

Компаративна геномика жита у ери нових секвенционих технологија

Драган Перовић, Дејан Додиг, Јелена Перовић,
Ново Пржуљ, Франк Ордон, Гордана Шурлан Момировић

Сажетак: *Компаративна геномика жита се скоро 30 година развијала упоредо са молекуларном генетиком, омогућавајући боље разумијевање еволуције гајених врста из фамилије трава, боље разумијевање многих важних биолошких процеса и стварање метода за искоришћавање у селекцији и оплемењивању. Теоријске претпоставке Дарвина, а посебно Вавиловог закона хомологних варијација, доживјеле су пуну потврду. Напредак у технологијама за секвенционирање омогућио је декодирање генома многих организама, али и пуну примјену закона компаративне генетике и геномике. С друге стране, класична генетичка и молекуларна истраживања довела су до мапирања и изоловања много различитих гена за отпорност према вирусима и другим болестима, али и важним оплемењивачким особинама код јечма и пшенице.*

Цитирање: Перовић Д, Додиг Д, Перовић Ј, Пржуљ Н, Ордон Ф, Шурлан Момировић Г (2020) Компаративна геномика жита у ери нових секвенционих технологија. У: Пржуљ Н, Тркуља В. (уредници) Од генетике и спољне средине до хране. Академија наука и умјетности Републике Српске, Бања Лука, Монографија XLI:181–205

Cite as: Perović D, Dodig D, Perović J, Pržulj N, Ordon F, Šurlan Momirović G (2020) Comparative genomics of cereals in an era of new sequencing technologies. In: Pržulj N, Trkulja V (eds) From genetics and environment to food. Academy of Sciences and Arts of the Republic of Srpska, Banja Luka, Monograph XLI:181–205

Секвенционирани геноми јечма и пшенице омогућују ефикасно оплемењивање на многе особине на нивоу алела, и тако доприносе стварању шире генетичке основе свих оплемењивачки важних особина код жита. Компаративна геномика ће у будућности бити изузетно важна, а посебну улогу имаће у изоловању важних гена код жита са великим геномима који се налазе у близини центромјера.

Кључне ријечи: Компаративна геномика жита, пшеница, јечам, савремене методе секвенционирања, молекуларни маркери

5.1. Увод

Човјек је од давнина уочавао разлике, али и сличности, које постоје у биљном свијету. Сличности између појединих врста дуго су времена највише коришћене у ботаничкој систематизацији. Тако, на примјер, током проучавања еволуције разних биљних и животињских врста, Дарвин је увидио да постоји паралелизам у варирању, како у оквиру једне врсте, тако и између сродних врста. Сличност између биљних врста обрнуто је пропорционална њиховој еволуционој удаљености – већа удаљеност значи и веће разлике у карактеристикама појединих врста. Ову законитост запазио је на морфолошком нивоу и описао, почетком двадесетог вијека, руски научник Н. И. Вавилов, назвавши је *законом хомологних редова или варијација*. Проучавајући колекције гајених биљака и њихових сродника из разних дијелова свијета, Вавилов је примијетио да се појединачне серије испољавања неке особине правилно понављају код сродних врста. На основу ове законитости, могао је да предвиди постојање неке особине код врста код којих је до тада била непозната. За уочене разлике и сличности на морфолошком нивоу дуго времена се претпостављало да су базиране на молекуларном нивоу, и то на насљедној основи. Крајем двадесетог вијека, развој молекуларне биологије и секвенционих технологија довео је до разјашњења ових појава на нивоу ДНК молекула и омогућио стварање нове научне дисциплине, која се назива компаративна геномика. Наука која на нивоу појединачних особина и гена проучава разлике и сличности код сродних врста, назива се компаративна генетика. Компаративна генетика тежи да објасни особине са еволуционог аспекта и да утврди у којој мјери је варирање појединачних особина посљедица варирања ортологних гена, односно гена истог поријекла. Истовремено, научна дисциплина која проучава сличности и разлике код сродника на нивоу цијелог генома, а не

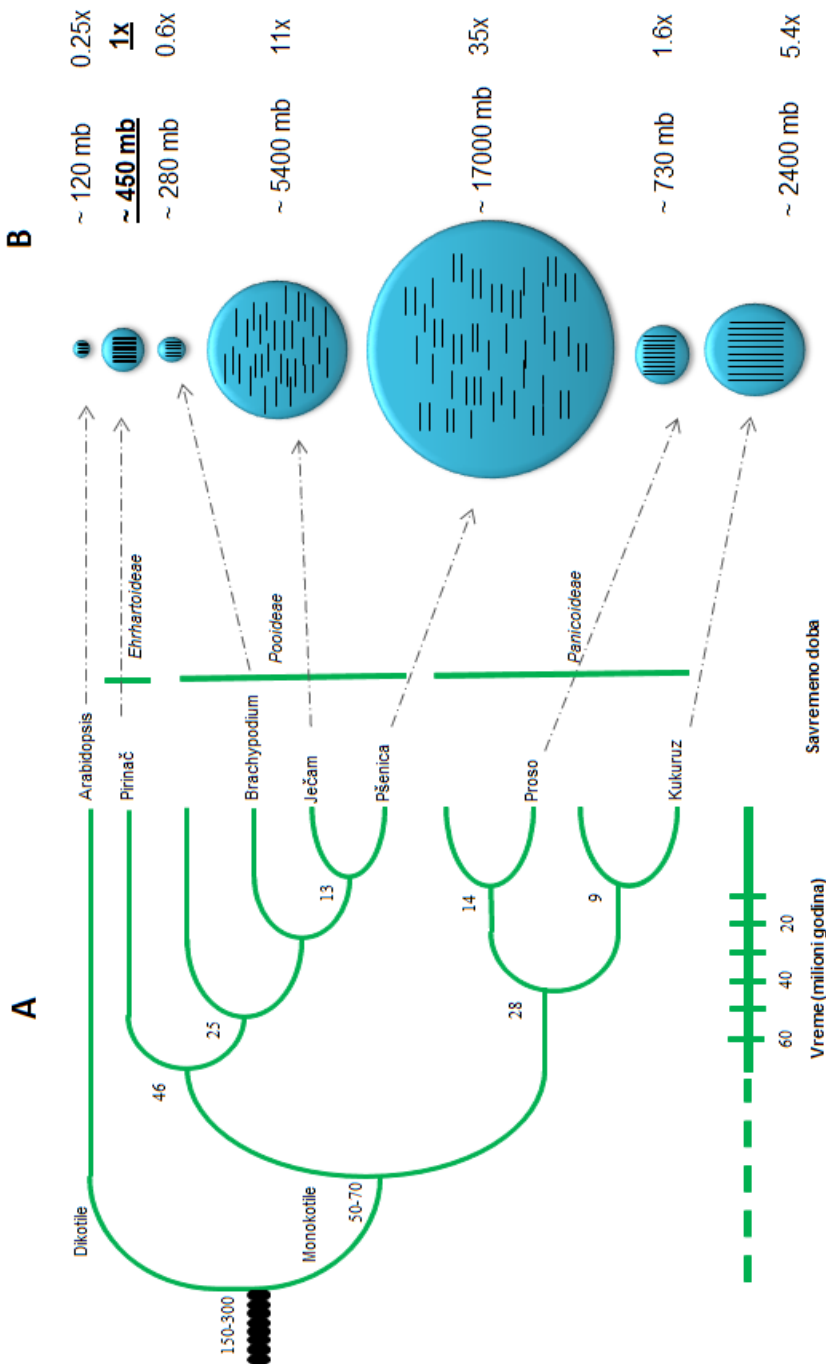
само појединачних гена, назива се компаративна геномика. Може се рећи да није далеко дан када ће скоро цјелокупна експериментална биологија бити заснована на хипотезама које потичу од поређења гена и генома сродних организама. У практичном смислу, познавање хомологних серија у варирању особина унутар врсте, између врста и родова, односно закона компаративне генетике и геномике, добија на значају у савременом оплемењивању биљака при преносу особина из дивљих сродника. У оквиру овог поглавља, у кратким цртама биће описан настанак компаративне геномике стрних жита, развој најважнијих метода који су утицали на развој ове научне области, са посебним освртом на савремене методе секвенционирања.

