

Miodrag GRBIĆ<sup>\*\*\*</sup>, Javier IBÁÑEZ<sup>\*\*\*</sup>, Vesna MARAŠ<sup>§</sup>,  
Jose Miguel MARTÍNEZ-ZAPATER<sup>\*\*\*</sup>

## ZNAČAJ GENOMSKIH TEHNOLOGIJA U ISTRAŽIVANJU I VALORIZACIJI GENETIČKE RAZNOVRSNOSTI U CRNOJ GORI

**Sažetak:** Bioekonomija znanja predstavlja odgovor na izazove društva koji nas očekuju u budućnosti: sigurnost u proizvodnji hrane, klimatske promjene, održivo raspolaganje resursima, kompetitivnost kompanija, otvaranje novih poslova i zavisnost od neobnovljivih resursa. Jedno od ključnih mjesta u ovom konceptu predstavlja genomika znanja i tehnologije koja se razvija na bazi čitanja sekvence DNK. Pravo sveobuhvatno genomsko istraživanje u Crnoj Gori, usmjereno na genomsko istraživanje genetskog diverziteta vinove loze, otkrilo je 63 nepoznate sorte vinove loze i uputilo na pedigree, odnosno njihovu genetsku povezanost, pokazujući da Crna Gora predstavlja stari vinogradarski region sa genetskom strukturom sorti sličnoj tradicionalnim vinskih regionima u Francuskoj i Španiji. Ovo otkriće otvara vrata za ekspanziju istraživanja biodiverziteta i njegovu valorizaciju genomskim tehnologijama. U ovom radu rezimiramo pristupe sekvencijaciji, sastavljanju i anotaciji genoma i aplikacijama genomskih tehnologija kao potencijalnog pravca razvoja crnogorske bioekonomije.

**Ključne riječi:** *sekvenciranje genoma, poljoprivreda, vinova loza, diverzitet, razvoj tehnologije*

### ISTORIJSKI RAZVOJ

Sekvenca nukleinskih kisjelina u molekulu DNK određuje nasljedne osobine i biohemijske karakteristike jednog organizma. Kompletna sekvenca

---

<sup>\*</sup> Odsjek za biologiju, Univerzitet Zapadni Ontario, London, Kanada

<sup>\*\*</sup> Odsjek za poljoprivredu i prehrambene nauke, Institut za istraživanje vinove loze, Univerzitet La Rioja, Logroño, Španija

<sup>\*\*\*</sup> Institut za istraživanje za vinovu lozu i vino, Logroño, La Rioja, Španija

<sup>§</sup> „13. jul — Plantaže”, Podgorica, Crna Gora

genoma jednog organizma sadrži u sebi sve informacije neophodne za razvoj organizma, njegovo ponašanje, fiziologiju, biohemijske procese koje organizam može da izvrši, sve do podataka o njegovoj otpornosti na bolesti i nasljedne osobine koje će se prenijeti na potomstvo. Sekvenca kompletnog genoma sažeto sadrži u sebi „uputstvo za upotrebu” određenog organizma i predstavlja osnovu za razumijevanja životnih funkcija i evolucije organizma, sadržeći podatke o istoriji i porijeklu organizma. Sekvenciranje i genomska analiza sekvence DNK je doživjela pravu eksploziju poslije objavljivanja genomske sekvence *Homo sapiens* 2001. godine [1,2]. Kako ove tehnologije napreduju ilustruje podatak da je cijena sekvenciranja genoma čovjeka koštala 3,8 milijardi dolara [3] i za sekvenciranje je bilo potrebno 13 godina, a sada je cijena svedena na ispod 1000 dolara i sekvenca se dobija za nekoliko sati. Brzina razvoja tehnologija za sekvenciranje genoma prevazilazi brzinu razvoja kompjuterskog čipa gdje se brzina čipa udvostručava svake 2 godine, dok se brzina sekvenciranja povećava gotovo eksponencijalno. Ovaj razvoj tehnologije otvara nevjerojatne mogućnosti za razvoj novih tehnologija, valorizaciju prirodnih resursa i osnovu za razvoj ekonomije znanja.

