

Методы секвенирования нового поколения и агрогеномика

2018 год

Материал для сайта www.svetmix.com

Резюме

Прогресс современной науки в значительной степени связан с развитием методов исследования и инновационных технологий. К таким методам в сфере биологии и нанотехнологии относится секвенирование нового поколения (NGS) - техника определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания её первичной структуры. Интенсивное развитие NGS в XXI веке сделало этот метод одним из передовых в области. NGS активно применяется в том числе научных исследованиях и практических разработках в сельском хозяйстве. При помощи NGS можно осуществлять описание, анализ и изучение объектов на молекулярном уровне (на уровне ДНК и РНК), а также создавать инновационные практические решения для аграрного сектора (агрогеномика): плодородие и состав почв, генетика и продуктивность с-х растений и животных, микробиология сельского хозяйства, ветеринария. Результаты анализов NGS находят применение также и в пищевой промышленности: разработка комбикормов для сельскохозяйственных животных, производство, хранение, оценка качества и повышение качества пищевой продукции сельского хозяйства.

Ключевые слова: агрогеномика, генетика, геномика, комбикорма, метагеномика, микробиология, нуклеотидная последовательность, омика, пищевая продукция, почвы, продуктивность, с-х животные, секвенатор, секвенирование нового поколения, сельское хозяйство, NGS.

Введение

Секвенирование нового поколения (NGS, *англ. next generation sequencing*) — техника определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания её первичной структуры. Технология методов секвенирования нового поколения (NGS) позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. NGS осуществляется с помощью повторяющихся циклов удлинения цепи, индуцированного полимеразой, или многократного лигирования олигонуклеотидов. В ходе NGS могут генерироваться до сотен мегабайт и гигабайт нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл [Инге-Вечтомов 2010, Жимулев 2007].

История NGS

NGS продолжает уже известные наработанные методы, но отличается увеличенным качеством, скоростью и информативностью анализа в том числе за счет ультрасовременного оборудования.

Со времени появления в 1977 году первой концепции секвенирования («метод обрыва цепи»), предложенной Сэнгером, эта область науки получила значительное развитие и усовершенствование. Переломной точкой развития технологии стало появление ПЦР и автоматизация основных этапов «чтения» ДНК, давшие начало методам секвенирования следующего поколения [Спирин 2011, Антонов 2003]. Платформы для методов нового поколения основываются на распараллеливании процесса «чтения» ДНК, и за один прогон работы секвенатора теперь можно определить первичные структуры нескольких участков генома. Стоимость секвенаторов нового поколения и проведения анализов также стала более доступной, по сравнению с пилотными проектами, и превосходит их по эффективности. На сегодняшний день производительность некоторых секвенаторов измеряется уже сотнями миллиардов пар оснований. Возможно проведение секвенирования полного индивидуального генома в течение всего нескольких дней.

В современных методах NGS применяют ДНК-чипы и интерактивные технологии. Информацию о нуклеотидных последовательностях, собранную в ходе циклических ферментативных реакций (ПЦР), визуализируют в виде различных диаграмм, графиков и схем. Полученные данные используются для восстановления нуклеотидной последовательности или, как для технологии SOLiD, динуклеотидных «цветов». Несмотря на разные методы амплификации (получения копий) участков генома и на техническую разницу дифференциации различных нуклеотидов в прочтенных последовательностях, общая схема работы для всех секвенаторов включает три стадии.

Основные стадии секвенирования:

Стадия 1— создание библиотеки случайных последовательностей ДНК, которые можно будет сшить с общедоступными адаптерными последовательностями.

Стадия 2 создание ампликонов с помощью ПЦР, которые будут использованы как образцы.

Стадия 3 — определение первичной структуры всех фрагментов.