5.2. Заједнички предак и посљедице раздвојеног еволуционог развоја

Жита, која припадају фамилији трава (*Poaceae*), обезбјеђују више од половине калорија за људску исхрану. Тај удио је много већи када се узму у обзир траве које се користе у исхрани животиња. Данас је познато око 10.000 врста из фамилије трава (Feuillet and Keller 2002; Feuillet and Salse 2009). Уз еколошку доминацију фамилије трава у скоро свим климатским областима и географским регионима на планети, производња малог броја гајених жита има економски доминантну позицију. Са еволуционог гледишта, пет најважнијих жита из фамилије трава, из три подфамилије *Panicoideae* (сирак, кукуруз), *Ehrhartoideae* (пиринач) и *Pooideae* (јечам, пшеница) (Сл. 5.1.А), потичу од заједничког претка, од кога су наставила да се развијају прије 50 до 70 милиона година. Цвјетнице су се појавиле прије 150–300 милиона година. Главне врсте стрних жита, пшеница и јечам, у форми коју знамо, настале су у процесу доместификације. Историја цивилизације је, на неки начин, и историја доместификације главних жита, чијим је одабирањем и гајењем одабраних линија/генотипова, човјек, од простог сакупљача, постао ратар. Паралелна и међусобно независна доместификација различитих жита, на различитим дијеловима земљине кугле, обезбјеђивала је, током историје, свим овим биљним врстама основу за исхрану. У периоду до Вавилових истраживања, проучавање гајених биљака било је углавном појединачно и независно, концентрисано на појединачне врсте, а пуну примјену упоредног проучавања донијела је ера ДНК, када су откривене сличности између сродних врста на нивоу секвенци.

Треба истаћи да, осим морфолошких и секвенционих сличности, постоји и велики број структурних и функционалних паралела или особина које су поједини представници жита очували у односу на заједничког претка. Током доместификације, човјек је одабирао сличне мутације у различитим гајеним врстама (Doebley et al. 2006). На примјер, одабирањем биљака са неломљивим вретеном класа, наши преци су и код пшенице и јечма, одабирали природне мутације које су значајно доприносиле повећању и очувању приноса, како код ове двије, тако и код других ратарских гајених биљака. Код њихових дивљих сродника, ломљиво вретено класа је доминантна особина која омогућава бољу адаптацију у природним условима (Krattinger et al. 2009). Проучавање ове и других особина важних за доместификацију гајених врста, представља један од основних мотивационих фактора за истраживања из области компаративне генетике. Једнако важне су разлике и сличности у секвенцама, у експресијама, протеинским структурама свих гена и генских продуката, који заједнички учествују у стварању биолошких разлика, одговорних за адаптацију на различите услове спољне средине. Као трећи, значајан фактор, који инспирише истраживања на пољу компаративне геномике, треба истаћи јако велике варијације у величини генома главних врста жита (Сл. 5.1.В). Према Bennett and Leitch (2003), разлика у величини генома пиринча, *Oryza sativa* L. од око 0,5 pg (~490 Mb) и хљебне пшенице *Triticum aestivum* L. од око 17,3 pg (~16.979 Mb) је чак 35 пута (Сл. 5.1). Разлике у величини генома су углавном у понављајућој (репетитивној) ДНК, док је број активних гена код свих врста скоро исти.

Имајући у виду разлике у величини и сложености генома жита, најважнија алатка у прошлости биле су компаративне мапе, док је данас ријеч о физичким и секвенционим мапама. Пошто су редослијед гена и њихова сличност на нивоу секвенци у различитим врстама у одређеној мјери очувани, то је представљало основу за употребу малих генома као модела у компаративној геномици. Први кораци компаративне геномике били су крајем 80-их година прошлог вијека или у вријеме RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) маркера, који су засновани на полиморфизму дужине рестрикционих фрагмената. Примјеном геномике, створене су могућности за изолацију гена код биљних врста са великим геномима, као и за разумијевање основних механизма у еволуцији генома.



Сл. 5.1. А. Филогенетско стабло скривеносеменица и главних жита. Вријеме дивергенције од заједничког претка означено је на филогенетским гранама (изражено у милионима година) (Bolot et al. 2008). В. Величина генома пшенице, јечма, пиринча, проса и кукуруза, као и двије модел биљне врсте *Brachypodium*-а и *Arabidopsis*-а. Геноми проса (Paterson et al. 2009) и кукуруза (Schnable et al. 2009) секвенционирани су прије десетак година, док су први генотипови јечма (Marscher 2017) и пшенице (*International Wheat Genome Sequencing Consortium*, IWGSC 2018) посљедњи секвенционирани. У периоду од 2000. године, када је секвенциониран геном човјека (Venter 2000), убрзо су секвенционирани геноми *Arabidopsis*-а (AGI 2000) и пиринча (Goff et al. 2002; International Rice Genome Sequencing Project 2005), док је геном *Brychypodium distachyon* секвенциониран 2010. године (International Brachypodium Initiative 2010). Модел врсте и пиринач имају мале секвенциониране геноме. Да би се олакшало поређење величине генома, пиринач је, из практичних разлога, као гајена врста означен са 1x, док су величине осталих генома прерачунате. Нове технологије секвенционирања, назване *нова генерација секвенционирања* (НГС), омогућиле су смањење трошкова секвенционирања и олакшале израду секвенционих мапа организама са већим геномима.

Fig. 5.1. A. A phylogram/phylogenetic tree of angiosperms and major cereals. The divergence time from the common ancestor is indicated on the phylogenetic branches (expressed in million of years) (Bolot et al. 2008). B. A genome size of wheat, barley, rice, millet and maize, as well as two plant species models of Brachypodium and Arabidopsis. The genomes of millet (Paterson et al. 2009) and maize (Schnable et al. 2009) were sequenced about ten years ago, while the first barley (Marscher 2017) and wheat (IWGSC 2018) genotypes were last sequenced. Genomes of Arabidopsis (AGI 2000) and rice (Goff et al. 2002; IRGSP 2005) have been rapidly sequenced since 2000, when the human genome was sequenced (Venter et al. 2000), while the genome of Brychypodium distachyon was sequenced in 2010 (International Brachypodium Initiative 2010). To facilitate comparisons of genome sizes, rice, as a cultivated species, has been designated with 1x for practical reasons, while the sizes of the remaining genomes have been computed. New sequencing technologies, called next-generation sequencing (NGS) have lead to the reduction in sequencing costs and provided sequential mapping of organisms with larger genomes.

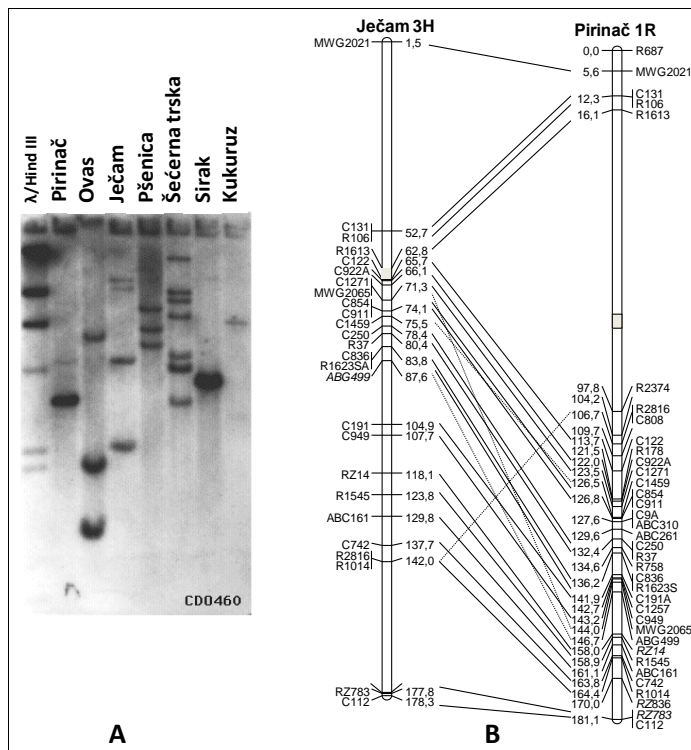
У суштини, први гени на којима се радило примјеном клонирања заснованог на мапи, код јечма и пшенице, били су изоловани уз помоћ маркера из других врста, који су омогућили повећање броја маркера у оквиру циљаних генских локуса и, у комбинацији са популацијама високе резолуције (неколико хиљада F_2 потомака), смањење величине интервала у циљаним локусима.

