



УДК 631.17

НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОТЕХНОЛОГИЙ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

*Доклад на I Международной научно-практической конференции
«Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур.
Традиции и перспективы», август 2008 г., ВНИИССОК*

Глазко В.И.

*Российский государственный аграрный университет –
Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева*

Рассмотрены современные направления нанотехнологий, их значение, в частности, для развития геномики. Представлены данные о том, что неслучайность распределения некоторых мотивов ДНК свидетельствует в пользу теории Лима-де-Фариа о связи между структурно-функциональной организацией генетического материала в нано- и микро-масштабах.

Приставка нано- означает одну миллиардную (10^{-9}) чего-либо, т.е. нанотехнология имеет дело с разнообразными структурами вещества, характерный размер которых порядка миллиардных долей метра. Хотя слово «нанотехнология» относительно новое, устройства и структуры нанометровых размеров не новы. История и перспективы наноразработок, которые выполняются в рамках Европейской программы по нанотехнологиям, представлены на рис.1 (<http://www.nanowerk.com/>).

Несмотря на то, что манипуляции в нанометровом масштабе развивались достаточно давно, только изобретение двух микроскопов позволило не только

вести наблюдения за такими манипуляциями, но и непосредственно в них внедряться: сканирующего туннельного микроскопа (СТМ) и атомно-силового микроскопа (АСМ).

Сканирующий туннельный микроскоп (СТМ) представляет систему «образец – игла», к которым приложена разность потенциалов. Электроны из образца туннелируют на иглу, создавая туннельный ток. Величина этого тока экспоненциально зависит от расстояния «образец – игла». Типичные значения 1-1000 пА при расстояниях около 1 Ангстрема.

Атомно-силовой микроскоп (АСМ) изобретён в 1986 году Гердом Биннигом и Кристофом Гербером в США, он применяется для снятия профиля поверхности

и для изменения её рельефа, а также для манипулирования микроскопическими объектами на поверхности. Это сканирующий зондовый микроскоп высокого разрешения, основанный на взаимодействии иглы кантилевера (зонда) с поверхностью исследуемого образца. В отличие от сканирующего туннельного микроскопа, атомно-силовой может исследовать как проводящие, так и непроводящие поверхности даже через слой жидкости, что позволяет работать с органическими молекулами (ДНК). Разрешение достигает атомарного по горизонтали и существенно превышает его по вертикали.

Манипуляторы АСМ и СТМ позволяют при габаритах в несколько сантиметров

передвигать иглу с разрешением в 0,1 Ангстрема.

Появление АСМ стимулировало развитие микроскопии в целом и привело к созданию целого ряда новых типов микроскопов (рис.2).

В развитых странах широкий интерес к нанотехнологии возник к 1996-1998 годам, когда правительственная комиссия США при содействии Центра Оценки Мировых Технологий (World Technology Evaluation Center) (WTEC), финансируемая Национальным Фондом Науки США и другими федеральными агентствами, предприняла изучение мирового опыта исследований и разработок в области нанотехнологии с целью оценки их технологического инновационного потенциала.

Группа правительственных учреждений под началом Национального Фонда Науки организовала изучение текущего мирового состояния нанонауки и нанотехнологий, направлений и перспектив ее развития. Результатом деятельности группы явились детально разработанные рекомендации по развитию этой области знаний. Принимая во внимание эти рекомендации, правительство США начало широко финансировать такие работы и сформировало долговременную государственную программу под названием «Национальная нанотехнологическая инициатива».

По прогнозу Национального Фонда науки США, к 2015 году годовой оборот рынка наноиндустрии достигнет 1 триллиона долларов. В процентном соотношении облик такого рынка прогнозируется следующим образом (табл. 1, <http://edrexler.com>).

Под эгидой организации ФАО создана база данных о 160 проектах использования нанотехнологий в сельском хозяйстве, которые финансировались и разрабатывались в 2006 году. Большинство из них связано с пищевой промышленностью, использованием наноматериалов для упаковки пищевых продуктов или определения и, в отдельных случаях, нейтрализации опасных токсинов, аллергенов или патогенов.

Развиваются проекты по созданию и улучшению пищевых добавок. Например, разрабатывается технология получения растительного масла с нанообложками, которые вызывают кластеризацию жирных кислот и препятствуют поступлению холестерина в кровь млекопитающих. Создаются добавки, которые делают шоколад более мелкодисперсным.

