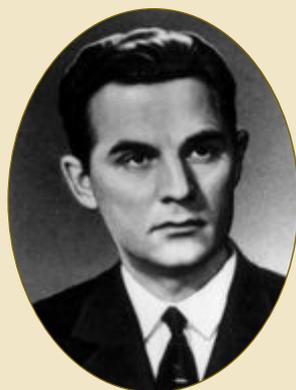


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

· КОЛЬЦОВ · ШРЕДИНГЕР · ЭЙВЕРИ · ЧАРГАФФ · УОТСОН · КРИК ·

· КОРНБЕРГ · НИРЕНБЕРГ · КОРАНА · ТЕМИН · БАЛТИМОР · БАЕВ ·

ВЕСТНИК
биотехнологии
и физико-химической
биологии
имени Ю.А. Овчинникова



Т. 6, № 1
2010

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

2010, Т. 6, № 1

ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Васильов

Редакционная коллегия

Е.Г. Борисенко, В.С. Воробьев, С.И. Матаев, О.Я. Мезенова

Редакционный совет

В.А. Быков (Москва), В.А. Вахитов (Уфа), М.С. Вонский (Санкт-Петербург),
В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск), В.В. Зверев (Москва),
В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пуццино), М.П. Кирпичников (Москва),
О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), О.Н. Озолинь (Пуццино), Е.Н. Орешкин (Москва),
А.Н. Панин (Москва), Е.В. Пименов (Киров), В.О. Попов (Москва),
К.Г. Скрыбин (Москва), Г. Хаммерлинг (Германия), Р.М. Хаитов (Москва),
В.И. Швец (Москва), Н.К. Янковский (Москва)

Журнал зарегистрирован в Росохранкультуре
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Воробьева

Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13, 662-95-91

E-mail: obr@biorosinfo.ru, ptashka095@rambler.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем»

Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@biorosinfo.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

ISSN 1996-4741

© Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем, 2010.

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Васильев* 4

Оригинальные статьи

BlsI- и GluI-ПЦР анализ — новый метод исследования метилированных участков ДНК.
Д.А. Гончар, А.Г. Акишев, С.Х. Дегтярев 5

Видовое разнообразие почвенных грибов рода *Trichoderma* из погребенных черноземов Республики Татарстан.
Р.И. Тухбатова, Э.А. Рафаилова, Ф.К. Алимova 13

Гидролиз зерна тритикале с применением ферментного комплекса грибов *Trichoderma*.
Е.В. Скворцов, Ф.К. Алимova, А.В. Шишкин, Э.А. Рафаилова, Р.П. Ибатуллина 20

Краткие сообщения

Влияние условий культивирования на эффективность этапа созревания соматических эмбрионов ели европейской *Picea abies*.
О.А. Чурочкина, О.Г. Попова, К.А. Шестибратов 28

К вопросу вариабельности химического состава семян амаранта: аминокислотная составляющая.
Е.Н. Офицеров, Н.А. Поткин, Л.А. Мирошниченко 31

Ресурсосберегающие биотехнологии в земледелии Республики Казахстан.
В.М. Кан, И.Н. Титов, А.А. Кусаинова 36

Обзоры

Этногеомика населения Евразии: состояние, проблемы и перспективы.
Э.К. Хуснутдинова, С.А. Федорова 40

Биотехнологии — важнейшее направление перехода к экономике инновационного типа.
В.А. Черешнев 50

Переход фармацевтической отрасли РФ на инновационную модель развития.
С.А. Цыб 53

Развитие биотехнологии — стратегический приоритет России?
Р.Г. Васильев 56

Биотехнология в России: попытка объективного анализа.
А.Л. Конов 59

Разработка оригинальных пептидных лекарственных препаратов: ситуация в России и в мире.
В.И. Дейгин 63

Страницы истории

К 100-летию со дня рождения выдающегося французского молекулярного биолога Жака Моно.
В.С. Воробьев 65

Юбилейные и знаменательные даты 2010 года 70

Хроника

События первой половины 2010 года 75

Информация

Предстоящие мероприятия 2010 года 76

Правила для авторов 78

СОДЕРЖАНИЕ

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov*4

Original articles

BlsI- and Glal-PCR assay – new method of DNA methylation study.
D.A. Gonchar, A.G. Akishev, S.Kh. Degtyarev 5
Species diversity of soil fungi of the genus *Trichoderma* buried black earth Republic of Tatarstan.
R.I. Tukhbatova, E.A. Rafailova, F.K. Alimova 13
Triticale grain hydrolysis with enzyme fungi *Trichoderma*.
E.V. Skvortsov, F.K. Alimova, A.V. Shishkin, E.A. Rafailova, R.P. Ibatullina20

Short communications

Effect of cultivation conditions on the effectiveness stage of maturation of somatic embryos Norway spruce *Picea abies*.
O.A. Churochkina, O.G. Popova, K.A. Shestibratov28
On the question of variability of the chemical composition of amaranth seeds: amino acid component.
E.N. Ofitserov, N.A. Potkin, L.A. Miroshnichenko 31
Resource-saving biotechnology in agriculture of the Republic of Kazakhstan.
V.M. Kan, I.N. Titov, A.A. Kusainova36

Reviews

Ethnogenomics population of Eurasia: state, problems and prospects.
E.K. Khusnutdinova, S.A. Fedorova40
Biotechnology – the most important direction of the transition to an innovation-based economy.
V.A. Chereshev 50
Moving the pharmaceutical industry of Russia on an innovative model of development.
S.A. Tsyb 53
Biotechnology – a strategic priority of Russia?
R.G. Vasilov56
Biotechnology in Russia: an attempt at objective analysis.
A.L. Konov59
Developing original peptide drugs: the situation in Russia and the world.
V.I. Deygin63

Pages of history

To the 100 anniversary of the birth of the outstanding French molecular biologist Jacques Monod.
V.S. Vorobyev65
Anniversary and significant dates 201070

The chronicle

Events of the first half-year 201075

The information

Forthcoming actions 201076

Rules for authors78

К читателям

6-й том нашего журнала выходит после важного события — его включения в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (решение Президиума ВАК Минобрнауки России от 19 февраля 2010 года № 6/6). Так что редколлегия ждет от соискателей статьи для публикации.

В первом номере собран ряд оригинальных работ и обзоров, а также некоторые материалы состоявшихся в конце 2009 г. парламентских слушаний, посвященных развитию биотехнологии.

Мы всегда рады участию наших постоянных авторов из НПО «СибЭнзим»: на этот раз они представили статью о новом методе исследования метилированных участков ДНК.

Читатели с интересом встретят работы коллектива сотрудников кафедры биохимии Казанского университета, в которых рассматриваются биотехнологические аспекты применения грибов рода *Trichoderma*.

Очень полезен обзор по этногеномике, сделанный Э.К. Хуснутдиновой и С.А. Федоровой. Авторы, высокие профессионалы в указанной области, дают исчерпывающие сведения об этом перспективном направлении современной науки. Они удачно сочетают антропологический, этнографический и молекулярно-биологический взгляды на этногеномику, создавая цельное представление о ней и ставя акцент на определенные отечественные достижения в изучении проблемы на материале населения евразийского пространства.

В номере помещены также краткие сообщения по вопросам лесной биотехнологии, биотехнологическому значению амаранта и оптимизированных схем земледелия с использованием цеолитовых удобрений, модифицированных по биотехнологическим технологиям.

Обзорные доклады (Черешнев В.А., Цыб С.А., Василов Р.Г., Конов А.Л., Дейгин В.И.) на парламентских слушаниях Государственной Думы ФС РФ «О совершенствовании законодательного обеспечения биотехнологической отрасли промышленности», состоявшихся 15 октября 2009 г., дают представление о сегодняшнем состоянии российской биотехнологии и путях ее развития.

По традиции сформирована историческая рубрика со статьями в честь 100-летия со дня рождения французского молекулярного биолога Жака Моно. Приводятся юбилейные и знаменательные даты 2010 года в соответствии с предметной областью журнала.

**Главный редактор,
президент Общества биотехнологов России,
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ**

BlsI- и GluI-ПЦР АНАЛИЗ – НОВЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТИЛИРОВАННЫХ УЧАСТКОВ ДНК

Д.А. ГОНЧАР*, А.Г. АКИШЕВ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

На основе уникальных метилзависимых сайт-специфических ДНК эндонуклеаз предложен новый метод BlsI- и GluI-ПЦР-анализа метилированных участков ДНК. Метод включает в себя обработку ДНК ферментами BlsI или GluI соответственно, с последующим ПЦР-анализом полученных гидролизатов. На примере изучения метилирования регуляторных областей ряда генов-онкосупрессоров человека показана эффективность нового метода и соответствие получаемых с его помощью результатов данным бисульфитного секвенирования ДНК. Исследование метилирования промоторной области гена *DAPK1*, района промотора и первого экзона гена *RARB* и области первого экзона гена *RASSF1A* новым методом выявило различные картины метилирования этих участков ДНК в клеточных линиях HeLa, Raji, U-937, Jurkat и контрольных клетках L-68. GluI-ПЦР-анализ определил метилирование регуляторной области гена *RARB* в ДНК всех малигнанных клеточных линий и отсутствие этой модификации в ДНК клеток L-68. BlsI- и GluI-ПЦР-анализ района первого экзона гена *RASSF1A* показал наличие метилированных участков ДНК только в клетках Raji и Jurkat. BlsI-ПЦР-анализ промоторной области гена *DAPK1* продемонстрировал дополнительное метилирование этого участка ДНК только в клетках Raji. Обсуждаются возможности использования BlsI- и GluI-ПЦР-анализа для выявления малигнанных клеток и определения типа онкопатологии.

Ключевые слова: метилирование ДНК, эндонуклеаза, онкосупрессор.

Введение

Одним из основных методов регуляции активности генов млекопитающих является метилирование ДНК, в результате которого модификации подвергаются только CG динуклеотиды с образованием 5-метилцитозинов в обеих цепях ДНК.

Метилирование ДНК осуществляется специальными ферментами ДНК-метилтрансферазами Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b, которые присутствуют в клетках человека и млекопитающих [1].

Dnmt1 обеспечивает поддерживающее метилирование *in vivo*, то есть, после репликации ДНК этот фермент метилирует цитозин CG динуклеотида во вновь образованной цепи. Dnmt3a и Dnmt3b необходимы для метилирования *de novo*, и они, видимо, различаются по своим функциям и используемым субстратам [1]. Исследование субстратной специфичности ферментов Dnmt3a и Dnmt3b показало, что они метилируют CG

динуклеотид преимущественно в последовательности PuCGPu [2].

На сегодня основным способом определения метилированных цитозинов является метод бисульфитной конверсии, в результате которой цитозиновые основания в ДНК превращаются в урацил, тогда как 5-метилцитозин устойчив к этой реакции. Последующий анализ исходной и модифицированной ДНК различными методами позволяет определить положение метилированных цитозинов в исследуемой ДНК [3–6]. Следует отметить, что метод бисульфитной обработки имеет существенные недостатки. Он является довольно дорогим, сложным в исполнении, дает неоднозначные и трудновоспроизводимые результаты вследствие неполной конверсии ДНК. Помимо этого, из-за значительной деградации ДНК в ходе бисульфитной обработки данный метод применим только к небольшим фрагментам (100–150 пар оснований).

Кроме бисульфитной конверсии, существует также ферментативный метод определения метилированных участков ДНК, так называемый метод метилчувствительной ПЦР, который основывается на неспособности ряда рестриктаз расщеплять сайт узнавания при наличии в нем 5-метилцитозинов [7]. В этом случае ПЦР с праймеров, соответствующих участкам ДНК вокруг

© 2010 г. Гончар Д.А., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х.

* **Автор для переписки:**

Гончар Данила Александрович

НПО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова 2/12,

E-mail: gonchar@sibenzyme.ru

сайта узнавания, приводит к образованию расчетного фрагмента ДНК, тогда как неметилированный сайт будет расщепляться и продукт ПЦР не образуется. Применение метилчувствительной ПЦР ограничено малым набором сайтов узнавания подобных рестриктаз.

В последние годы в НПО «СибЭнзим» были открыты и охарактеризованы совершенно новые ферменты *BlsI* и *GlaI*, относящиеся к классу метилзависимых сайт-специфических ДНК эндонуклеаз и расщепляющие только метилированную ДНК.

GlaI гидролизует последовательность ДНК 5'-Pu(5mC)GPy-3'/3'-PyG(5mC)Pu-5' [8, 9], тогда как *BlsI* узнает последовательность 5'-GCNGC-3', если в обеих цепях этого сайта присутствуют, как минимум, по одному 5-метилцитозину (N не учитывается) [10, 11].

В данной работе на основе ферментов *BlsI* и *GlaI* мы предложили новый ферментативный метод анализа метилированной ДНК и с его помощью исследовали метилирование регуляторных участков ряда генов в ДНК человека.

Материалы и методы

В работе использовали геномную ДНК из клеточных линий человека HeLa, Jurkat, L-68, Raji, U-937, эндонуклеазы рестрикции (в скобках указан сайт узнавания соответствующего фермента): 1) *FatI* (5'-CATG-3'), 2) *HaeIII* (5'-GGCC-3'), 3) *TaqI* (5'-TCGA-3'); метил-зависимые эндонуклеазы *BlsI* (5'-G(5mC)NGC-3'/3'-(5mC)GN(5mC)G-5') и *GlaI* (5'-G(5mC)G(5mC)-3') производства НПО «СибЭнзим». ДНК *Drosophila melanogaster* была любезно предоставлена Л.П. Захаренко (Институт цитологии и генетики СО РАН).

Гидролиз геномной ДНК. ДНК в количестве 5 мкг расщепляли 100 ед. акт. *TaqI* в 100 мкл реакционной смеси в буфере, указанном производителем, при 65 °С в течение 2 ч. Затем ДНК очищали методом фенольной экстракции и высаживали этанолом, как описано ранее [12]. Далее осадок ДНК растворяли в необходимом количестве буфера TE (10 мМ Трис-НСl рН 8,0; 1 мМ ЭДТА) так, чтобы ее концентрация составляла 0,1 мкг/мкл.

Каждый из образцов *TaqI*-обработанной ДНК в количестве 0,1 мкг затем расщепляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей либо 100 ед. акт. *HaeIII*, либо 10 ед. акт. *FatI*, либо 16 ед. акт. *BlsI*, либо 16 ед. акт. *GlaI* в реакционном буфере, рекомендованном производителем,

при температуре 37 °С (для *HaeIII*), 55 °С (для *FatI*), и 30 °С (для *BlsI* и *GlaI*) в течение 2 ч.

По окончании инкубации 1 мкл каждой реакционной смеси использовали для амплификации с соответствующими праймерами.

Полимеразная цепная реакция. Амплификацию проводили в 25 мкл в приборе «Терцик» (ДНК-Технология) с использованием набора для GC-ПЦР и HotStart *Taq* ДНК-полимеразы и праймеров производства НПО «СибЭнзим»:

PK51 5' GAA CCG TGT TTC CCT AGA ACC CAG TC 3' и PK387 5' CGG TCC GGC TGT CCT CCT CAC 3' для *DAPK1*;

AR118 5' CCG GGT AGG GTT CAC CGA AAG TTC ACT CGC 3' и AR941 5' TCA GCA AAG GGA ATC AAT ATG CAT GCC AGC 3' для *RARB*;

SF458 5' GCC ATG TCG GGG GAG CCT GAG CTC A 3' и SF879 5' CTG TGG CCC AGA TAC GAG TGG AGT GCG AC для *RASSF1A*.

Условия термоциклирования были оптимизированы для каждого из амплифицируемых фрагментов.

Электрофорез. Для выявления фрагментов в диапазоне 100–1000 п.о. использовали электрофорез в 1,2–2,0% агарозе «Low EEO, Type 1-A» («Sigma», США). На гель наносили по 10 мкл ПЦР-смеси на дорожку. Во всех случаях для электрофореза применяли трис-ацетатный буфер (40 мМ Трис-ацетат, рН 8,0; 1 мМ ЭДТА). После проведения электрофореза ДНК визуализировали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете.

Результаты и обсуждение

Определение метилированных участков ДНК методом *BlsI*- и *GlaI*-ПЦР-анализа. Хорошо известным вариантом метилчувствительной ПЦР для анализа метилирования CG динуклеотидов в том или ином районе генома является метод *HpaII*-ПЦР-анализа, который был предложен более 30 лет назад [13]. Метод *HpaII*-ПЦР-анализа заключается в гидролизе ДНК ферментом *HpaII* с последующей ПЦР с праймеров, лежащих справа и слева от сайта узнавания фермента 5'-CCGG-3' в исследуемом районе ДНК. Метод основывается на неспособности *HpaII* расщеплять сайт 5'-C(5mC)GG-3', тогда как этот неметилированный сайт полностью расщепляется ферментом [7]. Соответственно в результате ПЦР будет появляться фрагмент ДНК определенной длины в первом случае, тогда как во втором случае этот фрагмент образовываться не будет. Основным недостатком

ком HpaII-ПЦР-анализа является его ограниченность только одним сайтом 5'-CCGG-3', в то время как ДНК-метилтрансферазы млекопитающих Dnmt3a и Dnmt3b узнают и метилируют CG динуклеотид преимущественно в последовательности 5'-PuCGPu-3' [2].

В противоположность HpaII ферменты GlaI и BslI гидролизуют только метилированную ДНК. При этом последовательность 5'-PuCGPu-3'/3'-PuGCPu-5', являющаяся субстратом ферментов Dnmt3a и Dnmt3b, после метилирования ими превращается в последовательность 5'-Pu(5mC)GPu-3'/3'-PuG(5mC)Pu-5', которая, в свою очередь, узнается и расщепляется ферментом GlaI. В то же время BslI будет гидролизовать последовательность из двух таких сайтов, разделенных произвольным нуклеотидом (5'-Pu(5mC)GCNG(5mC)GPu-3'/3'-PuG(5mC)GNCG(5mC)Pu-5'). Метилзависимые эндонуклеазы GlaI и BslI были открыты недавно, но уже нашли применение в изучении метилирования геномной и сателлитной ДНК [14, 15].

Таким образом, метод BslI- и GlaI-ПЦР-анализа включает в себя гидролиз изучаемой ДНК ферментом BslI или GlaI, соответственно, с последующей ПЦР с праймеров, окаймляющих изучаемый район. При этом, в отличие от HpaII-ПЦР-анализа, положительным результатом BslI- и GlaI-ПЦР-анализа является расщепление метилированной ДНК и отсутствие продукта ПЦР, а не наоборот.

Структура регуляторных областей генов-онкосупрессоров. С помощью предложенного метода BslI- и GlaI-ПЦР-анализа мы исследовали метилирование регуляторных областей трех генов-онкосупрессоров

человека. В качестве объектов были выбраны промоторная область гена *DAPK*, район промотора и первого экзона гена *RARB* и район первого экзона гена *RASSF1A*. Недавно полученные данные по бисульфитному секвенированию регуляторных областей некоторых генов-онкосупрессоров человека показали, что метилированные CG динуклеотиды в них преимущественно локализованы в сайтах 5'-PuCGC-3' [16], что согласуется с субстратной специфичностью ферментов Dnmt3a и Dnmt3b.

Согласно базе данных GenBank [17], локализация гена *DAPK1* (death-associated protein kinase 1) – 9q34.1, гена *RARB* (retinoic acid receptor beta) – 3p24 и гена *RASSF1A* (Ras association domain family 1A) – 3p21.3.

