde bu metodların kullanım alanlarına değinilmiştir.

Anahtar kelimeler: DNA dizileme, genomik, yeni nesil dizileme, bitki

Next Generation DNA Sequencing Technologies and Applications in Plants

Abstract

High-throughput next generation DNA sequencing analysis has high potential in basic biological studies and genetic researches, therefore it emerges as one of the most important technologies used today. These technologies divide into three groups based on the sequencing method, sequencing by ligation, sequencing by synthesis and single molecule sequencing. The next-generation 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. In this review the next generation DNA sequencing methods with their advantages and disadvantages, usage of these methods in the plant species were discussed.

Key Words: DNA sequencing, genomics, next-generation sequencing, plant

GİRİŞ

DNA dizi analizi, bir DNA parçasında bulunan A, C, G, T nükleotid sıralarının belirlenmesi olarak tanımlanmaktadır. DNA parçalarına ait bu nükleotid sıralarının belirlenmesi; DNA bölgesinin hangi proteini kodlayabileceğine ilişkin bilgilerin elde edilmesinde, genomik DNA dizisi ile tamamlayıcı DNA'ya ait dizi bilgilerinin karşılaştırılarak ekson ve intronların ortaya çıkarılmasında, DNA dizi analizi ile gen aktivitesini kontrol eden bölgelerin tanımlanmasında, spesifik DNA dizilerinin belirlenmesi ile evrimsel akrabalık ilişkilerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır [1].

DNA dizi analizi ile ilgili araştırmalar ilk olarak 1960'lı yıllarda başlamıştır. 1977 yılında Allan Maxam-Walter Gilbert [2] ve Frederick Sanger [3] tarafından geliştirilen iki farklı DNA dizi analizi yöntemi yaygın kullanım alanı bulmuştur. Enzimatik DNA sentezine dayanan ve günümüzde en yaygın kullanılan DNA dizi analizi tekniği olan Sanger yönteminde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. DNA sentezini sağlamak için Klenow, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden birisi kullanılabilir. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanısıra,

deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanır [4]. Sanger dizileme tekniği ile büyük ölçekli kompleks nükleik asitlerin dizilenmesi nükleik asitlerin parçalara ayrılarak vektörlere klonlanmasını gerektirir [5]. Floresan temelli otomatik dizi analizi ise Smith ve ark. [6] tarafından geliştirilmiştir.

DNA dizileme yöntemleri kullanılan kalıp molekülün uzunluğuna göre değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin shotgun dizileme metodu 20 kb gibi uzun DNA parçalarını dizilemek için kullanılır. Dizileme yapılacak DNA molekülünün uzunluğu 2 kb kadar olduğunda ise tüm dizinin çıkarılması için 'primer walking' yöntemi kullanılmaktadır.

Son yıllarda geliştirilen ve günümüzde kullanılan en önemli teknolojilerden biri olarak karşımıza çıkan yeni nesil DNA dizileme teknolojileri yüksek doğrulukla, ultra hızlı olarak, dizileme yapabilmeleri sayesinde transkriptom analizi, ploidi seviyesinin belirlenmesi, moleküler markır geliştirme ve mRNA profilinin belirlenmesi gibi birçok çalışmada kullanılabilmektedir.

Bu derlemede, yeni nesil dizileme teknolojileri hakkında bilgi verilmiş, avantaj ve dezavantajları tartışılmış ve bu sistemlerin bitkilerde kullanılması ile ilgili yapılan çalışmalardan örnekler verilmiştir.

Yeni Nesil DNA Dizileme Teknikleri

Yeni nesil dizileme teknolojisi 2005 yılında ilk olarak 454 pirodizileme teknolojisinin kullanımı ile ticari olarak erişilebilir duruma gelmiştir. O zamandan beri birkaç farklı dizileme metodu geliştirilmiştir. 454 GS20 pirodizileme (Roche Applied Science), Solexa 1G (Illumina, Inc.), SOLiD (Applied Biosystems), Heliscope (Helicos, Inc.) ve İon Torrent olmak üzere yeni nesil dizi analiz teknolojilerine ticari olarak ulaşılabilmektedir. Bu yeni nesil dizileme teknolojilerinden Heliscope hariç diğerleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyomedisın alanında büyüleyici yeni faydalar açan yeni nesil yüksek-verimli DNA dizileme tekniği 2007 yılında Nature Methods tarafından yılın tekniği seçilmiştir [7, 8]. Bu yeni nesil dizileme tekniklerinin avantajı DNA fragmentlerinin klonlanmasına ihtiyaç duyulmadan amplifiye olmuş tek zincir DNA'dan dizi verilerinin belirlenmesidir. Bu tekniklerin sınırlayıcı faktörü ise yüksek maliyetli oluşudur. Diğer bir sınırlayıcı faktör ise elde edilen yüksek miktarda verilerin yorumlanması için gelişmiş bilgisayar yazılımlarına ihtiyaç duyulmasıdır [8].

Mevcut yeni nesil dizileme teknikleri benzer olarak üç temel aşamayı takip eder; 1) DNA'nın sonikasyon veya nebulizasyon aracılığıyla rastgele kesilmesi 2) universal adaptörlerin kesilmiş DNA fragmentlerine bağlanması 3) immobilizasyon ve amplikon kümelerinin oluşturulması için adaptör bağlı fragmentlerin çoğaltılması [9]. Bu yeni platformlar 25 bazdan 500 baza kadar değişen kısa DNA dizileri üretir ve her koşuda birkaç yüz milyondan birkaç milyara kadar baz oluşturur.

Yeni nesil DNA dizileme metodları genel olarak sentez aracılığıyla dizileme, ligasyon aracılığı ile dizileme ve tek molekül dizileme olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Bu metodolojik farklılıklar okuma uzunluğu, verim, hata oranı gibi anahtar performanslarda farklılıklar yaratmaktadır. Bu durum yeni nesil dizileme metodlarının avantaj ve dezavantajlarının belirlenmesinde oldukça önemlidir (Çizelge 1). Çünkü yeni nesil dizileme metodları okuma uzunluğu, hataların yaygınlığı, türü ve her koşuda oluşturulan okuma sayısı açısından farklılık gösterir [10].

Sentez Aracılığıyla Dizileme

Sentez aracılığıyla dizilemede uygun büyüklükteki DNA fragmentlerine adaptör dizileri bağlanır ve ardından bu diziler floresan veya kimyasal sinyali geliştirmek için amplifiye edilir. Daha sonra örnekler ayrılır ve flow cell döngüsü için sabitlenir. DNA dizilerinin uzamasında DNA polimeraz kullanılır. Sentez aracılığıyla dizilemede okuma uzunluğu ve örneklerin amplifiye edilmesi ve sabitlenmesi açısından farklılık gösteren üç metod vardır. Bunlar 454 GS20 pirodizileme, Illumina ve İon Torrent metodlarıdır [10].