Другая группа проектов направлена на развитие более эффективных и средосберегающих агротехнологий.

Это, например, использование наноматериалов для очистки вод в агроэкосистемах, или их применение для переработки отходов растениеводства в этанол.

Проводится разработка проектов с использованием наноматериалов для более точной и безопасной доставки пестицидов к биологическим мишеням, питательных веществ – к растениям. В этих проектах используются следующие технологии: транспортные процессы (наноматериалы, как агенты транспорта химических соединений, молекул и т.д.), биоселектирующие поверхности (наноматериалы с увеличенной или сниженной способностью связываться со специфическими молекулами или организмами), биоразделение (нано-

Рис. 1. История и перспективы развития нанобиотехнологий (<http://www.nanowerk.com/>).

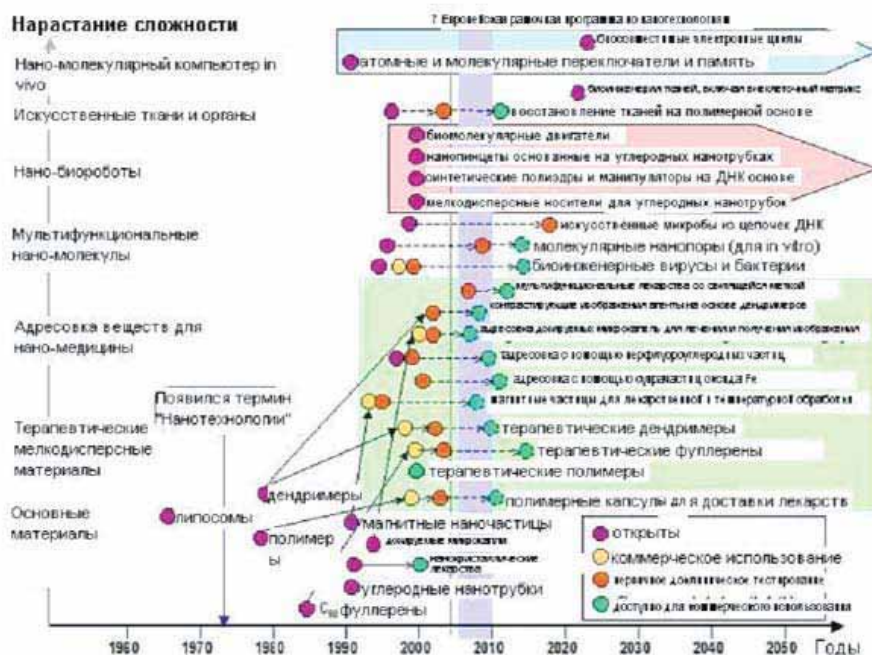


Диаграмма достижений и перспектив в нанобиотехнологии

материалы или нанопроцессы, которые способствуют разделению молекул, биомолекул или организмов), микропотоки (потоки в наномасштабе, которые используются для разделения, контроля или анализа состава, состояния свойств исследуемых объектов) и микроэлектромеханические системы (позволяют исследовать каналы и поверхности, потоки вещества через них), нанобиопроцессинг (использование нанотехнологий или биотехнологических про-

цессов для создания веществ с желательными свойствами), биоинженерия нуклеиновых кислот (использование ДНК в качестве блоков для формирования наночастиц или использования наночастиц для генной инженерии), адресовка веществ (использование наноматериалов для адресной доставки веществ к клеткам-мишеням у животных), моделирование (использование нанотехнологий для построения моделей наноматериалов и их применения в слож-