## NAČINI SEKVENCIRANJA GENOMA

**Prva generacija metoda sekvencioniranja genoma.** Prve sekvence genomskih fragmenata (gena) su dobijene 1965. godine kada je objavljena sekvenca t-RNA kvasca, *Saccharomyces cerevisiae* [4]. Ovo je pratilo razvoj tehnologije gde je Fred Sanger razvio metodu „čitanja” sekvence digestiranih fragmenata DNK, koristeći dvodimenzionalno frakcionisanje koje je uključivalo elektroforezu i hromatografiju. Ubrzo je ova procedura unaprijeđena i umjesto dvodimenzionalne frakcionacije, analiza DNK fragmenata, obilježenih radioaktivnim nukleotidima (*chain termination sequencing*), je analizirana na akriamidnom gelu i ovom metodom je sekvenciran prvi kompletan genom, genom bakteriofaga. Ove inovacije su doprinijele dizajnu prve *didexi* sekvencione mašine, ABI-Prism (Applied Biosystems) koja je bila u stanju da sekvencira simultano stotine uzoraka metodom *dideoxy chain termination* gdje je dodavanje obilježenih nukleotida od strane DNK polimeraze bila baza ove tehnologije i koja je proizvela prvu sekvencu ljudskog genoma. Međutim, ova tehnologija je zahtijevala mnogo manuelnih poteza i nije bila u mogućnosti da se automatizuje i stvori visoku prohodnost potrebnu za masovno sekvenciranje. Na kraju, visoka cijena sekvenciranja je bila limitirajuća što je dovelo do razvoja „druge generacije” sekvencionih tehnologija.

**Druga generacija sekvencionih tehnologija** je napravila konceptualni pomak, u odnosu na Sanger sekvenciranje, time da je baza sekvenciranja postala PCR (*polymerase chain reaction*) što je u kombinaciji sa tehnologijom

„reverzibilnog završavanja” (gdje se fluorescentni nukleotid uključivao u sekvencu, sekvenca se očitavala i ovaj nukleotid se eliminisao da bi omogućio uključivanje sljedećeg), što je omogućilo višestruko uvećanje kapaciteta sekvenciranja [4]. Umjesto analize sekvence na gelu, sekvenca se očitava direktno i proces je omogućavao robotizaciju i višestruko povećanje kapaciteta procesa sekvenciranja. Iako je dužina sekvence bila kraća (125 nukleotida) u poređenju sa Sanger metodom koji je proizvodio sekvence od 600 nukleotida), ova nova generacija sekvenciranja DNK donijela je pravu revoluciju u procesu sekvenciranja genoma, uz dramatično smanjenje cijene (ljudski genom ispod 1000 dolara) i vremena sekvenciranja. Dominantna tehnologija uključuje Illumina sekvenciranje koje višestruko povećava kapacitet sekvenciranja. Međutim, i ove tehnologije imaju određene limitacije. Dužina očitane sekvence je kratka, tako da je sastavljanje genoma, naročito kod ponavljajućih sekvenci, otežano ili gotovo nemoguće, dok je greška u sekvenciranju nešto veća od Sanger metoda. Ove limitacije predstavljaju izazov za razvoj novih sekvencionih tehnologija, vodeći ka tehnologijama sekvenciranja genoma treće generacije.

