

**Ewolucja jest procesem złożonym**, w trakcie którego dochodzi do zmian wpływających na poziom różnorodności i złożoności świata żywego. Przykładem tego są różnice w wielkości genomu i liczbie chromosomów pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami. Cennym materiałem do badań procesów towarzyszących ewolucji są łąbiny Starego Świata (OWL). Jest to grupa gatunków o wysokim poziomie zróżnicowania pod względem cech genomu takich jak liczba chromosomów czy wielkość genomu. Zakłada się, że różnice te mogą być skutkiem duplikacji/triplikacji całego genomu, który miał miejsce na wczesnych etapach ich ewolucji (około 25 milionów lat temu). Niestety dokładne mechanizmy prowadzące do wyodrębnienia się nowych gatunków oraz towarzyszących temu zmian w obrębie genomów są nadal nieznanne.

**Głównym celem proponowanych badań jest identyfikacja rearanżacji chromosomowych, do których doszło w trakcie ewolucji gatunków wchodzących w skład łąbinów Starego Świata. Wyniki tych analiz pozwolą na skonstruowanie modelu przemian, do których doszło w obrębie badanej grupy.**

Na potrzeby realizacji przedstawionego projektu postawiliśmy następujące hipotezy badawcze:

1. łąbiny Starego Świata współdzielą znaczące rejony genomu wykazujące wysoki poziom podobieństwa pomiędzy gatunkami, natomiast poszczególne chromosomy ulegały zmianom strukturalnym w różnym stopniu, prowadzącymi do międzygatunkowego zróżnicowania.
2. Mapowanie cytogenetyczne może zostać wykorzystane do wykrywania rejonów, w obrębie których doszło do rearanżacji chromosomowych. Użycie sekwencji gatunkowo specyficznych jako sond do hybrydyzacji *in situ* pozwoli na rozszyfrowanie ewolucji kariotypów badanej grupy.

W projekcie zostanie wykorzystana technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), umożliwiająca fizyczne zlokalizowanie badanych sekwencji w chromosomach, dzięki czemu możliwe jest prześledzenie zmian w ich strukturze pomiędzy analizowanymi gatunkami. Technika ta z powodzeniem wykorzystana została do określenia kariotypów gatunków modelowych takich jak rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*) czy kłosownica dwukłoskowa (*Brachypodium distachyon*) oraz gatunków uprawnych jak soja (*Glycine Max*) czy fasola (*Phaseolus vulgaris*).

Podobne podejście zastosowaliśmy w dotychczasowych analizach polegających na mapowaniu porównawczym czterech dzikich gatunków łąbinów Starego Świata (*Lupinus cryptanthus*, *L. cosentinii*, *L. micranthus* i *L. pilosus*), różniących się wiekiem ewolucyjnym, wielkością genomu oraz liczbą chromosomów z gatunkiem referencyjnym dla rodzaju (*L. angustifolius*). Uzyskane wyniki pozwoliły na przedstawienie wstępnego zarysu przemian chromosomowych, jednak wykryte zmiany zaszły tylko w obrębie ograniczonych fragmentów chromosomów (użytych klonów BAC). Do szczegółowego wyjaśnienia zmian zachodzących w trakcie ewolucji omawianych gatunków łąbinów konieczne jest zaprojektowanie sondy nowego typu, pozwalającej na prześledzenie (w jednej reakcji) zmian na całej długości chromosomów. Umożliwia to wykorzystanie sond chromosomowo specyficznych bazujących na wielu krótkich sekwencjach zwanych „oligonukleotydami”. Technika (nazwana przez to „oligopaints”) polega na wykorzystaniu tysięcy oligonukleotydów jako jednej sondy do FISH. Użycie tego typu sond umożliwiło „pomalowania” znacznych regionów dwóch chromosomów ogórka siewnego (*Cucumis sativus*) i mapowania porównawczego z innymi gatunkami z rodzaju *Cucumis*.

W proponowanym projekcie planujemy wygenerować sondy hybrydujące specyficznie z ramionami wybranych chromosomów, składające się z zestawów do 20 000 oligonukleotydów. Sondy te zaprojektowane zostaną w oparciu o sekwencje genomową *L. angustifolius* i wyniki sekwencjonowania nowej generacji (Miseq) przeprowadzonego dla trzech dzikich gatunków łąbinów. W toku planowanych badań wygenerowane zostaną również chromosomowo specyficzne markery bazujące na krótkich powtórzeniach sekwencji DNA (ang. Simple Sequence Repeats – SSR). Markery te wraz z wyselekcjonowanymi wcześniej klonami BAC, specyficznymi dla badanych chromosomów zostaną użyte wspólnie z sondami oligonukleotydowymi w reakcji FISH. Podejście to pozwoli na określenie dokładnej lokalizacji rejonów chromosomowych, które uległy zmianom strukturalnym. Na podstawie analizy układu sygnałów hybrydyzacyjnych w poszczególnych chromosomach możliwe będzie wnioskowanie o typie zmian, do których doszło na drodze ewolucji poszczególnych gatunków.