

Администрация Богородского муниципального округа Нижегородской
области

Муниципальное автономное общеобразовательное учреждение
«Школа № 5 «Перспектива»

**«Прикладная клеточная биология, биотехнология, генетика и
селекция»**

Возможность использования технологии Crispr/Cas9
для повышения устойчивости стручка рапса к
растрескиванию по выращиванию на полях Нижегородской
области

Участники

Ананьев Александр Дмитриевич, 10 класс, 2025-2026 учебный год

Сафонова Диана Сергеевна, 10 класс, 2025-2026 учебный год

Руководитель

Ананьева Лилия Валериевна

учитель биологии Муниципальное автономное общеобразовательное
учреждение

«Школа № 5
«Перспектива»

2025-2026 учебный год

2025,г.Богородск

Содержание

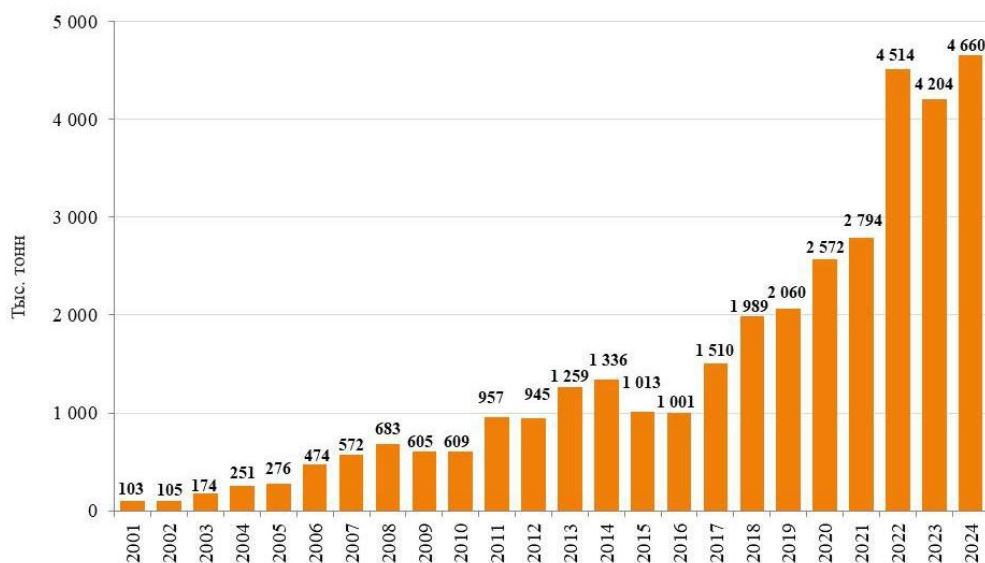
Введение.....	3
Основная часть.....	5
1. Теоретический раздел.....	5
1.1. Ген	5
1.2. Генная инженерия	7
1.3. Crispr/Cas9	8
2. Практический раздел.....	11
Реализация	11
Заключение.....	13
Приложение	14
Литературный обзор.....	14

Введение

Рапс является одной из важнейших масличных культур в России за последнее время. Только в Нижегородской области под него занято около 22тыс. гектаров по сравнению с 2018г 17тыс га. В 2024 году Нижегородская область заняла 13 место по валовому сбору ярового и озимого рапса. Рапс — очень перспективная культура для Нижегородской области культура. В 2025–2027 годах в особой экономической зоне региона агрохолдинг «Русское поле» построит завод по переработке рапса, проект находится на этапе разработки. Ожидается, что за счет этого посевы рапса в области увеличатся до 300 тыс. га. Это создает мощный стимул для развития сырьевой базы и повышения эффективности ее производства. Продукты переработки этого растения используются в пищевой, косметической, медицинской, металлургической, текстильной и других отраслях, а также для производства биодизеля. Устойчивое увеличение производства рапса соответствует стратегии импортозамещения и наращивания экспортного потенциала агропромышленного комплекса России.