**Sekvencione tehnologije treće generacije** postavljaju novu tehnološku paradigmu. U ovom procesu lanac DNK molekula se direktno sekvencira u kontaktu sa fiksiranim molekulom DNK polimeraze koja „dodaje” fluorescentne nukleotide čija sekvenca se očitava, oni se uklanjaju omogućujući inkorporaciju sljedećeg nukleotida. Ova tehnologija omogućuje izuzetno dugačke sekvence (*long range sequencing*) na nivou kilo i mega baznih parova i očitavanje sekvence u realnom vremenu. Predvodnik u ovom polju je Pacific Bioscience koji sa svojim PacBio sekvencerima proizvodi izuzetno dugačke sekvence idealne za „de novo” sastavljanje genoma [5]. Međutim, još dok se ova tehnologija nije ustalila, inovacija od strane Oxford Nanopore predstavlja posljednji skok i dramatično pojeftinjenje sekvenciranja [6]. Naime, ova tehnologija uključuje „provlačenje” lanca DNK kroz nano-poru i prolazak pojedinih nukleotida ne očitava se kroz svjetlosnu reakciju i dodavanje nukleotida od strane DNK polimeraze (kao u pređašnjim metodologijama, zahtijevajući skup laserski sistem i enzim) već se sekvenca očitava kroz promjenu napona elektriciteta u membrani koja okružuje nano-poru karakterističnu za set nukleotida. Ovo toliko pojednostavljuje sekvenciranje da je sekvencer nešto manji od veličine mobilnog telefona i direktno se uključuje u kompjuter. Ova metoda napravila je revoluciju u sekvenciranju DNK, snižavajući dramatično cijenu sekvenciranja. Međutim, ove tehnike pored mnogih prednosti imaju i nedostatke. Naime, trenutno nivo grešaka u sekvenci dostiže i do 8 do 10% što predstavlja problem pri sastavljanju genoma.

Savremeni pristup sekvenciranja genoma uključuje kombinaciju različitih pristupa i tehnologija da bi se dobio optimalni rezultat. *De novo* sekvenciranje

genoma uključuje kombinaciju Illumina metoda i *long-range* tehnologiju sekvenciranja da bi se mogao sastaviti novi, nepoznati genom. Ako se radi rekvenciranje genoma i upoređivanje sa već postojećim genomom (na primjer, različite rase životinjskih vrsta ili sorti biljaka), ovo se može uraditi samo na bazi Illumina sekvenciranja. Na kraju, ako se radi sekvenciranje RNK da bi se ispitala ekspresija gena u različitim tkivima, ovo se postiže Illumina metodom koji je superioran za ovu namjenu.

## STRATEGIJE SEKVENCIRANJA GENOMA I SASTAVLJANJE GENOMA

Sa razvojem novih tehnologija, pristup sekvenciranja genoma se razvija bazirano na to koja se tehnologija primjenjuje [7]. Klasičan pristup, na primjer, sa Illumina metodom uključuje kreiranje biblioteka sa različitom veličinom DNK inserata (kratkim insertima do 500 baznih parova i dugim insertima u rasponu od 3 do 40 kilobaza). Koja će se strategija primjenjivati zavisi od veličine genoma, dužine ponovljenih (repetitivnih) sekvenci i očekivanog kvaliteta završenog genoma. Ovo je presudno za sljedeći korak, koji predstavlja sastavljanje genoma od dobijenih sekvenci. Ovo je ujedno i najteži dio procesa, što zahtijeva poznavanje različitih programa za sastavljanje genoma i, takođe, zahtijeva ogromnu količinu kompjuterske memorije (na nivou terabajta), što znači da se ovaj korak u principu radi u saradnji sa jakim bioinformatičkim centrima, procentrima za sekvenciranje genoma. Sastavljanje genoma je iterativan proces koji uključuje različite varijacije sastavljanja, gdje se u svakom novom sastavljanju genom poboljšava dok se ne dostigne željeni kvalitet. Poslije prvog koraka, gdje se sastavljaju bazične sekvence (kontizi), prelazi se na povezivanje kontiga u duže segmente DNK (skaffolds) gdje se povezuju pojedini kontizi. Idealno sastavljanje genoma uključilo bi svođenje genoma, a broj hromozoma koji organizam posjeduje gdje bi svaki hromozom predstavljao linearnu sekvencu bez prekida. Trenutno ovakva idealna sekvenca ne postoji čak ni za genom *Homo sapiens*. Međutim, treba težiti ka što približnijem dostizanju ovog stanja.