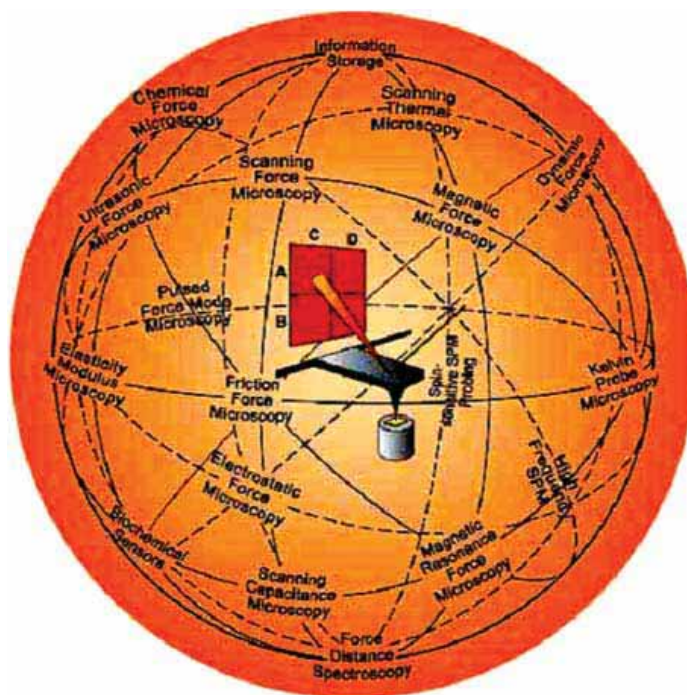


Рис. 2. Появление разработок новых микроскопов, связанных с изобретением атомно-силового микроскопа (<http://www.nanowerk.com/>).

Предполагаемое распределение рынка наноиндустрии к 2015 году

Направления наноиндустрии	Доли рынка, %
Наноэлектроника	40 - 45
Наноматериалы	30 - 35
Нанобиотехнологии	9 - 14
Полимеры	8 - 12
Наноэлектрoхимия	3 - 5
Нанооптика	2 - 4

ных системах).

По направлению исследований выделяются следующие проекты использования нанотехнологий:

- биосенсоры – контроль биологических процессов или биомолекул или определение биомолекул, биохимических процессов или организмов;
- защита окружающей среды ("зеленая" инженерия) – изучение состояния окружающей среды, удаление загрязнителей или уменьшение отходов, включает также изучение средовых эффектов наноматериалов;
- устойчивое сельское хозяйство – уменьшение его разрушающего действия на окружающую среду, качество питьевой воды, а также для получения конечной продукции менее энергоемким путем;
- определение патогенов в окружающей среде, организмах животных и растений, кормах, конечной сельскохозяйственной продукции;
- селекционная работа в растениеводстве (включая методы трансгеноза или клонирования), повышение устойчивости растений к биотическим (сорняки, болезни, вредители, высокие температуры, заморозки, засухи и т.д.) и абиотическим (обработка пестицидами) стрессорам;
- использование растений (рапс, кукуруза, подсолнечник, сахарный тростник и других) для получения биотоплива;
- низкотемпературная досушка с обеззараживанием зерна и плодов;
- ветеринария – улучшение здоровья животных, повышение безопасности пищевой животноводческой продукции, формирование оптимального микроклимата;
- пищевая промышленность – повышение питательной ценности продуктов, совершенствование технологий переработки пищевого сырья и улучшение качества пищевых продуктов, обеспечение потребностей диетического питания, а также методы ультрафильтрации, позволяющие управлять цветом, ароматом и другими свойствами конечной продукции;
- нанобиопромышленные продукты – получение продуктов, необходимых промышленности (например, энергоисточники) из сельскохозяйственного сырья или отходов сельского хозяйства;
- сельскохозяйственная техника – нанопорошковые материалы, повышающие ресурсы машин (увеличение стойкости к температуре, влаге, износу и т.д.); упрочнение режущих элементов; нанодобавки к шинам, маслам; уменьшение вредных выбросов;
- наноэлектробиотехника – модификация биологических и физиологических процессов на уровне клетки с помощью наночастиц за счет воздействия электронов, протонов, ионов, фотонов; направленное влияние оптического излучения (УФ) на

сельскохозяйственные объекты;

– наномембраны и пленки – светотрансформирующие пленки, мембраны для очистки воздуха и воды, опреснения морской воды; пленки с наночастицами серебра для бактерицидных фильтров, в том числе для молочной промышленности, а также как элемент упаковочного материала; использование силатранов, кремнийорганических биостимуляторов; разработка самоочищающихся кремниевых мембран.

Объем современных ежегодных инвестиций в реализацию третьей научно-технической революции можно оценить в 20-50 млрд. долл. Ожидается, что именно ее достижения и будут лежать в основе устойчивого развития, декларировавшегося на Всемирной встрече на высшем уровне, проведенной под эгидой ООН в Йоганнесбурге (ЮАР) 26 августа – 4 сентября 2002 года. Принятая на этом саммите Декларация глав государств заканчивалась словами: «Мы торжественно обязуемся перед народами мира и перед поколениями, которые неизбежно унаследуют нашу Землю, решительно действовать для обеспечения того, чтобы наша общая надежда на устойчивое развитие сбылась».