Валовые сборы рапса (в весе после доработки)
в России в 2001-2024 гг., тыс. тонн

АБ
центр ЭКСПЕРТНО-АНАЛИТИЧЕСКИЙ
ЦЕНТР АГРОБИЗНЕСА
ab-centre.ru



Проблема

Однако можно и занять меньшую территорию по выращиванию культуры, но при этом увеличить урожайность путем внедрения новых технологий. Основной проблемой является преждевременное растрескивание стручков, из-за чего ежегодно теряется большая часть урожая. Это явление имеет генетическую природу и обостряется под воздействием абиотических стрессоров, таких как циклы "увлажнение-высыхание" и сильные ветра в критический период уборочной кампании. Потери рапса при уборке могут достигать значительных величин, вплоть до 20–50%. Это явление, сильно зависящее от погодных условий в период созревания, приводит к высыпанию семян на землю и существенно снижает рентабельность и наносит существенный экономический ущерб. Существующие агротехнические методы (например, применение десикантов или подбор сроков уборки) не позволяют полностью решить проблему и могут иметь негативные экологические последствия.

Цели и задачи

Целью проекта является разработка стратегии генетической модификации рапса, с целью предотвращения преждевременного растрескивания стручков и снижения потерь урожая.

Задачи:

1. Проанализировать урожайность рапса на территории Нижегородской области и динамику потерь.
2. Выявить возможную причину потери урожая рапса
3. Проанализировать возможные инновационные варианты решения
4. Предложить своё решение выявленной проблемы, учитывая выбранную технологию

5. Составить план реализации проекта с оценкой временных и ресурсных затрат на ключевых этапах.

Место и сроки исследования: Сроки исследования по данному проекту проходили с мая 2025 года по сентябрь 2025 года в разработке плана реализации продукта