## ANOTACIJA GENOMA

Jednom sastavljen niz nukleotida, koji predstavlja naše „uputstvo za upotrebu”, treba anotirati, odnosno pročitati. Anotacija ima za zadatak prvo da strukturno anotira genom, što znači da utvrdi koje su sekvence u genomu koje su regulatorne (promotori, pojačivači i intragenske sekvence) i koji djelovi genoma kodiraju proteine, RNK koje ne kodiraju proteine, mikro-RNK i druge regulatorne RNK koje su otkrivene tek prije nekoliko godina. Staro uvjerenje da većina DNK kod čovjeka predstavlja „otpadnu DNK” se ispostavilo

pogrešnim pošto sada znamo da se 87% genoma transkribuje i ovo je samo početak otkrivanja novih mehanizama kako DNK funkcioniše [8]. Kvalitet anotacije genoma zavisi od kvaliteta sastavljanja genoma i od vrste koja je u pitanju [7]. Ako postoji već sekvenciran genom srodne vrste, onda se anotacija pojednostavljuje pošto se homologni geni između dvije srodne vrste mogu lakše „prepoznati” od strane anotacionog softvera. Međutim, ako je sekvencija genoma od nove vrste, gdje nema srodnog genoma, kao što je bila naša prva sekvencija koprivinog preglja [9] gdje nije postojao genom srodne vrste u okviru genomske baze podataka, onda je posebno razviti dodatne načine da anotacija bude kvalitetna, kao što je, na primjer, sekvenciranje transkripcionih profila pojedinih stadijuma razvića ili tkiva koji empirijski potvrđuju transkribovanje pojedinih RNK koje je predikcioni softver teoretski odredio. U procesu predikcije gena prvo je potrebno izdvojiti repetitivne sekvence, sekvence transpozicionih elementata i sekvence niske kompleksnosti (mini i mikro satelite itd.) da bi anotacija mogla uspješno da se izvede, pošto ove sekvence onemogućavaju uspješno prepoznavanje *bona fide* gena.

Svaki dobro predviđen gen model u sebi sadrži transkripcioni početak, introne i egzone sa svojim splajsing domenima, alternativne transkripte stvorene od istog gena i 3' i 5' netransletirane regione. Mnogi kompjuterski programi se koriste za anotaciju genoma i oni evoluiraju veoma brzo tako da izbor programa treba prepustiti bioinformatičkom timu koji vrši anotaciju. Na kraju, u završnoj fazi anotacije genoma, potrebno je izvršiti ručnu provjeru genskih modela od strane eksperata za određenu grupu gena. Na primjer, u genomu koprivinog preglja od 18,500 gena preko 7000 je ručno pregledano i potvrđeno [9]. Tek ovako završen genom se može predati u bazu podataka i podvrgnuti različitim tipovima analize. To uključuje determinaciju broja gena, različitih genskih klasa, komparativnu genomiku, gdje se genom date vrste ili sorte upoređuje sa drugim vrstama i sortama što služi za utvrđivanje srodnosti i porijekla sve do postojanja specifičnih grupa gena koji omogućavaju datom organizmu ili sorti da imaju specifična svojstva (kao, na primjer, sintezu specifičnih metabolita, otpornost na sušu, mogućnost da metabolišu različite supstance itd.).

## ZNAČAJ GENOMIKE ZA VALORIZACIJU PRIRODNIH RESURSA

Imajući na umu koliko je kompleksan proces sekvenciranja i analize genoma, postavlja se pitanje za šta ova kompleksna analiza zapravo služi. Prvo, ova analiza nam daje „uputstvo za upotrebu” svakog organizma i program kako individualni organizmi funkcionišu. Ova genomska znanja predstavljaju osnovu za ekonomiju znanja i bioekonomiju [10]. Ovo se može ilustrovati