Roche 454 GS Genom Dizileme

Pirofosfat algılamanın prensibi 1985'te [11] tanımlanmış ve bu prensip kullanılarak DNA dizileme için yeni bir metod 1988'de rapor edilmiştir [12]. Bu teknik Stokholm'da Ronaghi ve ark [13] tarafından rutin olarak kullanılan ticari bir teknik olarak geliştirilmiştir [8].

İlk yeni nesil dizileme teknolojisi olan 454 teknolojisi 2005 yılında piyasada yerini almıştır. 454 teknolojisi, son yıllarda en fazla kullanılan ve hakkında araştırma yayını yapılan yeni nesil dizileme teknolojisidir. Bu sistemde pirodizileme stratejisi kullanılmaktadır. Pirodizileme enzimatik DNA sentezi sırasında pirofosfatın (Ppi) serbest bırakılması esasına dayanan eş zamanlı dizileme stratejisidir.

Bu teknoloji emülsiyon PCR'in avantajlarından yararlanır. Emülsiyon PCR'da, bireysel DNA parçaları taşıyan streptavidin boncuklar ayrı emülsiyon damlacıkları içinde yakalanır. Bireysel amplifikasyon reaktörleri olarak davranan damlacıklar, boncuk başına yaklaşık 10^7 klonal kopya DNA kalıbı üretmektedir [14, 15]. Her boncuk içeren kalıp, sonradan pikotiter plakalar içine aktarılır ve klonal olarak ilişkili kalıplar pirodizileme reaksiyonu kullanılarak analiz edilir. Pikotiter plaka paralel olarak yüzbinlerce pirodizileme reaksiyonunun yapılmasına izin verdiği için kitlesel dizilemeyi arttırmaktadır [14, 15]. Pirodizileme yaklaşım [13, 15, 16], kemilüminesans tarafından inorganik pirofosfatın (PPi) serbest bırakımını ölçen bir dizileme-sentezleme tekniğidir. Bu tekniğe göre, tek bir DNA ipliğindeki tamamlayıcı zincir boyunca her adımda tek bir baz sentezlenir. Kalıp DNA karışımına dNTP solüsyonu eklenir ve reaksiyon sonrasında bu dNTP'ler ortamdan uzaklaştırılır. Işıma, kalıp moleküldeki ilk eşleşmemiş baz ile nükleotid solüsyonundaki bazlardan biri eşleştiğinde gerçekleşir. Tek iplikli kalıp DNA, dizileme primeri ile hibridize edilir. Bu karışım DNA polimeraz, ATP sülfiraz, lüsiferaz, apiraz ve substrat olarak 5' fosfosülfat ve lüsiferin ile inkübe edilir. Bu durumda genomun bir araya getirilmesi süreci tekrarlı bölgelerin çok fazla olmasından dolayı güçtür (1).

2008 yılında piyasaya çıkarılan 454 GS FLX Titanium sistemi %99.9 doğruluk ile 700 bp uzunluğunda okuma yapabilir ve 24 saat içinde her çalışmada 0.7 G veri çıkışı sağlar. 2009 yılının sonlarında GS Junior 454 dizileme sistemi içerisine kombine edilmiştir. Bu sistemde kütüphane hazırlanması ve veri işlemesi basitleştirilmiş ve veri çıkışı her çalışmada 14 G'ye yükseltilmiştir. Bu yöntem genomların (bakteri, hayvan, insan) dizilenmesinde uygulanmaya başlanmıştır [8]. Roche sisteminin en avantajlı özelliği hızıdır; dizilemenin başlangıcından bitimi sadece 10 saat zaman alır. Okuma uzunluğu diğer yeni nesil dizileme yöntemleri ile karşılaştırıldığında seçkin bir özellik olarak ayrılmaktadır. Ancak maliyet Roche 454 sistemi için bir sorun olarak devam etmektedir [17].

Illumina/Solexa Tekniği

Solexa dizileme platformu 2006 yılında ticarileştirilmiştir. Bu tekniğin temeli her biri farklı floresan boya ile etiketli dört tersine dönüşür sonlandırıcı nükleotidin dizileme-sentez esasına dayanır. Illumina/Solexa [15, 18, 19] yönteminde, tek bir DNA molekülünün bir ucunda adaptör kullanarak sağlam bir yüzeye bağlı molekülle daha sonra tamamlayıcı adaptörlerle hibridize olarak tamamlayıcı ipliklerin sentezini oluşturur. Amplifikasyon aşamasından sonra, 40 milyondan fazla küme ile flowcell üretilir, her küme tek bir kalıp molekülden yaklaşık 1000 klon kopyadan oluşur. Kalıplar, DNA sentez-dizileme yaklaşımı kullanılarak kitlesel paralel biçimde dizilenir, çıkarılabilir floresan parçalar ve özel DNA polimerazlar ile geri dönüşümlü sonlandırıcılar oligonükleotid zincir içine dahil edilebilir. Sonlandırıcılar, dört farklı renk ile işaretlidir ve baz uzunluğuna göre birbirlerinden ayrılırlar. Illumina tekniği, homopolimerik dizileri uzatmada pirodizileme tekniğinden daha etkili olmasına rağmen, bu teknik kısa okuma dizileri üretmekte [19] ve bu yüzden kısa dizi tekrarları çözümlenememektedir. Ek olarak, modifiye DNA polimeraz ve geri dönüşümlü sonlandırıcılar kullanıldığından dolayı illumina dizi datasında hatalar olmaktadır [20]. Solexa tekniği kullanılarak kanola bitkisinin yeniden dizilenmesi gerçekleştirilmiştir [21].