Базовые Определения

- Геном – последовательность ДНК отдельного организма/клетки
- Эпигеном – информация об устойчивых модификациях ДНК, влияющих на функцию ДНК
- Транскриптом – вся информация РНК данной клетке/ткани (динамическая информация об экспрессии генов)
- Метагеном – объединенный пул генетической информации сообщества микроорганизмов
- Секвенатор нового поколения, (NGS) – устройство для чтения генетической информации в объеме всего генома

Основы метода NGS

Преимущества современных методов NGS:

- высокая точность
- высокая производительность (от нескольких тысяч до нескольких миллиардов прочтений за 1 цикл)
- увеличенная степень детализации результатов анализа
- возможность проведения как качественного, так и количественного анализа
- «сквозная» применимость во всем аграрном секторе, «от зерна до прилавка»
- приемлемая стоимость проведения анализа

При помощи меченых зондов — клонированных копий отдельных генов — возможен анализ непосредственно вариантов самих генов и сравнение электрофоретической подвижности фрагментов геномной ДНК. Молекулу ДНК расщепляют той или иной рестриктазой и выявляют конкретные гены и их фрагменты по гибридизации с мечеными зондами — клонированными фрагментами ДНК. В таком анализе возможно учитывать гетерогенность популяции по длине рестрикционных фрагментов (RFLP — restriction fragments length polymorphism) и даже выявлять замены отдельных нуклеотидов (SNP — single nucleotides polymorphism – не путать с NGS — секвенирование нового поколения).

Наиболее часто определяемые маркеры генетических детерминант на сегодняшний день — это полиморфизмы отдельных нуклеотидов (SNP, *англ. single nucleotide polymorphism*). При помощи анализа полиморфизма SNP осуществляют полногеномный анализ, генетический анализ различных патологий и заболеваний. Полиморфизм SNP применяют при проведении генетического анализа в таксономическом определении (определение видов живых организмов и таксономической принадлежности), а также в генетике популяций. С развитием методов секвенирования стало возможным выявление SNP в составе изучаемых геномов и создание специальных SNP-чипов для направленного исследования генома на наличие определенных заданных SNP, которые соответствуют желательному фенотипу.

В направленной генетической селекции включение результатов анализа полиморфизма SNP в расчеты позволяет повысить предсказательную ценность метода до 40% [Perez-Enciso 2015, Blasco 2014]. Такие методы могут быть применимы, например при введении репродуктивных технологий на базе направленного генетического отбора в животноводстве [Thomasen 2016 и др].

Таким образом, наиболее современные методы NGS делают возможной работу с геномом живых организмов – растений, животных и бактерий на принципиально новом уровне [Cao 2017, Perez-Enciso 2015]. При помощи NGS стало возможным проведение широкоформатного анализа последовательностей генома большого числа видов, в том числе немодельных организмов; изучение организации, структуры функционирования и эволюции

генома с высокой степенью детализации и большой аналитической и предсказательной ценностью. NGS также открывает возможности для изучения генетических механизмов в основе биологических процессов и функций живого организма и влияния среды на них [Sharma 2017, Thomasen 2016, Van Borm 2015]. Среди ценных для практической зоотехнии областей прикладного применения данных анализа NGS — увеличение продуктивности животных и качества получаемой продукции (мясо, молоко, яйцо) и повышение выживаемости и устойчивости к патогенам среди поголовья (КРС, овцы, птица и др. с-х животные) при сокращении экономических затрат на производстве. В анализе NGS возможно получение широких панелей (большого объема) геномной информации, связанной с функциональными изменениями. Международный стандарт для метода NGS— это ISO/IEC 17025:2017.

С появлением NGS получил развитие целый спектр «Омик» (Omics) - наук о геноме – протеомика, транскриптомика, эпигеномика, метаболомика, агрогеномика и других (см схему на рис. 1), которые вносят значительный вклад в изучение устройства и функций биологических систем (отдельных организмов и сообществ), в том числе для изучения на молекулярном уровне изменений, происходящих в процессе развития, при изменении состояний системы (физиологических, молекулярных и биохимических в норме и при патологии) и под воздействием изменяющихся факторов окружающей среды [Barh 2013].