Схемы регуляторных областей генов *DAPK1* (позиция 19276988-19277344 в 9-й хромосоме), *RARB* (позиция 25409693-25410545 в 3-й хромосоме) и *RASSF1A* (позиция 50318239 – 50317790 в 3-й хромосоме), изучаемых в данной работе, представлены на рисунке 1 (части А–В, соответственно).

Мы исследовали промоторную область гена *DAPK1*, содержащую 12 сайтов 5'-PuCGPu-3', которые являются последовательностями узнавания GlaI в случае метилирования центрального CG динуклеотида (рис. 1А). Два этих сайта в позициях 19277174 и 19277179 образуют последовательность 5'-GCGCCGCGC-3' (вынесена на рис. 1А), которая является сайтом узнавания BslI в случае метилирования внутренних CG динуклеотидов в обеих последовательностях 5'-GCCG-3'.

Выбранный нами участок регуляторной области гена-онкосупрессора *RARB* включает в себя четыре сайта 5'-PuCGPu-3', которые могут быть метилированы.

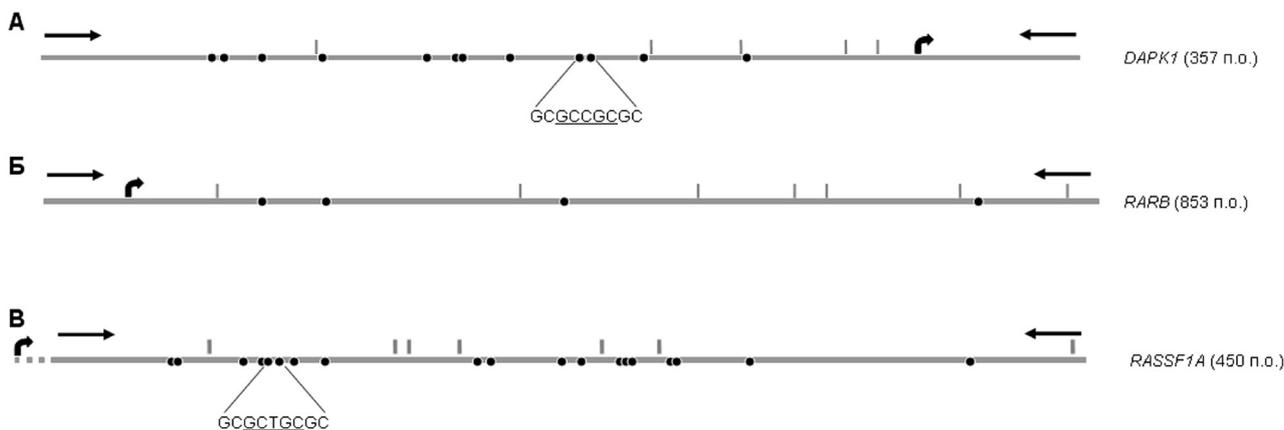


Рис. 1. Схема регуляторной области генов *DAPK1* (А), *RARB* (Б) и *RASSF1A* (В). Расположение сайтов контрольного фермента (HaeIII для А и В и FatI для Б) показано вертикальными черточками. Сайты 5'-PuCGPu-3' обозначены кружками. Вынесены пары сайтов 5'-PuCGPu-3', которые образуют последовательности узнавания BslI (подчеркнуты на А и В). Старт транскрипции обозначен изогнутой стрелкой. Размеры фрагмента ПЦР указаны справа от схемы

При этом здесь не встречается такой комбинации этих сайтов, когда две последовательности 5'-PuCGPy-3' разделены одним нуклеотидом и соответственно BslI не может гидролизовать данный участок ДНК (рис. 1Б).

Более сложной является структура регуляторной области гена *RASSF1A*. В нашей работе мы изучали метилирование участка первого экзона этого гена, включающего в себя 19 сайтов 5'-PuCGPy-3' и схематично представленного на рисунке 1В. Два таких сайта, находящиеся в позициях 50318146 и 50318141 и разделенные остатком Т, образуют последовательность 5'-GCCGTCGCGC-3' (вынесена на рисунке 1В). Данная последовательность является сайтом узнавания BslI, если метилированы внутренние СС динуклеотиды в обеих последовательностях 5'-GCCG-3'.

Препараты ДНК клеточных линий человека.

Метилирование ДНК в области генов-онкосупрессоров изучалось в пяти клеточных линиях человека. Для исследования были выбраны хорошо известные малигнанные клеточные линии HeLa (аденокарцинома шейки матки), Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия), Raji (лимфома Беркитта) и U-937 (гистиоцитарная лимфома), а в качестве контроля была взята клеточная линия L-68 (здоровый эмбрион, легкое, штамм диплоидных клеток). ДНК этих клеточных линий подвергалась предварительной фрагментации ферментом TaqI, сайты узнавания которого отсутствуют в исследуемых участках регуляторных областей генов-онкосупрессоров *DAPK1*, *RARB* и *RASSF1A*.

Полученные препараты фрагментированной ДНК в дальнейшем обрабатывали: а) контрольным ферментом рестрикции, который имеет сайты узнавания в изучаемом районе ДНК, б) Glal, в) BslI и г) без добавления

эндонуклеазы. После проведения гидролиза ДНК алиquotы четырех инкубационных смесей добавлялись в соответствующую реакцию смесь ПЦР. ДНК *Drosophila melanogaster* с такой же концентрацией была использована как негативный контроль ПЦР.

Изучение метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров человека. На рисунке 2 представлены результаты исследования метилирования промоторной области гена *DAPK1* методом BslI- и Glal-ПЦР-анализа. Как видно из этого рисунка, после проведения ПЦР образуется фрагмент, соответствующий расчетной длине 357 пар оснований. Мы наблюдаем появление этого фрагмента во всех отрицательных контролях, где эндонуклеазы не добавлялись (дорожки 5, 9, 13, 19, 23) и как результат BslI-ПЦР-анализа четырех препаратов ДНК (дорожки 4, 8, 18, 22). BslI-ПЦР-анализ ДНК из клеток Raji (дорожка 12) и ПЦР препаратов ДНК после обработки HaeIII (дорожки 2, 6, 10, 16, 20) дают положительный результат, то есть, не обнаруживают образования искомого фрагмента ДНК вследствие его расщепления. Glal-ПЦР-анализ демонстрирует либо отсутствие целевого фрагмента (дорожка 11), либо образование полосы со слабой интенсивностью (дорожки 3, 7, 17, 21). Таким образом, Glal-ПЦР-анализ дает положительный результат и показывает наличие существенно метилированных сайтов 5'-PuCGPy-3' в промоторной области гена *DAPK1* в ДНК из всех исследуемых клеточных линий. В то же время BslI-ПЦР-анализ выявил, что только в клетках Raji наблюдается метилирование двух сайтов, расположенных в позициях 19277174 и 19277179, с образованием последовательности 5'-G(5mC)GCCG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GGCG(5mC)G-5'. В остальных клеточных линиях эта

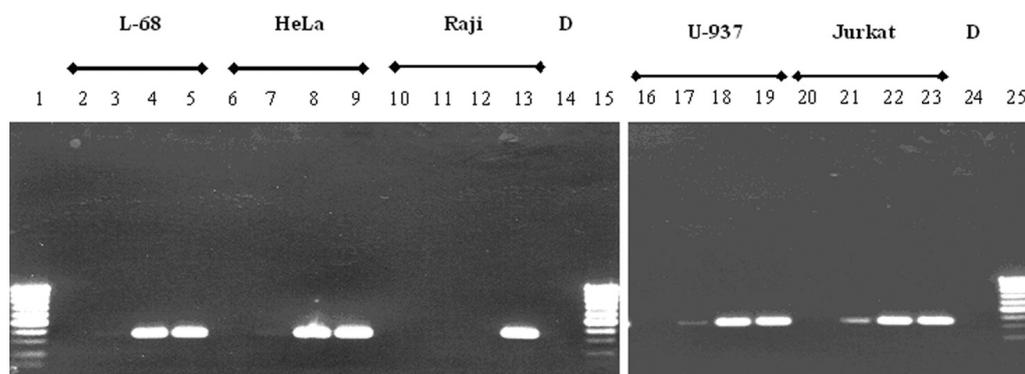


Рис. 2. Определение метилирования промоторной области гена *DAPK1* методом BslI- и Glal-ПЦР-анализа (ПЦР-фрагмент длиной 357 п.о.).

Фрагментированная ДНК из клеток L-68 (2–5); HeLa (6–9); Raji (10–13); U-937 (16–19); Jurkat (20–23). ДНК из *Drosophila melanogaster* (14 и 24). HaeIII (2, 6, 10, 16, 20), Glal (3, 7, 11, 17, 21), BslI (4, 8, 12, 18, 22). 100 бр ДНК маркер молекулярной массы (1, 15, 25)

последовательность либо метилирована только по одному сайту, либо не метилирована вообще.

Метилирование регуляторной области гена *DAPK1* в образцах ДНК, выделенных из тканей больных, исследовалось во множестве публикаций [18, 19, 20 и ссылки в них]. С помощью метода бисульфитной конверсии Raval A. et al. [21] детально изучили статус метилирования регуляторной области гена *DAPK1* в ДНК из клеточных линий Jurkat and Raji. Они наблюдали существенное (более 80%) метилирование промоторной области в ДНК из клеток Raji, тогда как ДНК из клеток Jurkat в изучаемом районе была метилирована не более чем на 20% [21].

Таким образом, полученные нами данные BslI- и GlalI-ПЦР-анализа соответствуют литературным данным. должен расщеплять данный участок ДНК, что согласуется с данными.

На рисунке 3 представлены результаты определения метилирования регуляторной области гена *RARB* с помощью BslI- и GlalI-ПЦР-анализа. В соответствии с данными рисунка 1Б результатом ПЦР должно быть образование фрагмента ДНК длиной 853 п.о. Фрагмент такой длины образуется во всех контрольных экспериментах (дорожки 5, 9, 13, 19, 23), в BslI-ПЦР-анализе (дорожки 4, 8, 12, 18, 22) и GlalI-ПЦР-анализе ДНК из клеток L-68 (дорожка 3). В то же время GlalI-ПЦР-

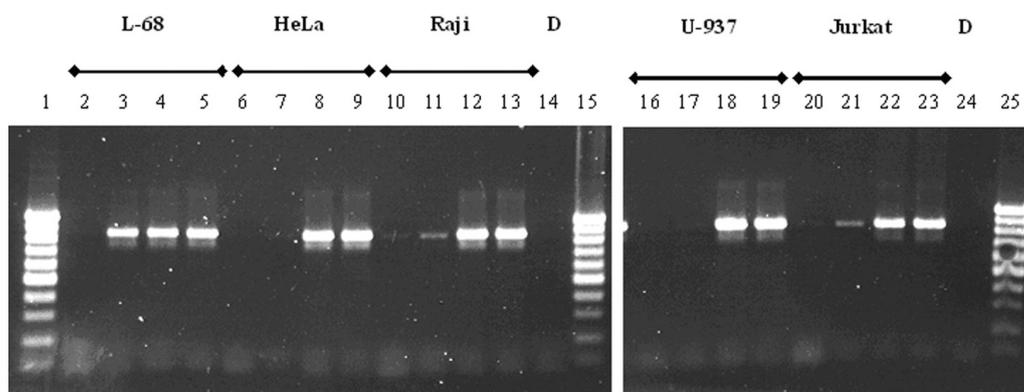


Рис. 3. Определение метилирования области промотора и первого экзона гена *RARB* методом BslI- и GlalI-ПЦР-анализа (ПЦР-фрагмент длиной 853 п.о.).

Фрагментированная ДНК из клеток L-68 (2–5); HeLa (6–9); Raji (10–13); U-937 (16–19); Jurkat (20–23). ДНК из *Drosophila melanogaster* (14 и 24). FatI (2, 6, 10, 16, 20), GlalI (3, 7, 11, 17, 21), BslI (4, 8, 12, 18, 22). 100 bp ДНК маркер молекулярной массы (1, 15, 25)

анализ ДНК из клеток Raji and Jurkat дает слабую полосу данного фрагмента, а в случае ДНК из клеток HeLa и U-937 искомого фрагмента на фотографии геля не видно. Как ясно показывается на рисунке 1Б, BslI не должен расщеплять данный участок ДНК, что согласуется с данными BslI-ПЦР-анализа. Из полученных результатов следует, что GlalI в значительной степени расщепляет регуляторную область гена *RARB* в ДНК всех малигнанных клеточных линий (дорожки 7, 11, 17, 21). В то же время сравнение дорожек 3 и 5 свидетельствует, что GlalI не расщепляет данный участок в ДНК контрольной клеточной линии L-68. Следовательно, GlalI-ПЦР-анализ показал существенное метилирование регуляторной области гена-онкосупрессора *RARB* в ДНК клеточных линий HeLa, Jurkat, Raji и U-937 и отсутствие метилирования этого района в ДНК клеток L-68.

Метилирование области промотора и первого экзона гена *RARB* в ДНК из опухолевых тканей наблюдалось во множестве работ [18, 19 и ссылки в них]. Более

того, было показано, что метилирование регуляторной области гена *RARB* является маркером ранних стадий развития опухоли [22]. Это, вероятно, связано с тем, что онкосупрессор *RARB* вовлечен в регуляцию клеточного цикла и размножения клеток ткани [3]. В этом случае определение факта метилирования регуляторной области данного гена может оказаться одним из наиболее значимых маркеров образования опухолей на ранних стадиях. Полученные нами результаты по метилированию области промотора и первого экзона гена-онкосупрессора *RARB* только в ДНК из малигнанных клеточных линий согласуются с этими литературными данными и подтверждают, что определение статуса метилирования этого района может являться методом ранней диагностики онкологических заболеваний.

На рисунке 4 представлены результаты BslI- и GlalI-ПЦР-анализа участка ДНК размерами 450 п.о. в области первого экзона гена-онкосупрессора *RASSF1A*. Мы наблюдаем образование такого фрагмента во всех

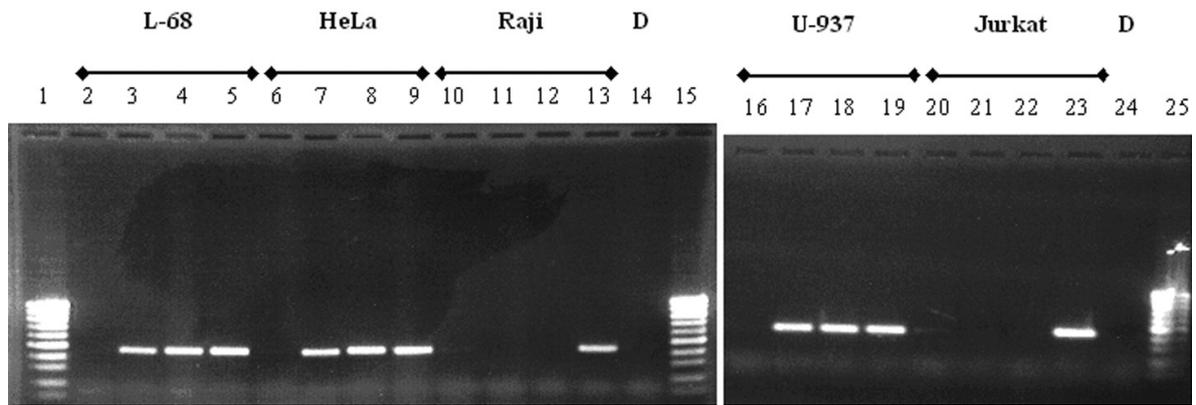


Рис. 4. Определение метилирования области первого экзона гена *RASSF1A* методом BlnI- и GluI-ПЦР-анализа (ПЦР-фрагмент длиной 450 п.о.).

Фрагментированная ДНК из клеток L-68 (2–5); HeLa (6–9); Raji (10–13); U-937 (16–19); Jurkat (20–23). ДНК из *Drosophila melanogaster* (14 и 24). HaeIII (2, 6, 10, 16, 20), GluI (3, 7, 11, 17, 21), BlnI (4, 8, 12, 18, 22). 100 бр ДНК маркер молекулярной массы (1, 15, 25)

контрольных экспериментах (дорожки 5, 9, 13, 19, 23), а также в GluI-ПЦР-анализе (дорожки 3, 7, 17) и BlnI-ПЦР-анализе (дорожки 4, 8, 18) препаратов ДНК из клеточных линий L-68, HeLa и U-937. В случае клеточных линий Raji и Jurkat оба анализа дают положительный результат, при этом как GluI, так и BlnI полностью расщепляют ДНК и ПЦР-фрагмент не образуется (дорожки 11, 12, 21, 22).

Полученные результаты BlnI-ПЦР-анализа свидетельствуют, что метилированная последовательность 5'-G(5mC)GCTG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GACG(5mC)G-5' (подчеркнута на рисунке 1С) присутствует только в ДНК клеток Raji и Jurkat. В других клеточных линиях эта последовательность либо не метилирована, либо содержит только один метилированный сайт 5'-GCCG-3'.

Метилирование регуляторной области гена *RASSF1A* в препаратах ДНК, выделенных из клинических изолятов, изучалось целым рядом авторов [23–25]. Yan P.S. et al. [26] предприняли детальное изучение метилирования промотора и первого экзона гена *RASSF1A* в ДНК малигнанных клеточных линий, полученных от больных раком молочной железы. Методом бисульфитной конверсии авторы показали, что в этих клеточных линиях район ДНК в непосредственной близости от последовательности 5'-GCCGCTGCCG-3' метилирован в значительной степени. Исходя из этих данных и полученных нами результатов, можно предположить, что существенное метилирование первого экзона гена *RASSF1A* действительно имеет место в ряде малигнанных клеточных линий, тогда как в других клеточных линиях такой модификации не наблюдается.

Суммируя полученные результаты, следует отметить, что BlnI- и GluI-ПЦР-анализ показал отсутствие метилирования исследованных участков регуляторных областей генов-онкосупрессоров *RARB* и *RASSF1A* в ДНК из контрольной клеточной линии L-68. В то же время регуляторная область гена *RARB* оказалась метилированной во всех малигнанных клеточных линиях, изучаемых в настоящей работе. Интересно отметить, что первый экзон гена *RASSF1A* совершенно не метилирован в двух малигнанных клеточных линиях (U-937 и HeLa) и полностью метилирован в двух других малигнанных линиях (Raji и Jurkat). В случае промоторной области гена *DAPK1* BlnI-ПЦР-анализ выявил дополнительное метилирование этого участка ДНК только в малигнantlyй клеточной линии Raji. Поразительно, что изучение метилирования участка регуляторных областей только трех генов-онкосупрессоров выявило различные картины метилирования во всех трех изучаемых лейкозных клеточных линиях U-937, Raji и Jurkat. Однако при этом наблюдаются совпадающие картины метилирования в препаратах ДНК из клеток аденокарциномы (HeLa) и гистиоцитарной лимфомы (U-937).

Мы полагаем, что метилирование регуляторных областей генов-онкосупрессоров *RARB* и *RASSF1A*, а также дополнительное метилирование промоторной области гена-онкосупрессора *DAPK1*, которые выявляются в различных комбинациях в изучаемых малигнantlyх клеточных линиях, по-видимому, приводят к инактивации соответствующих генов-онкосупрессоров и развитию разных онкопатологий. Очевидно, различие в картинах метилирования регуляторных областей в ДНК из клеток

HeLa и U-937 может быть найдено при изучении других генов-онкосупрессоров, которые не исследовались в нашей работе. Таким образом, по мере накопления экспериментальных данных результаты BslI- и GlaI-ПЦР-анализа могут быть использованы как для выявления малигнанных клеток, так и для их идентификации.