Основная часть

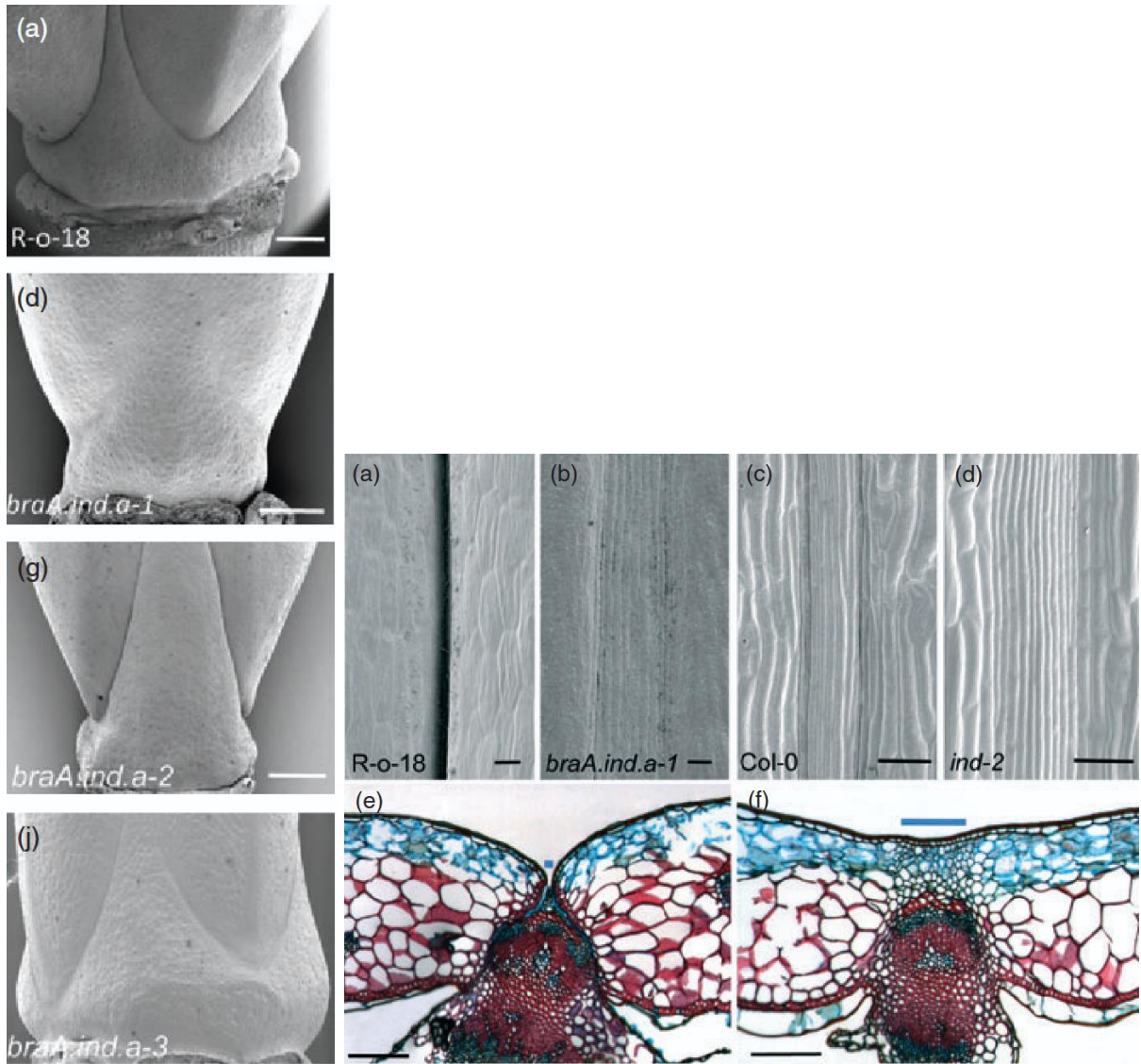
1. Теоретический раздел

1.1. Ген

В ходе изучения большого количества научных работ удалось выделить ген, который в большей степени влияет на растрескивание стручков рапса

Ген INDEHISCENT (IND) играет ключевую роль в развитии плода и распространении семян у растений, особенно в семействе крестоцветных. Он участвует в определении края створки (области, где плод раскрывается) и регулирует распределение ауксина, что необходимо для правильного раскрытия плода. IND контролирует белок bHLH, входящий в регуляторную сеть, контролирующую формирование плода и его раскрытие. IND определяет край створки — область между створками плода и реплумой (центральной частью плода). Также IND влияет на уровень фитогормона ауксина, создавая локальный минимум ауксина по краю створки. Этот минимум ауксина необходим для правильного развития края створки и последующего раскрытия плода.

Также были изучены естественные мутации этого гена, из-за которой в стручках не были развиты створки, и они не осыпались. Исследования на модельном растении *Arabidopsis thaliana* (родственник рапса) показали, что мутантные по гену IND линии демонстрируют полную неспособность к раскрытию стручков, что подтверждает его ключевую роль.



Стручки с рабочим и сломанным геном

1.2.Генная инженерия

Для редактирования генов на данный момент существует несколько способов и для определения наилучшего мы проанализировали каждый и составили таблицу, из которой понятно, что лучшим решением будет Crispr/Cas9.

Характеристика	Crispr/Cas9	ZFN	TALEN	Гомологическая рекомбинация	Ретровирусные векторы
Точность	Высокая	Высокая	Высокая	Очень высокая	Низкая
Сложность	Очень низкая	Высокая (Домен)	Высокая (TALE повторы)	Очень высокая (Вектор)	Средняя
Стоимость	Низкая	Очень высокая	Высокая	Высокая	Средняя
Время разработки	Дни	Месяцы	Недели-месяцы	Месяцы	Недели
Эффективность	Очень высокая	Средняя	Средняя-высокая	Очень низкая	Высокая
Гибкость	Максимальная	Низкая	Низкая	Низкая	Средняя
Недостатки	Off-target эффекты, размер доставки	Токсичность, сложность, Off-target	Токсичность, сложность, размер белка	Низкая эффективность, ограниченные организмы	Случайная интеграция, риск инерционного мутагенеза, размер

По сравнению с технологиями ZFN и TALEN, система CRISPR/Cas9 обладает превосходством в простоте дизайна гидов (sgRNA), высокой специфичности,

мультиплектности (возможности редактировать несколько генов одновременно) и меньшей стоимости.

1.3.Crispr/Cas9

CRISPR/Cas9— это мощная технология редактирования генов, позволяющая с высокой точностью вносить направленные изменения в ДНК практически любого организма. Она представляет собой адаптированную версию естественной иммунной системы бактерий, которая защищает их от вирусов, "запоминая" чужеродную ДНК и при повторном заражении разрезая ее. Ключевые Компоненты Системы:

1. Белок Cas9: Это "молекулярные ножницы". Он способен разрезать обе нити молекулы ДНК в строго определенном месте, создавая двухнитевой разрыв.