Образцы для анализа могут быть взяты от одной особ, от нескольких особей одного вида (популяции) или разных видов (сообщество - ценоз) [Knief 2014, Wang 2013].

При выборе в качестве объекта отдельных особей вида, изучение молекулярного уровня подразумевает как правило анализ строения, функций и механизмов работы отдельных видов клеток, тканей или органов данного организма – их морфологии, дифференцировки, формы организации - это может быть например корневая система или плоды у растений или рубец у жвачных животных. На основании этих первичных данных, изучают молекулярные, биохимические и физиологические механизмы в организмах и сообществах, связанные с зоотехнически важными характеристиками с-х растений и животных (продуктивность, устойчивость к стрессу и заболеваниям и др.) и/или физиологические процессы (скорость созревание плодов, скорость роста, заболеваемость, рождаемость, иммунитет и др) [Van Emon 2015].

Описание молекулярного компонента в популяционной генетике видов необходимо для понимания эволюционных процессов, влияющих на генетическую изменчивость вида. Кроме того, такие исследования вносят существенный вклад в количественный анализ признаков, в частности за счет идентификации новых и доминантных аллелей и/или для оценки вклада изменчивости генотипа в паттерны экспрессии генов и изменчивости фенотипа под влиянием факторов окружающей среды [Seman 2010, Ekblom 2014].



Рис. 1. Комплекс «Омик» - современных наук, ассоциированных с изучением генов и геномов (omics-based studies)

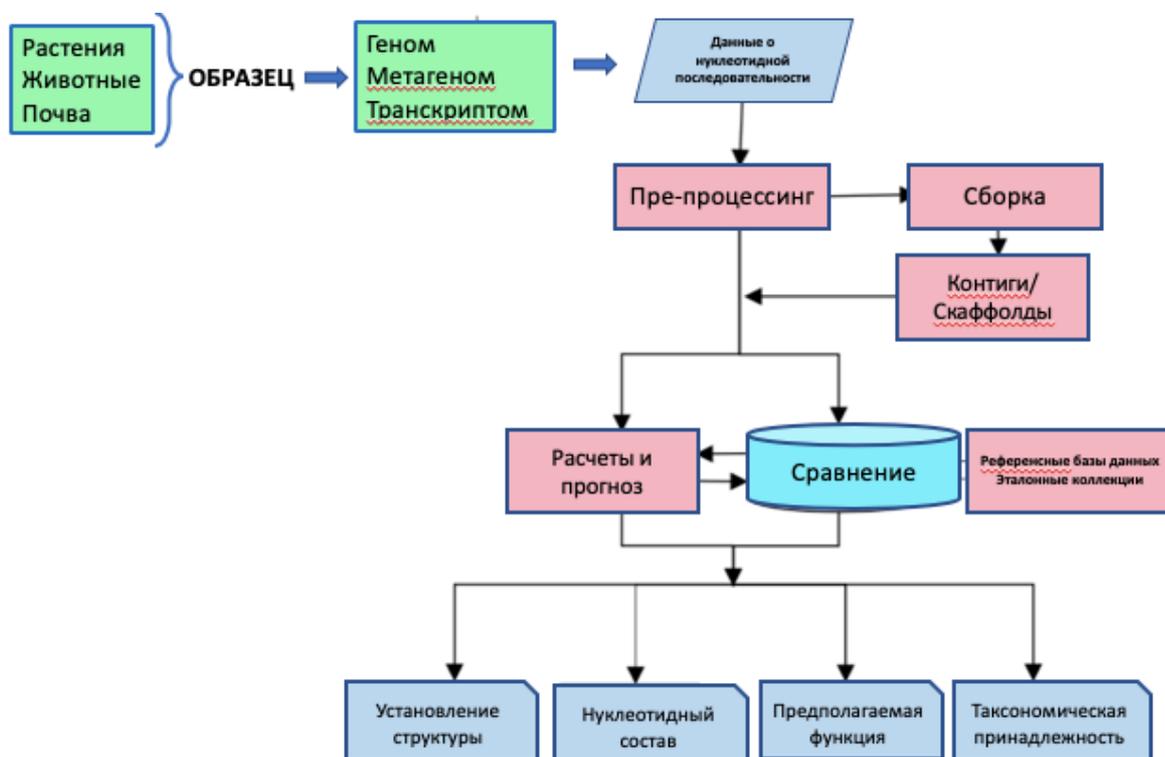


Рис. 2. Общая схема проведения NGS (секвенирования нового поколения)