Заключение

Предлагаемый метод BslI- и GlaI-ПЦР-анализа по сути является вариантом широко используемого ПЦР-анализа и требует лишь предобработки изучаемой ДНК эндонуклеазами. Такой анализ не требует сложного оборудования и может проводиться в стандартных медико-генетических лабораториях, а его простота позволяет проводить массовый скрининг образцов ДНК клинических изолятов.

Патент по данной работе находится в стадии оформления (РСТ/RU2009/127467).

Литература

1. Киселева Н.П., Лихтенштейн А.В. Эпигенетические изменения в опухолевых клетках. Роль метилирования ДНК в канцерогенезе / В кн.: Канцерогенез. Под ред. Д.Г. Заридзе. — М.: Медицина, 2004. — С. 191–203.
2. Handa V., Jeltsch A. Profound flanking sequence preference of Dnmt3a and Dnmt3b mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome // *J. Mol. Biol.* — 2005. — Vol. 348. — N 5. — P. 1103–1112.
3. De Cáseres I.I. and Cairns P. Methylated DNA sequences for early cancer detection, molecular classification and chemotherapy response prediction // *Clin. Transl. Oncol.* — 2007. — Vol. 9. — P. 429–437.
4. Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Molloy P.L., Paul C.L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1992. — Vol. 89(5). — P. 1827–1831.
5. Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S., Nellin B.D., Baylin S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* — 1996. — Vol. 93. — P. 9821–9826.
6. Xiong Z., Laird P.W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay // *Nucleic Acids Res.* — 1997. — Vol. 25(12). — P. 2532–2534.
7. Bird A.P., Southern E.M. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis* // *J. Mol. Biol.* — 1978. — Vol. 118. — P. 27–47.
8. Tarasova G.V., Nayakshina T.N., Degtyarev S.K. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease GlaI // *BMC Molecular Biology* — 2008. — Vol. 9. — P. 7.
9. Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Дегтярев С.Х. Зависимость активности сайт-специфической эндонуклеазы GlaI от количества и положения метилированных цитозинов в узнаваемой последовательности 5'-GCCG-3' // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* — 2006. — Т. 2. — № 1. — С. 30–39.
10. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайт-специфическая эндонуклеаза BslI узнает последовательность ДНК 5'-G(5mC)N^GC-3' и расщепляет ее с образованием 3'-выступающих концов // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* — 2007. — Т. 3. — № 1. — С. 28–33.
11. BslI product information [Электронный ресурс] — Режим доступа: <http://www.sibenzyme.com/info641.php>.
12. Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. — New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. — V. 1–3. — 2222 p.
13. Singer-Sam J., Grant M., LeBon J.M., Okuyama K., Chapman V., Monk M., Riggs A.D. Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the Pcgk-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation // *Mol. Cell Biol.* — 1990. — Vol. 10(9). — P. 4987–4989.
14. Чернухин В.А., Абдурашитов М.А., Томилов В.Н., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Сравнительный рестрикционный анализ хромосомной ДНК мышцы in vitro и in silico // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* — 2007. — Т. 3 — № 4. — С. 19–27.
15. Abdurashitov M.A., Chernukhin V.A., Gonchar D.A., Degtyarev S.K. GlaI digestion of mouse γ -satellite DNA: study of primary structure and ACGT sites methylation // *BMC Genomics.* — 2009. — Vol. 10 — P. 322–331.
16. Kim S., Li M., Paik H., Nephew K., Shi H., Kramer R., Xu D., Huang T-H. Predicting DNA methylation susceptibility using CpG flanking sequences // *Pacific Symposium on Biocomputing.* — 2008. — Vol. 13. — P. 315–326.
17. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. GenBank // *Nucleic Acids Res.* — 2008. — Vol. 36 (Database issue). — D25–D30.
18. Kristensen L.S., Mikeska T., Krypuy M., Dobrovic A. Sensitive Melting Analysis after Real Time-Methylation Specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection // *Nucleic Acids Res.* — 2008. — Vol. 36(7). — e42.
19. Zochbauer-Muller S., Fong K.M., Virmany N., Geradts J., Gazdar A., Minna J.D. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancer // *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61(1). — P. 249–255.

20. Herman J.G., Baylin S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation // *New England J. Med.* – 2003. – Vol. 349. – P. 2042–2054.
21. Raval A., Tanner S.M., Byrd J.C., Angerman E.B., Perko J.D., Chen S.S., Hackanson B., Grever M.R., Lucas D.M., Matkovic J.J., Lin T.S., Kipps T.J., Murray F., Weisenburger D., Sanger W., Lynch J., Watson P., Jansen M., Yoshinaga Y., Rosenquist R., de Jong P.J., Coggill P., Beck S., Lynch H., de la Chapelle A., Plass C. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia // *Cell.* – 2007. – Vol. 129(5). – P. 879–890.
22. Evron E., Dooley W.C., Umbricht C.B., Rosenthal D., Sacchi N., Gabrielson E., Soito A.B., Hung D.T., Ljung B., Davidson N.E., Sukumar S. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR // *Lancet* – 2001. – Vol. 357(9265). – P. 1335–1336.
23. Hesson L.B., Cooper W.N., Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer // *Disease Markers* – 2007. – Vol. 23. – P. 73–87.
24. Feng Q., Hawes S.E., Stern J.E., Wiens L., Lu H., Dong Z.M., Jordan D.C., Kiviat N.B., Vesselle H. DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients // *Cancer Epid. Biom. Prev.* – 2008. – Vol. 17. – P. 645–654.
25. Peters I., Rehmet K., Wilke N., Kuczyk M.A., Hennenlotter J., Eilers T., Machtens S., Jonas U., Serth J. RASSF1A promoter methylation and expression analysis in normal and neoplastic kidney indicates a role in early tumorigenesis // *Mol. Cancer.* – 2007. – Vol. 6(1). – P. 49.
26. Yan P.S., Shi H., Rahmatpanah F., Hsiau T.H., Hsiau A.H., Leu Y.W., Liu J.C., Huang T.H. Differential distribution of DNA methylation within the RASSF1A CpG island in breast cancer // *Cancer Research.* – 2003. – Vol. 63(19). – P. 6178–6186.

Список сокращений

5mC – 5-метилцитозин;

Трис – трис-(оксиметил)-аминометан;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

п.о., бр – пары оснований;

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

BLSI- AND GLAI-PCR ASSAY – NEW METHOD OF DNA METHYLATION STUDY

D.A. GONCHAR, A.G. AKISHEV, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

New BslI- and Glai-PCR assays have been developed to study DNA methylation. A new method includes DNA hydrolysis by methyl-directed site-specific DNA endonucleases Glai or BslI with subsequent routine PCR. Study of DNA methylation in regulation region of human tumor suppressor genes has been used as a model for evaluation of new method application. BslI- and Glai-PCR assays have revealed different methylation patterns of promoter region of *DAPK1*, promoter and first exon region of *RARB* and first exon region of *RASSF1A* tumor suppressor genes in malignant cell lines HeLa, Raji, U-937, Jurkat and control L-68 cells. Glai-PCR assay has shown methylation of *RARB* promoter and first exon region in DNA from all malignant cell lines, but not in control L-68 cells. Glai- and BslI-PCR assays have displayed DNA methylation of *RASSF1A* first exon region in Raji and Jurkat cells only. BslI-PCR assay of *DAPK1* promoter region has demonstrated an additional DNA methylation in Raji cells only. Glai- and BslI-PCR assays may be useful both in determination of malignant cells and their discrimination.

Keywords: DNA methylation, endonuclease, tumor suppressor.

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОЧВЕННЫХ ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA* ИЗ ПОГРЕБЕННЫХ ЧЕРНОЗЕМОВ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

Р.И. ТУХБАТОВА, Э.А. РАФАИЛОВА*, Ф.К. АЛИМОВА

Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, Казань, Республика Татарстан

Выделено из погребенных почв на территории Республики Татарстан 135 изолятов грибов рода *Trichoderma*. Проведена их идентификация по морфологическим и молекулярно-генетическим признакам. Выявлено 7 видов *Trichoderma*. Изучена популяционная структура выделенных изолятов. Показано, что в большинстве случаев исследованные изоляты представлены агрегатами гетерогенных популяций.

Ключевые слова: *Trichoderma*, погребенные почвы, идентификация.

Введение

Грибы рода *Trichoderma* широко распространены в природе. Они играют ключевую роль в сообществе микроорганизмов [1].

Род *Trichoderma* имеет важное хозяйственное значение в связи с широким использованием многих видов для получения ферментов, биологически активных веществ и препаратов для защиты растений. Некоторые виды этого рода являются более эффективными агентами биоконтроля против различных почвенных фитопатогенов, чем известные пестициды, и их воздействие намного более безопасно для окружающей среды [2]. Высокая изменчивость популяций видов рода *Trichoderma* может являться одной из причин более низкой эффективности биологического контроля по сравнению с лабораторными испытаниями. Многие активные штаммы-продуценты при неблагоприятных условиях хранения и культивирования теряют свои свойства, приближаясь к дикому типу, и вытесняются низкопродуктивными формами. Сохранение видового разнообразия грибов рода *Trichoderma* представляет большой практический интерес и играет значительную роль в биогеоценозе и антропогенных ландшафтах, а также открывает возможность использования данного рода грибов в сельскохозяйственной промышленности.

Материалы и методы

Изоляты грибов рода *Trichoderma* были выделены из погребенных почв Мурзихинского II могильника (VIII–VI вв. до н.э., Алексеевский р-н, Республика Татарстан) и Больше-Кляринского городища (VIII–X вв. н.э., Камско-Устьинский р-н, Республика Татарстан). Исследованные образцы почв были отнесены к выщелоченному чернозему из верхней части горизонта А1, который при сооружении археологических памятников был погребен (содержание гумуса – 3–8%, рН – 6–8).

Выделение *Trichoderma* из образцов почвы проводили методом серийных разведений с последующим высевом на среду с пароморфогенным веществом [3].

Изучение морфологии поверхности спор *Trichoderma* проводили при помощи атомно-силового микроскопа NTEGRA Prima (NT-MDT). Изображения были получены полуконтактным методом [4, 5].

Морфологическая характеристика видов была проведена по стандартной схеме, предложенной И.С. Дружининой [6, 7] по следующим параметрам: внешнему виду колонии, характеру роста мицелия, строению конидиеносца, наличию синанаморф, наличию и расположению хламидоспор, морфологии и размерам конидий.

ДНК была выделена из свежего мицелия фенол/хлороформным методом [8]. Участки ядерной рДНК, содержащие ITS1 и 2 и ген *tef1*, были амплифицированы в реакции ПЦР и секвенированы с использованием комбинации праймеров: SR6R (5'-AAG TAG AAG TCG TAA CAA GG-3') и LR1 (5'-GGT TGG TTT CTT TTC CT-3'); EF1-728F (5'-CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG-3') и EF1-986R (5'-TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC-3'). Молекулярную идентифика-

© 2010 г. Тухбатова Р.И., Рафаилова Э.А., Алимова Ф.К.

* **Автор для переписки:**

Рафаилова Элина Александровна, м.н.с. лаборатории с/х биотехнологии Казанского государственного университета, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18

Тел.: 89053754937,

E-mail: rafailova_elina@mail.ru

**Список видов и количество изолятов
грибов рода *Trichoderma*, выделенных
из погребенных черноземов**

Вид	Количество изолятов
<i>T. citrinoviride</i>	39
<i>T. longibrachiatum</i>	25
<i>T. asperellum</i>	18
<i>T. atroviride</i>	12
<i>T. harzianum</i>	10
<i>T. hamatum</i>	7
<i>T. koningii</i>	5
<i>T. spp.</i>	19
Сумма	135

цию нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы TrichoMark – TrichoBLAST [6]. Результаты секвенирования обрабатывали при помощи пакета программ Lasergene 5.03 (DNASTAR, Inc., США). Филогенетическое древо было построено с помощью программы MrBayes 3.0B4 с использованием алгоритма для филогенетической реконструкции Bayesian [9].

Вегетативную совместимость моноспорных клонов изучали сращиванием от двух до восьми колоний на чашках Петри на среде PDA с последующим визуальным наблюдением за поведением колонии и микроскопированием пограничной зоны между колониями, что позволило обнаружить анастомозы и оценить относительную частоту их образования. Характер проявления реакций при визуальной оценке и микроскопировании сравнивали с описаниями, приведенными у Ю.Т. Дьякова и А.В. Долговой [10, 11].

Результаты и обсуждение

Из исследованных образцов погребенных почв нами было выделено 135 изолятов рода *Trichoderma*.

В результате исследований была отмечена высокая частота встречаемости (КОЕ/г почвы) изолятов *Trichoderma* в погребенных почвах по сравнению с современными фоновыми и новообразованными почвами [12, 13].

Из погребенных почв было выявлено 7 видов *Trichoderma*, идентифицированных по морфологическим признакам, молекулярно-генетическому анализу. Для отдельных изолятов не обнаружено гомологичных сиквенсов, которые позволили бы отнести их хотя бы к одному из известных видов (табл. 1).

Наиболее распространенным и часто встречающимся оказался вид *T. citrinoviride* (39 изолятов). На втором месте по распространенности стоит *T. longibrachiatum* (25 изолятов), на третьем – *T. asperellum* (18 изолятов). Далее следуют *T. atroviride* (12 изолятов), *T. harzianum* (10 изолятов), *T. hamatum* (7 изолятов), *T. koningii* (5 изолятов). Также нами была выделена группа новых, неидентифицируемых изолятов (19 изолятов), отнесенных по данным молекулярно-генетического анализа к одному виду.

Изоляты *Trichoderma*, выделенные из погребенных почв, отличались от современных более высокой интенсивностью окраски колоний; более пышным ростом воздушного мицелия; наличием у представителей секции *Longibrachiatum* (*T. citrinoviride*, *T. longibrachiatum*)

сильно выраженного кокосового запаха и способности выделять ярко-желтый пигмент в среду (эти признаки ослабевали или исчезали при последующих пересевах).

Морфологические исследования конидий с использованием АСМ-микроскопии позволили выделить изоляты с разными по структуре поверхностями спор (рис. 1).

Изоляты, выделенные из погребенных почв, были идентифицированы с помощью молекулярно-генетических методов. Для идентификации использовались праймеры к гену *tef1* (EF1-728F и EF1-986R) и к ITS 1 и 2 (SR6R и LR1) как наиболее отвечающие требованиям идентификации [8, 14].

Секвенирование вышеуказанных фрагментов у изолятов *Trichoderma*, выделенных из погребенных почв, позволило нам получить их последовательности и сравнить с нуклеотидными последовательностями ранее описанных и внесенных в базу данных TrichoBLAST. Результаты поиска представлены в таблице 2 (по одному примеру для каждого вида).

Полученные последовательности были идентифицированы в Базе данных нуклеотидных последовательностей TrichoBLAST с 98–100% гомологией.

На основе полученных последовательностей методом Bayesian анализа было построено древо, отражающее филогенетическое положение исследованных изолятов (рис. 2). Ближе всех к основанию филогенетического древа лежали представители секции *Longibrachiatum* (*T. longibrachiatum* и *T. citrinoviride*).

Нами была исследована внутривидовая изменчивость изолятов *Trichoderma* при расщеплении гетероспоровой популяции на моноспорные клоны на

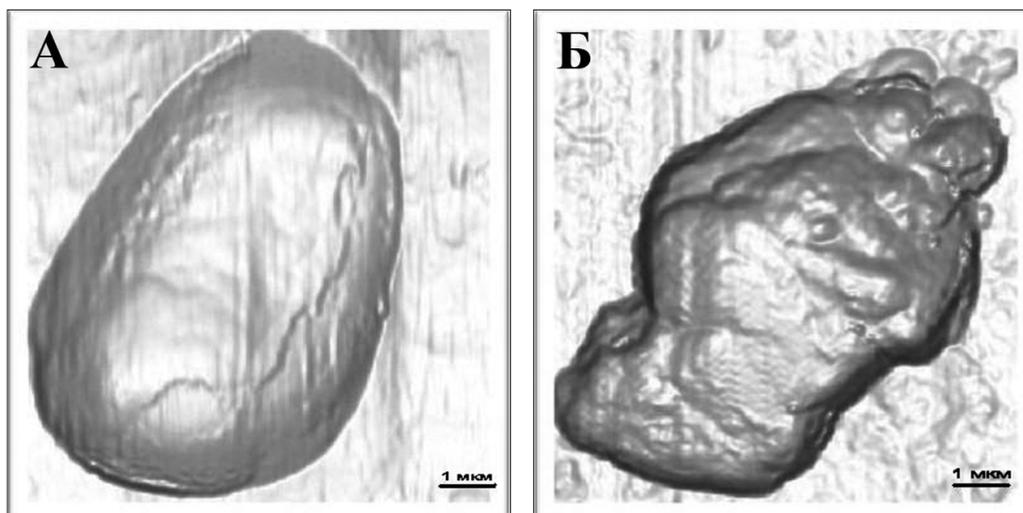


Рис. 1. Фотография конидий *Trichoderma*: А — изолят, выделенный из погребенной почвы Больше-Кляринского городища, трансформировавшейся в гидроморфных условиях; Б — изолят, выделенный из погребенной почвы Больше-Кляринского городища, трансформировавшейся в автоморфных условиях. Атомно-силовой микроскоп

Таблица 2

База данных нуклеотидных последовательностей TrichoBLAST у разных видов *Trichoderma*

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU280098.1	<i>Trichoderma citrinoviride</i> strain DAOM 172792 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	852	852	100%	0.0	98%
EU769111.1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> isolate T05 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1037	1037	100%	0.0	100%
EU330956.1	<i>Trichoderma asperellum</i> strain GJS 90-7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	985	985	98%	0.0	100%
AF456892.1	<i>Trichoderma atroviride</i> isolate DAOM 165779 ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	571	571	100%	5e-160	99%
EU821792.1	<i>Trichoderma harzianum</i> internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	839	839	100%	0.0	98%
DQ248967.1	<i>Trichoderma hamatum</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	817	817	99%	0.0	100%
EU280128.1	<i>Hypocrea koningii</i> strain DAOM 167645 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	828	828	100%	0.0	100%