Нанобиотехнология – особая область нанонауки и наноинженерии, применяющая методы и подходы нанотехнологий для создания устройств с использованием биологических макромолекул в целях изучения или управления биологическими системами. Нанобиотехнология использует способность биомолекул к самосборке в наноструктуры. Так, например, липиды способны спонтанно объединяться и формировать жидкие кристаллы. ДНК используется не только для создания наноструктур, но и в качестве важного компонента наномеханизмов. Предполагается, что ДНК может стать основным компонентом компьютеров следующего поколения. Вместо того, чтобы создавать кремниевую основу микросхемы, нанотехнологи смогут использовать двухцепочечную молекулу ДНК, которая представляет собой натуральный каркас для создания наноструктур, а ее способность к высокоспецифичному связыванию позволяет объединять атомы в предсказуемой последовательности, необходимой для создания наноструктуры. Так, например, Пол Ротмунд разработал методы создания двумерных структур с заданными формами на основе ДНК (автор назвал их «оригами»). Основные приоритеты развития нанобиотехнологий определяют по следующим направлениям: создание биологических наночипов для диагностики соматических и инфекционных заболеваний, в том числе для видовой идентификации возбудителей особо опасных инфекций и токсинов; наночастицы как лекарственные препараты нового поколения, а также как контейнеры

для адресной доставки лекарств в клетки-мишени; медицинские нанороботы, способные устранять дефекты в больном организме путем управляемых нанохирургических вмешательств; молекулярные детекторы для секвенирования генома на основе неорганических нанопор; саморазмножающиеся геномы, применимые в области биотехнологии с целью производства лекарств, проведения фармакологического скрининга и моделирования патологических процессов; биосовместимые наноматериалы широкого спектра применения (в том числе для создания искусственных органов, принципиально новых типов материалов с антимикробной, противовирусной и противовоспалительной активностью); миниатюризация биосенсоров путем объединения биологического и электронного компонентов в один прибор – биоблоки; использование новых (модифицированных) ферментов для развития экологически чистых производственных процессов ("зеленая" инженерия).

Качественно новые возможности в отношении транспорта и доставки разных веществ появились с открытием фуллерена 60, который обладает рядом уникальных свойств. Кроме хорошо известных электрофизических, оптических, адсорбционных и других полезных технических свойств фуллерена, особое место занимает возможность его применения в биологической и медицинской химии. Разнообразие технологий производства фуллеренов и их производных позволяет планировать существенное расширение спектра применения наночастиц как лекарств, создание математических моделей для прогнозирования биологической активности, формулирование требований к производственным технологиям и в итоге получение наночастиц с заданными лекарственными свойствами.

Разработаны углеродные нанотрубки – протяженные цилиндрические углеродные структуры диаметром от 1 до нескольких десятков нм и длиной до нескольких сантиметров, которые состоят из одной или нескольких свернутых в трубку гексагональных углеродных структур и заканчиваются обычно полусферической головкой. Благодаря методам получения углеродных нанотрубок различной формы и модификаций, создаются новые методы работы с живыми объектами в нанометровом масштабе, такие как нанопинцеты, нанопипетки.

Особое значение нанотехнологии имеют для развития сравнительно новой области исследований – геномики. Развитие методов нанобиотехнологий – работ с последовательностями ДНК в нанометровом масштабе – позволили появиться таким новым направлениям, как геномика, позволяющим сравнивать полиморфизм геномов. Структурная геномика оценивает, в частности, геномное разнообразие, функциональная – профили экспрессии различных генетических элементов. Геномика предполагает, в том числе, внутривидовое и внутривидовое сравнение геномов.

Использование ДНК-биочипов позволило обнаружить множественные мононуклеотидные сайты полиморфизма (SNP), создать карты их распространения вдоль геномов, выявить сегментные дубликации и выделить наиболее консервативные участки ДНК в кодирующих геномных последовательностях (Харченко, Глазко, 2006).

В то же время, в отличие от точковых мутаций, сегментных дубликаций, анализ распределения инвертированных повто-

ров позволяет оценивать особенности взаимного позиционирования нуклеотидных последовательностей, способных к участию в формировании вторичных структур ДНК, необходимых, в частности, для опознавания регуляторных сигналов.