činjenicom da je ekonomska analiza projekta sekvenciranja ljudskog genoma pokazala da se u USA svaki uloženi dolar u sekvenciranje ljudskog genoma vratio, generišući ekonomski povraćaj sredstava od 141 dolara, uključujući ukupnu dobit za ekonomiju od 796 milijardi dolara, lične zarade od 244 milijarde dolara i kreiranje zaposlenja od 3,8 milijardi godina zaposlenja [3]. Samo u 2010. godini porez koje su platile genomske kompanije državi iznosio je 3,7 milijarde dolara i 2,7 milijardi poreza na lokalnom nivou, što znači da se cio genomski projekat isplatio i preplatio od poreza za 2010. godinu. Ovo znanje predstavlja osnovu za razvoj novih tehnologija, uključujući medicinu i zdravlje, poljoprivredu i industriju hrane, veterinarstvo, industrijsku biotehnologiju, ekologiju i zaštitu životne sredine, sudsku medicinu i sigurnost proizvodnje. Ova znanja su kreirala čitav niz genomskih disciplina, integrišući biologiju, informatiku i matematiku u računarsku biologiju i biologiju sistema. Tri osnovne grane genomike čine: strukturna genomika (koja uključuje mapiranje i sekvenciranje), komparativna genomika (koja istražuje diverzitet i evoluciju genoma) i funkcionalna genomika (koja istražuje funkciju gena u biološkim sistemima). Na to se nadograđuju nove „OMICS” tehnologije, kao što su proteomika (koja studira proteine), metabolomika (koja istražuje metabolite), transkriptomika (koja istražuje RNK u raznim tkivima). Nove aplikacije uključuju arheološku genomiku, gdje se naša istorija „čita” kroz istoriju zapisanu u DNK, poljoprivrednu genomiku i genomiku zaštite životne sredine.

### ZNAČAJ GENOMIKE ZA CRNU GORU: PRIMJER GENOMIKE VINOVE LOZE

Na prvi pogled se čini da Crna Gora, kao jedna mala zemlja, ne treba i ne može da ulaže u ovako složenu disciplinu. Međutim, Crna Gora ima veliki genetski diverzitet poljoprivrednih biljnih vrsta [11–17] i to zahtijeva intenzivno i strateško ulaganje u genomiku, jer bez toga diverzitet i bogatstvo vrsta, koje Crna Gora ima, ostaće neiskorišteno. Vrh ledenog brijega i potencijal u ovoj oblasti otkriva do sada najveće genomsko istraživanje u Crnoj Gori, istraživanje genomskog diverziteta vinove loze (projekat „Genetski diverzitet vinove loze u Crnoj Gori”, 2014–2020) koje je realizovano između „Plantaža”, Ministarstva poljoprivrede i Ministarstva nauke Crne Gore i podržano od strane CANU, u saradnji sa vodećim svjetskim Institutom za vinovu lozu i vino (ICVV) iz La Riohe, Španija.

Ovo istraživanje, koje je opširnije obrađeno u ovom Zborniku, predstavlja polaznu tačku za dalju analizu koja ima potencijal da svrsta Crnu Goru u značajnu svjetsku vinogradarsku destinaciju, ali, takođe, i da kreira naučnu i tehnološku osnovu za eksploataciju ovih saznanja. Dosadašnji rezultati

ovih istraživanja su pokazali da, po strukturi pedigrea crnogorskih sorti vinove loze, crnogorsko vinogradarsko-vinarsko područje ima sličnu strukturu sa tradicionalnim vinogradarsko-vinarskim regionima Bordoos ili Burgundijom u Francuskoj, gdje su također individualne sorte *kaberne frank* ili *pino noir* osnova lokalnih pedigrea, što je karakteristika starih tradicionalnih vinogradarskih područja. Centralna sorta, koja je roditelj brojnih vinskih sorti u Crnoj Gori, je kratošija za koju je potvrđeno da ima isti genetski profil kao zinfandel/primitivo/crljenak kastelanski [18]. Pored toga, sorta kratošija ima veliki diverzitet u Crnoj Gori [18–23], a brojni literaturni i istorijski podaci, uključujući i Statut grada Budve iz 1427. godine [24, 25], potvrđuju da je kratošija sorta koja je vjekovima gajena na našem području, što sugerira i da je Crna Gora centar porijekla ove sorte [23]. Koristeći metode genomске analize, komparativne genomike i genetske pedigre analize, u ovim istraživanjima se pokazalo da Crna Gora ima 63 nepoznate sorte vinove loze (do sada najviše u okruženju) i da je komparativnom genomikom utvrđen kompletan pedigre ovih sorti i njihova genetska povezanost. Sekvenciranje genoma sorte vranac je pokazalo njegovo porijeklo od oca sorte kratošija i majke sorte duljenga i otvara put genomici i metabolomici koje treba da utvrde strukturu gena vranca i metabolite, kao što su resveratrol i mnogi kompleksni polifenoli i tanini koji su specifični za ovu sortu. Kompletiranjem istraživanja dobijeni rezultati biće publikovani u referentnim naučnim časopisima.