Компьютерная обработка данных анализа

В связи со сложностью и многофакторностью NGS, а также его значительной информационно-технологической компонентой, для успешной работы с методом необходимы не только компетентные знания в соответствующих областях биологии (генетика, микробиология, почвоведение, животноводство), но и экспертные навыки в области компьютерных технологий. Большое значение для успешного проведения и интерпретации данных NGS — в разработке и применении современных

методов и инструментов для компьютерной, в том числе статистической обработки полученных экспериментальных данных. Необходимость прочтения, обработки, систематизации, интерпретации и хранения огромного количества информации о последовательностях ДНК и РНК как в рамках конкретных проектов, так и в форматах единых баз данных обуславливает потребность в конструировании специального программного обеспечения и платформ для NGS. В этой связи помимо уже существующих статистических программ и баз данных нуклеотидных последовательностей (таких как GeneBank, NCBI), создан новейший проект BioCompute Object (BCO). Начало проекта стало возможным благодаря объединенной работе Университета им. Джорджа Вашингтона (George Washington University) и Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA, USFDA). На сегодняшний день в проекте участвуют более 20 университетов различных стран и регионов земного шара, в том числе, фирм-разработчиков в сфере биотехнологий и фармацевтических компаний, в том числе Сэвэн Бриджиз (Seven Bridges) и Гарвардскую медицинскую школу (Harvard Medical School). В задачи проекта входит не только разработка и введение в практику инструментов для компьютерной обработки данных NGS анализов, но также создание открытых международных баз данных и обмен данными и информацией между компаниями-участниками проекта. Проект особенно актуален для научно-исследовательских организаций и ученых, фармацевтической промышленности (в том числе ветеринарной), для сферы биотехнологий, а также для медицинских учреждений, особенно в рамках инновационного формата персонализированной медицины [Ginsburg 2009, Пальцев 2011]. Для BioCompute Object (BCO) уже разработан и утвержден международный стандарт, проект активно развивается [Simonyan et al 2017, BCO STU 2017].

Аграрная геномика (Агрогеномика)

Аграрная геномика (агрогеномика) – одно из направлений современной науки геномики в аграрном секторе — в сфере сельского хозяйства и почвоведения. Агрогеномика изучает геномы с-х растений и животных, а также биоценозов почв и вод и участвует в разработке инновационных решений для сельского хозяйства и пищевой промышленности [van der Vlugt 2015, Van Borm 2015, Deusch 2015].

Среди прочих видов, картированы и детально описаны (полностью секвенированы) геномы основных видов с-х животных: курица (*Gallus gallus*), лошадь (*Equus caballus*), КРС (*Bos taurus*), свинья (*Sus scrofa*), овца (*Ovis aries*), утка (*Anas platyrynchos*) и других. Эти данные имеют практическую значимость для ведения работы в популяционной генетике и селекции с-х животных, в том числе для совершенствования кроссов и пород, для направленной селекции по выбранным признакам/качествам фенотипа, для ветеринарии — при разработке вакцин, для лечения и профилактики заболеваний и оптимизации плановых ветеринарно-санитарных мероприятий.