5.3. Основни појмови и законитости компаративне геномике и резултати примјене молекуларних маркера у компаративној геномици

Првобитна RFLP компаративна мапирања, заснована на хибридизацији проба обиљежених са радиоактивним P^{32} на мембранама (*Southern blotting*), код сродних врста трава, пшенице, јечма и ражи, односно кукуруза, проса и других жита, показала су да постоји сличност у секвенцама, испољена у унакрсним хибридизационим сигналимa (тракама) (Сл. 5.2.A), а такође и сличност распореда на хромозомским мапама. Компаративна анализа је показала да су гени са појединачних хромозома, односно њихов број, структура и распоред на хромозомима, остали слични током милиона година независне еволуције, односно да су ове промјене биле много спорије него што је била динамика развоја њихових цјелокупних генома (Keller and Feulliet 2000).

Према Paterson (2006), промјене у организацији појединачних хромозома жита биле су знатно спорије, него што је то био случај код других родова гајених биљака. Други важан резултат првобитног компаративног мапирања био је утврђивање постојања очуваних хромозомских сегмената, чијом је упоредном анализом било могуће реконструисати геном и хромозомску структуру прапредака трава.

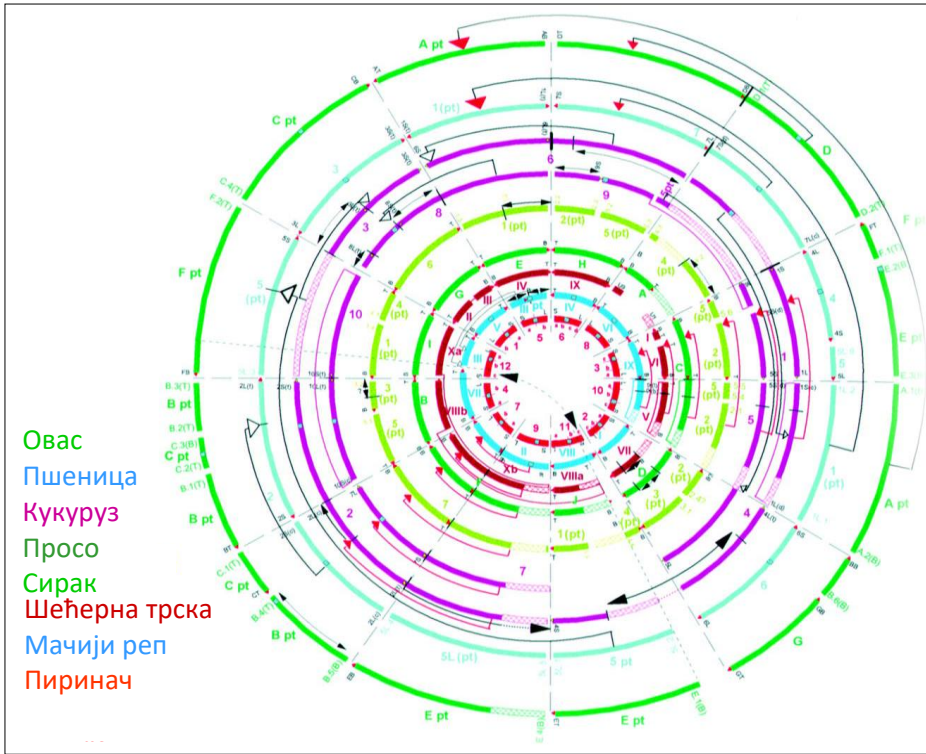
Постојање дијелова хромозома са структуром очуваном као код далеког претка жита, омогућило је, средином деведесетих година прошлог вијека, формирање теорије компаративне геномике жита, по принципу лево коцкица (Moore et al. 1995). Према овој теорији, конзервисани региони хромозома, или лево коцкице, садрже исте или сличне маркере и гене, а њихов распоред је исти или јако сличан. Овдје треба нагласити да је конзервација у секвенци маркера и њиховом распореду, независна од броја и структуре хромозома и пloidије читавих генома код проучаваних врста.



Sl. 5.2.A. Хибридизациона шема RFLP маркера CDO460 (CDO проба представља дио гена овса) на мембрани са ДНК изолованом из пиринча, овса, јечма, пшенице, шећерне трске, проса и кукуруза (Van Deynze et al. 1995). B. Компаративна мапа првог хромозома пиринча и трећег хромозома јечма (Smilde et al. 2001). Већина маркера на мапама су RFLP маркери.

Fig. 5.2.A. The hybridisation scheme of the RFLP marker CDO460 (CDO probe presents a portion of an oat gene) on the membrane with the DNA isolated from rice, oat, barley, wheat, sugar cane, millet and maize (according to Van Deynze et al. 1995). B. Comparative map of rice chromosome 1R (right) and barley chromosome 3H (left) (Smilde et al. 2001). The majority of markers on maps are RFLP markers.

Број еволуционо очуваних хромозомских фрагмената, који су били детектовани код шест сродних врста, при поређењу са геномом пиринча кретао се од 19 до 24 (Gale and Devos 1998; Devos and Gale 2000) (Сл. 5.3).



Сл 5.3. Концентрични кругови (*Crop Circles*) генома гајених жита. Слика представља консензус компаративну мапу фамилије трава (Gale and Devos 1998). Појединачни концентрични кругови представљају геноме, односно хромозоме и дијелове хромозома врста из фамилије трава.

Fig. 5.3. "Crop circles" – Concentric circles of the genomes of cultivated cereals. The Figure represents a consensus comparative map of the grass family (according to Gale and Devos 1998). Individual concentric circles represent the genomes, that is, chromosomes and chromosomal fragments of species of the grass family.

Компаративне мапе, које обухватају молекуларне и морфолошке маркере појединих врста трава и жита, омогућиле су нови увид у структуру и еволуцију рода трава, али и отвориле нове путеве у искоришћавању ове законитости, како у основним, тако и у примијењеним истраживањима и oplemeњивању. Прве компаративне мапе биле су конструисане, као што је већ напоменуто, RFLP пробама које су имале јасан сигнал на мембранама после рестрикције геномске ДНК различитих трава (Сл. 5.2.В).

Сет RFLP проба, погодних за првобитну анализу компаративне геномике жита, сачињавао је између 200 и 300 маркера који су потицали од дијелова или читавих гена са конзервисаном структуром и секвенцама. Ова истраживања су потврдила заједничко поријекло и повезаност врста из рода *Triticeae*, хомологију хромозома и колинеарност распореда гена на нивоу читавих генома и омогућила стварање јединствене номенклатуре хромозома.

Генетичке карте, конструисане сетом компаративних проба са малим бројем копија, имале су малу резолуцију и маркери су просјечно били удаљени 10 цм. Накнадним процјенама ових података и мапа (Gaut 2002), увидјело се да постоје значајне реорганизације хромозома и да се резултати ове теорије морају узимати и примјењивати са одређеним резервама.

