

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра молекулярной биологии

Аннотация к дипломной работе

МИХАЙЛЕНКО
Полина Олеговна

СОЗДАНИЕ ВЕКТОРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ СИСТЕМЫ
CRISPR/CAS ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ ГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ
StDMR6-1* И *StCHL1

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Ермишин Александр Петрович

Минск, 2025

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 61 стр., 11 рис., 8 табл., 91 источников.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, спейсер, протоспейсер, PAM, sgRNA, *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, *Solanum tuberosum*, *StCHL1*, *StDMR6-1*.

Объект исследования: различные генотипы *Solanum tuberosum* сортов белорусской селекции: Першацвет, Уладар, Водар, Красавик, Умка, Юлия, Десятка.

Предмет исследования: *Solanum tuberosum CHL1* (GeneID: 102589204, updated on 2-Nov-2023) и *DMR6-1* (GeneID:102590513, updated on 6-Nov-2021). Ген *StDMR6-1* кодирует 2-оксоглутарат (2OG) и Fe(II)-зависимую оксигеназу, которая обладает активностью 5-гидроксилазы салициловой кислоты (SA). Ген *StCHL1* является брассиностероид-чувствительным фактором транскрипции хозяина CIB1/HBI1-like 1.

Цель: создание векторных генетических конструкций, несущих в своем составе CRISPR/Cas9 систему для сайт-специфического мутагенеза генов *CHL1* и *DMR6-1* *Solanum tuberosum*.

Материалы и методы: В рамках дипломной работы был изучен и оценен морфогенетический потенциал 7 сортов картофеля белорусской селекции: Першацвет, Красавик, Юлия, Уладар, Десятка, Умка, Водар. Данные сорта обладают различной степенью устойчивости к патогену *Phytophthora infestans*. На основе морфогенетического потенциала и устойчивости к патогену для генетического редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9 были отобраны 3 сорта картофеля белорусской селекции: Першацвет, С, Юлия. С помощью биоинформатического анализа, используя эталонную последовательность генома картофеля и полученные ранее нами методом секвенирования по Сэнгеру нуклеотидные последовательности кодирующих областей генов мишеней *StCHL1* и *StDMR6-1* сортов белорусской селекции (Першацвет, Красавик, Юлия), был осуществлен дизайн синтетических олигонуклеотидов для синтеза спейсерных гомодуплексов. Синтезированные спейсерные последовательности гомодуплексов соответствуют протоспейсерам генов мишеней: для гена *StDMR6-1* в положении 132-154 п.о. 1-ого экзона и 6226-6248 п.о. 4-ого экзона, для гена *StCHL1* в положении 1262-1284 п.о. и 1418-1440 п.о. 2-ого экзона. В результате с помощью методов молекулярно-генетического клонирования и синтезированных спейсерных гомодуплексов были созданы 4 векторные генетические конструкции *pRGEB31+gRNA1_StDMR6-1*, *pRGEB31+gRNA2_StDMR6-1*,

pRGEB31+gRNA3_StCHL1, *pRGEB31+gRNA4_StCHL1*, несущие в своем составе CRISPR/Cas9 систему для сайт-специфического мутагенеза генов *CHL1* и *DMR6-1 Solanum tuberosum*. Полученные векторные генетические конструкции далее будут использованы в редактировании генома картофеля сортов белорусской селекции Першацвет, Красавик, Юлия.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца 61 стар., 11 мал., 8 табл., 91крыніц.

Ключавыя словы: CRISPR/ Cas9, спейсер, протаспейсер, PAM, sgRNA, *Agrobacterium*-апасродкавана трансфармацыя, *Solanum tuberosum*, *StCHL1*, *StDMR6-1*.

Аб'ект даследавання: розныя генатыпы *Solanum tuberosum* гатункаў беларускай селекцыі: Першацвет, Уладар, Вадар, Красавік, Умка, Юлія, Дзясятка.

Прадмет даследавання: *Solanum tuberosumCHL1*(GeneID:102589204, updatedon 2-Nov-2023) і *DMR6-1* (GeneID: 102590513, updatedon 6-Nov-2021). Ген *StDMR6-1* кадуе 2-оксоглутарат (2og) і Fe(II)-залежную оксигеназу, якая валодае актыўнасцю 5-гидроксилазы саліцылавайкіслаты (SA). Ген *StCHL1* з'яўляецца брассиностероид-адчувальным фактарам транскрыпцыі гаспадара CIB1/ HBI1-like 1.

Мэта: стварэнне вектарных генетычных канструкцый, якія нясуць у сваім складзе CRISPR/Cas9 сістэму для сайт-спецыфічнага мутагеназагену *CHL1* і *DMR6-1* *Solanum tuberosum*.