2. sgRNA (single-guide RNA - однонаправляющая РНК): Это искусственно сконструированная молекула РНК, объединяющая в себе две функции природных молекул CRISPR (crRNA и tracrRNA). Она служит "гидом" или "адресной меткой":

5'-конец (Spacer sequence): Содержит последовательность из примерно 20 нуклеотидов, которая комплементарна (точно соответствует) конкретному целевому участку ДНК в геноме, который нужно отредактировать. Эта последовательность программируется исследователем под любую нужную мишень.

3'-конец (Scaffold): Имеет фиксированную структуру, которая связывается с белком Cas9, формируя функциональный комплекс.

Принцип Работы:

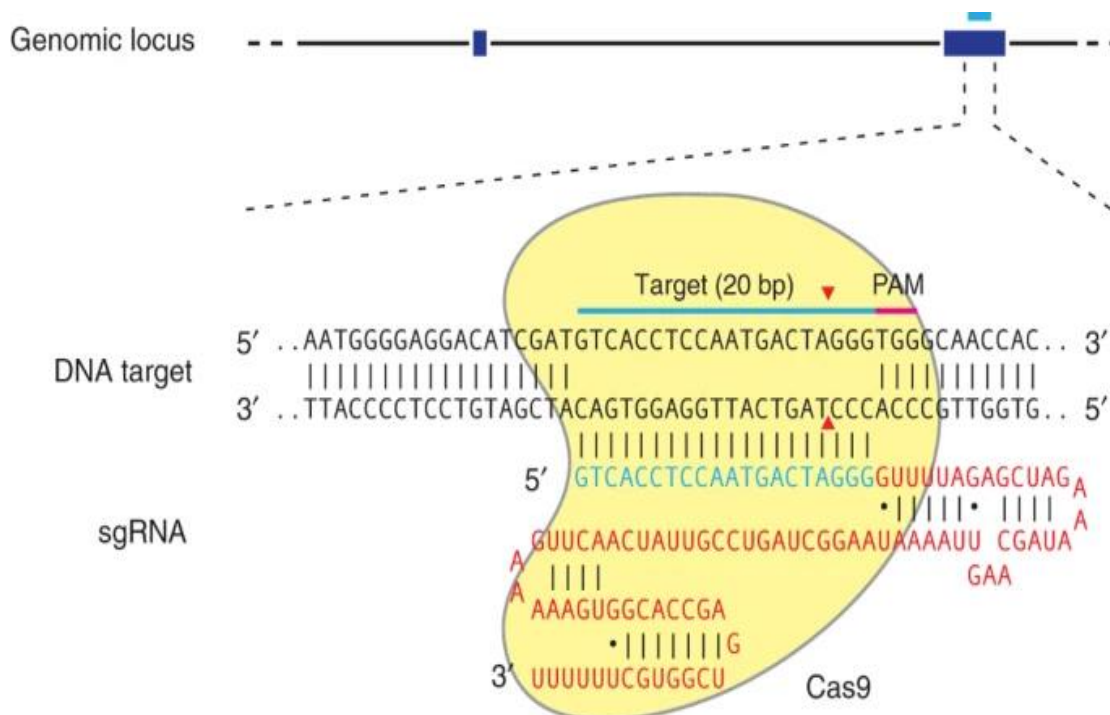
3. Формирование Комплекса: Создаётся молекула sgRNA с уникальной 5'-последовательностью, соответствующей выбранному участку гена-мишени. Эта sgRNA связывается с белком Cas9, образуя активный комплекс sgRNA/Cas9.

4. Поиск Мишени: Комплекс sgRNA/Cas9 перемещается внутри клетки (или ядра) и сканирует огромный геном. Он распознает целевую последовательность ДНК по принципу комплементарного спаривания оснований между гидом sgRNA и ДНК.

5. Привязка и Разрез: Как только комплекс находит участок ДНК, полностью совпадающий с гидом sgRNA (и прилегающую короткую специфическую последовательность, называемую PAM - Protospacer Adjacent Motif, которая необходима для узнавания Cas9), он прочно связывается с ДНК.

6. Создание Двухнитевого Разрыва: Связавшись с ДНК, белок Cas9 активирует свои "ножницы" и делает точный разрез обеих нитей ДНК в месте, расположенном рядом с PAM.