Након секвенционирања генома *Arabidopsis*-а, а посебно пиринча (Chen et al. 2002), почела је нова фаза развоја компаративне геномике жита. У временском периоду 2002–2009. година завршена је детаљна анализа генома пиринча, али су истовремено секвенционирани транскриптоми скоро свих гајених биљака. Треба нагласити да је тада, као метод за секвенционирање, коришћена Сангерова техника која је временом бивала јефтинија, али, у суштини, није довела до значајнијег појефтињења. Паралелно са секвенционирањем, развијале су се PCR (*Polymerase Chain Reaction*) врсте молекуларних маркера, који су знатно јефтинији и једноставнији за употребу, од поменутих RFLP маркера. PCR маркери се, према поријеклу секвенци, дијеле на генске (потичу од гена) и геномске (потичу од негенских, понављајућих и између генских дијелова ДНК). Према врсти, PCR маркери су, начелно, подијељени у двије групе: SSR (*Simple Sequence Repeats*) или микросателити, засновани на разликама у дужини PCR продукта, и SNP (*Single Nucleotid Polymorphism*) маркери, засновани на разлици у појединачним базама (Pržulj i Perović 2005). За компаративно мапирање су од посебног значаја све врсте генских маркера, док је значај геномских маркера ограничен само на конзервисане некодирајуће регионе ДНК и, из њихових секвенци развијених, PCR маркера.

5.4. Поређење геномске секвенце пиринча и транскриптома јечма и пшенице

Постојање секвенционираних модела биљака са малим геномом и секвенционираних транскриптома, односно генског репертоара, омогућило је поређење секвенци различитих врста и, уз примјену закона

колинеарности распореда гена дуж хромозома *in silico*, предвиђање положаја гена код врста са великим геномима (Perović i sar. 1994; Perović et al. 2015; Perović et al. 2019). Првих година XXI вијека покренути су велики пројекти мапирања EST-ова (Expressed Sequence Tags), односно експримираних дијелова гена или читавих гена, код многих биљних врста. Тако је код пшенице RFLP мапирање преко 7000 EST-ова, коришћењем делеционих и еуплоидних линија, довело до конструкције физичке мапе са преко 16.000 локуса (Qi et al. 2004; Miftahudin et al. 2004). Sorrells et al. (2003) мапирани су 4.485 пшеничних EST-ова и компаративно упоредили са пиринчаним геномом. На овај начин, аутори су повећали резолуцију компаративне мапе ове двије врсте до 30 пута, у односу на претходну RFLP мапу. С друге стране, код јечма је конструисана консензус мапа уз употребу три генетичке популације [Igr1 x Franka (I x F), Steptoe x Morex (S x M) и Oregon Wolfe Barley (OWB)] која је садржавала преко 1.000 генских маркера (Stein et al. 2007). Распоред овако мапираних гена код пшенице и јечма упоређен је са секвенционираним геномом пиринча, што је довело до конструкције компаративних мапа повећане резолуције. Практична примјена ових компаративних мапа омогућила је детаљнију реконструкцију прагенома жита, у односу на RFLP маркере, али и још бољу сатурацију циљаних локуса, као и много прецизнију детекцију кандидатних гена (Ordon and Perović 2013). Укратко, у првој деценији XXI вијека компаративним мапирањем откривен је велики број реорганизација између генома пиринча, пшенице и јечма. Ови резултати довели су до прве ревизије кружног прагенома жита (Devos 2005; Drader et al. 2009), а створене су и нове алатке за микроколинеарна проучавања из области компаративне геномике.

У периоду од 2008. до 2013. године, направљен је велики број генетичких мапа јечма, пшенице и других врста жита са великим геномима, које су садржавале по пар хиљада маркера, који су развијени послје секвенционирања EST-ова код различитих сората и линија. Ове генетичке мапе анализиране су примјеном нових биоинформатичких алгоритама и омогућиле су још детаљнија компаративна проучавања. Код јечма појединачне генетичке мапе, као што су мапа од 2.890 PCR маркера (Sato et al. 2009), консензус мапа од 3.070 маркера (Close et al. 2009), као и мапа од 2.000 SNP маркера (Thiel et al. 2009), створиле су базу за сљедећу генерацију студија компаративне геномике. У овом временском периоду, технологија секвенционирања направила је велики искорак, јер је довела до вишеструког појевтињења и до много лакшег секвенционирања и ресеквенционирања генома свих живих организама. Због тога се данашња компаративна геномика заснива на поређењу секвенци комплетних генома,

а у хуманој генетици омогућила је стварање такозване персоналне медицине. Првобитни резултати компаративног поређења читавих геномских секвенци потврдили су исправност коришћења *Arabidopsis*-а, као модела за све дикотиледоне биљке, те пиринча, као модела биљке просоликих жита, али истовремено упутили да је *Brachypodium*, са својим малим геномом, модел за проучавање гајених врста рода *Triticeae* (Drader and Kleinhofs 2010). Више о компаративној геномици нове генерације секвенционирања (НГС), биће изложено у сљедећем поглављу.

5.5. Нове технологије секвенцирања ДНК

Сангерово откриће секвенционирања молекула ДНК, односно одређивања редослиједа појединачних нуклеотида у молекулу ДНК примјеном дводимензионалне хроматографије, прије више од четрдесет година био је велики напредак молекуларне биологије, те се може рећи да је представљало прву секвенциону револуцију (Sanger and Coulson 1975). Друга револуција почела је крајем XX вијека, када је развијена технологија нове генерације секвенционирања ДНК (***Next Generation Sequencing*** – NGS), која је смањила трошкове секвенционирања и истовремено повећавала капацитете, чинећи могућим секвенционирање цијелих генома и ресеквенционирање појединачних генотипова (Henry 2012). Главне предности NGS технологија су да не захтијевају бактеријско клонирање фрагмената ДНК и електрофоретско раздвајање производа за секвенционирање (Morey et al. 2013). NGS укључује сљедеће главне технолошке платформе: Roche/454, Illumina/Solexa и Life/APGSOliD (Hodžić et al. 2017). Прва NGS технологија MPSS (***Massively Parallel Signature Sequencing***) примјењује се од 2000. године (Brenner et al. 2000). Након MPSS-а 454 (Life Sciences) развио је 2005. *pyrosequencing* технологију, која је била шест пута јефтинија у односу на традиционално Сангер секвенционирање (Margulies et al. 2005). Током 2005–2006, 454-GS-20 Roche платформа омогућила је секвенционирање до 20 Mbp. Сљедећа Roche платформа GS-FLKS, из 2007. године, могла је да секвенционира до 100 Mbp, а она је додатно побољшана на 400 Mbp, односно на 600 Mbp уз дужину читања до 1000 bp примјеном 454-GS-FLKS + Titanium платформе. У истој години, анализатор генома компаније Illumina увео је технологију секвенционирања путем синтезе, што је и данас један од главних метода секвенционирања цијелих генома. Од почетног једног Gbp у једном циклусу, до данашњих платформи које имају капацитет секвенционирања од 15 Gbp (MiSec) и 600 Gbp (HiSec), Illumina је у међувремену била и остала лидер у

секвенционирању многих генома. Трећа платформа, SOLiD систем секвенционирања, почела је са примјеном 2007. године, а слиједиле су је SOLiD 5500v и 5500lv у 2010. Најновија SOLiD4 платформа има капацитет између 35–50 Gbp с максималном дужином читања између 35–50 база. Life Technologies Ion Torrent секвенцер објављен је 2011. године и користи секвенционирање-по-синтези и емулзији PCR-а. Неки од модела су PGM 314, PGM 316, PGM 318, PI и PII. PII је покренут почетком 2015, са просјечном дужином читања од 100 база и капацитетом секвенцирања до 64 Gbp.