Çizelge 1. Yeni nesil DNA dizileme metotlarının karşılaştırılması.

| Dizileme platformu | Dizileme yöntemi | Dizileme kimyası | Çalışma süresi | Okuma uzunluğu (bç) | Her çalışma için okuma sayısı (milyon) |
|---------------------|--------------------------------|---|----------------|---------------------|--|
| Roche 454 FLX | Sentez aracılığıyla dizileme | Pirodizileme | 24 saat | 400-500 | ~ 1 |
| Illumina | Sentez aracılığıyla dizileme | Reversible terminatör | 3-10 gün | 100 | 160 |
| İon torrent | Sentez aracılığıyla dizileme | Naturel nükleotidler 200 | 2 saat | 200 | 100 |
| ABI SOLİD | Ligasyon aracılığıyla dizileme | Parçalanabilir ligasyon aracılığıyla dizileme | 7-14 gün | 50 | 500 |
| Polonator | Ligasyon aracılığıyla dizileme | Parçalanmayan ligasyon aracılığıyla dizileme | 80 saat | 28 | 300-400 |
| Helicos HeliScope | Tek zincir dizileme | Reversible terminatör | 8 gün | 25-55 | 600-800 |
| Pacific BioSciences | Tek zincir dizileme | Real time | ~ 1 saat | 1300 | 35000 |

2008 yılında yeni optik ve kamera ile güncellenen Illumina Genome Analyzer II ile geniş alanlarda DNA kümelerinin daha etkili görüntülenmesi sağlanmıştır. Her pikotiter plakanın 50 milyondan fazla okuma yapması sağlanmıştır. 36 döngü için çalışma süresi tekli okumada 2 güne ve çiftli okumada dört güne düşürülmüştür [8].

Günümüzde illumina tarafından piyasaya sürülmüş MiSeq, NextSeq, HiSeq ve HiSeq X olmak üzere dört farklı software bulunmaktadır [22].

İon Torrent

En son geliştirilen yeni nesil DNA dizileme sistemlerinden olan İon Torrent teknolojisinde, yarı iletken entegre devre, genomların DNA dizi analizini optik olmadan direk gerçekleştirebilmektedir. İon Torrent sistemi [23] dizilerin belirlenmesinde semikonduktör teknolojisi kullanılarak nükleotid eklenmesinde bir H⁺ iyonunun serbest bırakılması sonucu pH değişimini ölçme esasına dayanan bir teknolojidir. Yeni nesil dizileme teknolojileri arasında floresan boyama yöntemine dayalı olmayan eşsiz bir yöntemdir [24]. Cihaz nükleotidlerin sıralı olarak eklenmesi aracılığıyla büyüyen dizi içerisine eklenen nükleotidleri belirleyebilir. Şu an bu teknolojiye İon PGM ve yeni İon Proton olmak üzere ulaşılabilir 2 sistem vardır. Yeni Proton sistemi tahmini 660 milyon sensöre sahip sonraki donanım çipinin serbest bırakılması üzerine 165 milyon sensör ile 250 bç uzunluğuna kadar okuma yapması ile lanse edilir. Hem PGM hemde yeni Proton sistemi için her donanım çipinin verimi geliştirilip artırılabilir. Yeni 318 çip seti ile PGM dizileme 11.1 milyon sensör ile 1000 Mb'm üzerinde dizi üretebilir. İon Torrent sisteminin diğer bir ilgi çekici özelliği ise örnek hazırlama maliyetinin diğer sistemler ile karşılaştırıldığında daha düşük olmasıdır. İon Torrent sistemi ile ilgili yayınlar mikrobiyal genomların dizilenmesi üzerine odaklanmıştır [24, 25], ancak bu sistem bitkilerde de kullanılmak için geliştirilmektedir [10].

Ligasyon Aracılığıyla Dizileme

Ligasyon aracılığıyla dizileme metodunda floresan etiket ile işaretlenmiş olan değişen uzunlukta oligonükleotid problemler kullanılır. DNA fragmenteri problemlerin hibridizasyonuna izin veren bilinen kısa bir dizi ile astarlanır. DNA ligaz flowcell'e eklenir. Floresan görüntüleme hangi probun bağlandığını belirlemek için kullanılır. Bu işlem nükleotid dizilerini değerlendirmek için farklı prob setleri kullanılarak tekrarlanır [10]. Ligasyon aracılığıyla dizilemede ABI/Solid ve Polonator olmak üzere iki metod vardır.

ABI/SOLID

SOLID (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) 'Life Technology' tarafından geliştirilmiş ve 2008 yılından bu yana kullanılmakta olan yeni nesil dizileme teknolojisidir. SOLID tekniği kütüphane dizilerinin analizi için 454 tekniğiyle benzer olarak tek molekül emülsiyon PCR ile başlar. Amplifikasyon ürünleri cam bir yüzeye aktarılır, 4 farklı floresan boya etiketli 16 dinükleotid kombinasyonu ile hibridizasyon ve ligasyon oluşur (her boya dört dinükleotidi etiketlemek için kullanılır). Nükleotidlerin identifikasyonu birbirini izleyen iki ligasyon reaksiyonunun sonuçları renk analizine göre belirlenir.

ABI SOLID sistemi boncuklara bağlı klonal olarak çoğaltılmış DNA fragmentlerinin paralel dizilenmesine olanak sağlar [26]. Bu dizileme metodu boya etiketli oligonükleotidler ile ardışık olarak bağlanma esasına dayanır ve her çalışma başına 500 milyon bazdan fazla haritalanabilir data üretebilir. Bu sistem yeniden dizileme sırasında oluşan hataların belirlenmesini sağlayan her bazı iki defa sorgulayan iki-baz kodlama mekanizmasına sahiptir. Bu iki-baz kodlama sistemi nispeten yüksek ham okuma hata oranını karşıladığı için dizileme güvenilirliğini artırır [27].

Yeni nesil DNA dizileme analizleri için geliştirilen SOLiD® BioScope™ Software Life Technology tarafından 2010 yılında piyasaya sürülmüştür [28].

Complete genomics/Polonator Sistem

Dover Sistem Polonator George Church'ın laboratuvarı ve Danaher Corporation (Washington, DC) arasındaki işbirliği ile geliştirilmiştir. Bu platformun en ilgi çekici özelliği tüm yönleri ile kullanıcılar tarafından ücretsiz erişilebilir, değiştirilebilir ve geliştirilebilir 'open source' bir platform olmasıdır [29]. Complete genomics ligasyon temelli dizileme olan Polonator G.007 sistemine dayalı dizilemedir. Polonator G.007 sistemi Dr. George Church'ın laboratuvarında Harvard Üniversitesi ile Dover sistem işbirliği içinde geliştirilmiştir. Polonator sistemde dizileme için kütüphanenin hazırlanması, emülsiyon PCR kullanılarak kalıp DNA'nın amplifikasyonu, örneklerin flowcell üzerine yüklenmesi ve ligasyon aracılığıyla tamamen otomatik polimeraz koloni (polony olarak adlandırılan) dizileme kullanılarak gerçekleştirilir [30]. Polonator sistem kişisel genom projesinde [31] kullanılan major sistem olsa da bitki genomunda kullanımı sınırlıdır.