Zahvaljujući ovim istraživanjima, uz pomoć genomike Crna Gora je uspjela da sačuva sorte vinove loze od nestajanja (umnožene i kolekcionisane), da utvrdi njihov pedigre i genetsku povezanost i obezbijedi razvoj autohtonog vinogradarstva i vinarstva za sljedeće vjekove [25]. Pedigre crnogorskih sorti ima veliki značaj i za arheobotaniku koja sve više izaziva pažnju u najnovijim istraživanjima. Sa pedigreom crnogorskih sorti i brojnim arheološkim nalazištima iz grčkog, rimskog i srednjovekovnog perioda, mogla bi se rekonstruisati genetska istorija crnogorskih sorti, što bi predstavljalo jako veliki skok za istoriju i genetiku vinove loze u Crnoj Gori i svijetu [25].

Bioekonomija predstavlja odgovor na izazove društva koji nas očekuju u budućnosti: sigurnost proizvodnje hrane, klimatske promjene, održivo raspolaganje resursima, kompetitivnost kompanija, otvaranje novih poslova i zavisnost od neobnovljivih resursa. U bioekonomiji genomika igra ključnu ulogu, naročito u poljoprivredi, zaštiti čovjekove sredine i tehnologiji [10]. Crna Gora je jedna od najbogatijih evropskih država što se tiče biodiverziteta [26]. Naročito je veliki udio endemskih i reliktnih biljaka (koje se ne mogu naći na drugim područjima) kao rezultat geološkog refugijuma koji je ovaj prostor imao u Evropi za vrijeme posljednjeg ledenog doba. Takođe, ostaje neistražen biodiverzitet mikroorganizama, od potencijalnih autohtonih kvasaca za fermentaciju vina do različitih mikroorganizama, koji imaju specifične

enzime pogodne za razvijanje biotehnoških procesa i drugih vrsta mikroorganizama. Genomska znanja o ovim mikroorganizmima su osnova za nove industrijske procese na bazi rekonbinantne DNK gdje se novi proteini, enzimi i materijali proizvode u bioreaktorima od strane mikroorganizama koji se transformišu, na primjer, sa stranim genom od druge vrste koji ima industrijsku primjenu. Ova tehnologija se uveliko koristi u farmakologiji za proizvodnju vakcina i farmakoloških produkata; međutim, njena primjena se širi za različite tehnološke procese [28]. Diverzitet ljekovitih biljaka i biljaka koje se mogu koristiti za nutritivnu (zdravu ishranu i nove proizvode koji utiču na prevenciju bolesti) su oblasti koje imaju veliki potencijal za genomska istraživanja. Stoga, ulaganje u opsežne studije biodiverziteta i selekcija interesantnih kandidata biljaka i životinjskih vrsta, koje imaju značajna svojstva za poljoprivredu, farmaceutsku industriju, biotehnologiju i očuvanje čovjekove sredine, od velikog su značaja za Crnu Goru. Na osnovu sekvenciranja genoma, geni za koje se pokaže da, na primjer, sadrže otpornost na sušu, slano zemljište, koji proizvode određene metabolite značajne za farmakološku industriju se mogu patentirati i predstavljati osnovu za razvoj novih tehnologija stvaranja biljaka otpornih na sušu i pogodnih za gajenje na zaslanjenim zemljištima ili novih ljekova. Jedan od takvih primjera je naše patentiranje gena za svilu koprivinog preglja koji predstavlja osnovu za razvoj novih bio-nano-materijala [27], što prije genomskog projekta i sekvence gena za svilu preglja nije bilo moguće. Istraživanje genetskog diverziteta vinove loze predstavlja prvi ozbiljan korak i dobar primjer u aplikaciji genomike u poljoprivredi Crne Gore. Međutim, razvoj ovih istraživanja mora da bude u velikoj mjeri prihvaćen kao strategija razvoja sa programima koji će finansirati istraživanje, očuvanje i proučavanje biodiverziteta na genomskom nivou. Ovo bi trebalo da bude fokus za potencijalne evropske projekte koji bi trebalo da imaju 4 cilja: 1) proučavanje genetskog biodiverziteta u Crnoj Gori, 2) uspostavljanje saradnje sa vodećim institucijama i firmama u ovim oblastima u Evropi i svijetu (genomika, farmakologija, poljoprivreda, nutritivna itd.), 3) obučavanje crnogorskih stručnjaka u ovim oblastima, 4) otvaranje institucija i radnih mjesta u Crnoj Gori koje će biti nosioci ovih projekata u kontekstu partnerstva između državnih i privatnih institucija. Uspostavljanje biotehnoškog parka, koji bi bio fokusiran na pretvaranje naučnih otkrića u potencijalne nove proizvode i usluge, bila bi sljedeća karika u uspostavljanju ekonomije znanja, bazirana na ekologiji, biodiverzitetu i genomici.