Убрзо након појављивања NGS, појавила се технологија секвенцирања треће генерације (*Third Generation Sequencing* – TGS), која се одликује секвенционирањем у једном молекулу (*Single Molecule Sequencing* – SMS) и у реалном времену (Schadt et al. 2010). Прва SMS технологија комерцијализована је од стране Helicos Biosciences, али је била релативно спора, скупа и производи секвенционирања били су кратки, 32 bp. Прву комерцијалну TGS технологију избацио је на тржиште Pacific Biosciences (PacBio), 2011. године, и названа је секвенционирање у једном моменту (*Single Molecule Real Time* – SMRT). Просјечна дужина SMRT секвенци је 10–15 Kb, док се максималне дужине крећу и преко 80 Kb (Sakai et al. 2015). Oxford Nanopore Technologies (ONT) је 2014. започео нанопоре секвенционирање са промјенљивом дужином читања (дужине читања су ограничене само дужинама молекула у узорку) (Jain et al. 2015). Поред одсуства PCR амплификације и процеса секвенционирања у реалном времену, важна карактеристика SMRT и нанопор секвенционирања су дуге секвенце. Као алтернатива методама које су развили PacBio и ONT, Illumina је увела кит за припрему библиотека за "синтетичке дуге секвенце" (*Synthetic Long Reads* – SLR). Годину дана касније, 10Ks Genomics представио је варијанту микро флуида за SLR, са много већим капацитетом партиционирања. У Illumina SLR, ДНК се скупља у фрагменте од 10 kb, док 10Ks Genomics систем користи природне фрагменте произвољне величине до 100 kb (van Dijk et al. 2018).

Када је ријеч о примјени горе поменутих технологија на биљне врсте, најшире и најважније је секвенционирање цијелих генома (*Whole Genome Sequencing* – WGS) (Hodžić et al. 2017). NGS технологије друге и треће генерације такође су широко коришћене при секвенционирању, уз смањење комплексности попут генотипизација уз секвенционирање (*Genotyping by Sequencing* – GBS) (Elshire et al. 2011), *Multiplex Shotgun Genotyping* – MSG (Andolfatto et al. 2011), при изолацији гена и томе слично.

Технологије NGS такође се примјењују за циљано ресеквенционирање, како би се идентификовали гени повезани са доместикацијом поређењем

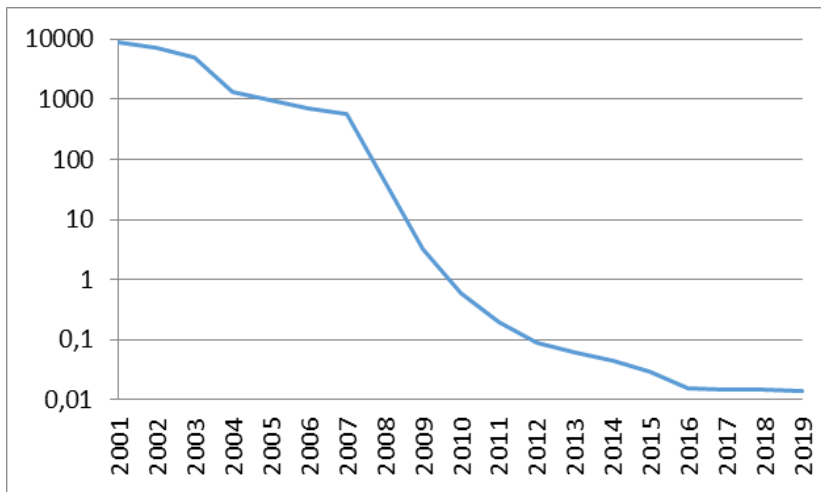
генома врста усјева и њихових дивљих сродника (Henry 2012). Однедавно, комбинација мутацијске генетике и NGS омогућава брзо циљање и изолацију свих типова гена (Perović et al. 1999, 2001, 2013). На примјер, секвенционирање обogaћивањем гена отпорности (RenSec) (Andolfo et al. 2014), и три, од ње развијене, методе секвенционирања хромозома са мутираним генима (*Mutant Chromosome Sequencing*) (MutChromSec), асоцијацијска генетика са секвенцирањем обogaћивања R гена (AgRenSec) и секвенцирање мутаната након обogaћивања гена отпорности (MutRenSec).

5.6. Компаративна геномика у NGS ери

Открићем нових метода за секвенционирање молекула ДНК, с једне стране, појефтинили су трошкови секвенционирања по нуклеотиду, а, с друге стране, количински су увећане могућности секвенционирања, што је све заједно резултирало убрзањем биолошких истраживања (Граф. 5.1).

Највећи пад цијена секвенционирања нуклеинских база забиљежен је 2007. године и од тада цијене константно падају, по Муровом закону (*Moore's Law*). Што се тиче компаративне геномике жита, овај технолошки напредак омогућио је, на првом мјесту, секвенционирање већег броја мањих генома, као што су *Brachypodium* (International Brachypodium Initiative 2010), просо (Paterson et al. 2009) и кукуруз. Величина ових биљних генома значајно је мања у поређењу са јечмом и пшеницом, који су посљедњи секвенционари. Треба нагласити да, након секвенционирања било ког генома, предстоји дуготрајан рад на анотацији свих гена, кодирајућих и некодирајућих региона као и контролних региона. Код пиринча и *Arabidopsis-a*, два првобитно секвенционирани генома, процес анотирања још увијек траје и сваке године бива објављена још детаљнија верзија.

Доступност секвенци пет генома врста из фамилије трава омогућило је ревизију теорије концентричних кругова, као и реконструкцију палеогенома трава. Abrouk et al. (2010) објавили су резултате анализе који указују да су гени и понављајући елементи другачије организовани код малих генома, у поређењу са великим геномима. Према овој теорији, палеогеном трава био је полиплоидан, вишеструко се редуковао и, затим, појединачним дупликацијама које су углавном биле специфичне за поједине врсте, увећавао до данашње величине (Salse et al. 2008). У скорој будућности могу се очекивати нове анализе поријекла и еволуције трава и ревизије ове теорије, и то у складу са акумулацијом секвенционих података главних жита.



Граф. 5.1. Смањење трошкова секвенционирања у периоду 2001–2019.

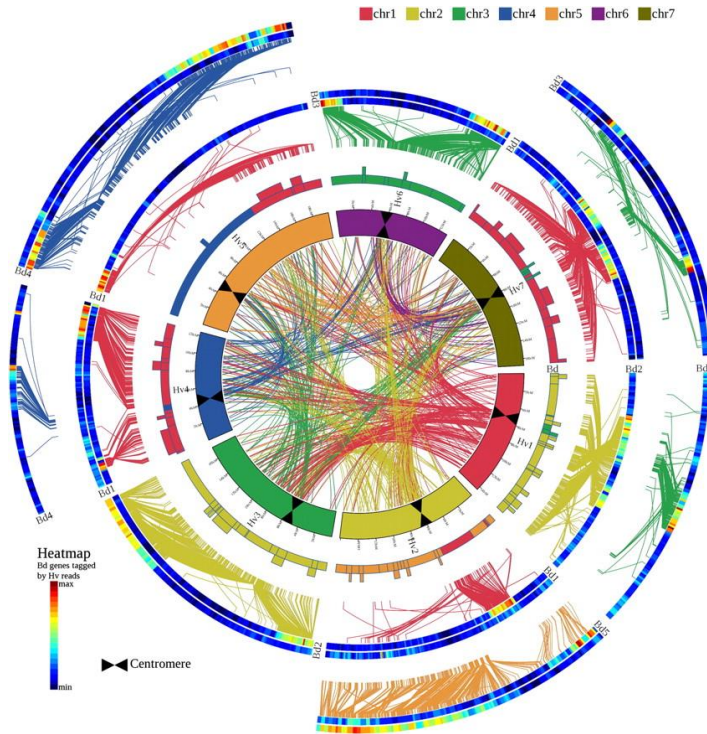
Цијене трошкова изражене су у доларима по нуклеотиду (Y оса)

Graph. 5.1. Diagram of the reduction of sequencing costs in the 2001-2019 period.