Tek Molekül Dizileme

Tek molekül dizileme sistemi sıklıkla 'üçüncü nesil dizileme' olarak adlandırılır. Bu platformda yer alan yöntemler, tek nükleik asit molekülünden DNA dizileme sırasında kimyasal luminisans yoluyla nükleotid birleşmesinin sinyalini belirleme prensibine dayanır. Bu yöntemler diğer yeni nesil dizileme metodlarına göre düşük konsantrasyonda başlangıç materyali kullanılabilen basitleştirilmiş örnek hazırlama yönünden avantaj sağlar [32]. Tüm tek molekül dizileme metodları nükleotid birleşmesini algılamak için floresan görüntüleme kullanılır. Tek nükleotid dizileme teknolojileri piyasada nispeten yenidir. Bu metodlar daha ulaşılabilir olmakta ve bitki genomunda uygulanabilirliği bu alandaki yayınlar ile takip edilmeye devam etmektedir [10].

Helicos Sistemi

Bir tür üçüncü nesil dizileme sistemi olan HeliScope, Helicos BioSciences (Cambridge, MA) tarafından ticarileştirilmiştir. Bu teknik, denatüre DNA örneklerinin katı bir yüzeye yapıştırılan oligonükleotid primerlerin hibridizasyonu ile sabitlenmesine veya DNA örneği ile katı yüzeye kovalent bağ ile bağlanarak direkt olarak immobilize edilerek hibridize olan, ardından universal primer ile astarlanan denature DNA fragmentlerin kullanılmasına dayanan bir tekniktir [10, 33]. Floresan etiketli nükleotidler tek sıra halinde salınarak dizilenir [29, 34]. Tek baz uzamanın çoklu döngüsü ortalama 35 bç veya daha fazla uzunlukta olan okuma gerçekleştirir. Ortalama okuma uzunluğu hata oranı yaklaşık %4 olduğunda 20 nükleotid civarındadır. Flowcell prototipinde binlerce okuma oluşturulmasına rağmen, HeliScope sisteminde 600 milyon ile 1 milyar arasında okuma yapılır.

Pasific Biosciences

Tek nükleotid dizileme platformlarından biri olan Pacific BioSciences (PacBio RS) [35] 2010 yılında sınırlı sayıda piyasaya sürülmüştür. Bu yöntemde DNA polimeraz molekülleri zero-mode waveguide (ZMW) içerisinde immobilize edilir [36]. Kalıp DNA molekülleri dizileme için polimeraz ile bağlanır. Her biri farklı floresan boya ile etiketli dört nükleotidte karışım içerisinde hazır bulunur. Bu immobilize edilen DNA polimeraz modeli Helicos ile karşılaştırıldığında daha uzun DNA kalıplarının analizine izin verir [37]. İmmobilize DNA polimeraz lazer uyarımları tarafından bozulmaya uğrar ve yeniden değiştirilemez. Bu durum okuma uzunluğu potansiyelini sınırlamaktadır. Ek olarak bu metod yeni nesil DNA dizileme metodları arasında en yüksek hata oranına (%15) sahiptir. Fakat aynı molekülün çoklu okunması ile dizileme yapılarak bu durumun üstesinden gelinir ve hata elimine edilebilir [37, 38].

Life Technologies — VisiGen/Starlight

2008 yılında Life Teknolojileri tarafından satın alınan VisiGen real-time DNA dizileme sistemi ile dizileme yapan tek molekül dizileme platformlarından biridir [39]. O zamandan beri Life Tech Starlight platformu olarak yeniden adlandırılmıştır. Birleşen nükleotidlerin belirlenmesi için kuantum dot (qdot)-türevi floresan enerji transfer (FRET) kullanılmasından dolayı bu isimlendirme yapılmıştır. Kalıp DNA'lar cam yüzeye yapışmış oligonükleotidlere bağlanarak sabitlenir ve sabitlenen oligonükleotidler tamamlayıcı DNA fragmentleri ile astarlanır. PacBio RS gibi Starlight sistemi de DNA dizilerinin belirlenmesinde dört-renk floresan görüntüleme

kullanır. Helicos gibi DNA polimerazın yenisiyle değiştirilebilme avantajına sahiptir. Şu anda bu teknolojinin diğer yeni nesil DNA dizileme yöntemleri ile nasıl karşılaştırılacağı bilinmemektedir. Ancak okuma uzunluğu açısından (harcanan polimerazın yenisiyle değiştirilme yeteneğinden dolayı) muhtemelen PacBio ile rekabet edebilir veya daha iyi performans gösterebilir [10].

NanoporDizileme

Nanopor dizileme üçüncü nesil dizileme metodları arasında yer alan bir metottur. Nanopor iyon değişimini kolaylaştıran lipid tabaka üzerine gömülü protein kanalda bulunabilen ince bir biyopordur [40]. Nanopor dizilemenin konsepti α -heptamerik (α HL) por boyunca tek zincir DNA'nın dizilmesini içerir. α HL *Staphylococcus aureus*'tan izole edilen 33 kD boyutunda bir proteindir ve 100 mV'in üzerinde olağanüstü voltajı tolere edebilir [41]. Bu eşsiz özellik nanopor blok inşası rolünü destekler. Nanopor dizilemede iyonik flow sürekli uygulanmaktadır. Güncel bozulma standart elektrofizyolojik teknik aracılığıyla basitçe tespit edilir. Okuma tüm deoksiribonükleosid monofosfatlar (dNMP) arasındaki boyut farkına dayanır. Bu nedenle, verilen dNMP için karakteristik geçerli modülasyon ile ayırım yapılır [17]. Günümüzde Oxford Nanopore Technologies bünyesinde MinION, PromethION ve GridION olmak üzere üç cihaza ticari olarak erişim sağlanmaktadır [42].

Yeni nesil DNA dizileme metodları arasında yer alan farklı stratejiler maliyet, okuma uzunluğu (bç) ve çalışma süresi açısından birbirlerine göre avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Helicos sistemi diğer sistemler ile karşılaştırıldığında daha az kullanılmaktadır. Pasific bioscience sistemi yeni nesil DNA dizileme metodları arasında en yüksek hata oranına sahiptir. İon torrent sisteminin çalışma süresi oldukça kısadır. Ancak bitkilerde kullanımı kısıtlı kalmıştır. 454 ve Illumina teknikleri gerek verim, gerekse güvenilirlik açısından bitkilerde en yaygın kullanılan metodlardır.