Матэрыялы і метады: У рамках дыпломнай працы быў вывучаны і ацэнены морфогенетычны патэнцыял 7 гатункаў бульбы беларускай селекцыі: Першацвет, Красавік, Юлія, Уладар, Дзясятка, Умка, Вадар. Дадзеныя гатункі валодаюць рознай ступенню ўстойлівасці да патэгену *Phytophthora infestans*. На аснове морфагенетычнага патэнцыялу і ўстойлівасці да патэгену для генетычнага рэдагавання з дапамогай сістэмы CRISPR/Cas9 былі адабраны 3 гатункі бульбы беларускай селекцыі: Першацвет, Красавік, Юлія. З дапамогай біяінфарматычнага аналізу, выкарыстоўваю эталонную паслядоўнасць геному бульбы атрыманыя ранней намі метадам секвенирования па Сэнгеру нуклеотидные паслядоўнасці кадавальных абласцей генаў мішеней *StCHL1* і *StDMR6-1* сортов беларускай селекцыі (Першацвет, Красавік, Юлія), быў ажыццёўлены дызайн сінтэтычных олигонуклеотидов для сінтэзу спейсерных гомодуплексов. Сінтэзаваныя спейсерныя паслядоўнасці гомодуплексоў адпавядаюць протаспейсерам генаў мішеняў: для гена *StDMR6-1* встановішчы 132-154 п. о. 1-ого экзона і 6226-6248 п. о. 4-ого экзона, для гена *StCHL1* ў становішчы 1262-1284 п.о. і 1418-1440 п. о. 2-ого экзона. У выніку з дапамогай метадаў малекулярна-генетычнага кланавання і сінтэзаваных спейсерных гомодуплексаў былі створаны 4 вектарныя генетычныя канструкцыі *pRGEB31+gRNA1_StDMR6-1*, *pRGEB31+gRNA2_StDMR6-1*, *pRGEB31+gRNA3_StCHL1*, *pRGEB31+gRNA4_StCHL1*, якія нясуць у сваім

складзе CRISPR/Cas9 сістэму для сайт-спецыфічнага мутагенезу генаў *CHL1* і *DMR6*-

1Solanumtuberosum. Атрыманыя вектарныя генетычныя канструкцыі далей будуць выкарыстаны ў рэдагаванні геному бульбы гатункаў беларускай селекцыі Першацвет, Красавік, Юлія.

REPORT

The thesis 61 pages, 11 figures, 8 tables, 91 sources.

Keywords: CRISPR/Cas9, spacer, protospacer, PAM, sgRNA, Agrobacterium-mediated transformation, *Solanum tuberosum*, *StCHL1*, *StDMR6-1*.

Object of research: various genotypes of *Solanum tuberosum* varieties of Belarusian breeding: Pershatsvet, Uladar, Vodar, Krasavik, Umka, Julia, Ten. Subject of the study: *Solanum tuberosum CHL1* (GeneID: 102589204, updated on 2-Nov-2023) and *DMR6-1* (GeneID: 102590513, updated on 6-Nov-2021). The *StDMR6-1* gene encodes 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent toxygenase, which has the activity of salicylic acid 5-hydroxylase (SA). The *StCHL1* gene is a brassinosteroid-sensitive host transcription factor CIB1/HBI1-like 1.

Objective: to create vector genetic constructs carrying the CRISPR/Cas9 system for site-specific mutagenesis of *CHL1* and *DMR6-1* *Solanum tuberosum*.

Materials and methods: As part of the thesis, the morphogenetic potential of 7 potato varieties of Belarusian breeding was studied and evaluated: Pershatsvet, Krasavik, Julia, Uladar, Ten, Umka, Vodar. These varieties have varying degrees of resistance to the pathogen *Phytophthora infestans*. Based on the morphogenetic potential and resistance to the pathogen, 3 potato varieties of Belarusian breeding were selected for genetic editing using the CRISPR/Cas9 system: Pershatsvet, Krasavik, Julia. Using bioinformatic analysis, using the reference sequence of the potato genome and the nucleotide sequences of the coding regions of the target genes *STCHL1* and *StDMR6-1* of Belarusian varieties (Pershatsvet, Krasavik, Yulia) obtained earlier by Sanger sequencing, synthetic oligonucleotides were designed for the synthesis of spacer homoduplexes. The synthesized spacer sequences of the homoduplexes correspond to the protospacers of the target genes: for the *StDMR6-1* gene at positions 132-154 bp of the 1st exon and 6226-6248 bp. The 4th exon, for the *StCHL1* gene at positions 1262-1284 bp and 1418-1440 bp of the 2nd exon. As a result, using the methods of molecular genetic cloning and synthesized spacer homoduplexes, 4 vector genetic constructs were created: *pRGEB31+gRNA1_StDMR6-1*, *pRGEB31+gRNA2_StDMR6-1*, *pRGEB31+gRNA3_StCHL1*, *pRGEB31+gRNA4_StCHL1*, carrying the CRISPR/Cas9 system for site-specific mutagenesis of *CHL1* and *DMR6-1* *Solanum tuberosum*.

The obtained vector genetic constructs will then be used in editing the genome of potato varieties of Belarusian breeding Pershatsvet, Krasavik, Julia.