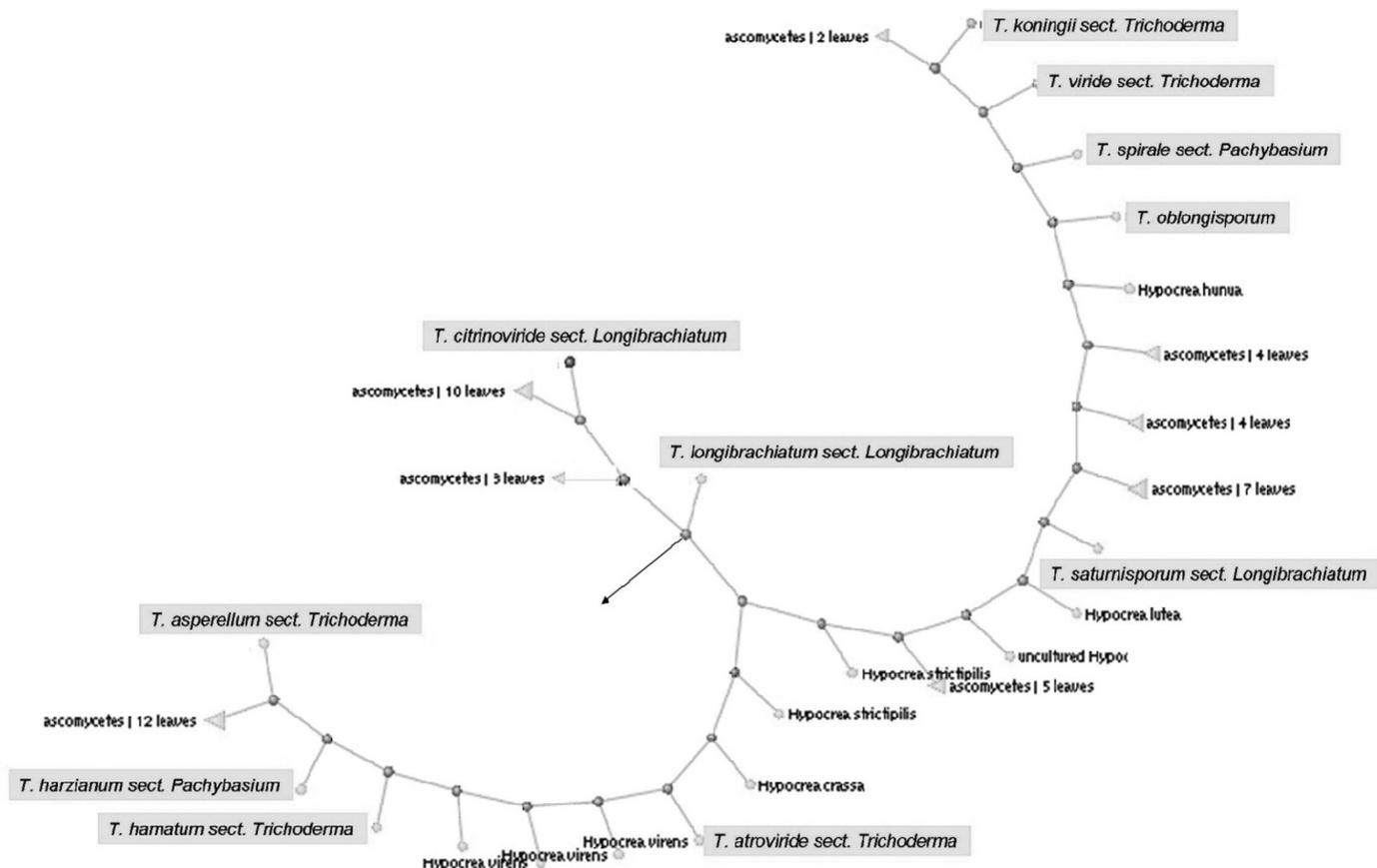


Рис. 2. Древо, построенное с использованием Bayesian анализа изолятов *Trichoderma*, выделенных из погребенных почв, основанное на сиквенсах ITS 1 и 2

Таблица 3

**База данных нуклеотидных последовательностей TrichoBLAST
у одного вида *T. asperellum***

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU280110.1 T. 204(0)	<i>Trichoderma asperellum</i> strain CIB T113 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	976	976	100%	0.0	100%
EU856297.1 T. 204(1)	<i>Trichoderma asperellum</i> strain GJS 01-294 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	841	841	92%	0.0	100%
EU330956.1 T. 204(2)	<i>Trichoderma asperellum</i> strain GJS 90-7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	985	985	98%	0.0	100%

примере *T. asperellum* 204: сравнивались нуклеотидные последовательности ITS 1 и 2 «родителя» – 204(0) и его «клонов» – 204(1) и 204(2). Результаты сравнения с базой данных представлены в таблице 3.

Нами обнаружена невысокая изменчивость между исследуемыми ДНК различных изолятов,

относящихся к одному виду. Полученные последовательности были гомологичны друг другу на 92–98%, а значимой считается разница в 20% и более внутри одного вида [15].

Ниже приводится сравнение последовательностей клонов изолята *T. asperelum* 204 (рис. 3).

		*	20	*	40	*	
CPK1711	:	-----		-----			: -204(0) ASP
CPK1712	:	-----		-----		GTGAACGT	: 8 204(2) ASP
CPK1714	:	-----		-----		GTGAACGT	: 8 204(1) ASP
		60	*	80	*	100	
CPK1711	:	-----	CTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCC	CCGGGTGCGTCGCAGCCCC			: 43 204(0) ASP
CPK1712	:	TACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCC	CCGGGTGCGTCGCAGCCCC				: 58 204(2) ASP
CPK1714	:	TACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCC	CCGGGTGCGTCGCAGCCCC				: 58 204(1) ASP
	*	120	*	140	*		
CPK1711	:	GGAACCAAGCGCCCGCGGAGGAACCAACCAAACT	-CTTCTGTAGTCCC				: 92 204(0) ASP
CPK1712	:	GGAACCAAGCGCCCGCGGAGGAACCAACCAAACT	-CTTCTGTAGTCCC				: 107 204(2) ASP
CPK1714	:	GGAACCAAGCGCCCGCGGAGGAACCAACCAAACT	-CTTCTGTAGTCCC				: 107 204(1) ASP
		160	*	180	*	200	
CPK1711	:	CTCGCGGACGTATTTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTC	-AAAATGAATC				: 141 204(0) ASP
CPK1712	:	CTCGCGGACGTATTTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTC	-AAAATGAATC				: 156 204(2) ASP
CPK1714	:	CTCGCGGACGTATTTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTC	-AAAATGAATC				: 156 204(1) ASP
	*	220	*	240	*		
CPK1711	:	AAAACCTTTCAACAACCGGATCTCTTGGTTCTGGC	ATC GATGAAGAACGCAG				: 191 204(0) ASP
CPK1712	:	AAAACCTTTCAACAACCGGATCTCTTGGTTCTGGC	ATC GATGAAGAACGCAG				: 206 204(2) ASP
CPK1714	:	AAAACCTTTCAACAACCGGATCTCTTGGTTCTGGC	ATC GATGAAGAACGCAG				: 206 204(1) ASP
		260	*	280	*	300	
CPK1711	:	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATC					: 241 204(0) ASP
CPK1712	:	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATC					: 256 204(2) ASP
CPK1714	:	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATC					: 256 204(1) ASP
	*	320	*	340	*		
CPK1711	:	TTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGCATGCCTGTCCGA					: 291 204(0) ASP
CPK1712	:	TTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGCATGCCTGTCCGA					: 306 204(2)
CPK1714	:	TTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGCATGCCTGTCCGA					: 306 204(1)
		360	*	380	*	400	
CPK1711	:	GCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCGGGGGATCGGCCGTTGGGGATCGG					: 341 204(0)
CPK1712	:	GCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCGGGGGATCGGCCGTTGGGGATCGG					: 356 204(2)
CPK1714	:	GCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCGGGGGATCGGCCGTTGGGGATCGG					: 356 204(1)
CPK2127	:	GCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCGGGGGATCGGCCGTTGGGGATCGG					: 360 18
	*	420	*	440	*		
CPK1711	:	GACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCCTAAATACAGTGCCGGTCTCGCCGCA					: 391 204(0)
CPK1712	:	GACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCCTAAATACAGTGCCGGTCTCGCCGCA					: 406 204(2)
CPK1714	:	GACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCCTAAATACAGTGCCGGTCTCGCCGCA					: 406 204(1)
		460	*	480	*	500	
CPK1711	:	GCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACAACTCGCACCGGG-AGCGCGGCGCG					: 440 204(0)
CPK1712	:	GCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACAACTCGCACCGGG-AGCGCGGCGCG					: 455 (204(2)
CPK1714	:	GCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACAACTCGCACCGGG-AGCGCGGCGCG					: 455 204(1)
	*	520	*	540	*		
CPK1711	:	TCCACGTCGTAACCAACCC-AACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAG					: 489 204(0)
CPK1712	:	TCCACGTCGTAACCAACCC-AACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAG					: 504 204(2)
CPK1714	:	TCCACGTCGTAACCAACCC-AACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAG					: 504 204(1)
		560	*	580			
CPK1711	:	GTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG					: 528 204(0)
CPK1712	:	GTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG					: 543 204(2)
CPK1714	:	GTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG					: 543 204(1)

Рис. 3. Сравнительный анализ сиквенсов ITS последовательностей изолятов *T. asperellum* 204 и его клонов

Нами были исследованы гетерогенные популяции *Trichoderma*, выделенные из современных и погребенных почв в районе расположения археологических памятников, и их расщепление на клоны.

Природные популяции грибов представляют собой мозаику клонов, одним из изолирующих механизмов которых являются различные культурально-морфологические типы колоний, реакции вегетативной совместимости и гетерокариоз [11, 16, 17].

Сравнительный анализ колоний гетероспоровых популяций позволил выделить два стабильных культурально-морфологических типа из ранее описанных четырех. Гетероспоровые популяции в большей степени были представлены вторым культурально-морфологическим типом, из них 18% приходилось на изоляты *T. koningii*, 22% — на изоляты *T. atroviride*, по 8% — на изоляты *T. longibrachiatum*, *T. asperellum*, 7% — на изоляты *T. harzianum*, 5% — на *T. hamatum* и 25% — у неидентифицированных изолятов. К четвертому типу принадлежат 35% из исследованных изолятов, из них: 23% — у изолятов *T. citrinoviride*, по 12% пришлось на изоляты *T. longibrachiatum* и *T. hamatum*, 8% — на *T. atroviride*, 7% — на *T. asperellum*, по 4% — на изоляты *T. harzianum* и *T. koningii*, остальные 30% — на неидентифицированные штаммы.

При исследовании взаимодействия между гетероспоровыми популяциями и моноспоровыми клонами нами были обнаружены различные реакции вегетативной совместимости: образование мицелиального валика из гиф воздушного мицелия, мелдинг-реакция, взаимное проникновение мицелия (нейтральная или индифферентная реакция), а также реакции несовместимости барраж, бордюор и ограничение роста. Вегетативная совместимость типа валик выявлена у 23% исследованных изолятов.

У 25% отмечена индифферентная реакция. Вегетативная совместимость типа мелдинг обнаружена у 15% исследованных изолятов.

Вегетативная несовместимость типа барраж найдена у 23% изолятов; бордюор — у 11% исследованных изолятов; ограничение роста — у 3% исследованных изолятов. У 30% исследованных изолятов идентифицирован смешанный тип реакций.

При расщеплении гетероспоровых популяций на моноспоровые клоны преобладает тип вегетативной несовместимости барраж — 24%, бордюор — у 9% клонов, ограничение роста — у 4%. Среди типов вегетативной совместимости преобладает индифферентная реакция — 33% клонов, валик — 17%; мелдинг-реакция обнаружена у 13% исследованных клонов.

Показано, что в большинстве случаев исследованные изоляты представлены агрегатами гетерогенных популяций. Сравнение общих частот реакций совместимости (63%) и несовместимости (37%) указывает на наличие тенденции относительного сдвига в сторону реакций смешанного типа и вегетативной совместимости. В состав аборигенных изолятов *Trichoderma* входят гетерогенные и моноспоровые клоны, представленные двумя культурально-морфологическими типами (II, IV).

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании из погребенных почв на территории Республики Татарстан выделено 135 изолятов грибов рода *Trichoderma* и проведена их идентификация по морфологическим и молекулярно-генетическим признакам. Выявлено 7 видов *Trichoderma*. Изученные изоляты в основном представляют собой агрегаты, состоящие из гетерогенных популяций.

Литература

1. Великанов Л.Л. Роль грибов в формировании мико- и микробиоты почвоестественных и нарушенных биоценозов и агроценозов: Дисс. ... доктор биол. наук 03.00.04. Защищена 23.03.1997. Московский. гос. ун-т. — М., 1997. — 145 л.
2. Singh A., Srivastava S., Singh H.B. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases // *Bioresource Technology*. — 2007. — Vol. 98. — N 2. — P. 470–473.
3. Бенкен А.А., Хацкевич Л.К. Параморфогенные вещества в практике фитопатологических исследований // *Микология и фитопатология*. — 1972. — Т. 6. — Вып. 2. — С. 174–177.
4. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. — М.: Мир, 2004. — 144 с.
5. Бухараев А.А., Коновалова О.А., Бизяев Д.А., Салахов М.С. Атомно-силовая микроскопия микро и наноструктур. Учебно-методическое пособие к выполнению лабораторных работ для студентов, бакалавров, магистров физического факультета КГУ. — Казань: КГУ, 2006. — 80 с.
6. Druzhinina I.S., Kopchinskiy A.G., Kubicek C.P. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data // *Mycoscience*. — 2006. — Vol. 47. — P. 55–64.
7. Overton B.E., Stewart E.L., Geiser D.M. Taxonomy and phylogenetic relationships of nine species of *Hypocrea* with anamorphs assignable to *Trichoderma* section *Hypocreanum* // *Studies in Mycology*. — 2006. — N 56. — P. 39–65.
8. Druzhinina I.S., Kopchinski A., Komon A. et al. A DNA-barcode for strain identification in *Trichoderma* // *J. Zhejiang Univ. SCI*. — 2005. — Vol. 6B. — N 2. — P. 100–112.

9. Yang W., Hoiland H.D. The Nekpoort paleosol at Strata 1 Gaborone, Botswana: soil formation during the Great Oxidation Event // *Am. J. Sci.* – 1997. – Vol. 303. – P. 187–220.
10. Дьяков Ю.Т., Долгова А.В. Вегетативная несовместимость у фитопатогенных грибов. – М.: МГУ, 1995. – 161 с.
11. Дьяков Ю.Т., Швырева А.Т., Сергеев А.Ю. Введение в генетику грибов. Учебное пособие для студ. вузов. – М.: ИЦ «Академия», 2005. – 304 с.
12. Алимова Ф.К. *Trichoderma*/Нурочреа (Fungi, Ascomycetes, Нурочреалес): таксономия и распространение. – Казань: Казанский гос. ун-т, 2007. – 264 с.
13. Lu B., Druzhinina I.S., Fallah P. et al. Нурочреа/*Trichoderma* species with pachybasium-like conidiophores: teleomorphs for *T. minutisporum* and *T. polysporum* and their newly discovered relatives // *Mycologia.* – 2004. – Vol. 96(2). – P. 310–342.
14. Bulat S.A., Lubeck M., Mironenko N.V. et al. UP-PCR analysis ITS1 ribotyping of *Trichoderma* and *Gliocladium* fungi // *Mycol. Res.* – 1998. – Vol. 102(8). – P. 933–943.
15. Druzhinina I.S., Komon-Zelazowska M., Bissett J. et al. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in Oyster mushroom farms worldwide // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2007. – Vol. 73(22). – P. 7415–7426.
16. Лухачев А.Н. Культуральные и биологические особенности штаммов *Trichoderma lignorum* // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология.* – 1998. – Вып. 3. – С. 103–104.
17. Алимова Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. – Казань: Унипресс: ДАС, 2006. – 268 с.

SPECIES DIVERSITY OF SOIL FUNGI OF THE GENUS *TRICHODERMA* BURIED BLACK EARTH REPUBLIC OF TATARSTAN

R.I. TUKHBATOVA, E.A. RAFAILOVA, F.K. ALIMOVA

V.I. Ulyanov-Lenin Kazan State University, Kazan, Tatarstan

It is allocated 135 isolates of *Trichoderma* from buried soil on Tatarstan Republic's territory. Their identification to morphological and molecular-genetic signs is spent. 7 kinds *Trichoderma* are revealed. The populational structure of the allocated isolates is studied. Investigated isolates, in most, have been presented by aggregates of heterogeneous populations.

Keywords: *Trichoderma*, buried soil, identification.

ГИДРОЛИЗ ЗЕРНА ТРИТИКАЛЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ГРИБОВ *TRICHODERMA*

Е.В. СКВОРЦОВ*¹, Ф.К. АЛИМОВА¹, А.В. ШИШКИН¹,
Э.А. РАФАИЛОВА¹, Р.П. ИБАТУЛЛИНА²

¹ Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина,

² ООО «НПИ «Биопрепараты», Казань, Республика Татарстан

Применение ферментного комплекса *Trichoderma* значительно углубляет процесс гидролиза зерна тритикале. Показано увеличение глубины гидролиза зерна тритикале на 15% при использовании ферментного комплекса *Trichoderma* в технологии спиртовой промышленности. Установлено увеличение глубины гидролиза зерна тритикале на 14% при применении ферментного комплекса *Trichoderma* в процессе быстрого гидролиза для производства кормов из тритикале.

Ключевые слова: ксиланаза, целлюлаза, протеаза, *Trichoderma*, тритикале.

Введение

В настоящее время в сельском хозяйстве Республики Татарстан все большие площади выделяются под посевы зерновой культуры тритикале. Повышенный интерес к данной культуре вызван ее уникальными свойствами. Являясь гибридом пшеницы и ржи, тритикале характеризуется высокой стойкостью к заморозкам, как рожь. Кроме того, это зерно не уступает ржи в урожайности. Но при этом тритикале обладает более высокими технологическими свойствами, приближенными к свойствам пшеницы. Однако до настоящего времени не проведены широкие исследования особенностей применения тритикале в пищевой и кормовой промышленности. Поэтому исследования гидролиза зерна тритикале актуальны и крайне востребованы для внедрения в спиртовой промышленности и кормопроизводстве.

Ксиланы являются компонентами зерна пшеницы и ржи, которые затрудняют его гидролиз. Гидролиз ксиланов осуществляют ксиланазы, синтезируемые грибами. Ведущие биотехнологические фирмы при производстве ксиланаз используют грибы *Trichoderma* [1], обладающие

сильным гемицеллюлазным и целлюлазным комплексами экзоферментов. Актуальным остается вопрос поиска и выделения новых штамм грибов *Trichoderma*.

В связи с вышесказанным целью работы явился анализ гидролиза тритикале с помощью гидролитического комплекса грибов *Trichoderma*.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Определить биохимический состав углеводной фракции зерна тритикале.

2. Изучить действие ферментного комплекса *Trichoderma* при гидролизе тритикале в спиртовой промышленности и кормопроизводстве.

Материалы и методы

В работе использовали штамм *Trichoderma asperellum* 302, выделенный из почв Республики Татарстан, и фуражное зерно тритикале.

Питательные среды для культивирования *Trichoderma asperellum* 302:

- Среда Чапека, (%): NaNO_3 – 0,2; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; KCl – 0,05; FeSO_4 – 0,001; Сахароза – 3,0; Агар – 2,0.

- Природная экспериментальная среда экстракт ржаных пентозанов (%) включает в себя: растворенные пентозаны – 0,2; белок – 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5. Получение среды проводили следующим образом: рожь дробили до прохода через сито 1 мм 85% помола. Проводилась экстракция зерна 0,5М NH_4OH при $\text{pH}=10,0$ гидромодулем 1:10. Дробленую рожь из расчета 50 г на

© 2010 г. Скворцов Е.В., Алимова Ф.К., Шишкин А.В., Рафаилова Э.А., Ибатуллина Р.П.

* Автор для переписки:

Скворцов Евгений Владимирович,
кандидат биологических наук, научный сотрудник
кафедры биохимии КГУ,
420008 Казань, ул. Кремлевская, 18,
Тел. (843)2315266, т/ф (843)5710438,
E-mail: eskvortsov@rambler.ru

500 мл экстрагировали при постоянном перемешивании в течение 1 часа при комнатной температуре. Экстракт отделяли центрифугированием. Экстракт после коррекции рН до 4,5 1 М серной кислотой помещали в кипящую водяную баню, затем центрифугировали в течение 15 мин. при 4500 об./мин. для отделения осажденного белка. Кислотность надосадочной жидкости доводили 1 М КОН до рН=6,0, помещали в кипящую водяную баню на 60 мин., затем центрифугировали в течение 15 мин. при 4500 об./мин. Супернатант отделяли и после добавки солей ($MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,05%, $FeSO_4$ — 0,001%) использовали в качестве среды, содержащей растворенные пентозаны для культивирования продуцентов ксиланаз.