## LITERATURA

- [1] Lander E. S. et al. (2001): International Human Genome Sequencing Consortium Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* volume 409, 860–921.
- [2] Craig Venter J. et al. (2001): The Sequence of the Human Genome. *Science*, Vol. 291, Issue 5507, 1304–1351.
- [3] Tripp S. and Grueber M. (2011): Economic impact of the Human Genome Project. Battelle Memorial Institute.
- [4] Heather M., Chain B. (2016): The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 107, 1–8.
- [5] Rhoads A., Fai Au K. (2015): PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13 (2015), 278–289.
- [6] Hengyun L., Francesca G., Zemin N. (2016): Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 14, 265–279.
- [7] Ekblom R. and Wolf J. B. W. (2014): A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evolutionary Applications*, 1026–1042.
- [8] The ENCODE Project Consortium (2012): An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* Vol. 489, 57–74.
- [9] Grbic M. et al. (2011): The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature* Vol. 479, 487–492.
- [10] Lainez M., Manuel González J., Aguilar A., Vela C. (2018): Spanish strategy on bioeconomy: Towards a knowledge based sustainable innovation. *New Biotechnology* 40, 87–95.
- [11] Cindrić P., Korać N., Žunić D., Pejović Lj., Maraš V., Matijašević S. (2003): Grapevine genetic resources in Serbia and Montenegro. ECPGR-Report of working group, Palić.
- [12] Jovović Z., Čizmović M., Lazović B., Maraš V., Božović Đ., Popović T., Stešević D., Velimirović A. (2011): The state of agricultural plant genetic resources in Montenegro. *Poljoprivreda i šumarstvo* 57 (1), 33.
- [13] Lazović B., Bošković R., James C., Tobutt K. R., Gasić K. (2000): Genetic diversity of olives grown along the coast of Montenegro. IV International Symposium on Olive Growing 586, 167–170.
- [14] Božović Đ., Lazović B., Ercisli S., Adakalić M., Jaćimović V., Sezer I., Koc A. (2016): Morphological characterization of autochthonous apple genetic resources in Montenegro. *Erwerbs-Obstbau* 58 (2), 93–102.
- [15] Jaćimović V., Božović Đ. (2014): Biological traits of cornelian cherrz genotypes (*Cornus mas* L.) from territory of Montenegro. *Genetika* 46 (2), 427–436.
- [16] Lazović B., Adakalić M., Pucci C., Perović T., Bandelj D., Belaj A., Mariotti R., Baldoni L. (2016): Characterizing ancient and lokac olive germplasm from Montenegro. *Scientia Horticulturae* 209, 117–123.
- [17] Knap T., Arbeiter A. B., Jakse J., Čizmović M., Adakalić M., Popović R., Lazović B., Strikić F., Podgornik M., Bandelj D. (2015): Diversity of figs (*Ficus carica* L.) from the east Adriatic coast. V International Symposium on Fig 1173, 11–16.

