

Biblioteka BAC genomu jądrowego *Lupinus angustifolius*.

Biblioteka BAC genomu jądrowego łubinu wąskolistnego odmiany Sonet (Kasprzak i in. 2006) zawiera 55 296 klonów o średniej wielkości insertu 100 ± 5 kpz, co teoretycznie przekłada się na sześciokrotne pokrycie genomu *L. angustifolius*. Biblioteka ta charakteryzuje się bardzo niskim poziomem zanieczyszczenia fragmentami DNA pochodzącymi z chloroplastów i mitochondriów, które wyrażone procentowo wynosi odpowiednio 0,018% dla mtDNA i 0,045 % dla cpDNA. Prawdopodobieństwo odnalezienia genomowej sekwencji w bibliotece oszacowano ze wzoru Clarke'a i Carbona na 99,7 %. Klony BAC przechowywane są w stanie zamrożonym (-80°C), na pożywce LB z dodatkiem 20% glicerolu i 12,5 $\mu\text{g/ml}$ chloramfenikolu, umieszczonej w 144 płytkach 384-studzienkowych. Dla celów przeszukiwania biblioteki BAC sondami molekularnymi, DNA wyizolowany z klonów wchodzących w skład biblioteki umieszczono na filtrach nylonowych, będących w istocie makromacierzami DNA o dużej gęstości. Do przeszukiwania biblioteki genomowej BAC łubinu wąskolistnego zastosowano sondy molekularne zaprojektowane na podstawie następujących sekwencji DNA:

- fragmenty genów ENOD40 i SymRK, odpowiedzialnych za tworzenie brodawek korzeniowych,
- fragment genu syntazy chalkonowej z *L. albus*, jednego z genów szlaku metabolizmu fenylopropanoidów,
- markery AntjM1 i AntjM2, sprzężone z odpornością *L. angustifolius* na antraknozę, wywoływaną przez *Colletotrichum lupini*,
- markery Ph258M2 i PhtjM2, związane z odpornością *L. angustifolius* na brunatną plamistość łodyg, powodowaną przez *Diaporthe toxica*,
- marker RustM1, sprzężony z odpornością *L. angustifolius* na rdzę, za którą odpowiedzialny jest patogen *Uromyces lupinicolus*.

DNA wyizolowany z klonów BAC używano jako matrycy w reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla sekwencji stosowanych sond molekularnych. Posiadając matryce o wysokim stężeniu DNA przeprowadzono sekwencjonowanie końców insertów wyizolowanych klonów BAC (ang. BES). Uzyskano łącznie 485 BES, o średniej długości ok. 620 pz. Sekwencje te poddano adnotacji funkcjonalnej, ukierunkowanej na identyfikację sekwencji znanych genów i białek, na podstawie podobieństwa kolejności występowania poszczególnych nukleotydów bądź aminokwasów. Korzystano z programu COBALT i zaimplementowanych baz danych sekwencji powtórzonych w genomie oraz ogólnie dostępnych algorytmów BLAST, głównie BLASTX i BLASTN. Rozpoznano geny i białka należące do różnych klas i pochodzące z niekiedy znacznie oddalonych ewolucyjnie gatunków roślin i zwierząt. Poznane geny cechują się znacznym zróżnicowaniem funkcjonalnym – są to zarówno białka budulcowe, jak i katalityczne, transportowe, czy regulatorowe. Na podstawie BES wykazujących podobieństwo do zidentyfikowanych genów zaprojektowano startery do PCR, które zastosowano do generowania markerów genetycznych typu STS i ustalania lokalizacji klonów BAC na mapie genetycznej łubinu wąskolistnego. Klony BAC poddano także mapowaniu fizycznemu, wykonując fingerprinting restrykcyjny z użyciem enzymów rozpoznających sekwencje sześcionukleotydowe. Na tej podstawie wygenerowano szereg kontigów klonów BAC. Weryfikację ułożenia klonów w tych kontigach przeprowadzono kilkustopniowo, zarówno przy pomocy mapowania genetycznego jak i przy zastosowaniu fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (BAC-FISH).

Osoba odpowiedzialna za Bibliotekę: Prof. dr. hab. B. Wolko