7. Репарация ДНК: Клетка пытается "залечить" разрыв одним из двух основных путей. Для нашей цели используется путь негомологичного соединения концов (NHEJ), который часто приводит к небольшим делециям или вставкам (indels) в месте разреза. Это, в свою очередь, вызывает сдвиг рамки считывания и инактивацию целевого гена IND.



ДНК-мишень

position	target sequence	sequence information				number of target sites [?]		
		GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	restriction sites	20mer + PAM	12mer + PAM	8mer + PAM
329 - 351	+ AGCCGAACCGCCGTAACGTA AGG [gRNA]	60.00 %	79.18 °C	-		2 [detail]	2 [detail]	387 [detail]

Готовая sgRNA

■ T7 Promoter
 ■ Added 5'G
 ■ Target DNA
 ■ Overlap/RNA Scaffold

Sequence 1: AGCCGAACCGCCGTAACGTA

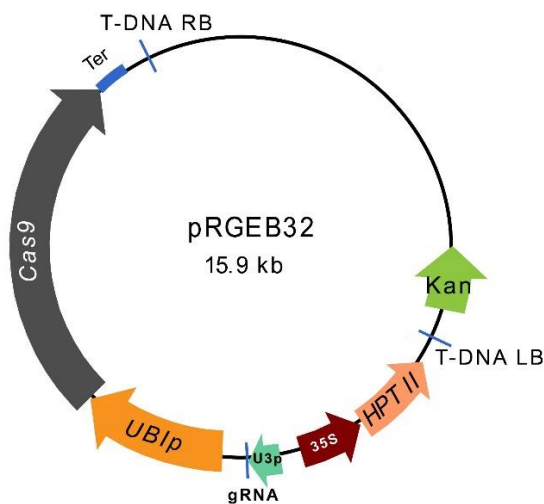
Target-specific DNA oligo template (5'→3'):

TTCTAATACGACTCACTATAAGCCGAACCGCCGTAACGTA**AGTTT**TAGAGCTAGA

Transcribed sgRNA sequence (5'→3'):

GAGCCGAACCGCCGUAACGUA**G**UUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

Используемая плаزمида



2. Практическая раздел

Реализация

1. Подготовка генетического конструктора (Плазмиды CRISPR/Cas9)
2. Встраиваете в плазмиду:

Ген Cas9: Кодирован "ножницы". Для повышения безопасности и избежания нецелевого редактирования рекомендуется использовать системы "чистого редактирования", такие как CRISPR/Cas9-рибонуклеопротеиновый комплекс (RNP), который доставляется непосредственно в протопласты, что минимизирует перенос плазмидной ДНК.

Ген sgRNA: Специально спроектированный под ваш ген IND (нацелен на критичный экзон).

Ген селекции: Устойчивость к антибиотику (канамицин).

Результат: Готовая плазмида, которая при попадании в клетку рапса начнет производить Cas9 и sgRNA.

3. Выбор и подготовка эксплантов (пророщенные семена) или, для повышения эффективности, изолированные протопласты.
4. Доставка плазмиды в клетки рапса с помощью *Agrobacterium tumefaciens*

- Вводите вашу плазмиду в бактерии.

- Культивируете бактерии до высокой концентрации.

Кокультивирование:

Погружаете экспланты в бактериальную суспензию на 10–30 мин.

Переносите на стерильную фильтровальную бумагу в чашках Петри на 2–3 дня (в темноте, при 22–25°C).

Бактерии передают T-ДНК плазмиды (с Cas9, sgRNA, маркером) в ядра клеток рапса.

5. Отбор трансформированных клеток

- Промывка: Убираете избыток бактерий с эксплантов стерильным раствором.

- Посадка на селективную среду:

Экспланты переносите на среду MS (Мурасиге-Скуга) с:

Антибиотиком канамицин – убивает нетрансформированные клетки.

Антибиотиком против *Agrobacterium* (цефотаксим) – убивает оставшиеся бактерии.

Гормонами роста:

Ауксины (2,4-Д или пиклорам) – стимулируют образование каллуса.

Цитокинины (BAP или кинетин) – стимулируют органогенез.

- Рост каллуса:

Через 2–4 недели на краях эксплантов появляется каллус (бесформенная масса клеток).