Yeni nesil dizileme teknolojilerinin piyasaya çıkması biyolojide, genomik ve transkriptomik yaklaşımlarda devrim yaratmıştır. Bu yeni dizileme araçları keşif, popülasyonlarda genetik markırların değerlendirilmesi ve doğrulanması için değerlidir [43]. Örneğin moleküler markır geliştirme çalışmaları kapsamında DNA'da tek baz değişimini ifade eden tek nükleotid polimorfizmi (SNP veya nokta mutasyonu) yeni nesil dizileme yöntemleri ile belirlenebilir. SNP genetik varyasyonların belirlenmesinde ve bağlantı haritalarının oluşturulmasında kullanılabilir. Tüm prokaryot ve ökaryotlarda DNA üzerinde 1-6 nükleotid arasında tekrar eden dizileri ifade eden basit dizi tekrarları (SSR) yüksek mutasyon oranı ve buna bağlı olarak yüksek polimorfizm oranından dolayı bağlantı haritalarının geliştirilmesinde, kantitatif özellik lokusu (QTL) haritalamada, markır yardımıyla seleksiyon uygulamaları için oldukça uygundur. Yine yeni nesil dizileme platformları kullanılarak transkripton analizi, ploidi seviyesinin belirlenmesi ve filogenetik çalışmalar gerçekleştirilebilir.

Yeni nesil DNA dizileme teknolojileri her geçen gün gelişmektedir. Araştırmacılar yeni nesil dizileme teknolojilerinin en kısıtlayıcı faktörlerinden biri olan maliyeti azaltmak ve verimi artırmak amacıyla sürekli yeni yöntemler geliştirmektedir. Tek molekül dizileme tekniklerinde de son yıllarda yenilikler olmuştur. Bunlar arasında optik dizileme ve SMRT teknikleri sayılabilir.

Optik Dizileme ve Haritalama

Çok uzun ancak maliyetine göre düşük verimli okuma yapan başka teknolojiler de vardır. Örneğin tek molekül dizileme yöntemlerinden biri olan optik dizileme ve haritalama tekniği ile yüzlerce kilobaz uzunluğunda DNA moleküllerinin çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesilerek veya dizi spesifik kırılma enzimleri ile muamele edildikten sonra işaretlenerek dizilenmesi mümkündür. Klasik dizileme ile dizilenmesi zor olan yüksek tekrarlayan ve duplike genoma sahip mısır, bu tek molekül dizileme tekniği ile başarılı bir şekilde analiz edilmiştir [44]. Bu optik dizileme teknolojileri genom yapısı için güçlü bir görünüm sağlar fakat gen ifadesi analizleri gibi yüksek sayıda okuma gerektiren uygulamalar için ayrıntılı dizi verileri sağlayamaz [45].

Single-molecule real-time DNA sequencing (SMRT®)

DNA dizileme aracılığıyla tek-nükleotid resolüsyonunda modifiye bazların direkt belirlenmesi gerçekleştirilmektedir. SMRT metodu bakteri DNA metiltransferazlarının karakterizasyonu için uygun bir tekniktir. Bu metot pulse width (PW) ve interpulse duration (IPD) olmak üzere iki parametre şeklinde, her dNTP'nin birleşme oranının kinetik veri ilişkisinden yararlanır. Bu kinetik parametrelerdeki önemli değişiklikler SMRT dizileme sırasında DNA polimeraz zincir üzerinde m6A, m5C veya 5-hmC ile karşılaştığı zaman gözlenmiştir. Bu farklı kinetik işaretler DNA örneğindeki baz modifikasyonlarının tipi ve pozisyonunun belirlenmesine olanak sağlar [46].

RNAP sequencing

Tek molekül DNA dizileme için çok farklı bir yaklaşım RNA polimeraz (RNAP) kullanılarak geliştirilmiştir [47]. Bu yöntemde, RNAP bir polistiren boncuğa bağlıdır. DNA fragmentinin bir ucuna başka bir boncuk bağlıdır. Her boncuk optik tuzağa yerleştirilir. RNAP, DNA fragmenti ile etkileşir ve kalıp boyunca RNAP'ın transkripsiyonel hareketi iki boncuk arasındaki DNA'nın uzunluğunu değiştirir. Bu durum tek DNA molekülü üzerinde tek-baz çözülmesi ile sonuçlanan angstrom oranında hassaslık ile kaydedilebilen iki boncuğun yer değiştirmesine yol açar. Bu yöntem ile dört nükleotid için yer değiştirme kayıtları hizalanarak ve kalibrasyon için dizilenecek bilinmeyen fragmentleri kuşatan bilinen diziler kullanılarak dizi bilgilerini anlamak mümkün olmaktadır [8].

2010 yılında National Human Genome Research Institute (NHGRI) düşük maliyetli üçüncü nesil dizileme teknolojilerinin gelişimi için 10 farklı araştırma grubuna fon sağlamıştır [48]. NHGRI'nün desteklediği projelerden bir tanesi Droplet-based microfluidic tekniğidir. Abate ve ark. [49] Droplet-based microfluidic tekniğinin saniyede binlerce mikrometre ölçekli damlacıkları üretebildiğini bildirmişlerdir. Bu tekniğe göre her damla toplam bileşenin küçük miktarları ile dakikada milyonlarca reaksiyonun gerçekleşmesine izin veren bireysel biyokimyasal reaksiyonun evi olabilir.

Bitkilerde Yeni Nesil DNA Dizileme Çalışmaları

Bitkilerin tüm genomunun yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak dizilenmesi ile ilgili çalışmalar 2010 yılından itibaren yayınlanmaya başlanmıştır. 2010 yılına kadar ise bazı bitkilerin genomlarının bir kısmı dizilenmiştir. Örneğin 2006 yılında [50] iki temel çift çenekli bitkinin (*Nandina domestica* Thunb. (Berberidaceae) ve *Platanus occidentalis* L. (Platanaceae) plastid genomu, 2009 yılında [50] bir tür yabancı ot olan

Amaranthus tuberculatus (waterhemp) bitkisinin kloroplast genomu yeni nesil dizileme tekniği kullanılarak dizilenmiştir. Arpada yürütülen yeni nesil DNA dizileme çalışmaları sonucunda bir genom snapshot; yaklaşık %1 haploid genomuna eşdeğer olarak tespit edilmiş ve arpa genomunun yaklaşık %60 transpose edilebilir elementler ve yaklaşık %9 yeni tekrar dizileri içerdiği gösterilmiştir [5, 52].