Очевидно, что инвертированные повторы объединяют гетерогенную по структурно-функциональным характеристикам группу нуклеотидных последовательностей, для которых, по-видимому, невозможно обнаружить некоторые универсальные черты внутригеномного распределения.

В наших исследованиях полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными декануклеотидами (RAPD-PCR), на геномной ДНК сортов ячменя, а также разных видов млекопитающих были получены следующие данные. Полилокусные спектры RAPD-PCR зависят от нуклеотидной последовательности декануклеотида; распределение инвертированных декануклеотидных повторов для отдельных видов и таксонов имеет выраженные таксон-специфичные черты; спектры продуктов амплификации, в основном, определяются шестью нуклеотидами на 3' конце; отмечается широкая изменчивость динамики накопления продуктов амплификации с разных участков генома при одних и тех же условиях ПЦР.

Выполнен анализ распределения потенциальных сайтов отжига декануклеотидов UBC-85 и UBC-126 (RAPD-PCR) в секвенированных последовательностях различных таксонов (Глазко и др., 1997).

Наибольшее количество ампликонов при поисках полного совпадения с UBC-85 выявляется у вирусов (57) и прокариот (75); к UBC-126 – у грибов (19), прокариот (20) и беспозвоночных (15). Наименьшее количество выявлено по UBC-85 у человека (3), грызунов (4), позвоночных (3) и растений (6); по UBC-126 – у человека (5), грызунов (1), позвоночных (2), растений (6) и млекопитающих (0).

Для таких таксонов, как человек, грызуны, другие млекопитающие, позвоночные, растения некоторые длины ампликонов являются «перепредставленными» по сравнению с другими.

У беспозвоночных, вирусов и прокариот распределение частот встречаемости ампликонов разной длины относительно более равномерно. Тем не менее, спектр потенциальных ампликонов у вирусов, полученный с использованием UBC-85 (252 ампликона), существенно отличается от выявляемого при использовании UBC-126 (38 ампликонов).

Полученные данные свидетельствуют о наличии определенной неслучайности распределения сайтов узнавания декануклеотидов – специфичности спектра ампликонов в зависимости от используемого праймера и исследуемого таксона.

В исследованиях на геномах сортов и близкородственных видах сои, сортов пшениц выявлен широкий размах изменчивости в спектрах продуктов амплификации при использовании в качестве праймера фрагментов микросателлитных локусов с различными коровыми последовательностями (ISSR-PCR).

Обращает на себя внимание высокая точность воспроизводства спектров ампликонов, полученных таким образом: обнаруживаются выраженные отличия между спектрами в случае использования в качестве праймера одного и того же корового микросателлитного мотива, но с разными «якорными» нуклеотидами, а также в случае мотива, сдвинутого на один нуклеотид или комплементарного ему. Это свиде-

тельствует о достаточно высокой точности идентификации флангов амплифицируемых фрагментов ДНК (Глазко и др., 1999).

Наибольшее количество продуктов амплификации у разных видов получается при использовании в качестве праймеров фрагментов пурин/пиримидиновых последовательностей (ди-, тринуклеотидные микросателлиты GA, AG, GAG, CTC). Для участков ДНК, фланкированных такими инвертированными повторами, отмечается и наибольший консерватизм по длинам продуктов амплификации, полученным на геномной ДНК различных видов.

Два динуклеотидных мотива – (GA)₉C и (CA)₉G в базе данных пг для *Arabidopsis thaliana* отличались тем, что первый встречался с существенно большей частотой, чем второй, при этом 38% от общего числа сайтов гомологии локализована в транскрибируемых последовательностях dbEST – то есть, лидерных последовательностях и экзонах.

Иное распределение обнаруживается по сайтам гомологии к микросателлиту (CA)₉G – их частота встречаемости почти в четыре раза ниже в геноме данного вида, чем первого динуклеотида, и только 10% от общего числа сайтов локализовано в транскрибируемых районах (Глазко и др., 1999).

Накопленные данные свидетельствуют о наличии неслучайности в распределении фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором участка микросателлитного локуса в зависимости от его нуклеотидной последовательности и принадлежности к пурин/пиримидиновым трекам.