Редактирование гена IND внутри клеток

В живых клетках:

Производится Cas9 и sgRNA.

Комплекс Cas9-sgRNA находит ген IND и делает разрез.

Клетка "чинит" разрыв с ошибкой (NHEJ), следовательно ген IND ломается.

6. Регенерация растений из каллуса

Через 4–8 недель из каллуса появляются зеленые побеги, которые необходимо укоренить на среде с пониженным содержанием гормонов, а затем напрямую в почве.

7. Проверка полученных растений

Необходимо провести ПЦР – тест и секвенирование для дальнейшего отбора растений с успешными изменениями. Для подтверждения отсутствия вставки трансгена (в случае использования подхода RNP) проводится ПЦР на наличие гена Cas9. Для подтверждения редактирования гена IND проводится секвенирование Сэнгера целевого локуса.

8. Получение стабильных, "чистых" линий (T1, T2 поколения)

Для получения генетически стабильных линий необходимо самоопыление первых поколений и последующая посадка их семян с постоянным молекулярным скринингом на закрепление желаемой мутации и отщепление трансгена Cas9.

9. Фенотипическая проверка

Оценка показателей и устойчивости полученного стабильного сорта рапса в контролируемых условиях (*in vitro*) и в полевых испытаниях. Ключевые параметры: механическая прочность стручков, урожайность, всхожесть семян, устойчивость к патогенам.

Заключение

Применение Crispr/Cas9 демонстрирует современный, точный и эффективный подход по сравнению с традиционной селекцией, позволяя достичь результата в сжатые сроки — в течение нескольких поколений растений.

Разработанный план обеспечивает путь к созданию линий с кардинально повышенной устойчивостью к растрескиванию стручка рапса. Полученные линии, не содержащие чужеродных генов (продукты редактирования могут быть признаны не-ГМО в ряде юрисдикций), будут иметь значительное преимущество при регистрации и внедрении в сельскохозяйственное производство.

Модернизация важной масличной культуры, которая потенциально экономически выгодна и снижение потерь урожая прямо ведёт к увеличению валового сбора и рентабельности культуры. Успешная реализация проекта позволит обеспечить сырьем строящийся перерабатывающий завод и укрепить позиции Нижегородской области как лидера в высокотехнологичном агропромышленном производстве.

Решению данной проблемы позволит существенно повысить урожайность рапса, при этом не увеличивая площади посевов.

Приложение

Данные по рапсу

- <https://ab-centre.ru/page/selskoe-hozyaystvo-nizhegorodskoy-oblasti>
- <https://www.kommersant.ru/doc/7042786>
- <https://specagro.ru/analytics/202411/daydzhest-maslichnye-v-rossii-v-2024-godu-mogut-sobrat-rekordnyy-urozhay-soi-i>
- <https://specagro.ru/news/202411/rossiya-blizka-k-rekordnym-urozhayam-soi-rapsa-i-risa-lut>
- <https://mcx.gov.ru/press-service/regions/vysokoproduktivnye-gibridy-yarovogo-i-ozimogo-rapsa-pokazali-lipetskim-agrariyam/>
- <https://ab-centre.ru/news/raps-ploschadi-sbory-i-urozhaynost-v-2001-2019-gg>

Описание технологий геномного редактирования

- <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://actanaturae.ru/2075-8251/article/download/10529/pdf>
- <https://biolabmix.ru/solutions/tehnologii-genomnogo-redaktirovaniya/>
- <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-313X.2010.04244.x>
- <https://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-crispr-cas9-sistemy-dlya-genomnogo-redaktirovaniya-gena-ntpds-tabaka-nicotiana-tabacum/viewer>
- <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01309-7>
- <https://hal.science/hal-01204205v1/document>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3176093/>

Программы и сайты с которыми работали

- <https://www.addgene.org/63142/>

- <https://crispr.dbcls.jp/>
- <https://sgrna.neb.com/#!/sgrna>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/827911>
- <https://www.benchling.com/>
- <https://www.snapgene.com/>
- <https://plants.ensembl.org/index.html>
- <http://brassicadb.cn/#/>
- <https://goldenbraidpro.com/tools/crisprs/>
- <https://cctop.cos.uni-heidelberg.de/>
- <https://www.addgene.org/63142/>