Melonomiks projesi çerçevesinde, kavunun (*Cucumis melo* L.) 480 Mbp'lik genomu, Roche 454 GS FLX Titanium sistemi ile dizilenmiştir. Toplamda, 24 milyondan fazla okumayı temsilen 17.6 X kavun genomu dizilenmiştir. Şimdiye kadar kavun genomunun 382 Mb'lık kısmı (%80) dizilenmiştir [53]. B73 ve Mo17 kodlu doğal mısır hatlarında 454 dizileme tekniği kullanılarak aday SNP'ler tespit edilmiştir. Belirlenen SNP'lerden yaklaşık %85'i (94/110) Sanger dizileme tarafından başarılı bir şekilde doğrulanmıştır. Bu doğrulama oranına dayanarak, bu pilot denemede 2400'den fazla mısır geni içerisinde 4900'dan fazla geçerli SNP tanımlanmıştır [54]. Novaes ve ark. [55] yapmış oldukları çalışmada agronomik açıdan önemli olan fakat az sayıda genomik araştırma yapılan *Eucalyptus grandis* bitkisinin genomunda SNP'leri tespit etmişlerdir. Bu amaçla çalışmada 21 farklı ökaliptus genotipinin dokularından eşit miktarda örnek alınarak havuz oluşturulmuş, daha sonra mRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bir araya toplanan mRNA örnekleri dizileme için cDNA kütüphanelerinin oluşturulmasında kullanılmıştır. 454 dizileme tekniği kullanılarak toplamda 148.4 Mbp EST dizisi oluşturulmuştur. Çalışma sonunda toplam 23.742 SNP belirlenmiştir. Sanger dizileme tekniği ile lokuslarda bulunan 337 SNP'nin 279'unun (%82.8) geçerliliği doğrulanmıştır. Bir başka SNP tespit projesi yüksek heterozigot ve poliploid genoma sahip şeker kamışında gerçekleştirilmiştir. Şeker kamışı *Saccharum officinarum* ve *Saccharum spontaneum* melezidir [56]. Çalışmada 307 PCR amplifikasyonu haritalama popülasyonuna ait iki ebeveynde (Q165 ve IJ76-514) gerçekleştirilmiştir. Eşit miktarda PCR ürünleri kullanılarak bir havuz oluşturulmuş ve 454 FLX dizileme sistemi ile dizi analizleri yürütülmüştür. Ortalama 90.000'den fazla 454 okuma her iki ebeveyn için elde edilmiştir. Q165 ebeveyninde 1.632 ve IJ76-514 ebeveyninde 1.013 aday SNP belirlenmiştir. Benzer şekilde *Amaranthus (Amaranthus caudatus)* bitkisinde dört haritalama popülasyonuna ait ebeveynlerinde SNP belirleme çalışmaları 454 FLX dizileme metodu ile gerçekleştirilmiştir [57]. İkili karşılaştırma ile belirlenen SNP'lerin sayısı 140'tan 11.047'ye kadar değişiklik göstermiştir. Sanger doğrulaması ile 35 SNP'nin 34'ünün (%97) geçerli olduğu gösterilmiştir [29]. Kompleks bitki genomunda yeni nesil dizileme ile SNP keşfi mısırdaki 454 teknoloji ile AFLP (Amplifiye Parça Uzunluk Polimorfizmi) analizi birleştirilerek kanıtlanmıştır. AFLP fragment kütüphaneleri 454 sekanslama teknolojisi kullanılarak 5-10 kat fazla dizilenir ve hatalı diziler çoğaltılmış parçalardan ayrılan diziler hizalanır ve gerçek polimorfizm belirlenir. Bu sistem mısırdaki doğrulanmış ve belirlenen SNP'lerin %75'i doğru polimorfizm olarak teyit edilmiştir [27]. Zalapa ve ark. [58] yapmış oldukları çalışmada, turna yemişi (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) bitkisinin genomunda 454 dizileme metodu ile SSR tespit etmişlerdir. Çalışmaları sonucunda 107244 SSR lokusu keşfedilmiş ve AG tekrar dizisi %35 oranı ile en sık rastlanan SSR motifi olmuştur.

Domates gen kaynakları içerisinde, genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla altı doğal domates varyetesinin kök,

yaprak, çiçek, meyve ve kallus dokularından cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Illumina GAI yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak her domates varyetesi için toplam dizinin 2.5 Gb'dan fazlası ortaya çıkarılmıştır. Tek ve eşleştirilmiş 60 bp'lik okuma ile domateslerin 32.5 Mb transkriptom dizilemesi gerçekleştirilmiştir. Bu yeni diziler, türler arasında gen duplikasyonlarının belirlenmesi, domates tek nükleotid polimorfizmlerinin incelenmesi gibi gelecek analizler için araç olacağı belirtilmiştir [59]. Huang ve ark. [60] 150 rekombinant kendilenmiş çeltik hattı ile genetik harita popülasyonu oluşturmuşlar ve bu popülasyonda Illumina dizileme sistemi kullanarak SNP'leri tespit etmişlerdir. 150 rekombinant kendilenmiş hatta (RIL) ortalama uzaklığı 25 SNP/Mb veya RIL için her 40 kb'da 1 SNP olan toplam 1.493.461 SNP belirlenmiştir. Azam ve ark. [61] iki nohut genotipinde (ICC4958 ve ICC1882) yaptıkları çalışmada Illumina GA I yeni nesil dizileme tekniğini kullanarak nohut moleküler islahı çalışmalarında yararlı olabilecek SNP'leri tespit etmişlerdir.

Bitkilerde SNP'lerin belirlenmesinde Solexa dizileme teknolojisini kullanılabileceği kanola (*Brassica napus*) bitkisinde gösterilmiştir [21]. Çalışmada Tapidor ve Ningyou 7 genotipleri kullanılmıştır. Genç bitkilerin yapraklarından elde edilen diziler yaklaşık 26 Mb referans dizi ile hizalanmıştır. Hizalanmış diziler iki kültür arasında okuma şiddetine bağlı olarak 23.330-41.593 aday SNP olduğunu göstermiştir. Papatya bitkisinde (*Tragopogon miscellus*) 454 ve Illumina dizileme yöntemleri kullanılarak SNP'ler tespit edilmiştir. Çalışmada *T. dubius*, *T. pratensis* ve *T. miscellus* türleri kullanılmıştır. Diploid *T. miscellus* türlerinde 7782 SNP tespit edilmiştir [62]. *Aegilops tauschii* bitkisinin genomunda yeni nesil DNA dizileme metodu kullanılarak SNP'ler tespit edilmiştir. *Aegilops tauschii* AL8/78 genotipinin genomik DNA'sı Roche 454 platformu ile, *Aegilops tauschii* AS75 genotipinin genomik DNA'sı SOLID ile dizilenmiştir. Toplam 195.631 SNP gen bölgelerinde keşfedilmiştir. 155.580 SNP karakterize olmayan tek-kopya bölgelerinde, diğer 145.907 SNP ise tekrar bağlantı noktalarında keşfedilmiştir [63].