Cost prices are expressed in dollars (\$) per nucleotide (Y axis)

Да би се пребродило јаз у генетичким и биолошким истраживањима између секвенционираних и несеквенционираних генома, 2010. године пришло се изради *Genome zipper*-а (Mayer et al. 2011), односно виртуелног модела генома врста које су много мање карактерисане, у односу на мале секвенционирани модел геноме (Сл. 5.4).

У форми компримованог патента (рајсфершлус), Mayer et al. (2011) израдили су виртуелну хромозомску мапу генома јечма на основу анализе три анотирана модела *Brachypodium*-а, пиринча и проса. *Genom zipper* јечма садржи секвенце скоро 22.000 гена или 69% од укупно процијењених 32.000. Ова група биоинформатичара комбиновала је доступне податке геномике јечма, као што су генетичке и хибридизационе мапе, физички сортиране хромозоме и NGS доступне геномске секвенце, у конзервисаном синтеном моделу компаративне геномике, да би одредила највјероватнији теоретски распоред јечмених гена на хромозомима.



Сл. 5.4. Компаративна мапа генома *Brachypodium-a* и јечма (Mayer et al. 2011). Унутрашњи концентрични круг представља виртуелни распоред гена јечма (*Genom zipper* јечма 1H – 7H), док спољашњи кругови представљају хромозоме и на њима распоред гена *Brachypodium-a*, као и хомологију њиховог распореда са генима јечма.

Fig. 5.4. Comparative map of genomes of *Brachypodium* and barley (Mayer et al. 2011). The inner concentric circle represents the virtual barley gene order (barley genome zipper 1H – 7H), while the outer circles represent chromosomes with the *Brachypodium* gene order and homology of their order with barley genes.

Вријеме потребно за позиционо изоловање гена у ери NGS, код јечма и пшенице се скратило са више од десет година, на око четири године. Више детаља о убрзаној изолацији гена може се наћи у радовима Lürken et al. (2013) и Yang et al. (2014). Када је ген изолован, значајно је олакшано тражење нових алела у природним или мутираним популацијама или прављење функционалних маркера који омогућују такозвано паметно оплемењивање (*Smart breeding*).

5.7. Закључак

Секвенционирани геноми јечма и пшенице отворили су нове путеве у истраживању ова два важна жита. Генетичари и оплемењивачи јечма и пшенице данас су у позицији у којој су корисници првих секвенционираних модела биљака, пиринча и *Arabidopsis*-а, били прије више од петнаест година. Познавање цјелокупних генома јечма и пшенице не само да промовише оплемењивање, него и пружа изванредну прилику за основна биолошка истраживања, тј. убрзану изолацију нових гена и брзу детекцију природних варијација. Доступност секвенци генома унаприједиће генетику јечма и пшенице, убрзати идентификацију и употребу ријетких алелних варијанти у класичном оплемењивању, као што су повратна укрштања уз помоћ маркера (**Marker Assisted Back Crossing** – МАВC), маркер асистирана селекција (**Marker Assisted Selection** – МАС) и пирамидизирање генетичких фактора одговорних за важне особине. Позициона изолација гена биће знатно олакшана уз помоћ референтних секвенци. У складу с тим, изолација гена биће јефтинија и бржа, јер ће се смањити вријеме од мапирања гена до идентификације и функционалне валидације гена кандидата. Након секвенцирања више сората, као резултат PanGenоme пројеката, биће могуће извршити директно циљање важних варијанти гена и увести их у сорте како би се искористиле богате гермплазме за потребе оплемењивања.

Литература

- Abrouk M, Murat F, Pont C, Messing J, Jackson S, Faraut T, Tannier E, Plomion C, Cooke R, Feuillet C, Salse J (2010) Paleogenomics of plants: synteny-based modelling of extinct ancestors. *Trends Plant Sci* 15:479–487
- AGI (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. The *Arabidopsis* Initiative. *Nature* 408:796–815
- Andolfatto P, Davison D, Erezylmaz D, Hu TT, Mast J, Sunayama-Morita T, Stern DL (2011) Multiplexed shotgun genotyping for rapid and efficient genetic mapping. *Genome Res* 21(4):610–617
- Andolfo G, Jupe F, Witek K, Etherington GJ, Ercolano MR, Jones JDG (2014) Defining the full tomato NB-LRR resistance gene repertoire using genomic and cDNA RenSeq. *BMC Plant Biology* 14(1):120
- Bennett M, Leitch I (2003) Nuclear DNA Amounts In Angiosperms. *Annals Of Botany* 76:113–176

- Bolot S, Abrouk M, Masood-Quraishi U, Stein N, Messing J, Feuillet C, Salse J (2008) The 'inner circle' of the cereal genomes. *Curr Opin Plant Biol* 12:119–125
- Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo S, McCurdy S, Foy M, Ewan M, Roth R, George D, Eletr S, Albrecht G, Vermaas E, Williams SR, Moon K, Burcham T, Pallas M, DuBridge RB, Kirchner J, Fearon K, Mao J-i, Corcoran K (2000) Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature Biotechnology* 18(6):630–634
- van Deynze AE, Nelson JC, Yglesias ES, Harrington SE, Braga DP, Mc Couch SR, Sorrells ME (1995) Comparative mapping in grasses. *Wheat relationships. Mol Gen Genet* 25:744–754
- van Dijk, EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C (2018). The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics* 34(9): 666-681
- Vavilov NI (1935) (redactor): *Теоретической основой селекции растений*. Том 1, 2 и 3. Сельскохоз. Москва-Leningrad, с.2615
- Venter JC (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304–1351
- Gale MD, Devos KM (1998) Comparative genetics in the grasses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1971–1974
- Gaut BS (2002) Evolutionary dynamics of grass genomes. *New Phytol* 154:15–28
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296:92–100
- Devos KM, Gale MD (2000). Genome relationship: the grass model in current research. *Plant Cell* 12:637–646
- Devos KM (2005) Updating the 'Crop Circle'. *Current Opinion in Plant Biology* 8:155–162
- Doebley JF, Gaut BS, Smith B (2006) The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell* 127:1309–1321
- Drader T, Kleinhofs A (2010) A synteny map and disease resistance gene comparison between barley and the model monocot *Brachypodium distachyon*. *Genome* 53:406–417
- Drader T, Johnson K, Brueggeman R, Kudrna D, Kleinhofs A (2009) Genetic and physical mapping of a high recombination region on chromosome 7H(1) in barley. *Theor Appl Genet* 118:811–820
- Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species". *PLoS One* 6(5) e19379
- International Brachypodium Initiative (2010) Genome sequencing and analysis of the grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463:763–768