Грибы рода *Trichoderma* выращивали на агаризованной среде Чапека при температуре 28 °С, 7 сут. По истечении указанного срока с поверхности колоний водопроводной водой смывали споры грибов. Полученную суспензию в дальнейшем использовали в качестве инокулята для засева глубинных культур. Культуральные среды засеивали 2% инокулята. Культуры выращивали в 200 мл колбах, содержащих 100 мл среды, в течение 120 ч на лабораторных качалках с интенсивностью качания 200 об./мин. при температуре 28 °С при исходном значении рН 6,0. Клетки отделяли центрифугированием.

Ферментативный гидролиз тритикале проводился следующим образом: тритикале дробили до прохода 85% через сито 1 мм, добавляли воду, ферменты и нагревали до оптимальных температур и выдерживали определенное время при перемешивании суспензии. В опытный образец добавлялся препарат *Trichoderma*, в контрольный образец препарат не добавлялся. Таким образом, гидролиз контрольного образца зерна проводился только амилолитическими ферментами, тогда как опытный образец содержал добавку ксиланаз *Trichoderma*. Гидролизуемую суспензию разделяли центрифугированием при 4500 об./мин. 15 минут. Содержание растворенных веществ определяли с использованием рефрактометра ИРФ-454Б2М. Измерение проводили через каждый час. По содержанию растворенных веществ, определенных рефрактометрическим методом, можно установить общее количество гидролизованного зерна (в %). Оно рассчитывается по формуле:

$$\% \text{ гидролиза} = \% \text{ растворенного вещества} \times K,$$

где K = гидромодуль с учетом влажности зерна.

Исследование проводилось следующим образом. Для проведения гидролиза в колбу помещали:

- Тритикале — 100 г, вода — 400 мл.
- 1-я стадия: Ксиланазы — из расчета 0,75 IU/ г, варка 1 ч, 55 °С.

- 2-я стадия: Термамил — из расчета 2 ед./ г крахмала, варка 1–2 ч, 60–80 °С.

- 3-я стадия: Сахзим — из расчета 6700 ед./г крахмала, варка 1 ч, 50 °С.

Анализ редуцирующих сахаров проводили таким образом: к 120 мкл исследуемой пробы добавляли 1200 мкл дистиллированной воды и 600 мкл динитросалициловой кислоты (DNSA). Ставили пробы на 10 мин. в кипящую водяную баню при 100 °С, затем 5 мин. охлаждали при 0 °С. После этого добавляли во все пробы по 6 мл дистиллированной воды и измеряли оптическую плотность при 530 нм. В качестве контроля использовали дистиллированную воду вместо пробы.

Определение моносахаридного состава нецеллюлозных полисахаридов (НЦП) растительных материалов проводили методом жидкостной хроматографии [2]. Исследуемые образцы были размолоты на лабораторной мельнице Perten Laboratory Mill 3100 в муку с проходом через сито 200 мкм 80% помола. Для определения влажности брали навески около 5 г и определяли ее как разницу в весе до и после нагревания при 105 °С в течение 4 ч. Перед взвешиванием, после сушки, образцы помещали в эксикатор с хлористым кальцием для охлаждения на 30 мин. Влажность вычислялась как среднее четырех параллельных измерений. НЦП — это легкогидролизуемые кислотами углеводы. Для проведения мягкого кислотного гидролиза брали 0,1 г образца, суспендировали в 55 мл 1 М HCl и нагревали до 90 °С в течение 90 мин. После окончания гидролиза суспензия разделялась центрифугированием (4500 об./мин, 15 мин.). После центрифугирования супернатант фильтровали через целлюлозный фильтр. Полученный фильтрат пропускали через фильтр Ser-pak cartridge C18, предварительно смоченный метанолом с условным диаметром пор 0,45 мкм. 2 мл фильтрата переносили в вialу и использовали для хроматографического анализа. Образцы анализировались в двух повторностях. Для анализа моносахаридного состава гидролизата методом жидкостной хроматографии был применен хроматограф Perkin Elmer Series 200 (USA), оборудованный автоматическим пробоотборником. Разделение моносахаридов проводилось на хроматографической колонке Supelcosil LC-NH2 58338 высотой 250 мм и диаметром 4,6 мм. В качестве элюента при проведении исследований использовали ацетонитрил. Для приготовления 1 л элюента смешивали 750 мл ацетонитрила с 250 мл бидистиллированной воды. Полученную смесь фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм с помощью вакуумного насоса и установки для вакуумной фильтрации. Для регистрации

выходящих фракций моносахаридов применялся рефракционный детектор Refractive Index Detector, объем инъекции анализируемого раствора — 20 мкл, скорость элюирования 1 мл/мин., температура 30 °С. Регистрацию выходящих фракций проводили в течение 20 мин. Калибровку проводили, используя в качестве стандартов растворы глюкозы, мальтозы, ксилозы, арабинозы. Время удерживания ксилозы 6,8 мин., арабинозы — 7,5 мин., глюкозы — 9,8 мин., мальтозы — 17,4 мин. Приготовление стандартных растворов сахаров осуществляли следующим образом: 500 мг стандарта каждого сахара растворяли в мерной колбе вместимостью 50 мл бидистиллированной воды. Концентрация сахаров в данном основном растворе — 1%. Из основного стандартного раствора готовили рабочие стандартные растворы с концентрациями сахаров, которые ожидаются в исследуемых образцах. Вычисление концентраций моносахаридов в исследуемом растворе проводили по площади пиков компонентов, пользуясь программным обеспечением хроматографа в автоматическом режиме.

Анализ полисахаридного состава НЦП зерна тритикале проводили согласно методике Maes [3]. Пентозаны в зерне являются суммой ксилозы и арабинозы в гидролизате, поэтому содержание пентозанов в исследуемом зерне найдено путем пересчета концентрации этих моносахаридов на количество гидролизованного материала и степень разведения гидролизата, с учетом присоединения молекулы воды к моносахаридам в процессе гидролиза. Продуктами гидролиза крахмальной фракции являются глюкоза и мальтоза, их сумма дает содержание крахмала в исходном зерне.

Определение ксиланазной и целлюлазной активности ферментных препаратов проводилось по методу Koenig [4]. Образцы разбавляли до конечной концентрации (в D раз) приблизительно до концентрации 0,2–0,7 IU/мл для ксиланаз, 0,15–0,25 IU/мл — для целлюлаз. Исследование проводили в трех повторностях. Разбавленный образец в количестве 0,06 мл помещали в пробирку. Пробирку помещали на 5 мин. в 40 °С на водяную баню. Добавляли 0,6 мл субстрата и перемешивали. Через 20 мин. инкубация прерывалась добавлением 0,3 мл раствора DNSA. Субстрат для исследования активности ксиланаз готовили следующим образом. Сначала 750 мг ксилана (Sigma X0502) помещали в 40 мл ацетатного буфера. Растворяли ксилан перемешиванием на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения до комнатной температуры pH раствора доводили 25% HCl до 5,0. Объем раствора доводили до 50 мл ацетатным буфером. Субстрат для

исследования активности целлюлаз готовили таким образом: суспендировали 2 г карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) в 40 мл ацетатного буфера. КМЦ растворяли перемешиванием на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения до комнатной температуры доводили pH до 5,0 HCl (25%). Разбавляли ацетатным буфером до 50 мл. Для построения калибровочного графика стандарты глюкозы и ксилозы помещали в 0,06 мл ацетатного буфера в пробирку. Образцы не инкубировали при 40 °С, а сразу добавляли DNSA. Полученный раствор инкубировали точно 10 мин. в кипящей водяной бане, затем охлаждали в ледяной бане 5 мин., добавляли 3 мл воды и перемешивали. Абсорбцию измеряли при 530 нм, используя двухлучевой спектрофотометр Lambda 35 Perkin Elmer Ins. Одна единица активности энзима (IU) соответствует количеству фермента, вызывающего выход одного мкМоля восстанавливающих сахаров в минуту при гидролизе соответствующего субстрата. Выход восстанавливающих сахаров определяли по калибровочным графикам, построенным по глюкозе и ксилозе, соответственно.

Протеолитическую активность определяли по казеину [5]. Субстратом служил 2%-ный раствор казеина в 0,1 М Трис-HCl буфере, pH 9,0. Реакционная смесь состояла из предварительно прогретых до 37 °С 1 мл казеина и 1 мл ферментного раствора. Инкубацию проводили в течение 15 мин. при 37 °С, после чего добавляли 2 мл 5%-ного раствора ТХУ и инкубировали при той же температуре еще 20 мин. Смесь отфильтровывали через плотный фильтр. Затем к 1 мл фильтрата приливали 5 мл 6%-ного раствора Na₂CO₃ и 1 мл реактива Фолина. Помещали смесь на 20 мин. в темноту, затем измеряли оптическую плотность против контроля на двухлучевом спектрофотометре Lambda 35 Perkin Elmer Ins при длине волны 670 нм. Контроль ставили параллельно следующим образом: смешивали 1 мл ферментного раствора и 2 мл 5%-ного раствора ТХУ, инкубировали 20 мин. при 37 °С, после чего добавляли 1 мл 2%-ного раствора казеина и выдерживали еще 15 мин. при 37 °С. С фильтратом поступали, как описано выше. Протеолитическую активность определяли по калибровочному графику. При вычислении результатов за одну единицу протеазной активности (U) принимали количество фермента, необходимого для образования 1 мкМ растворимого эквивалента тирозина за 1 мин. в пересчете на 1 мл исследуемого раствора.

Для статистической обработки данных использовали программу Excel. Для сравнения применяли интервальные оценки. Уровень значимости $p < 0,05$. Данные

на рисунках представлены как среднее \pm стандартное отклонение [6].

Результаты и обсуждение

Ранее было сказано, что грибы выращивали на природной экспериментальной среде экстракте ржаных пентозанов объемом 100 мл. В качестве источника углерода культуральные среды содержали растворимые пентозаны, полученные щелочной экстракцией зерен ржи. Полученная культуральная жидкость *Trichoderma* обладала следующими активностями ферментов: ксиланазная – $8,82 \pm 0,31$ IU/ml, целлюлазная – $1,05 \pm 0,10$ IU/ml, протеолитическая – $0,08 \pm 0,01$ IU/ml.

В результате проведения хроматографического исследования гидролизата получены концентрации моносахаридов ксилозы, арабинозы, глюкозы и мальтозы, входивших в исходном материале в состав крахмала и пентозанов. Исходя из этих концентраций и молекулярных масс сахаридов, вычислено содержание соответствующих полисахаридов в исследованных образцах зерна в % воздушно-сухого вещества (ВСВ). Результаты анализа приведены в таблице 1.

Таблица 1

Содержание нецеллюлозных углеводов в зерне злаков, % ВСВ*

Культура	Ксиланоза	Арабиноза	Глюкоза	Мальтоза	Пентозаны	Крахмал
Рожь (фураж)	6,98 $\pm 0,34$	5,95 $\pm 0,30$	60,41 $\pm 1,25$	2,07 $\pm 0,11$	11,37	56,23
Пшеница (фураж)	3,93 $\pm 0,35$	3,16 $\pm 0,25$	56,62 $\pm 1,04$	2,19 $\pm 0,07$	6,24	52,93
Тритикале (фураж)	5,58 $\pm 0,33$	4,61 $\pm 0,31$	59,35 $\pm 1,05$	1,21 $\pm 0,12$	8,97	54,50

*(n=3) ($\alpha \leq 0,05$)

Из результатов проведенных анализов видно, что в составе зерна всех злаков содержится довольно значительное количество пентозанов. Наибольшее их количество до 11,4% содержат фуражные сорта ржи, именно это обстоятельство не позволяет использовать ее в качестве основы кормовых рационов сельскохозяйственных животных. Несколько меньше пентозанов содержит тритикале – 8,97% и пшеница – до 6,24%. Таким образом, из состава зерна тритикале можно сделать заключение о целесообразности исследования применения ксиланаз в процессе гидролиза.

Исследовано влияние ферментов, полученных при культивировании *Trichoderma*, на скорость и глубину гидролиза. Ранее было указано на то, что изучение гидролиза тритикале препаратами *Trichoderma* было проведено при гидромодуле 1:4. С учетом влажности исходного зерна, равной 14,64%, гидромодуль гидролиза составил 1:4,68.

Данные на рисунке 1 показывают динамику содержания растворенных веществ в гидролизате. Как видно из графика, уже после первого часа проведения гидролиза зерна тритикале ферментным комплексом штамма *Trichoderma* содержание растворенных веществ в опытном образце превышает данный показатель в контроле в 1,71 раз.

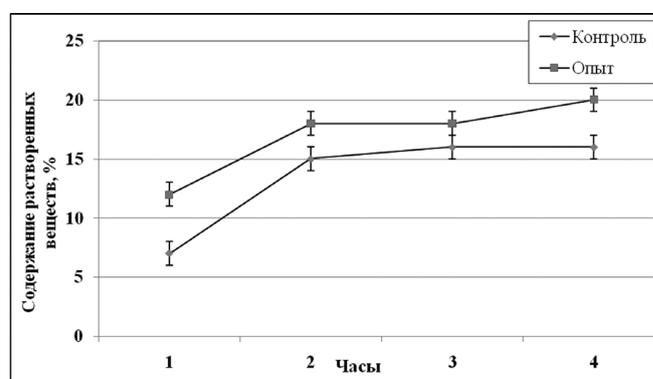


Рис. 1. Влияние добавления ферментов *Trichoderma* на содержание растворенных веществ в ходе гидролиза

Через 3 часа после начала гидролиза, после добавления Термамила содержание растворенных веществ в контроле составило 16%, а в опыте – 18%. После добавления последнего фермента Сахзим содержание растворенных веществ в опытном образце составило 20%, что значительно превышает данный показатель в контроле.

На рисунке 2 показана динамика гидролиза зерна тритикале. Гидролиз в контрольном образце составил 78%, а в опытном образце – 93%. Причем, этот процесс протекал эффективнее на всех его этапах. Эти данные свидетельствуют о высокой эффективности действия ферментного комплекса штамма *Trichoderma* 302.

Как видно на рисунке 3, в опытном и контрольном образцах после проведения гидролиза зерна тритикале количество редуцирующих сахаров составило 28–30% абсолютно сухого вещества (АСВ) зерна тритикале. Как было показано выше (см. рис. 2), глубина гидролиза опытного образца составила 93%, гидролиз в контрольном образце составил 78%. Следовательно, большая часть сахаров ферментализата находится в по-

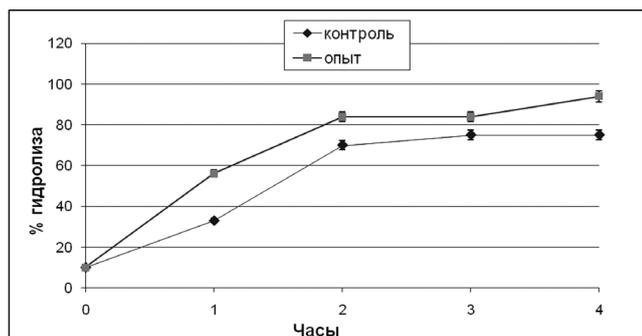


Рис. 2. Увеличение скорости и глубины гидролиза зерна тритикале при добавлении ферментного препарата штамма *Trichoderma* 302

лимерном состоянии. Оценить степень полимеризации углеводов в гидролизате возможно после полного мягкого кислотного гидролиза растворенных полисахаридов.

Для того чтобы гидролизовать все оставшиеся в растворе полисахариды, мы использовали слабый раствор соляной кислоты. Как продемонстрировано на рисунке 4, содержание редуцирующих веществ (РВ) после проведения кислотного гидролиза значительно увеличилось и составило 75% в случае контроля и 85% — в опытном образце. Значительная разница в содержании РВ в образцах вызвана действием ферментов штамма *Trichoderma* 302.

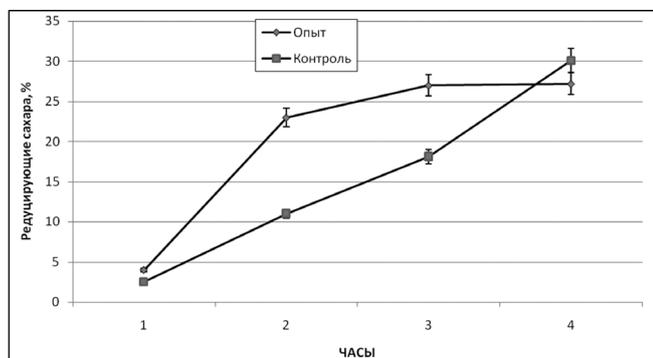


Рис. 3. Влияние добавления ферментов *Trichoderma* на содержание редуцирующих сахаров в % АСВ зерна в гидролизате

Как можно заметить на рисунке 4, в опытном образце содержание РВ до 3-го часа проведения гидролиза изменялось очень плавно, но после 3 часов происходит резкое увеличение содержания РВ. В контрольном образце наоборот: сразу после начала эксперимента содержание РВ резко возрастает, а затем на 2–3-й час выходит на плато. После 3 часов содержание РВ снова слегка увеличивается. По-видимому, это связано с тем, что ксиланазы штамма *Trichoderma* 302, добавляемые в начале гидролиза в опытном образце, конкурируют за

поверхность субстрата с амилазами, добавляемыми через 1 ч гидролиза. И до тех пор пока ксиланазы не гидролизуют пентозаны, находящиеся на поверхности субстрата и не освободят его поверхность, амилазы *Термамила* не могут в полной степени использовать свою активность. Включение в работу амилаз приводит к резкому увеличению РВ в гидролизатах опытных образцов на 3–4-й часы гидролиза.

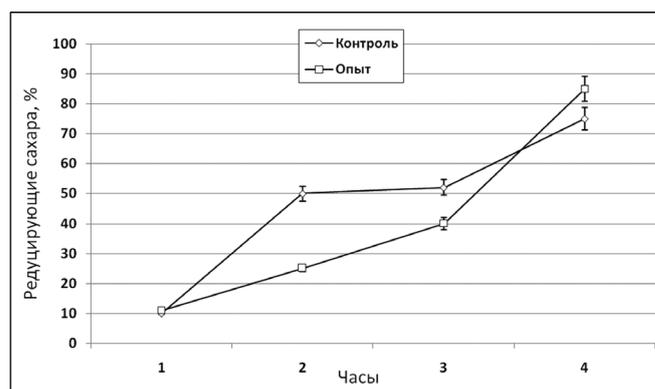


Рис. 4. Влияние добавления ферментов *Trichoderma* на содержание редуцирующих сахаров в % АСВ зерна в гидролизате после проведения кислотного гидролиза пробы

Из полученных данных, которые представлены в таблице 2, можно определить количество пентозанов и крахмала, которое в процессе ферментализации гидролизовалось до моносахаридов и мальтозы. Исходя из формулы [2], количество пентозанов, гидролизованных до мономеров, равно 2,09%, а крахмала — 12,10%. Сравнивая эти данные с показаниями таблицы 1, можно сказать, что около 25% пентозанов исходного зерна гидролизуются до мономеров.

Количество крахмала, гидролизованного до глюкозы и мальтозы, соответственно составляет около 22%. Сопоставляя данные содержания редуцирующих сахаров в опытном гидролизате (см. рис. 3) — 85% — с количеством углеводов, гидролизованных до мономерного состояния (см. табл. 2), видно, что около 75% растворенных в гидролизате углеводов находятся в полимерном состоянии.