SONUÇ

1950'li yıllardan itibaren Moleküler Biyoloji biliminin hızla gelişmesi ile DNA çalışmaları ön plana çıkmıştır. Geçtiğimiz 10-15 yıl içerisinde de yeni nesil DNA dizileme teknikleri ile yürütülen çalışmalar oldukça hızlanmış ve halen hızla devam etmektedir. Çeşitli yeni nesil dizileme platformları şu an ulaşılabilir durumdadır. 2000'li yılların başından bu yana DNA dizi analizi için kullanılan metotlarda ve cihazlarda çok hızlı bir gelişim gerçekleşmiştir. Farklı dizileme yollarına, çeşitli örnek hazırlama stratejilerine, immobilizasyona ve nükleik asit kimyasına sahip bu dizileme yöntemleri halen geliştirilmeye devam etmektedir. Bitkilerde yeni nesil DNA dizileme metotları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde, 454 ve Illumina dizileme stratejileri kullanılarak yapılan çalışma sayısının daha fazla olduğu göze çarpmaktadır.

KAYNAKLAR

[1] M. Türктаş, DNA Dizi Analizi. Floresan Temelli Yeni nesil genetik analiz uygulamaları: DNA dizi analizi, moleküler markörler uygulamaları ve çoklu gen anlatım analizleri uygulamalı eğitimi kitapçığı, TÜBİTAK (2011).

[2] A. Maxam and W. Gilbert, A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (1977), pp. 560-564.

[3] F. Sanger, S. Nicklen and A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (1977), pp. 5463-5467.

[4] S.W. Klug and W.R. Cummings, *Concept of Genetics*, Prentice Hall, New Jersey (2000), pp. 745.

[5] A. Brautigam, U. Gowik, What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research, *Plant Biology*, 12 (2010), pp. 831-841.

[6] L.M. Smith, et al, Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis, *Nature*. 321 (1986), pp. 674-679.

[7] S. Schuster, et al, Method of the year, next-generation DNA sequencing, *Functional genomics and medical applications. Nature Methods*, 5 (2008), pp. 11-21.

[8] W.J. Ansorge, Next-generation DNA sequencing techniques, *New Biotechnology*, 25(4) (2009), pp. 195-203.

[9] J. Shendure and H. Ji, Next-generation DNA sequencing, *Nature Biotechnology*, 26 (2008), 1135-1145.

[10] A.N. Egan, J. Schlueter and M. David, Spooner. Applications of next-generation sequencing in plant biology, *American Journal of Botany*, 99(2) (2012), pp. 175-185.

[11] P. Nyren and A. Lundin, Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis, *Analytical Biochemistry*, 151 (1985), pp. 504-509.

[12] E.D. Hyman, A new method of sequencing DNA, *Analytical Biochemistry*, 174 (1988), pp. 423-436.

[13] M. Ronaghi, S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlen and P. Nyren, Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release, *Analytical Biochemistry*, 242 (1996), pp. 84-89.

[14] M. Margulies, M. Egholm, W.E. Altman, S. Attiya, J.S. Bader, L.A. Bembien, J. Berka, M.S. Braverman, Y.J. Chen, et al, Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors, *Nature*, 437 (2005), pp. 376-380.

[15] O. Morozova and M.A. Marra, Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*, 92 (2008), pp. 255-264.

[16] P. Nyren, B. Pettersson and M. Uhlen, Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay, *Analytical Biochemistry*, 208 (1993), pp. 171-175.

[17] L. Liu, Y. Li, S. Li, N. Hu, Y. He, R. Pong, D. Lin, L. Lu and M. Law, Comparison of Next-Generation Sequencing Systems, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 251364, (2012), pp. 11.

[18] S. Bennett, Solexa Ltd. *Pharmacogenomics*, 5 (2004), pp. 433-438.

[19] D.R. Bentley, Whole-genome re-sequencing, *Current Opinion in Genetics & Development*. 16 (2006), 545-552.

[20] C.A. Hutchison, DNA sequencing: bench to bedside and beyond, *Nucleic Acids Research*, 35 (2007), pp. 6227-6237.

[21] M. Trick, Y. Long, J.L. Meng and I. Bancroft, Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in the polyploid *Brassica napus* using Solexa transcriptome sequencing, *Plant Biotechnology Journal*, 7 (2009), pp. 334-346.