- [18] Calò A., Costacurta A., Maraš V., Meneghetti S. and Crespan M. (2008): Molecular Correlation of Zinfadel (Primitivo) with Austrian, Croatian and Hungarian cultivars and Kratošija, an additional synonym. *Am. Journal Enol. Vitic.* 59, 205–209.
- [19] Ulićević M. (1959): Prilog rejonizaciji vinogradarstva u Crnoj Gori (Contribution to the zoning of viticulture in Montenegro). *Naša poljoprivreda i šumarstvo*, num. 2/V, Titograd.
- [20] Ulićević M. (1966): Prilog proučavanju osobina najvažnijih sorata vinove loze gajenih u SR Crnoj Gori (Contribution to the properties research of the most important grapevine varieties cultivated in federal Republic Montenegro). *Archive of Agricultural Sciences*, year X, sv. 23, 1–100.
- [21] Pejović Lj. (1988): Ampelografska proučavanja varijeteta kratošije. *Jugoslovensko vinogradarstvo i vinarstvo*, N. 3–4, Beograd.
- [22] Maraš V. (2000): Ampelografske karakteristike varijeteta sorte vinove loze Kratošija u Crnoj Gori. *Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet. Zemun — Beograd.*
- [23] Maraš V., Božović V., Giannetto S., Crespan M. (2014): SSR molecular marker analysis of the grapevine germplasm of Montenegro. *Journal International des sciences de la vigne et du vin.* 48 (2), 87–97.
- [24] *Statuta et leges civitatis Buduae, civitatis scardonae et civitatis et insulaelesinae, opera prof. Simeonis Ljubić. XV Century.*
- [25] Maraš V., Tello T., Gazivoda A., Mugoša M., Perišić M., Raičević J., Štajner N., Ocete R., Božović V., Popović T., García-Escudero E., Grbić M., Martínez-Zapater J. M. and Ibáñez J. (2020): A wide prospection in old Montenegrin vineyards reveals the existence of active ancient ways of generating genetic diversity in grapevine. *Scientific Reports*, in press.
- [26] Nacionalna strategija biodiverziteta sa Akcionim planom za period 2010–2015. godine. *Ministarstvo uređenja prostora i zaštite životne sredine*, jul 2010, Podgorica.
- [27] Grbić M., Van de Peer Y., Rombauts S., Grbic V. (2010): Spider mite silk proteins, EP2483297 A1.
- [28] Adrio J. L. and Demain A. L. (2010): Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered Bugs* 1: 2, 116–131;
- [29] Lainez M., José Manuel González, J. M., Alfredo Aguilar, A. A., Vela C. (2016): Spanish strategy on bioeconomy: Towards a knowledge based sustainable innovation. *New Biotechnology* 40 (2018), 87–95.

Miodrag GRBIĆ, Javier IBÁÑEZ, Vesna MARAŠ,  
Jose Miguel MARTÍNEZ-ZAPATER

THE SIGNIFICANCE OF GENOMIC TECHNOLOGIES IN  
EXPLORATION AND VALORIZATION OF GENETIC  
DIVERSITY IN MONTENEGRO

*Summary*

Bioeconomy approach is an answer to the challenges of the society that we expect in the future: food production, climate change, sustainable resource management, competitiveness of companies, new jobs opening and dependence on non-renewable resources. One of the key points in this concept is genomics knowledge and technologies that are developed on the basis of DNA sequencing. The true comprehensive genomic research in Montenegro, directed at the genomic research of the genetic diversity of grapevine, revealed 63 unknown varieties and made pedigrees of their genetic relationships, showing that Montenegro is an old viticultural region with a genetic structure of varieties similar to traditional regions in France and Spain. This outstanding discovery opens the door for the expansion of biodiversity research in Montenegro and its valorization with genomic technologies. In this paper we summarize approaches to sequencing, assembly and annotation of genome and applications of genomic technologies as promising direction for development of Montenegrin bioeconomic strategy.

*Key words:* genome sequencing, agriculture, grapevine, diversity, intellectual protection, technology development