Таблица 2

Содержание углеводов в опытном гидролизате тритикале, % ВСВ

Ксилоза	Арабиноза	Глюкоза	Мальтоза
0,43±0,02	1,95±0,30	3,32±0,23	10,12±0,48

*(n=3) ($\alpha \leq 0,05$)

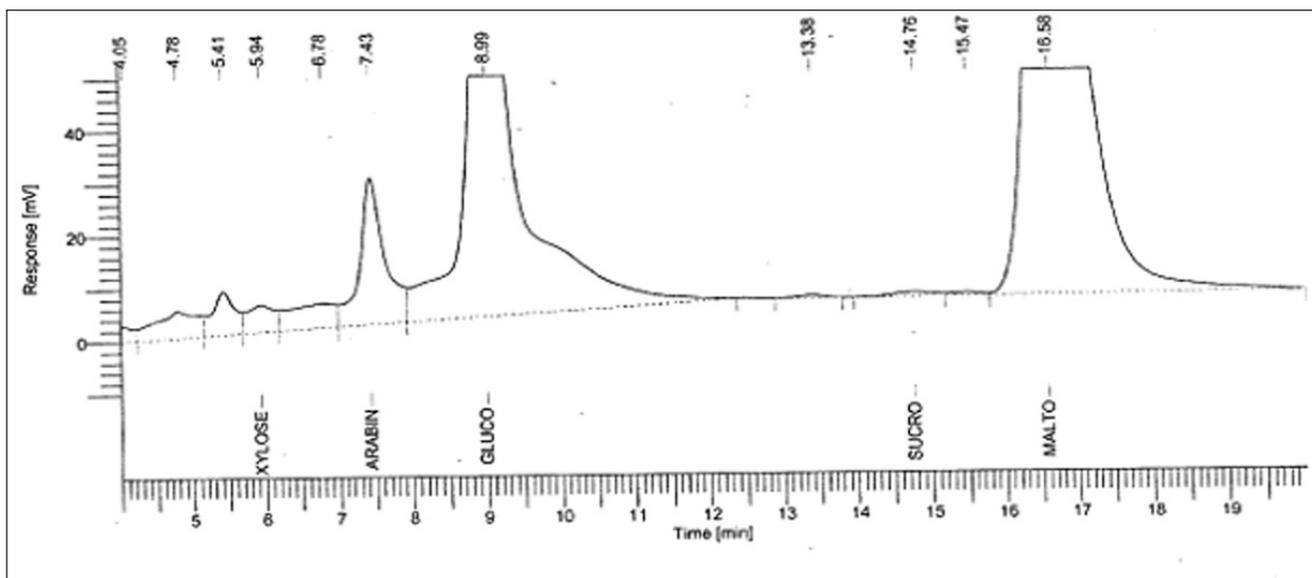


Рис. 5. Хроматограмма опытного гидролизата

На рисунке 5 представлены данные, полученные в результате хроматографии гидролизатов.

Ферментативный гидролиз тритикале в процессе производства кормов принципиально отличается от такового в спиртовой промышленности, прежде всего, необходимостью проведения быстрого процесса. Многочасовые процессы гидролиза, проводимые на спиртзаводах, сделают нерентабельным получение кормовых сахаров из зерна тритикале.

По полученным данным, глубина гидролиза зерна в контрольном образце составила 73% АСВ. При добавлении ферментного препарата *Trichoderma* степень гидролиза увеличилась на 14% и составила 87% АСВ зерна.

Эти данные свидетельствуют о целесообразности применения ферментного препарата *Trichoderma* совместно с амилазами в процессе быстрого гидролиза зерна тритикале.

При сопоставлении данных трехстадийного процесса (см. рис. 2) с результатами одностадийной варки обнаружено, что одноступенчатый процесс уступает лишь 6% гидролиза зерна тритикале, при значительном сокращении времени процесса и, следовательно, энергозатрат.

Следует отметить, что содержание редуцирующих сахаров также больше в опытном образце по сравнению с контролем на 30%.

В опытном образце содержание редуцирующих сахаров составило 58%, а, как было показано выше, степень гидролиза зерна составила 87%; в контрольном образце — соответственно 28 и 73%. Следовательно,

часть растворенных веществ находится в полимерном состоянии.

Оценивали степень полимеризации углеводов в гидролизате после проведения мягкого кислотного гидролиза растворенных полисахаридов. После проведения кислотного гидролиза содержание редуцирующих сахаров увеличилось с 58 до 78% в опытном образце и с 28 до 65% — в случае контроля.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в опытном образце продукты гидролиза имеют меньшую степень полимеризации, что, в свою очередь, говорит о наличии синергизма в процессе одновременной работы ксиланаз *Trichoderma*, эндо- и экзоамилаз и отсутствии блокады поверхности субстрата, что проявляется при поочередном добавлении ферментов, как представлено на рисунке 4.

Данные таблицы 3 отражают содержание углеводов в опытных гидролизатах тритикале после проведения быстрого гидролиза, определенное с помощью хроматографии гидролизатов, что показано на рисунке 6.

Таблица 3

**Содержание углеводов
в опытном гидролизате тритикале, % ВСВ**

Ксилоза	Арабиноза	Глюкоза	Мальтоза
0,54±0,03	0,05±0,02	2,11±0,13	38,12±0,48

*(n=3) ($\alpha \leq 0,05$)

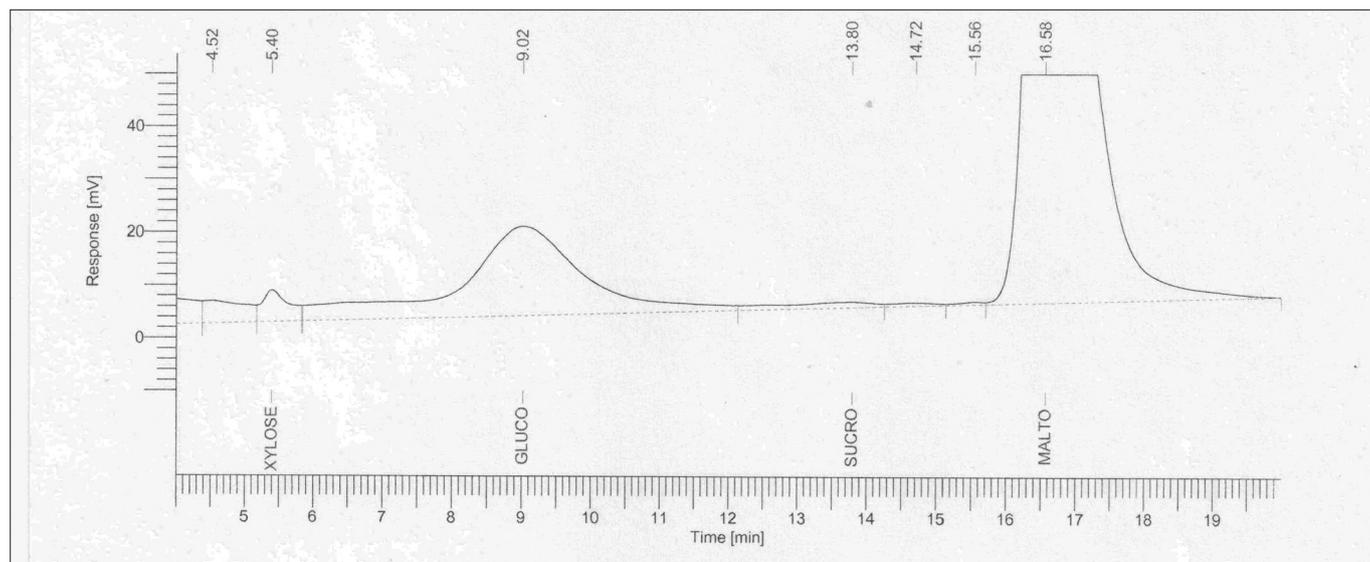


Рис. 6. Хроматограмма опытного гидролизата

Из табличных данных можно определить количество пентозанов и крахмала, которое в процессе ферментализации гидролизовалось до моносахаридов и мальтозы. Исходя из формулы [3], количество пентозанов, гидролизованных до мономеров, равно 0,52%, а крахмала — 36,20%.

Сравнивая эти данные с показаниями таблицы 1, можно сказать, что применение быстрого гидролиза позволяет гидролизовать до мономеров лишь около 6% пентозанов исходного зерна. Количество же крахмала, гидролизованного до глюкозы и мальтозы, напротив, больше, нежели при гидролизе методом спиртовой промышленности, и соответственно составляет около 65%.

При сопоставлении величины содержания редуцирующих сахаров в опытном гидролизате до и после мягкого кислотного гидролиза — соответственно 58 и 78%, обнаруживается, что около 20% растворенных в гидролизате углеводов находятся в полимерном состоянии, что в 2,5 раза меньше, чем при длительном гидролизе, применяемом в спиртовой промышленности.

Заключение

В данной работе определен биохимический состав нецеллюлозных полисахаридов зерна тритикале. Зерно содержит 8,97% пентозанов и 54,5% крахмала.

Нами показано, что применение ферментного комплекса *Trichoderma* значительно углубляет процесс гидролиза зерна тритикале, что может эффективно использоваться в спиртовой промышленности и кормопроизводстве.

Найдено увеличение на 15% глубины гидролиза зерна тритикале при использовании ферментного комплекса *Trichoderma* в технологии спиртовой промышленности.

Установлено увеличение на 14% глубины гидролиза зерна тритикале при применении ферментного комплекса *Trichoderma* в процессе быстрого гидролиза для производства кормов из тритикале.

Литература

1. Алимova Ф.К., Тазетдинова Д.И., Тухбатова Р.И. Биотехнология. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. — Казань, 2007. — 229 с.
2. Bartolome B., Santos M., Jimenez J.J. Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent grain // J. of Cereal Science. — 2002. — Vol. 36. — P. 51–58.
3. Maes C., Delcour J.A. Structural characterisation of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran // J. of Cereal Science. — 2002. — Vol. 35. — P. 315–326.
4. Koenig J., Grasser R., Pikor H., Vogel K. Determination of xylanase, glucanase, and cellulase activity // Anal. Bioanal. Chem. — 2002. — Vol. 374. — P. 80–87.
5. Каверзнева Е.Д. Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеиназ // Прикладная биохимия и микробиология. — 1971. — Т. 7. — № 2. — С. 225–228.
6. Акберова Н.И. Описательная статистика. Интервальные оценки: Учебно-методическое руководство и сборник задач к практическим занятиям по курсу «Математические методы в биохимии». — Казань: Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина. — 2004. — 40 с.

TRITICALE GRAIN HYDROLYSIS WITH ENZYME FUNGI TRICHODERMA

E.V. SKVORTSOV, F.K. ALIMOVA, A.V. SHISHKIN,
E.A. RAFAILOVA, R.P. IBATULLINA

*V.I. Ulyanov-Lenin Kazan State University,
«NPI «Biologies» Ltd., Kazan, Tatarstan*

Use of enzyme complex of *Trichoderma* considerably deepens process of hydrolysis of grain triticale. In this work was shown increase of depth of hydrolysis of grain triticale on 15% at use of enzyme complex of *Trichoderma* in industry alcohol technology. Is established the increase of depth of hydrolysis of grain triticale on 14% at use of enzyme complex *Trichoderma* in the course of fast hydrolysis for manufacture of forages from triticale.

Keywords: xylanase, cellulase, protease, *Trichoderma*, triticale.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭТАПА СОЗРЕВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ ЭМБРИОНОВ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ *PICEA ABIES*

О.А. ЧУРОЧКИНА*, О.Г. ПОПОВА, К.А. ШЕСТИБРАТОВ

Филиал Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии
имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пушкино Московской области

В работе показано, что прекультивация эмбрионного каллуса ели европейской (*Picea abies*) на безгормональной среде непосредственно до этапа созревания и использование в качестве желирующего агента агара ЕТ положительно влияют как на частоту созревания соматических эмбрионов, так и на их морфологию.

Ключевые слова: лесная биотехнология, ель европейская, *Picea abies*, соматические эмбрионы, культивирование.

Процесс соматического эмбриогенеза на примере ели европейской можно разделить на четыре основных стадии: инициация эмбрионного каллуса, пролиферация, созревание эмбрионов, прорастание эмбрионов. Наиболее проблемным этапом является стадия созревания [1]. Ее успешность зависит как от условий культивирования на данном этапе, генотипических особенностей растительного материала, так и от условий культивирования на предыдущих стадиях эмбриогенеза.

В ряде работ сообщается [1–4] о положительном влиянии на процесс созревания соматических эмбрионов прекультивации эмбрионных каллусов в течение 3–7 дней на среде без регуляторов роста. Данная предобработка приводит к снижению эндогенного уровня ауксинов и цитокининов, остаточные количества которых после этапа пролиферации могут ингибировать эффект абсцизовой кислоты на стадии созревания соматических эмбрионов.

Для оценки действия данной предобработки на эффективность созревания соматических эмбрионов ели европейской (*Picea abies*) проведен эксперимент,

в первом варианте которого эмбрионный каллус прекультивировали 6 дней на твердой безгормональной питательной среде NSIII [5] с добавлением 1% сахарозы и 0,3% Gelrite. В контрольном варианте этап предобработки отсутствовал. Эмбрионный каллус переносили непосредственно на среду для созревания соматических эмбрионов (1/2NSIII, 6% сахарозы, 40 мкМ АБА, 0,8% Gelrite).

Каллусные группы после этапа прекультивации оставались плотными и компактными, вторичный рост каллуса не наблюдался (рис. 1Б), формировались соматические эмбрионы. В то время как в контрольном варианте каллус становился рыхлым и пушистым, отмечался вторичный рост (рис. 1А), а после 2–3 недель культивирования на среде для созревания наблюдалось побурение и некроз. На каллусных группах с симптомами побурения соматические эмбрионы не развивались (рис. 1Б).

На этапе созревания излишняя доступность воды в питательной среде может оказывать негативное влияние на формирование и развитие соматических эмбрионов. Устранить нежелательный фактор можно путем добавления осмолитиков [6], увеличения концентрации сахарозы [7] или оптимизации типа и концентрации желирующих агентов.

На этапе пролиферации в качестве желирующего агента чаще всего используется Gelrite в концентрации 0,3–0,4%. В предварительных экспериментах нами проведена оценка влияния концентраций Gelrite в пределах от 0,6 до 1% на созревание соматических эмбрионов. По полученным данным, оптимальная концентрация Gelrite на стадии созревания — 0,8%.

© 2010 г. Чурочкина О.А., Попова О.Г.,
Шестибратов К.А.

* Автор для переписки:

Чурочкина Ольга Александровна — младший научный сотрудник,
группа лесной биотехнологии Филиала Учреждения
Российской академии наук Института биоорганической
химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
(ФИБХ).

142290 Пушкино, Московская обл., Проспект Науки, 6.

Тел.: 8(4967)330966

E-mail: cholga-13@rambler.ru

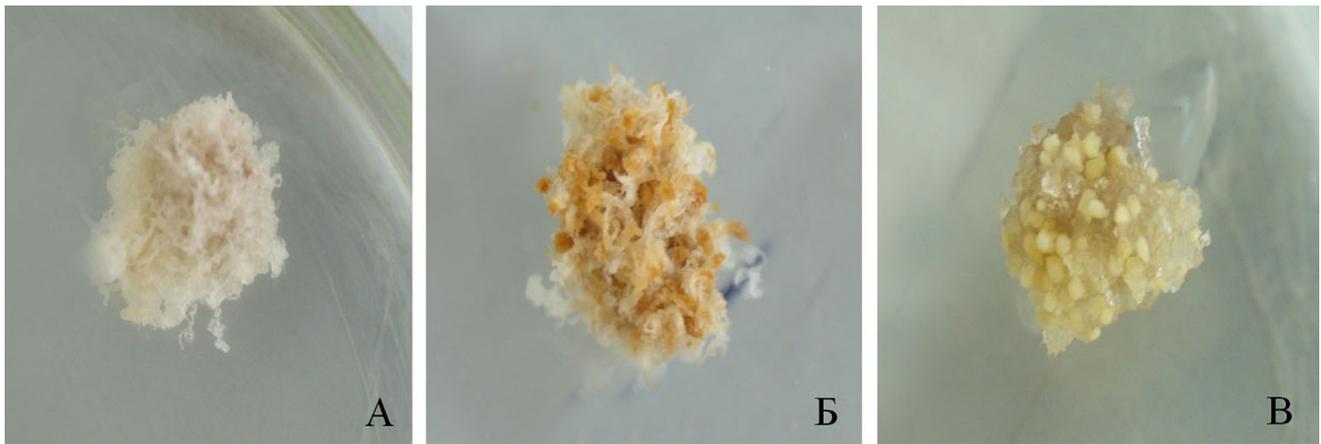


Рис. 1. Характер роста калусных групп на среде для созревания. А — рост каллуса на среде для созревания без этапа предобработки; Б — побурение каллуса без предобработки спустя 2 недели культивирования на среде для созревания; В — развитие соматических эмбрионов на среде для созревания после этапа 6-дневного культивирования на безгормональной среде

Эффективность созревания эмбрионов при данной концентрации была выше в 2–3 раза, чем на средах с 0,6 и 1% желирующего агента (данные не приводятся). Однако после проведения морфологического анализа развившихся соматических эмбрионов выявили довольно большое число витрифицированных эмбрионов, что может быть следствием неоптимального типа желирующего агента.

С целью подбора оптимального типа и концентрации желирующих агентов на стадии созревания проводили сравнение пяти вариантов желирования: 1) 0,3%

Gelrite и 0,8% агар Европейского Типа (ЕТ); 2) 0,6% Gelrite и 0,5% агар ЕТ; 3) 1% агар ЕТ; 4) 1,5% агара ЕТ; 5) 0,8% Gelrite (контрольный вариант).

По истечении 4 нед. культивирования эмбриогенного каллуса на среде для созревания с разными типами и концентрациями желирующих агентов были обнаружены следующие закономерности. Характер роста калусных групп на этапе созревания сильно зависел как от особенностей эмбриогенной калусной линии [8], так и от способа желирования среды. Из 4 калусных линий (110/

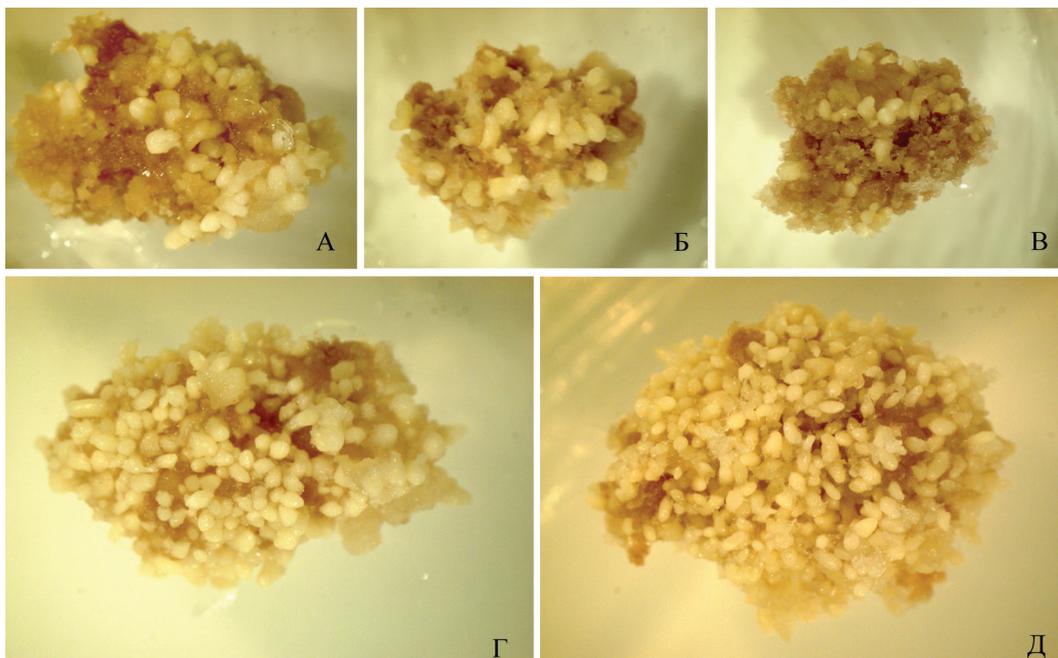


Рис. 2. Влияние типа и концентрации желирующего агента на созревание соматических эмбрионов линии 110/1. А — комбинация желирующих агентов 0,3% Gelrite и 0,8% агар ЕТ; Б — комбинация желирующих агентов 0,6% Gelrite и 0,5% агар ЕТ; В — 0,8% Gelrite; Г — 1% агара ЕТ; Д — 1,5% агара ЕТ.