- International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436 (7052):793–800
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) (2018) Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361 eaar7191.
[dx.doi.org/10.1126/science.aar7191](https://doi.org/10.1126/science.aar7191)
- Jain M, Fiddes IT, Miga KH, Olsen HE, Paten B, Akeson M (2015) Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer. *Nature Methods* 12: 351
- Keller B, Feuillet C (2000) Colinearity and gene density in grass genomes. *Trends Plant Sci* 5:246–251
- Krattinger S, Wicker T, Keller B (2009) Map-Based Cloning of Genes in Triticeae (Wheat and Barley). In: Feuillet C, Muelbauer GJ (eds) *Genetics and genomics of the Triticeae, plant genetics and genomics: crops and models 7*. Springer Verlag, New York, USA, S337–355
- Lüpken T, Stein N, Perović D, Habekuß A, Krämer I, Hähnel U, Steuernagel B, Scholz U, Zhou R, Ariyadasa R, Taudien S, Platzer M, Martis M, Mayer K, Friedt W, Ordon F (2013) Genomics based high resolution mapping of the BaMMV/BaYMV resistance gene *rym11* of barley. *Theor Appl Genet* 32:27–37
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen Y-J, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer MLI, Jarvie TP, Jirage KB, Kim J-B, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437(7057):376–380
- Marscher M, Gundlach H., Himmelbach A, Beier S, Twardziok SO, Wicker T, Radchuk V, Dockter C, Hedley PE, Russell J, Bayer M, Ramsay L, Liu H, Haberer G, Zhang XQ, Zhang Q, Barrero RA, Li L, Taudien S, Groth M, Felder M, Hastie A, Simkova H, Stankova H, Vrana J, Chan S, Munoz-Amatriain M, Ounit R, Wanamaker S, Bolser D, Colmsee C, Schmutzer T, Aliyeva-Schnorr L, Grasso S, Tanskanen J, Chailyan A, Sampath D, Heavens D, Clissold L, Cao S, Chapman B, Dai F, Han Y, Li H, Li X, Lin C, McCooke JK, Tan C, Wang P, Wang S, Yin S, Zhou G, Poland JA, Bellgard MI, Borisjuk L, Houben A, Dolezel J, Ayling S, Lonardi S, Kersey P, Langridge P, Muehlbauer GJ, Clark MD, Caccamo M, Schulman AH, Mayer KFX, Platzer M, Close TJ, Scholz U, Hansson M, Zhang G,

- Braumann I, Spannagl M, Li C, Waugh R, Stein N (2017) A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature* 544(7651):427–433
- Mayer KF, Martis M, Hedley PE, Simková H, Liu H, Morris JA, Steuernagel B, Taudien S, Roessner S, Gundlach H, Kubaláková M, Suchánková P, Murat F, Felder M, Nussbaumer T, Graner A, Salse J, Endo T, Sakai H, Tanaka T, Itoh T, Sato K, Platzer M, Matsumoto T, Scholz U, Dolezel J, Waugh R, Stein N (2011) Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *Plant Cell* 23:1249–1263
- Miftahudin A, Ross K, Ma X-F, Mahmoud AA, Layton J, Rodriguez M, Chikmawati A, Ramalingam J, Feril O, Pathan MS, Surlan Momirovic G, Kim S, Chema K, Fang P, Haule L, Struxness H, Birkes J, Yaghoubian C, Skinner R, McAllister J, Nguyen V, Qi LL, Gill BS, Linkiewicz AM, Dubcovsky J, Akhunov ED, Dvorak J, Dilbirligi M, Gill KS, Peng JH, Lapitan NLV, Bermudez-Kandianis CE, Sorrells ME, Hossain KG, Kalavacharla V, Kianian SF, Lazo GR, Chao S, Anderson OD, Gonzalez-Hernandez J, Wennerlind EJ, Anderson JA, Choi D.W, Fenton RD, Close TJ, McGuire PE, Qualset CO, Nguyen HT, Gustafson JP (2004) Analysis of EST loci on wheat chromosome group 4. *Genetics* 168:2
- Moore G, Devos KM, Wang Z, Gale MD (1995) Cereal genome evolution: grasses, line up and form a circle. *Curr Biol* 5:737–739
- Morey M, Fernandez-Marmiesse A, Castineiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA (2013) A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Molecular Genetics and Metabolism* 110(1-2):3–24
- Ordon F, Perovic D (2013) Virus resistance in barley. *Translational Genomics for Crop Breeding* In: Varshney RK, Tuberosa R. *Biotic Stresses*. First Edition. John Wiley & Sons, Inc
- Paterson AH (2006) Comparative genomics in cereals. pp 121–135
- Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, Schmutz J, Spannagl M, Tang H, Wang X, Wicker T, Bharti AK, Chapman J, Feltus FA, Gowik U, Grigoriev IV, Lyons E, Maher CA, Martis M, Narechania A, Ollilar RP, Penning BW, Salamov AA, Wang Y, Zhang L, Carpita NC, Freeling M, Gingle AR, Hash CT, Keller B, Klein B, Kresovich S, McCann MC, Ming R, Peterson DG, Mehboob R, Ware D, Westhoff P, Mayer KFX, Messing J, Rokhsar DS (2009) The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature* 457: 551–556
- Perović D, Vračarević M, Vlajić J (1994) Primena klaster analize za ocenu srodnosti sorata pšenice. X SNIRS, Beograd, Zbornik radova, str 197–203

- Perović D, Prodanović S, Vračarević M, Perović J, Zorić D, Knežević G (1999) Sprouting resistance and hordein composition in barley. In: Proceeding of Eight International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals. Detmold, Germany, pp 31–38
- Perović D, Pržulj N, Milovanović M, Prodanović S, Perović J, Kophanke D, Ordon F, Graner A (2001) Characterisation of spring barley genetic resources in Yugoslavia. In: Proceedings of a symposium dedicated to the 100th birthday of Rudolf Mansfeld, Schriften zu Genetischen Ressourcen, Gatersleben October 2001, Germany Band. 22:301–306
- Perović D, Stein N, Zhang H, Drescher A, Prasad M, Kota R, Kopahnke D, Graner A (2004) An integrated approach for comparative mapping in rice and barley with special reference to the *Rph16* resistance locus. *Funct Integr Genomics* 4:74–83
- Perović D, Tiffin P, Douchkov D, Bäumlein H, Graner A (2007) An integrated approach for comparative analysis of multigene families with special reference to the barley nicotianamine synthase genes. *Funct Integr Genomics* 2: 169–179
- Perović J, Silvar C, Koenig J, Stein N, Perović D, Ordon F (2013) A versatile fluorescence-based multiplexing assay for CAPS genotyping on capillary electrophoresis systems, *Molecular Breeding* 32:61–69. DOI 10.1007/s11032-013-9852-x
- Perović J, Silvar C, Perović D, Stein N, Ordon F (2015) Fluorescence-based CAPS Multiplex Genotyping on Capillary Electrophoresis Systems. *Bio-protocol*, 5(10)
- Perović D, Kopahnke D, Habekuss A, Ordon F, S Albrecht (2019) Marker-Based Harnessing of Genetic Diversity to Improve Resistance of Barley to Fungal and Viral Diseases. *Applications of Genetic and Genomic Research in Cereals* 25:137–151
- Pržulj N, Perović D (2005) Molekularni markeri. II. Mikrosateliti. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Zbornik radova 41:299-312
- Sakai H, Naito K, Ogiso-Tanaka E, Takahashi Y, Iseki K, Muto C, Satou K, Teruya K, Shiroma A, Shimoji M, Hirano T, Itoh T, Kaga A, Tomooka N (2015) The power of single molecule real-time sequencing technology in the de novo assembly of a eukaryotic genome. *Scientific Reports* 5
- Salse J, Bolot S, Throude M, Jouffe V, Piegou B, Quraishi UM, Calcagno T, Cooke R, Delseny M, Feuillet C (2008) Identification and characterization of shared duplications between rice and wheat provide new insight into grass genome evolution. *Plant Cell* 20:11–24
- Sanger F, Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94(3):441–448