Содержание геномных последовательностей доступно в открытых базах данных. Эти базы регулярно пополняются, в том числе новыми последовательностями геномов и результатами анализа SNP. В ходе NGS-анализа выделяют фрагменты генома (участки хромосом и отдельные гены), которые вносят наибольший вклад в ответ организма на изменения условий среды, и данные таких анализов помогают описать механизмы этих изменений на молекулярном и клеточном уровне. Например, в ответ на изменение состава и/или калорийности комбикорма, введение вакцин, кормовых добавок или антибиотиков [Baï 2012]. Особый интерес для изучения представляют взаимодействия ген-ген и ген-среда [Kadarmedeen 2014].

Значительное место в рамках агрогеномики занимает изучение геномов прокариот – микроорганизмов, обитающих в почвах, воде, растениях и в кишечнике животных. Микроорганизмы – неотъемлемая часть всех биоценозов: воды, почвы, живых организмов (растений, животных и человека), и показатели их качественного и количественного состава во многих случаях являются характеристическими признаками биоценоза - его состояния и изменений, происходящих в нем. Анализ микробиомов позволяет описывать и сравнивать их, а также выявлять происходящие изменения во времени и под воздействием различных факторов — средовых, физических и технологических условий содержания животных, зоотехнических (вакцинация, состав рационов, кормовые добавки) и др.

Сравнительно небольшая относительно огромного биоразнообразия степень изученности геномики в сочетании с важной ролью микроорганизмов в агро- и биоценозах делает данные исследования актуальными как для фундаментальной науки, так и для практики в сфере сельского хозяйства (плодородие почв, урожайность с-х культур и их защита от вредителей, продуктивность и здоровье с-х животных и качество производимой с-х продукции тесно связаны с популяционно-видовым составом микробиологического сообщества и часто обусловлены изменениями, происходящими в нем. Современные методы NGS позволяют изучать биоразнообразие микроорганизмов, выявлять взаимосвязи в биоценозах и механизмы/ этиологию происходящих изменений [Whitman 1998, Rappe 2003, Acosta-Martínez 2014]. На основе получаемых результатов создают практические и прикладные решения для сельского хозяйства с целью увеличения качества и продуктивности производства, повышения безопасности и защиты от патогенов почв, растений и животных.

Важно также и то, что при успешном применении таких разработок снижаются производственные материальные затраты, а его производительность и экономическая рентабельность возрастает. То есть, успехи агрогеномики оказывают положительное влияние на экономику отрасли, что является безусловным стимулирующим фактором для развития этой научной области.

Мониторинг качества продуктов питания.

Применение NGS позволяет с высокой степенью точности и детализации оценивать видовой состав бактериального микробиома пищевых продуктов и его изменения в процессе хранения и при применении различных методов обработки продукции (охлаждение, замораживание, маринование, добавление соли и других агентов для увеличения срока хранения и сохранности пищевой продукции).

При помощи NGS становится возможным сравнительный анализ, (качественной и количественный), а также оценка исходных и приобретенных свойств продукта и корреляции с составом микробиома. Так, например, уже известно, что при добавлении соли и применении вакуумной упаковки сохранение свежести, защита от протухания и увеличение сроков хранения мясной гастрономии на уровне микробиома обеспечивается за счет видов *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* and *Leuconostocaceae*. Такое подробное изучение микробиома стало возможным именно с применением методов NGS [Fougy 2016]. В исследованиях было показано, что быстрое протухание пищевых продуктов, а также потеря ценных гастрономических свойств (приятный вид, цвет, запах консистенция и вкусовые качества) связана именно с изменениями в составе и численности микробиома, как правило с дефицитом либо полной элиминацией из состава микробиома ряда видов бактерий [Gschwendtner 2016]. Подобные исследования на данный момент проведены уже для достаточно большого числа видов продукции, в том числе мясомолочных продуктов [Nieminen 2012, Lo 2016], подтверждена достоверность и статистическая значимость результатов.