1, 110/3, 110/9, 75/6) максимальной эмбриогенностью обладала линия 110/1, минимальной — линия 110/9. На рисунке 2 приведены фото калусных групп линии 110/1 после культивирования на среде для созревания с 5 вариантами желирования. Максимальное число и нормальная морфология соматических эмбрионов имеют место только в вариантах с желированием питательной среды агаром ЕТ.

Среднее число эмбрионов, формирующихся на 1 калусной группе линии 110/1, достигало 120 и 102,9 штук при концентрации агара ЕТ 1 и 1,5%, соответственно (рис. 3).

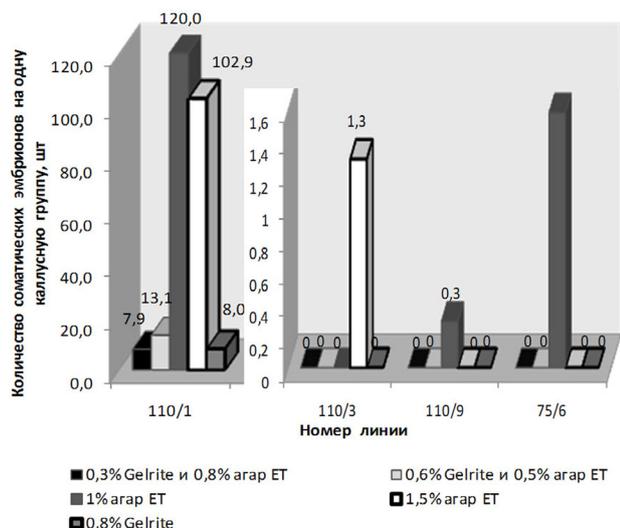


Рис. 3. Число соматических эмбрионов на 1 калусную группу при культивировании на разных типах и концентрациях желирующих агентов

С повышением концентрации желирующего агента наблюдались изменения и в морфологии эмбрионов. В 4-м варианте (1,5% агара ЕТ) форма эмбрионов ближе к торпедовидной, что говорит об успешном созревании. Комбинация различных концентраций 2 типов желирующих агентов не способствовала формированию соматических эмбрионов. Среднее число визуально различимых эмбрионов на 1 калусную группу не превышало 13 у линии 110/1 (см. рис. 3). У 3 других линий формирование соматических эмбрионов при данных условиях не наблюдалось. В кон-

трольном варианте выявлялся некроз калусных групп, а формирование соматических эмбрионов происходило с низкой частотой только у линии 110/1.

Таким образом, основываясь на результатах проведенных экспериментов, можно сделать вывод, что прекультивация эмбриогенного каллуса ели европейской на безгормональной среде непосредственно до этапа созревания и использование в качестве желирующего агента агара ЕТ положительно влияют как на частоту созревания соматических эмбрионов, так и на их морфологию.

Литература

1. Klimaszewska K., Cyr D.R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development // *Dendrobiology*. — 2002. — Vol. 48. — P. 31–39.
2. Harry I., Thorpe T. Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of red spruce // *Bot. Gaz.* — 1991. — Vol. 152(4). — P. 446–452.
3. Becwar M.R., Noland T.L., Wyckoff J.L. Maturation, germination, and conversion of Norway spruce somatic embryos of plant // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* — 1989. — Vol. 25. — P. 575–580.
4. Roberts D.R. Abscisic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce // *Physiol. Plant.* — 1991. — Vol. 83. — P. 247–254.
5. Jain S.M., Newton R.J., Soltes E.J. Enhancement of somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* L.) // *Theoretical and Applied Genetics*. — 1988. — Vol. 76. — P. 501–506.
6. Bozhkov P.V., Arnold von S. Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos // *Physiologia Plantarum*. — 1998. — Vol. 104. — P. 211–224.
7. Arnold von S., Egertsdotter U., Ekberg I., Gupta P., Mo H., Norgaard J. Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*) / In: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. — Kluwer Academic Publishers, 1995. — Vol. 3. — P. 17–36.
8. Jalonen P., von Arnold S. Characterization of embryogenic cell lines of *Picea abies* in relation to their competence for maturation // *Plant Cell Reports*. — 1991. — Vol. 10. — P. 384–387.

EFFECT OF CULTIVATION CONDITIONS ON THE EFFECTIVENESS STAGE OF MATURATION OF SOMATIC EMBRYOS NORWAY SPRUCE *PICEA ABIES*

O.A. CHUROCHKINA, O.G. POPOVA, K.A. SHESTIBRATOV

Branch Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Moscow region

It is shown that precultivation embryogenic callus of Norway spruce (*Picea abies*) on medium without hormones directly to the stage of maturation and use as a gelling agent agar ЕТ positively affect both the rate of maturation of somatic embryos and their morphology.

Keywords: forest biotechnology, Norway spruce, *Picea abies*, somatic embryos, cultivation.

К ВОПРОСУ ВАРИАбельНОСТИ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА СЕМЯН АМАРАНТА: АМИНОКИСЛОТНАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ

Е.Н. ОФИЦЕРОВ*¹, Н.А. ПОТКИН¹, Л.А. МИРОШНИЧЕНКО²

¹ *Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва;*

² *ОАО «Русская олива», Воронеж*

Приведены собственные данные об аминокислотном составе семян амаранта. Актуальность работы обосновывается ее значением для биотехнологического производства.

Ключевые слова: амарант, семена, аминокислотный состав.

В последние годы на мировом рынке появился новый источник сырья для пищевой промышленности, производства БАД, новых медицинских технологий — семена амаранта, обладающие ценным химическим составом, высокой пищевой и биологической ценностью, содержащие широкий спектр биологически активных веществ, а по составу незаменимых аминокислот превосходящие сою [1–5].

Научную основу разработки схемы комплексного использования предопределяет химический состав семян амаранта.

Амарант — травянистое однолетнее растение с крупными листьями, высотой достигающее 3–4 метров и диаметром стебля до 10 см. В нарядных метелках его соцветий образуется до 500000 семян. Семена очень мягкие, расцветка от белых, кремовых, розовых до красных и черных; диаметр — до 1–1,5 мм.

Научные центры России активно ведут работы в области изучения и внедрения амаранта в пищевую промышленность [6–8]. И на сегодняшний день особенно актуальным является практическое применение полученных результатов в:

- хлебопекарной, кондитерской промышленности;
- производстве продуктов диетического, лечебно-профилактического назначения;
- производстве продуктов детского питания;
- химико-фармацевтической промышленности;
- парфюмерно-косметической промышленности;

© 2010 г. Офицеров Е.Н., Поткин Н.А., Мирошниченко Л.А.

* **Автор для переписки:**

Офицеров Евгений Николаевич, д.х.н., профессор, декан факультета технологии органических веществ и химико-фармацевтических средств РХТУ им Д.И. Менделеева, Москва

- масложировой промышленности;
- комбикормовой промышленности.

Перспективы использования амаранта в медицине представлены в работах [9–24]. Итого начального этапа использования амаранта в медицине были подведены на Первом Международном конгрессе по амаранту (Мексика, 1990) [25].

Такой широчайший спектр применения амаранта объясняется наличием во всех частях растения огромного количества биологически активных веществ: аминокислот, микроэлементов, витаминов, протеинов и др. Конечно, самая высокая концентрация этих веществ наблюдается в семенах, из которых по новым технологиям извлекается амарантовое масло.

Однако широкое практическое использование семян амаранта в биотехнологии (производство биотоплива, глубокая переработка) сдерживается рядом особенностей семян, некоторые из которых приведены ниже:

- уникально малый размер зерен крахмала не позволяет использовать разработанные технологии на основе белка бобов сои и семян других растений, так как при переработке семян амаранта образуются гели, желеобразующие массы, не поддающиеся традиционной фильтрации и осаждению [26];
- малый размер гранул крахмала делает неприемлемыми существующие гидроциклонные технологии выделения крахмала из семян амаранта [27];
- значительное содержание масла приводит к образованию белок-липидных комплексов, устойчивых к разрушению;
- высокая генетическая пластичность и, как следствие, вариабельность химического состава при переходе от одного вида амаранта к другому, от одного сорта

к другому затрудняют как разработку универсальных технологий, так и оценку экономической эффективности.

Ранее нами была изучена вариабельность содержания флавоноида рутина в надземной массе амаранта и показано, что в зависимости от вида или сортообразца, а также вегетационной фазы содержание рутина может изменяться от 0,1 до 3,5% на а.с.в.

В настоящем сообщении речь идет о зависимости содержания белка в семенах амаранта от сорта и продукта переработки.

Особенно актуальным этот вопрос стал при разработке на основе семян амаранта амарантового молока, высокобелковых напитков. В настоящее время зарегистрированы торговые марки «Амарантовое молоко» и «Амарантэль», предполагающие создание функциональных продуктов питания на основе семян амаранта. Отрабатываются технологии с применением излучения СВЧ диапазона, ферментных препаратов с целью повышения глубины переработки пищевого сырья и улучшения органолептических свойств новых пищевых продуктов функционального назначения для различных групп населения с учетом медико-биологических показателей.

Однако аттестация разработанных продуктов затруднена вследствие вариабельности химического состава семян, и это ориентирует производителя только на одного поставщика семян амаранта, так как при переходе к другому могут поменяться количественные характеристики продукта.

Это одна из причин, которая побудила нас заняться как анализом литературы по химическому составу семян амаранта, так и провести собственные исследования.

Объектами исследований были выбраны сорта зернового направления Ультра, Кремовый ранний, Харьковский, Кармин и Жайвир, перспективные для интродукции в Центральной черноземной зоне России. Опыт проводили в соответствии с методическими указаниями Б.А. Доспехова (1985) [28], ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса Россельхозакадемии. Показатели фотосинтетической деятельности растений в посевах (площадь листьев, фотосинтетический потенциал — ФП, удельная поверхность площади листьев — УППЛ, удельная поверхность площади растений — УППР, чистая продуктивность фотосинтеза — ЧПФ) определяли по методике А.А. Ничипоровича (1957).

Биохимические анализы содержания протеинов, липидов, углеводов осуществляли в НИИ питания РАМН (г. Москва), в испытательной лаборатории «НТЦ» Комбикорм» (г. Воронеж). Для определения сроков хранения семян и продуктов переработки амаранта

использовали ГОСТ для кислотного, перекисного чисел. Активность фермента липазы рассчитывали на основе реакции гидролиза триглицеридов растительного масла, активность липоксигеназы определяли спектрофотометрически при 234 нм.

Исследования проводили в 3-кратных биологических повторностях. Для определения достоверности результатов применяли методы вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

В таблице 1 приведены литературные данные (за исключением России и стран СНГ) по содержанию незаменимых аминокислот в семенах и листьях амаранта и рекомендованные ФАО нормы.

Таблица 1

Содержание незаменимых аминокислот в листьях и семенах амаранта (данные литературы) и рекомендуемое ФАО

Аминокислоты	Содержание аминокислот в листьях, %	Содержание аминокислот в семенах, %	Рекомендации ФАО, %
Изолейцин	3,15–3,20	3,2–3,8	3,7
Лейцин	4,8–5,2	5,7	5,6
Лизин	5,9–6,5	8,0	7,5
Цистеин + метионин		3,9–4,4	3,4
Фенилаланин + тирозин	4,52–6,63	6,6–7,3	3,4
Треонин	2,19–4,0	3,2–3,7	4,4
Триптофан	0,5–1,8	0,8–1,6	0,46
Валин	3,02–4,2	2,4–4,6	4,1

Как следует из таблицы 1, семена амаранта близки по содержанию незаменимых аминокислот к идеальному белку.

Также были исследованы семена 5 сортов амаранта, выращиваемых на территории России, и была установлена определенная вариабельность химического состава: аминокислотный состав и общий белок (табл. 2). Как становится ясным из таблицы 2, у всех образцов содержание белка колебалось от 12 до 15% на сухую массу. По наибольшей величине данного показателя можно выделить семена сорта Ультра (15,34%) и сорта Кремовый ранний (14,26%).

Анализ аминокислотного состава белка семян амаранта показывает, что по наличию таких незаменимых аминокислот, как тирозин, цистин, валин, гистидин и треонин, а также по заменимым аминокислотам — глю-

Аминокислотный состав семян различных сортов амаранта ($n = 3, p \leq 0,05$)

Аминокислоты	Кармин		Кремовый ранний		Харьковский		Жайвир		Ультра	
	г на 100 г белка	%								
Аргинин	2,17	17,2	2,44	17,1	1,65	12,0	2,17	14,6	2,54	16,5
Лизин	0,64	5,09	0,79	5,54	0,80	5,82	0,90	6,07	0,85	5,54
Тирозин	0,45	3,58	0,48	3,37	0,51	3,71	0,55	3,71	0,57	3,72
Фенилаланин	0,47	3,74	0,87	6,10	0,56	4,07	0,61	4,11	0,55	3,59
Гистидин	0,35	2,78	0,31	2,17	0,32	2,33	0,30	2,02	0,28	1,83
Лейцин	0,68	5,41	0,78	5,47	0,81	5,89	0,85	5,73	0,79	5,15
Изолейцин	0,38	3,02	0,37	2,59	0,43	3,13	0,50	3,37	0,44	2,87
Метионин	0,32	2,54	0,35	2,45	0,36	2,62	0,42	2,83	0,39	2,54
Валин	0,52	4,14	0,57	4,00	0,67	4,87	0,67	4,52	0,69	4,50
Пролин	0,49	3,99	0,55	3,86	0,60	4,36	0,59	3,98	0,60	3,91
Треонин	0,46	3,66	0,50	3,51	0,52	3,78	0,54	3,64	0,50	3,26
Серин	0,65	5,17	0,72	5,05	0,72	5,24	0,80	5,39	0,77	5,02
Аланин	0,46	3,66	0,51	3,58	0,52	3,78	0,56	3,78	0,52	3,39
Глицин	0,84	6,68	0,92	6,45	0,91	6,62	1,02	6,88	1,02	6,65
Цистин	0,33	2,62	0,34	2,38	0,31	2,25	0,35	2,36	0,40	2,61
Триптофан	0,23	1,83	0,25	1,75	0,30	2,18	0,26	1,75	0,25	1,63
Глутаминовая кислота	1,88	14,9	2,15	15,0	2,30	16,7	2,22	14,9	2,52	16,4
Аспарагиновая кислота	1,24	9,87	1,36	9,54	1,46	10,6	1,52	10,2	1,66	10,8
Белок	12,56	100	14,26	100	13,75	100	14,83	100	15,34	100

тамату, аспартату и серину — он очень близок к соевому белку. Отношение лейцина к лизину в протеине большинства исследованных нами образцов семян амаранта приближается к единице, то есть белок амаранта отвечает по данному показателю идеальному протеину [18].

Заключение

Сравнение данных таблиц 1 и 2, а также данных по отдельным аминокислотам, особенно по лизину, и процентному содержанию белка позволяет сделать вывод, что высокая вариабельность отдельных показателей (в данном случае содержание белка и отдельных аминокислот) заставляет при разработке конкретных биотехнологий продуктов ориентироваться на один конкретный сорт, который необходимо указывать и во всей нормативно-технической документации. При переходе к

семенам другого сорта встает необходимость разработки новой нормативно-технической документации и технологических регламентов.

Литература

1. Sala M., Berardi R. Amaranth seed: Le potenzialita // Riv. Ital. Sostanze grasse. — 1998. — Vol. 75. — N 11. — P. 503–506.
2. Чернов И.А., Земляной В.Я. Амарант — фабрика белка. — Казань: Изд-во Казанского ун-та, 1991. — 91 с.
3. Чернов И.А. Амарант — физиолого-биохимические основы интродукции. — Казань: Изд-во Казанского ун-та, 1992. — 90 с.
4. Солоненко Л.П., Железнова Н.Б., Железнов А.В. Химический состав растений различных видов амаранта в условиях Западной Сибири / В сб.: II Международный симпозиум «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». — Пущино, 1997. — С. 28–30.