- [22] <http://www.illumina.com>
- [23] <http://www.iontorrent.com>
- [24] J.M. Rothberg, W. Hinz, T.M. Rearick, J. Schultz, W. Mileski, M. Davey and J.H. Leamon, An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing, *Nature*, 475 (2011), pp. 348 – 352.
- [25] D.P. Howden, C.R.E. Mcevoy, D.L. Allen, K. Chua, W. Gao, P.F. Harrison and J. Bell, Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR, *PLoS Pathogens*, 7: e1002359, (2011).
- [26] S.C. Schuster, Next-generation sequencing transforms today's biology, *Nature Methods*, 5 (2008), pp. 16–18.
- [27] M. Imelfort, C. Duran, J. Batley and D. Edwards, Discovering genetic polymorphisms in next-generation sequencing data. *Plant Biotechnol J*, 7 (2009), pp. 312–317.
- [28] <http://www.lifetechnologies.com>
- [29] S. Deschamps and M.A. Campbell, Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery, *Molecular Breeding*, 25 (2010), pp. 553-570.
- [30] J. Shendure, G.J. Porreca, N.B. Reppas, X. Lin, J.P. McCutcheon, A.M. Rosenbaum and M.D. Wang, Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome, *Science*.309 (2005), pp. 1728 – 1732 .
- [31] <http://www.personalgenomes.org>
- [32] L. Orlando, A. Ginolhac, M. Raghavan, J. Vilstrup, M. Rasmussen, K. Magnussen and K. Steinmann, True single-molecule DNA sequencing of a Pleistocene horse bone, *Genome Research*, 21 (2011), pp. 1705 – 1719.
- [33] J.F. Thompson and K.E. Steinmann, Single-molecule sequencing with a HeliScope Genetic Analysis System, *Current Protocols in Molecular Biology*, 92 (2010), pp. 7.10.1 – 7.10.14.
- [34] T.D. Harris, P.R. Buzby and H. Babcock, Single-molecule DNA sequencing of a viral genome, *Science*, 320 (2008), pp. 106–109.
- [35] <http://www.pacificbiosciences.com>
- [36] M.J. Levene, J. Korlach, S.W. Turner, M. Foquet, H.G. Craighead and W.W. Webb, Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentration, *Science*, 299 (2003), pp. 682- 686 .
- [37] M.L. Metzker, Sequencing technologies — The next generation, *Nature Reviews Genetics*, 11 (2010), pp. 31-46.
- [38] J. Eid, A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto and P. Peluso, Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules, *Science*, 323 (2009), pp. 133-138.
- [39] S.H. Hardin, Real-time DNA sequencing. In M. Janitz [ed.], *Nextgeneration genome sequencing: Towards personalized medicine*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, (2008), pp. 97-102.
- [40] L. Song, M.R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley and J.E. Gouaux, "Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore," *Science*, 274 (5294) (1996), pp. 1859–1866.
- [41] D.W. Deamer and M. Akeson, Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid Sequencing, *Trends in Biotechnology*, 18(4) (2000), pp. 147–151.
- [42] <http://www.nanoporetech.com>
- [43] J.W. Davey, P.A. Hohenlohe, P.D. Etter, J.Q. Boone, J.M. Catchen and M.L. Blaxter, Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing, *Nature Reviews*, 12 (2011), pp. 499-510.
- [44] S. Zhou, F. Wei, J. Nguyen, M. Bechner, K. Potamouis, S. Goldstein, L. Pape, M.R. Mehan, C. Churas, S. Pasternak, D.K. Forrest, R. Wise, D. Ware, R.A. Wing, M.S. Waterman, M. Livny and D.C. Schwartz, A single molecule scaffold for the maize genome, *PLoS Genetics*, 5:e1000711, (2009).
- [45] J.F. Thompson and P.M. Milos, The properties and applications of single-moleculeDNA sequencing, *Genome Biology*, 12 (2011), pp. 217-227.
- [46] T.A. Clark, I.A. Murray, R.D. Morgan, A.O. Kislyuk, K.E. Spittle, M. Boitano, A. Fomenkov, R.J. Roberts and J. Korlach, Characterization of DNA methyltransferase specificities using single-molecule, real-time DNA sequencing, *Nucleic Acids Research*, 40(4) (2012), pp. 1-12.
- [47] W.J. Greenleaf and S.M. Block, Single-molecule, motion-based DNasequencing using RNA polymerase, *Science*. 313 (2006), pp. 801.
- [48] <http://www.genome.gov/27541189#top>
- [49] A.R. Abate, T. Hung, R.A. Sperling, P. Mary, A. Rotem, J.J. Agresti, M.A. Weiner and D.A. Weitz, DNA sequence analysis with droplet-based microfluidics, *Lab Chip*, 13(24) (2013), pp. 4864-4869.
- [50] M.J. Moore, A. Dhingra, P.S. Soltis, R. Shaw, W.G. Farmerie, K.M. Folta and D.E. Soltis, Rapid and accurate pyrosequencing of angiosperm plastid genomes, *BMC Plant Biology*, 6 (2006), pp. 13.
- [51] R.M. Lee, J. Thimmapuram, K.A. Thinglum, G. Gong, A.G. Hernandez and C.L. Wright, Sampling the waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) genome using pyrosequencing technology, *Weed Sciences*, 57 (2009), pp. 463–469.
- [52] T. Wicker, S. Taudien, A. Houben, B. Keller, A. Graner, M. Platzer and N. Stein, A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley, *Plant Journal*, 59 (2009), pp. 712–722.
- [53] J. Garcia-Mas, The Shotgun Sequence of the Melon Genome, a New Toolfor Melon Breeding, 28th *International Horticultural Congress*, Abstracts, August 22-27, Lisbon, (2010), pp. 9.
- [54] W.B. Barbazuk, S.J. Emrich, H.D. Chen, L. Li and P.S. Schnable, SNP discovery via 454 transcriptome sequencing, *Plant Journal*, 51 (2007), pp. 910–918.
- [55] E. Novaes, D.R. Drost, W.G. Farmerie, G.J. Pappas Jr, D. Grattapaglia, R.R. Sederoff and M. Kirst, High-throughput gene and SNP discovery in *Eucalyptus grandis*, an uncharacterized genome, *BMC Genomics*, 9 (2008), pp. 312-326.
- [56] P.C. Bundock, F.G. Elliott, G. Ablett, A.D. Benson, R.E. Casu, K.S. Aitken, Targeted single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in a highly polyploid plant species using 454 sequencing, *Plant Biotechnology Journal*, 7 (2009), pp. 347–354.
- [57] P.J. Maughan, S.M. Yourstone, E.N. Jellen and J.A. Udall, SNP discovery via genomic reduction, barcoding, and 454 pyrosequencing in amaranth, *Plant Genome*, 2 (2009), pp. 260–270.
- [58] J.E. Zalapa, H. Cuevas, H. Zhu, S. Steffan, D. Senalik, E. Zeldin and B. Mccown, Using next-generation sequencing approaches for the isolation of simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences, *American Journal of Botanic*, 99 (2012), pp. 193-208.
- [59] D. Francis, Next Generation Sequencing of the Tomato Transcriptome, 28th *International Horticultural*

Congress, Abstracts, August 22-27, Lisbon, 1 (2010), pp. 10.

[60] X. Huang, Q. Feng, Q. Qia, et al, High-throughput genotyping by whole-genome resequencing, *Genome Research*, 19 (2009), pp. 1068–1076.

[61] S. Azam, V. Thakur, P. Ruperao, T. Shah, J. Balaji, B.P. Amindala, A.D. Farmer, D.J. Studholme, G.D. May, D. Edwards, J.D.G. Jones and R.K. Varshney, Coverage-based consensus calling(CbCC) of short sequence reads and comparison of CbCC results for the identification of SNPs in chickpea (*Cicer arietinum*; Fabaceae), across species without a reference genome, *American Journal of Botany*, 99 (2012), pp. 186-192.

[62] R.J.A. Buggs, S. Chamala, W. Wu, L. Gao, G.D. May and P.S. Schnable, Characterization of duplicate gene evolution in the recent natural allopolyploid *Tragopogon miscellus* by next generation sequencing and Sequenom iPLEX MassARRAY genotyping, *Molecular Ecology*, 19(s1) (2010), pp. 132–146.

[63] F.M. You, N. Huo, K.R. Deal, Y.Q. Gu, M. Luo, P. McGuire, J. Dvorak and O.D. Anderson, 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 (2011), pp. 59.