Известно, что микросателлитные локусы с относительно повышенной частотой позиционированы в геноме с последовательностями ретротранспозонов. Для выяснения этого вопроса на сортах овса были выполнены сравнения полилокусных спектров, полученных с использованием одного праймера – фрагмента микросателлитного локуса, и двух, когда один праймер был тот же, а второй – фрагмент терминальной последовательности ретротранспозона (Календарь, Глазко, 2002). Оказалось, что спектры, полученные с использованием двух праймеров, существенно более обогащены продуктами амплификации, чем при амплификации фрагментов ДНК, фланкированных только инвертированным повтором микросателлита.

То есть, экспериментально было показано, что близкое расположение микросателлита и ретротранспозона встречается чаще, чем антипараллельные микросателлитные локусы.

Анализ распределения длин участков ДНК, фланкированных инвертированными повторами терминальных участков ретротранспозонов у сортов риса, пшеницы также свидетельствует об отсутствии равновероятного рассеивания таких фрагментов по длине генома.

Накопленные данные позволяют ожидать, что наиболее полиморфным вариантом молекулярно-генетических маркеров, удобных для решения ряда прикладных задач в исследованиях генофонда культурных растений, могут быть маркеры, основанные на оценке полиморфизма участков ДНК, связанных с транспозирующими элементами.

Таким образом, накопленные данные о распределении различных вариантов инвертированных повторов свидетельствуют об их внутригеномной организованности.

Такая организованность согласуется с наблюдениями Лима де Фария о неслучайности чередования гетерохроматиновых блоков по длине хромосом у ряда расти-

тельных видов, позволившая ему сформулировать гипотезу о «хромосомных полях», благодаря которым нуклеотидные последовательности и скопление различных семейств повторов, включая центромерные и теломерные, непосредственно связаны с морфологией хромосом.

В последние годы накоплено много данных, свидетельствующих в пользу представлений Антонио Лима де Фария о тесной связи между молекулярной структурой материала наследственности и морфологией хромосом, тем, что Лима де Фария называл «хромосомным фенотипом». К таким данным относятся факты неслучайного распределения ретротранспозонов по длине хромосом *Arabidopsis* (Kendal, Suomela, 2005), а также ряда видов грибов; неслучайная локализация семейств ретротранспозонов в центромерных районах некоторых видов растений, в частности, кукурузы (Jin et al., 2005), локализация ретротранспозонов в теломерных районах хромосом.

В представления о взаимной детерминированности микро- и наноуровней организации генетического материала хорошо укладываются данные об участии механизмов ретровирусной экспансии в возникновении самой линейной хромосомы эукариот, ее теломерных и центромерных структур.

В этой связи, очевидно, что оценки геномных полиморфизмов должны выполняться с учетом принадлежности молекулярно-генетических маркеров к семействам различных геномных элементов, имеющих неслучайное распределение по длине хромосом, структурно-функциональную организацию, а также закономерности консервативности/ полиморфизма и эволюции. Использование для генофондных исследований только определенных типов молекулярно-генетических маркеров может приводить к существенному искажению результатов генофондных сравнений при экстраполяции получаемых данных на геномную изменчивость.

Литература

- Глазко В.И., Дубин А.В., Календарь Р.Н. и др. Генетические взаимоотношения между сортами сои, оцененные с использованием ISSR маркеров // Цитология и генетика. – 1999. – Т. 33, № 5. – С. 47.
- Глазко Г.В., Рогозин И.Б., Глазко В.И. и др. Экспериментальные и рассчитанные спектры ампликонов UBC-85 и UBC-126 (RAPD-PCR) // Цитология и генетика. – 1997. – № 5. – С. 32-35.
- Жученко А.А. Ресурсный потенциал производства зерна в России. – М.: Изд-во АГРОРУС, 2004. – 1109 с.
- Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиол. и биохим. культ. растений. 2002. №4. С.279-296.
- Харченко П.Н., Глазко В.И. ДНК технологии в развитии агробиологии – под ред. член-корр. Б.Ф.Ванюшина. – Москва: Воскресенье. – 2006. – 473 с.
- Jin W., Lamb J. C., Vega J.M. et al. Molecular and Functional Dissection of the Maize B Chromosome Centromere//The Plant Cell. – 2005. Vol. 17, 1412-1423.
- Kendal W.S., Suomela D.P. Large-scale genomic correlations in *Arabidopsis thaliana* relate to chromosomal structure//BMC Genomics 2005, 6:82
- Lima-de-Faria A. The Chromosome Field Theory Confirmed by DNA and Hybridization// Riv. Biol. – Biol. Forum 80 (1987), pp. 266-268.