- Sato K, Nankaku N, Takeda K (2009) A high-density transcript linkage map of barley derived from a single population. *Heredity* 103:110–117
- Schadt EE, Turner S, Kasarskis A (2010) A window into third-generation sequencing". *Human Molecular Genetics* 19:R227–R240
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P, Reily AD, Courtney L, Kruchowski SS, Tomlinson C, Strong C, Delehaunty K, Fronick C, Courtney B, Rock SM, Belter E, Du F, Kim K, Abbott RM, Cotton M, Levy A, Marchetto P, Ochoa K, Jackson SM, Gillam B, Chen W, Yan L, Higginbotham J, Cardenas M, Waligorski J, Applebaum E, Phelps L, Falcone J, Kanchi K, Thane T, Scimone A, Thane N, Henke J, Wang T, Ruppert J, Shah N, Rotter K, Hodges J, Ingenthron E, Cordes M, Kohlberg S, Sgro J, Delgado B, Mead K, Chinwalla A, Leonard S, Crouse K, Collura K, Kudrna D, Currie J, He R, Angelova A, Rajasekar S, Mueller T, Lomeli R, Scara G, Ko A, Delaney K, Wissotski M, Lopez G, Campos D, Braidotti M, Ashley E, Golser W, Kim H, Lee S, Lin J, Dujmic Z, Kim W, Talag J, Zuccolo A, Fan C, Sebastian A, Kramer M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, Miller B, Ambrose C, Muller S, Spooner W, Narechania A, Ren L, Wei S, Kumari S, Faga B, Levy MJ, McMahan L, Van Buren P, Vaughn MW (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326:1112–1115
- Smilde WD, Haluskova J, Sasaki T, Graner A (2001) New evidence for the synteny of rice chromosome 1 and barley chromosome 3H from rice expressed sequence tags. *Genome* 44:361–367
- Sorrells M E, La Rota M, Bermudez-Kandianis CE, Greene RA, Kantety R, Munkvold JD, Miftahudin A, Ma XF, Gustafson PJ, Qi LL, Echaliier B, Gill BS, Matthews DE, Lazo GR, Chao SM, Anderson OD, Edwards H, Linkiewicz AM, Dubcovsky J, Akhunov ED, Dvorak J, Zhang DS, Nguyen HT, Peng JH, Lapitan NLV, Gonzalez-Hernandez JL, Anderson JA, Hossain K, Kalavacharla V, Kianian SF, Choi DW, Close TJ, Dilbirligi M, Gill KS, Steber C, Walker-Simmons MK, McGuire PE, Qualset CO (2003) Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. *Genome Res* 13:1818–1827
- Stein N, Perović D, Kumlehn J, Pellio B, Stracke S, Streng S, Ordon F, Graner A (2005) The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *Plant J* 42:12–922
- Stein N, Prasad M, Scholz U, Thiel T, Zhang H, Wolf M, Kota R, Varshney RK, Perovic D, Grosse I, Graner A (2007) A 1000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor Appl Genet* 114:823–829

- Thiel T, Graner A, Waugh R, Grosse I, Close TJ, Stein N (2009) Evidence and evolutionary analysis of ancient whole-genome duplication in barley predating the divergence from rice. *BMC Evol Biol* 9:209
- Henry RJ (2012) Next-generation sequencing for understanding and accelerating crop domestication. *Brief Funct Genomics* 11(1):51–56
- Hodžić J, Gurbeta L, Omanović-Miklićanin E, Badnjević A (2017) Overview of Next-generation Sequencing Platforms Used in Published Draft Plant Genomes in Light of Genotypization of Immortelle Plant (*Helichrysum Arenarium*)". *Medical archives* 71(4):288–292. doi:10.5455/medarh.2017.71.288-292
- Feuillet C, Keller B (2002) Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution. *Ann Botany* 89:3–10
- Feuillet C, Salse J (2009) Comparative Genomics in Triticeae. In: Feuillet C, Muelbauer GJ (eds) *Genetics and genomics of the Triticeae, plant genetics and genomics: crops and models 7*. Springer Verlag, New York, USA, pp 451–477
- Chen M, Presting G, Barabazuk WB, Goicoechea JL, Blackmon B, Fang G, Kim H, Frisch D, Yu Y, Sun S et al (2002) An integrated physical and genetic map of the rice genome. *Plant Cell* 14:537–545
- Close TJ, Bhat PR, Lonardi S, Wu Y, Rostoks N, Ramsay L (2009) Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics* 10:582
- Qi L, Echaliier B, Chao S, Lazo GR, Butler GE, Anderson OD, Akhunov ED, Dvorak J, Linkiewicz AM, Ratnasiri A, Dubcovsky J, Bermudez-Kandianis CE, Greene RA, Kantety R, La Rota CM, Munkvold JD, Sorrells SF, Sorrells ME, Dilbirligi M, Sidhu D, Erayman M, Randhawa HS, Sandhu D, Bondareva SN, Gill KS, Mahmoud AA, Ma X-F, Miftahudin, Gustafson JP, Conley EJ, Nduati V, Gonzalez-Hernandez JL, Anderson JA, Peng JH, Lapitan NLV, Hossain KG, Kalavacharla V, Kianian SF, Pathan MS, Zhang DS, Nguyen HT, Choi D-W, Fenton RD, Close TJ, McGuire PE, Qualset CO, Gill B S (2004) A Chromosome Bin Map of 16,000 Expressed Sequence Tag Loci and Distribution of Genes Among the Three Genomes of Polyploid Wheat. *Genetics* 168:701–712
- Yang P, Lüpken T, Habekuss A, Hensel G, Steuernagel B, Kilian B, Ariyadasa R, Himmelbach A, Kumlehn J, Scholz U, Ordon F, Stein N (2014) Protein disulfide isomerase like 5-1 is a susceptibility factor to plant viruses. *PNAS* 111:2104–2109

Comparative genomics of cereals in an era of new sequencing technologies

Dragan Perović, Dejan Dodig, Jelena Perović, Novo Pržulj, Frank Ordon,
Gordana Šurlan Momirović

Summary

Since ancient times, man has been observing not only diversities but also similarities that existed in the plant world. Similarities among certain species have long been predominantly used in the botanical systematisation. Thus, for instance, while studying the evolution of various plant and animal species, Darwin realised that there was a parallelism in the variation both within one species and between/among related species. According to many scientists and systematists, the similarity among plant species is inversely proportional to their evolutionary distance, and a greater distance means greater differences in traits of individual species. At the beginning of the 20th century, this regularity, even at the morphological level, was recognised and described by the Russian scientist Vavilov, calling it the law of homologous series. Studying collections of cultivated plants and their relatives from different parts of the world, Vavilov noticed that individual series of expressions of certain traits were regularly repeated in related species. Based on this regularity, this scientist could have predicted the existence of a trait in species in which it was as yet unknown. The observed differences and similarities at the morphological level have long been assumed to have their basis at the molecular level, in the genetic background/hereditary basis. At the end of the 20th century, the development of molecular biology led to the elucidation of the genetic code of the hereditary basis and provided establishing of a new scientific discipline, called comparative genomics. Comparative genetics is a science in which differences and similarities of related species are observed at the level of individual traits and genes that tends to explain traits from the evolutionary perspective and to determine to what extent the variation of individual traits is a result of orthologous genes, i.e. genes of the same origin. Comparative genomics is a scientific discipline in which similarities and differences in related species are studied not only at the level of individual genes, but at the level of the whole genome. It is considered that almost entire experimental biology will be, in the near future, based on hypotheses derived from comparisons of genes and genomes of related organisms, indicating the importance of comparative genetics and genomics. In practical sense, knowledge

of homologous series in variation of traits within a species, between species and genera, that is knowledge of the laws of comparative genetics and genomics, is of great importance in breeding of plants with new traits.

Cereal comparative genomics has been evolving for the past 25 years along side with the development of molecular genetics, providing better understanding of the evolution of cultivated species of the grass family, better comprehension of many important biological processes and invention of tools to be used in selection and breeding. Darwin's theoretical assumptions, especially of Vavilov's law of homologous series of variation, have come to full confirmation. Technological improvements in sequencing techniques have enabled decoding of genomes of many organisms, but also a complete application of laws of comparative genetics and genomics. On the other hand, the traditional approach to genetic and molecular studies has led to mapping and isolation of many different genes controlling regulating instead of controlling resistance to viruses and diseases, but also to important breeding traits in barley and wheat. Whole-genome sequencing of barley and wheat will in the near future provide efficient breeding for many traits at the allele level/for many allele-level traits, thus contributing to a broader genetic basis of all breeding-relevant traits in cereals. Comparative genomics will be extremely important, and it will play a special role in the isolation of important genes in cereals with large genomes in the vicinity of centromeres.

Key words: Comparative genomics of cereals, wheat, barley, modern methods of DNA sequencing, molecular markers