Таблица 1. Основные виды NGS (по Quail 2012, Liu 2012):

метод	принцип	длина одного прочтения, пар оснований	стоимость секвенирования 1 млн пар оснований	стоимость секвенатора	время работы за цикл	количество прочтений за цикл
454 Life Sciences	пиросеквенирование	400	10\$	500 000\$	7 часов	1 000 000
Illumina-SOLEXA	SBS (sequencing-by-synthesis)	300	0,05—0,15\$	600 000\$	9 дней	до 3 000 000 000
IonTorrent	ионный полупроводник	600	1\$	50 000\$	1,5 часа	до 5 000 000
SOLiD	секвенирование на основе лигирования	35—50	0,13\$	595 000\$	9 дней	1 300 000 000
Helicos	HeliScope	2900	2\$		1 час	35 000—75 000

Стоимость анализа

Стоимость и время выполнения анализа био-материала методом NGS зависят от объема и метода секвенирования, а также от необходимости и количества дополнительных работ по выделению нуклеиновых кислот из биологического материала и необходимости обработки ДНК или кДНК перед секвенированием (синтез кДНК, нормализация, вычитающая гибридизация и др.). Дополнительно оплачиваются (при необходимости проведения) такие процедуры как подготовка геномной ДНК (shotgun) для секвенаторов, совместимых с TruSeq (Illumina), удаление избытка рибосомальной РНК, синтез кДНК по технологии RNA-seq (с рассеянной затравки), обогащение по поли(А+) фракции, подготовка библиотеки малых РНК для секвенаторов, совместимых с TruSeq (Illumina). Средняя стоимость выполнения анализа для одного образца (например, при длине 50-150 пар оснований, 1 дорожка, 20-800 млн чтений) составляет в России от 200 до 400 тысяч рублей. Однако цены могут значительно отличаться в связи с большим числом параметров анализа, разнообразием состава и объема образцов, страной проведения анализа, рангом лаборатории и установленным оборудованием.

Время выполнения анализа для одного образца – в среднем от двух недель до двух месяцев, в зависимости от характеристик образца и деталей метода.

Выводы

Развитие методов секвенирования нового поколения (методы NGS) обеспечило высокую скорость, автоматизацию, качество и широкий спектр аналитических возможностей геномного анализа, в том числе для решения прикладных задач в аграрном секторе.

Для NGS утверждены следующие международные стандарты:

- ISO/IEC 17025:2017 (метод);
- BioCompute Object (BCO) specification document Standard Trial Use (STU) Release 1.0 (платформа для обработки данных)

Основные направления NGS - это:

- Геномный анализ;
- Направленное пересеквенирование геномов;
- Метагеномика, Агрогеномика и другие «Омики»;
- Секвенирование транскриптома
- Картирование ДНК-связывающих белков и анализ

хроматина

Развитие и применение методов NGS активно происходит в сельском хозяйстве (агрогеномика). Доказана их эффективность для решения прикладных задач по следующим основным направлениям:

- селекция растений;
- переработка отходов;
- ветеринария (диагностика, изучение патологий, терапия, усиление иммунитета);

- производство, оценка и повышение качества пищевых продуктов с-х промышленности;
- применение анализа NGS в решении прикладных задач агрогеномики позволяет повысить экономическую рентабельность производства.

Литература:

1. Антонов, В.Ф., Черныш А.М. и соавт. Биофизика: Учеб. для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. проф. В.Ф. Антонова. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Владос, 2003. — 288 с. — ISBN 5-691-01037-9.
2. Жимулев, И.Ф. Общая и молекулярная генетика: изд. 4-е. / И.Ф. Жимулев. — Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. — 479 с. — ISBN: 5-379-00375-3; 978-5-379-00375-3.
3. Инге-Вечтомов, С.Г. Генетика с основами селекции: 2-е издание / С.Г. Инге-Вечтомов. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. — 720 с. — ISBN 978-5-94869-105-3.
4. Пальцев, М.А. Персонафицированная медицина / М.А. Пальцев. — Наука в России. — 2011. — № 1. — С. 12-17. — ISSN 0869-7078.
5. Спирин, А.С. Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка / А.С. Спирин. — М.: Академия, 2011. — 513 с.
6. Acosta-Martínez, V. Predominant bacterial and fungal assemblages in agricultural soils during a record drought/heat wave and linkages to enzyme activities of biogeochemical cycling / V. Acosta-Martínez et al. // *Applied Soil Ecology*. — 2014. — Vol. 84. — P. 69–82.
7. Bai, Y. Current status and future perspectives for sequencing livestock genomes / Y. Bai // *Journal of Animal Science and Biotechnology*. — 2012. — Vol. 3:8. — <http://www.jasbsci.com/content/3/1/8>.
8. Barh, D. Omics. Applications in biomedical, agricultural, and environmental sciences / D. Barh, V. Zambare, V. Azevedo. — Boca Raton: CRC Press. 2013.
9. BioCompute Object (BCO) specification document Standard Trial Use (STU) Release 1.0.
10. Blasco, A. A short critical history of the application of genomics to animal breeding / A. Blasco, M.A. Toro // *Livestock Science*. — August 2014. — Vol. 166. — P. 4—9.
11. Cao, Y. A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies / Y. Cao // *Frontiers in Microbiology*. — September 2017. — Vol. 8. — Article 1829.
12. Consortium HMP. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. — *Nature*. — 2012. — Vol. 486(7402). — P. 207–214.
13. Deusch, S. News in livestock research—use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals / S. Deusch et al. // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. — 2015. — Vol. 13. — P. 55–63.
14. Ekblom, R. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation / R. Ekblom, J.B.W. Wolf // *Evol. Appl.* — 2014. — Vol. 7(9). — P. 1026–1042.
15. Epp, L.S. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems / L.S. Epp et al. // *Mol Ecol*. — 2012. — Vol. 21(8). — P. 1821–1833.

16. Esposito, A. Bioinformatics for agriculture in the Next-Generation sequencing era / A. Esposito et al. // *Chem. Biol. Technol. Agric.* — 2016. — Vol. 3:9. — P. 12. — doi 10.1186/s40538-016-0054-8.
17. Esposito, A. Comparison of rock varnish bacterial communities with surrounding non-varnished rock surfaces: taxon-specific analysis and morphological description / A. Esposito et al. // *Microb. Ecol.* — 2015. — P. 1–10.
18. Fougy, L. Reducing salt in raw pork sausages increases spoilage and correlates with reduced bacterial diversity / L. Fougy et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2016. — Vol. 82. — P. 3928–3939. — doi: 10.1128/AEM.00323-16.
19. Ginsburg, G.S. Genomic and personalized medicine: foundations and applications / G.S. Ginsburg, H.F. Willard // *Translational research.* — 2009. — Vol. 154(6). — P. 277–287.
20. Global SNP In Agrigenomics Market – Analysis & Forecast 2017–2021: Focus on Application (Crops and Livestock), Product Type (Kits and Consumables, Instruments and Others) and Region / March 2018. — 201 pages. — Report ID: 5365480.
21. Grenier, B. Next-generation sequencing reveals links between nutrition and genes / Dr. B. Grenier // *Biomin.* — Dec 2017.
22. Gschwendtner, S. N₂ gas flushing alleviates the loss of bacterial diversity and inhibits psychrotrophic *Pseudomonas* during the cold storage of bovine raw milk / S. Gschwendtner et al. // *PLoS ONE.* — 2016. — 11:e146015. — doi: 10.1371/journal.pone.0146015.
23. Handelsman, J. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products / J. Handelsman et al. // *Chem Biol.* — 1998. — Vol. 5(10). — P. 245–249.
24. Howe, A.C. Tackling soil diversity with the assembly of large, complex metagenomes / A.C. Howe // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2014. — Vol. 111(13). — P. 4904–4909.
25. ISO/IEC 17025:2017 — General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
26. ISO/IEC 17025:2017(en) — General requirements for the competence of testing and calibration laboratories - <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v1:en>.
27. Kadarmedeen, A. Genomics to systems biology in animal and veterinary sciences: Progress, lessons and opportunities / A. Kadarmedeen et al. // *Livestock Science.* — 2014 — Vol. 166. — P. 232–248.
28. Knief, C. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies / C. Knief // *Front Plant Sci.* — 2014. — №5.
29. Kodzius, R. Marine metagenomics as a source for bio- prospecting / R. Kodzius, T. Gojobori T. // *Mar. Genom.* — 2015.
30. Liu, L. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems / L. Liu et al. // *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* — Hindawi Publishing Corporation. — 2012. — P. 1–11. — doi:10.1155/2012/251364.
31. Lo, R. Culture-independent bacterial community profiling of carbon dioxide treated raw milk / R. Lo, M.S. Turner, M. Weeks, N. Bansal // *Int. J. Food Microbiol.* — 2016. — Vol. 233. — P. 81–89. — doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.015.
32. Nieminen, T.T. The effect of marination on lactic acid bacteria communities in raw broiler fillet strips / T.T. Nieminen et al // *Front. Microbiol.* — 2012b. — Vol. 3. — №376. — doi:10.3389/fmicb.2012.00376.
33. Ofek-Lalzar, M. Niche and host-associated functional signatures of the root surface microbiome / M. Ofek-Lalzar // *Nat. Commun.* — 2014. — №5.

