

Technologia ukierunkowanej mutagenyzy CRISPR/Cas9 umożliwia precyzyjną edycję genomów, dzięki czemu znajduje szerokie zastosowanie w badaniach z zakresu genomiki funkcjonalnej roślin. *Brachypodium distachyon*, ze względu na szereg korzystnych cech biologicznych jak również stale powiększającą się bazę zasobów i narzędzi badawczych, uważany jest za modelowy organizm dla zbóż oraz traw użytkowych strefy klimatu umiarkowanego. Innym przedstawicielem rodzaju *Brachypodium*, wykorzystywanym między innymi w badaniach mechanizmów charakterystycznych dla organizmów allopoliploidalnych jest allotetraploidalny gatunek *B. hybridum*.

Głównym celem niniejszej pracy była optymalizacja metodyki edycji genomów *B. distachyon* i *B. hybridum* z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9. W pracy zastosowano trzy rodzaje wektorów, z których dwa posiadały wyłącznie jedno miejsce do wklonowania sekwencji gRNA, a jeden umożliwiał jednoczesną edycję dwóch genów. Transformację *B. distachyon* oraz *B. hybridum* przeprowadzono z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens* na kalusie embriogennym indukowanym z zarodków niedojrzałych.

Uzyskano mutanty *B. distachyon* w genach *PDS*, *CDKG1* i *CDKG2* oraz mutanty *cdkg1* i *cdkg2* *B. hybridum*. Mutacje wykryto z wykorzystaniem reakcji PCR połączonej z trawieniem restrykcyjnym, a następnie potwierdzono za pomocą sekwencjonowania.

Najczęściej obserwowano niewielkie indele, skutkujące przesunięciem ramki odczytu, przedwczesnym powstawaniem kodonu STOP i w związku z tym, powstawaniem skróconej, niefunkcjonalnej formy białka.

Gen *PDS* u *B. distachyon* wybrano do analiz ze względu na zaangażowanie kodowanej przez niego desaturazy fitoenu w proces biosyntezy chlorofilu. Zastosowanie tego typu markera fenotypowego umożliwiło wstępną ocenę użyteczności systemu CRISPR/Cas9 w edycji i badaniach genomów wybranych gatunków z rodzaju *Brachypodium* na przykładzie *B. distachyon*. Fenotyp albinotyczny uzyskanych mutantów potwierdził, iż wprowadzone mutacje przyczyniają się do inaktywacji genu.

W ostatnim etapie badań przeprowadzono analizę cytomolekularną parowania chromosomów w trakcie podziału mejotycznego u roślin typu dzikiego oraz mutantów *cdkg1* i *cdkg2* *B. distachyon* i *B. hybridum*. Nie wykazano zaangażowania kinaz cyklozależnych CDKG1 i CDKG2 oraz wpływu podwyższonej temperatury otoczenia na badany proces. Zoptymalizowanie metodyki edycji genomów *B. distachyon* i *B. hybridum* z wykorzystaniem

technologii CRISPR/Cas9 umożliwi w przyszłości przeprowadzenie kompleksowych analiz funkcji innych genów u tych modelowych traw.