34. Pérez-Enciso, M. Sequence- vs. chip-assisted genomic selection: accurate biological information is advised / M. Pérez-Enciso et al. // *Genetics Selection Evolution*. — 2015. — #47.
35. Quail, M.A. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers / M.A. Quail // *BMC Genomics*. — Jan 2012. — Vol. 13 (1). P. 341. — doi:10.1186/1471-2164-13-341.
36. Rappé, M.S. The uncultured microbial majority / M.S. Rappé, S.J. Giovannoni // *Ann Rev Microbiol*. — 2003. — Vol. 57(1). — P. 369–394.
37. Repkova, J. Application of Next-Generation Sequencing in Plant Breeding / J. Repkova, D. Vlk // *Czech J. Genet. Plant Breed.* — 2016. — doi: 10.17221/192/2016-CJGPB.
38. Semagn, K. The genetic dissection of quantitative traits in crops / K. Semagn et al. // *Electron J Biotechnol.* — 2010. — Vol. 13(5). — P. 16–17.
39. Sharma, A. Next generation sequencing in livestock species - A Review / A. Sharma // *JABG*. — 2017 Sep. — Vol. 1(1). — P. 23-30. — <https://doi.org/10.12972/jabng.20170003>.
40. Simonyan, V. Biocompute Objects—A Step towards Evaluation and Validation of Biomedical Scientific Computations / V. Simonyan, J. Goecks, R. Mazumder // *PDA journal of pharmaceutical science and technology*. — 2017. — Vol. 71(2). — P. 136-146. — doi:10.5731/pdajpst.2016.006734.
41. Thomasen, J.R. Reproductive technologies combine well with genomic selection in dairy breeding programs / J.R. Thomasen et al. // *Journal of Dairy Science*. — 2016. — Vol. 99. — No. 2.
42. Van Borm, S. Next-generation sequencing in veterinary medicine: how can the massive amount of information arising from high-throughput technologies improve diagnosis, control, and management of infectious diseases? / S. Van Borm et al. // *Veterinary infection biology: molecular diagnostics and high-throughput strategies*. — Berlin: Springer. — 2015. — P. 415–436.
43. Van der Vlugt, R. Application of next generation sequencing for study and diagnosis of plant viral diseases in agriculture / R. Van der Flugt. — 2015.
44. Van Emon, J. Omics revolution in agricultural research / J. Van Emon // *J. Agri Food Chem.* — 2015.
45. Wang, J. Environmental bio-monitoring with high-throughput sequencing / J. Wang et al. // *Brief Bioinform.* — 2013. — Vol. 14(5). — P. 575–588.
46. Whitman, W.B. Prokaryotes: the unseen majority / W.B. Whitman et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1998. — Vol. 95(12). — P. 6578–6583.