5. Кононков П.Ф., Гинс В.К., Гинс М.С. Амарант — перспективная культура 21 века. — М.: Изд-во Российского ун-та дружбы народов, 1999. — 296 с.
6. Скурихин И.М., Волгарев М.Н. Химический состав пищевых продуктов. — М.: Агропромиздат, 1987. — 360 с.
7. Матвеева И.В., Пучкова Л.И., Луценко У.Н. и др. Применение муки из семян амаранта при производстве хлеба: Обзор. — М.: ЦНИИТЭИ хлебопродуктов, 1994. — 32 с.
8. Пащенко Л.П., Макеев А.М., Магомедов И.М. Липопротеиновый комплекс из амаранта — биологический улучшитель продуктов // Пищевая промышленность. — 1990. — № 2. — С. 38–40.
9. Коновалов А.И., Офицеров Е.Н. Перспективы использования растений рода *Amaranthus* в медицине / В сб.: I Международный симпозиум «Новые нетрадиционные растения и перспективы их практического использования». — Пущино, 1995. — С. 69–71.
10. Макеев А.М., Мирошниченко Л.А., Суворцев И.С., Джувеликян Х.А. Регенерационные и противоопухолевые свойства амарантового масла / В сб.: III Международный симпозиум «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». — Пущино, 1999. — С. 100–103.
11. Офицеров Е.Н. Амарант — перспективное сырье для фармацевтической промышленности / В сб.: Материалы 1-й Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными растительными ресурсами и создания функциональных продуктов». — М., 2001. — С. 26–27.
12. Коновалов А.И., Шекуров В.Н., Соснина Н.А., Минзанова С.Т., Офицеров Е.Н., Лапин А.А. Технология переработки травы амаранта / В Сб. Материалов научно-практической конференции «Амарант и люпин — источники новых и диетических продуктов». — СПб., 1996. — С. 86.
13. Коновалов А.И., Офицеров Е.Н., Карасева А.Н., Хазиев Р.Ш., Карлин В.В. Патент РФ № 2041232, кл. С/ 07 Н 1/ 08, 17/06. Бюлл. № 22. 1995.
14. Офицеров Е.Н., Хазиев Р.Ш., Карасева А.Н., Коновалов А.И. Химический состав растений рода *Amaranthus* L. / В сб.: I Международный симпозиум «Новые нетрадиционные растения и перспективы их практического использования». — Пущино, 1995. — С. 28–30.
15. Кадошников С.И., Чернов И.А., Кадошникова И.Г., Барсуков П.А., Офицеров Е.Н., Гарусов А.В. Возможности использования амарантовых в качестве источника сырья для получения рутина / В сб.: I Международный симпозиум «Новые нетрадиционные растения и перспективы их практического использования». — Пущино, 1995. — С. 66–69.
16. Дэсалень Т.Л., Мукумов М.Р., Карлин В.В., Соснина Н.А., Офицеров Е.Н. Изучение гликозидов растений рода *Amaranthus* / В сб.: I Международный симпозиум «Новые нетрадиционные растения и перспективы их практического использования». — Пущино, 1995. — С. 33–35.
17. Коновалов А.И., Офицеров Е.Н., Соснина Н.А., Хазиев Р.Ш., Цапаева О.В., Лапин А.А. Патент РФ № 2101294, кл. С/ 08 В 37/ 06. Бюлл. № 1. 1998.
18. Кадошников С.И., Кадошникова И.Г., Галиуллина А.С., Чернов И.А. Фармакологические свойства амаранта / В сб.: Материалы докладов 1-й Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными растительными ресурсами и создания функциональных продуктов». Химия и компьютерное моделирование. Бултеровские сообщения. 2001, № 5 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://chem.kstu.ru/jchem&cs/russian/n5/>.
19. Офицеров Е.Н. Использование амаранта в решении проблемы гипокальциемии // Бултеровские сообщения. — 2005. — Т. 6. — № 2. — С. 56–66.
20. Зеленков В.Н., Офицеров Е.Н. Биологически активное сырье из амаранта для производства биологически активных добавок к пище, пищевых продуктов, напитков с профилактическими свойствами и пробиотиков на основе культур микроорганизмов. Патент РФ 2198554. Приоритет от 12.06.2002.
21. Офицеров Е.Н. Итоги исследования химического состава растений рода *AMARANTHUS* / В Сб. тезисов докладов II Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ». — Казань, 2002. — С. 178.
22. Зеленков В.Н., Офицеров Е.Н., Михеева Л.А. Кальциевый препарат на основе листьев амаранта и медико-биологические аспекты его применения с использованием модели *in vitro* / В сб.: Материалы IV Межд. съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». — СПб., 2002. — С. 575–578.
23. Дэсалень Т.Л., Цапаева О.В., Соснина Н.А., Елькина Г.И., Бравова Г.Б., Офицеров Е.Н., Лапин А.А. Выделение пектина из *Amaranthus cruentus* и изучение его влияния на работу изолированного сердца крыс // Бюлл. эксп. биол. мед. — 1997. — Вып. 1. — С. 90–95.
24. Коновалов А.И., Миронов В.Ф., Соснина Н.А. Комплексная технология получения белково-пектиновых веществ профилактического назначения из фитомассы амаранта и их структурно-химическая характеристика / В сб.: Тезисы докладов Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ». — Сыктывкар, 2000. — С. 11.
25. Primer Congreso Internacional del Amaranto. — Oaxtepec, Morelos, Mexico, del 22 al 27 septembre de 1991. — 230 p.
26. Saunders R.M., Becker R. *Amaranthus*: A potential food and feed resources // Advances in cereal science and technology. — 1984. — Vol. 6. — p. 357–396.

27. Bressani R., Conzalez J.M., Zuniga J., Breuner M., Elias I.G. Yield, selected chemical composition and nutritive value of 14 selections of amaranth grain representing four species // J. Sci. Food and Agr. –1987. – N 38. – P. 347–356.
28. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

ON THE QUESTION OF VARIABILITY OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF AMARANTH SEEDS: AMINO ACID COMPONENT

E.N. OFITSEROV, N.A. POTKIN, L.A. MIROSHNICHENKO

*D.I. Mendeleev Russian Chemical-Technological University, Moscow;
JSC «Russian olive», Voronezh*

We present our own data on the amino acid composition of amaranth seeds. The urgency of the work is justified by its value for biotechnological production.

Keywords: amaranth, seeds, amino acid composition

РЕСУРСОБЕРЕГАЮЩИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В ЗЕМЛЕДЕЛИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

В.М. КАН^{*1}, И.Н. ТИТОВ², А.А. КУСАИНОВА¹

¹ *Институт почвоведения и агрохимии им. У.У. Успанова МСХ РК, Алматы, Республика Казахстан,*

² *Владимирский государственный педагогический университет, Владимир*

В работе исследовали влияние модифицированных цеолитных удобрений, насыщенных гуминовыми и микробными препаратами вермикюльтивирования, на темно-каштановых почвы Заилийского Алатау в условиях проведения интенсивных овоще-кормовых севооборотов. Показана эффективность примененного метода в плане повышения продуктивности почв.

Ключевые слова: земледелие, модифицированные цеолитные удобрения, биотехнология.

Согласно Н.Ф. Реймерсу, все ресурсы планеты конечны (исчерпаемы) и все, что мы берем от природы, рано или поздно придется отдавать. В настоящее время индустриальное потребление природных ресурсов (в том числе и почвы) становится близким к способности природы к саморегулированию. Как только произойдет превышение «потребительского давления» населения Земли над самовоспроизводством природы, начнется ее деградация. Необходим постепенный переход от экономики природопользования к экономике природосохранения. Это — аксиома сохранения человечества и ее цивилизации.

Пути прогрессивного развития почв и их ценность определяются законами, постулатами и аксиомами экологии, земледелия, агроэкологии: закон развития природы за счет окружающей среды; второе правило Тинемана; закон единства растений и среды В.И. Вернадского; правило о четырех экологических факторах (свет, тепло, питание, вода) В.Р. Вильямса; закон минимума Либиха; закон совокупности действия факторов (синергизма) Э.С. Митчерлиха; закон относительности действия лимитирующих факторов Лунгарда-Полетаева; закон толерантности В. Шелфорда; закон необходимости разнообразия.

С учетом этих законов оцениваются оптимальные параметры почв. Факторы, лимитирующие урожай, в наибольшей степени должны определять и ценность почв. То есть, вклад отдельных свойств в ее плодородие и ценность далеко не равнозначен. Очевидно, что разные почвы имеют неодинаковую устойчивость к внешним факторам воздействия и деградации. Критерием плодородия является биоразнообразие в почвах и надпочвенном растительном покрове. Правило меры преобразования природных систем (в том числе почвенные) запрещает при их эксплуатации переходить некоторые пределы, за которыми теряется их способность к самоподдерживанию (самоорганизации, саморегулированию). С практической точки зрения, важно, каков максимально допустимый урожай, загрязнения, максимальная антропогенная нагрузка на нее. Этот показатель определяет и ценность почв, эффективность технологии. В этом смысле для всех почвенно-мелиоративных процессов большое значение имеет емкость ландшафтов, которая понимается как способность принять их и трансформировать определенное количество веществ и энергии при устойчивости функционирования (Кирюшин В.И., 2000).

Правило цепных реакций и «жесткого» управления природой создает объекты, меняющие природные процессы, и ведет к цепным реакциям, значительная часть которых оказывается экологически, социально и экономически неприемлемой в течение длительного периода. Биосистема, попадая в экстремальные условия, упрощается, становится «жесткой», у нее уменьшается число степеней свободы (Шашкин В.В.). Это характерно для окультуренных почв, по сравнению с целинными.

Возможность и целесообразность использования ресурсосберегающих технологий в настоящем и будущем

© 2010 г. Кан В.М., Титов И.Н., Кусаинова А.А.

* **Автор для переписки:**

Кан Вячеслав Максимович, д.с.-х.н., профессор,
главный научный сотрудник Института почвоведения
и агрохимии им. У.У. Успанова,

Республика Казахстан Алматы, Академгородок,

пр. Аль-Фараби, 75В

Тел.: 8 (727) 269-47-37

Факс: 8 (727) 269-47-33

E-mail: kangsoil@mail.ru

**Содержание элементов питания
в орошаемой темно-каштановой почве**

Глубина, см	Гумус, %	Валовые формы, %			Подвижные формы, мг/кг		
		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
0–20	3,03	0,18	0,23	2,94	4,2	4,3	36,0
20–30	2,97	0,16	0,21	2,91	3,5	3,4	41,0
30–40	2,00	0,13	0,15	2,97	3,0	2,7	36,0
40–50	1,35	0,09	0,19	2,76	2,2	0,7	39,0

Удобрения вносили под основную обработку весной и дополнительно летом на варианты замачивания корнеплодов картофеля.

Посев картофеля проводили новым сортами «Астана» и «Тамыр» селекции Казахского НИИ картофельного и овощного хозяйства (КАЗНИИКОХ), предназначенных для подгорной зоны юга Казахстана. Технология возделывания культур общепринятая, и она осуществлялась в соответствии с рекомендациями КазНИИКОХ.

Объектами исследования были темно-каштановые почвы интенсивных овощных севооборотов с такими вариантами внесения: сложные удобрения на основе модифицированного цеолита (МЦ) азотом и фосфором, препараты эффективных микроорганизмов под названием «БАЙКАЛ», Гумистар (Россия) и Гуми-К (гуминовый препарат ГМ продукта мягкой щелочной вытяжки биогумуса с микроорганизмами — технология подана на патент Республики Казахстан, авторы — Кан В.М., Титов И.Н.), сульфат цинка и марганца (ZnSO₄, MnSO₄), опилки древесные, компостированные с ЭМ.

В 2009 году исследовались более сложные биоминеральные удобрения 3–4-го передела на основе цеолита чистого, цеолита, модифицированного нитроаммофосфатом, аммиачной селитрой, биостимуляторами МЭРС (препарат профессора Усманова), ЮВ (анальгетик Института химии им. Бектурова, автор — профессор Ю. Валентина), Гуми-30, Гуми-К (автор — В.М. Кан), фитогормоном ГМ (академика Мурата Гильманова) на темно-каштановых почвах КНИИХОК.

Варианты полевого опыта для разработки нового биотехнологического продукта следующие:

- ЦМ 2 т/га
- ЦМ+MnSO₄
- ЦМ+МЭРС

определяют в значительной мере экономические законы. Капитал и земля вместе образуют вещественное богатство страны на длительный период его использования (Фишер С. и др., 1999). Площадь возделываемых земель в расчете на одного человека определяет уровень жизни в развивающихся странах. Земля относится к экономическим ресурсам, куда также входят трудовые ресурсы, капитал, предпринимательские способности, обладание ресурсосберегающими технологиями.

В современном понимании ресурсосберегающие технологии — это биотехнологии, оптимизирующие почвенно-биологические, почвенно-мелиоративные, экологические процессы, параметры плодородия почв при экономически выраженной доходности и окупаемости, то есть продуктивности почв.

Объектом настоящего исследования явился биотехнологический продукт: модифицированные цеолитные удобрения, насыщенные гуминовыми и микробными препаратами вермикюльтивирования на темно-каштановых почвах Заилийского Алатау в условиях осуществления интенсивных овоще-кормовых севооборотов.

Цель работы — обосновать научные основы, разработать биотехнологические механизмы повышения и воспроизводства плодородия орошаемых почв юга Казахстана.

Определены основные принципы создания биотехнологических механизмов воспроизводства плодородия почв в условиях овощных севооборотов на основе модифицированных минеральными, гуминовыми и биорганическими удобрениями цеолитов Сарыозекского месторождения Алматинской области

Темно-каштановые почвы на лессовидных отложениях отличаются стабильным соотношением состава поглощенных оснований, максимум которых приходится на кальций — 88,9–89,7%. Емкость поглощения — в пределах 16–18 мг/экв. Темно-каштановые почвы на глубине до 30 см содержат 2,97–3,03% гумуса, валовых форм азота — 0,16–0,18%, фосфора — 0,21–0,23% и калия — 2,91–2,94 % (табл. 1).

Полевые опыты проводились в трехкратной повторности в период 2006–2009 гг. Площади опытных делянок с удобрениями составляли 16 м². В опытах по модифицированию цеолитов использовались следующие удобрения и препараты: аммиачная селитра, нитроаммофосфат, сульфат калий, Гумистар, Гуми-К (вытяжка биогумуса продукта вермикюльтивирования), эффективные микроорганизмы (ЭМ) производства России, стимуляторы роста и технологии научных учреждений Республики Казахстан.

- ЦМ+(NH₄NO₃)+Гуми К
- ЦМ+Гуми-30
- ЦМ+Гуми-30 замочка клубней картофеля
- Контроль НАФТ 150 кг
- ЦЧ 2 т/га +НБЮВ
- ЦЧ 2 т/га+Гуми-30
- ЦМ+(NH₄NO₃)+биогумус
- ЦМ+НБГМ
- ЦЧ 2 т/га+МЭРС

Микробиологические процессы воспроизводства плодородия почв. Биотехнологические проблемы повышения продуктивности орошаемых почв и важнейших сельскохозяйственных культур при минимизации энерго- и ресурсозатрат и охраны окружающей среды связаны с созданием высокоэффективных растительно-микробных систем, позволяющих более полно реализовать потенциал растений. Отбор комплементарных растениям ассоциативных микроорганизмов и эффективных препаратов позволяет решить целый ряд проблем оптимизации органо-минерального питания картофеля и их адаптации к неблагоприятным условиям.

Эти задачи решались путем изучения активности азотфиксирующих, аммонифицирующих микроорганизмов, а также степени разложения целлюлозы и желатина в сезонной динамике вегетации картофеля на темно-каштановой почве. Определены целлюлозоразлагающая и ферментативная активность за вегетационные периоды 2006–2009 гг. По разложению целлюлозы особых отличий между вариантами не наблюдается. Высокая ферментативная протеазная активность характерна для всех вариантов опыта. Выделяются варианты с 7-го по 15-й, в которых использовались модифицированные цеолитные биоорганические удобрения.

Продуктивность почв в модельных опытах. Показатели содержания гумуса, подвижных элементов питания (азот, фосфор, калий), их динамические колебания на темно-каштановых почвах в период вегетации картофеля выражены в небольших пределах и не отражают в балансе потребления растений изменения урожайности (рис. 1–3), обусловленные высокой буферностью почв и уровнем обеспеченности элементами питания. Анализ данных по урожайности картофеля сорта «Астана» и «Тамыр» свидетельствует о несомненном существенном влиянии модифицированного цеолита и биоорганических удобрений на его продуктивность. Различия в урожайности (7–72% – 2006 г.; 50–110% – 2009 г.) и качестве продукции картофеля (см. рис. 1) между вариантами обусловлены в основном новым оптимальным уровнем

обеспеченности элементами минерального питания в различные периоды метаболизма растений (рис. 2, Дел. 2, 7, 12, 14). Качественный состав клубней этих вариантов по составу существенно выше, чем в контроле (см. рис. 2).

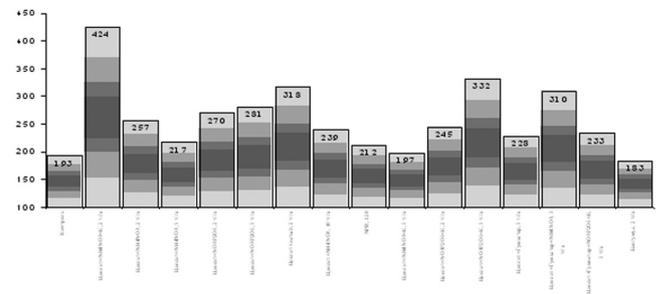


Рис. 1. Влияние биоорганических модифицированных цеолитных удобрений на урожайность картофеля, ц/га (2006 г.)

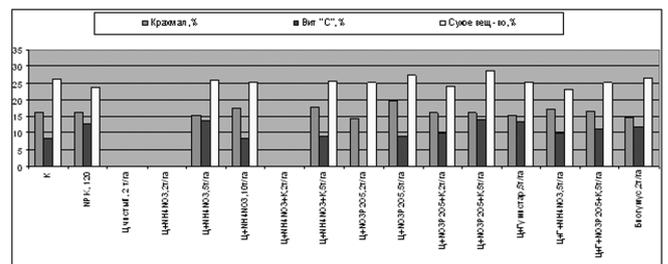


Рис. 2. Качественный состав клубней картофеля сорта «Астана» на ОПУ-2-2006 (Кайнар, 2006 г.)

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Получен новый биотехнологический продукт: модифицированные цеолиты (МЦ) различного уровня передела – до 5 – с пролонгирующими свойствами, служащие биоматрицей гуминовых препаратов и эффективных микроорганизмов.
2. В вегетационных опытах наибольшее число азотфиксаторов приходится на варианты с модифицированными цеолитными гуминовыми и эффективными микробными препаратами (МЦ+ЭМ+Г. и ЭМ+МЦ). Биопрепараты, такие как МЭРС, Гуми К, Гуми-30 и НБГМ, достоверно увеличивали число микроорганизмов в несколько раз.
3. Применение биоорганических удобрений и препарата ЭМ значительно увеличивает число аммонификаторов. В вариантах с Гумистаром и Гумистар+ЭМ, а также с сульфатом цинка число последних доходит до 2,6 млн., тогда как в контроле и в варианте «цеолит чистый» их число не превышает 0,9 и 1,3 млн./г почвы. Максимальный рост аммонификаторов приходится на летний и осенний срок вегетации картофеля.

4. Наиболее высокая активность фермента протеазы весной приходится на варианты МЦ с цинком, марганцем, с ЭМ+гумистар и составляет 85–90%. К осени его активность снижается до 30%.

5. Матрица чистого цеолита содержит меньшее количество инокулированных азотфиксаторов, чем при их насыщении биорганическими препаратами. МЦ как биоматрица более производителен (3–7,5 раз) и функционален во времени из-за оптимизации жизнедеятельности азотфиксирующих микроорганизмов по водообеспеченности и питанию.

6. Модифицированные биоорганические удобрения (аммиачные и нитратные формы и гуматы органических удобрений) с культурами иммобилизованных азотфиксирующих микроорганизмов дают эффект повышения продуктивности почв от 19 до 100%. Продукты модификации обладают оптимальными физико-химическими параметрами, технологичны и экономичны при использовании под рисовые, овощные, технические культуры.

RESOURCE-SAVING BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

V.M. KAN, I.N. TITOV, A.A. KUSAINOVA

*U.U. Uspanov Institute of Soil Science and Agrochemistry MA, Almaty, Kazakhstan,
Vladimir State Pedagogical University, Vladimir*

We investigated the effect of modified zeolite fertilizer rich in humic and microbial preparations vermicultivation on dark chestnut soils Trans-Ili Alatau in intensive vegetable-fodder crop rotation. The efficiency of the technique used in improving soil productivity.

Keywords: agriculture, the modified zeolite fertilizers, biotechnology

ЭТНОГЕНОМИКА НАСЕЛЕНИЯ ЕВРАЗИИ: СОСТОЯНИЕ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Э.К. ХУСНУТДИНОВА*¹, С.А. ФЕДОРОВА²

¹ Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа; ² Якутский научный центр комплексных медицинских проблем СО РАМН, Якутск

В обзоре анализируется современное состояние проблемы этногеномики населения Евразии. Подробно рассматривается вклад отечественных авторов в эту проблему. Определяются также перспективы развития данного направления.

Ключевые слова: этногеномика, Евразия.

Введение

Исследования происхождения, эволюции и разнообразия генома человека в популяциях получили бурное развитие за последние годы в связи с полной расшифровкой генома в начале XXI в. В рамках геномики, изучающей структуру и функции генома, возник новый раздел науки — этногеномика. Основная задача этногеномики состоит в изучении особенностей геномного полиморфизма разных групп народонаселения — отдельных сообществ, этносов, этнотерриториальных общностей — и реконструкции на этой основе их генетической истории. Для описания особенностей структуры генофонда отдельных этносов и оценки филогенетических взаимоотношений между ними используют 3 группы маркеров: митохондриальную ДНК (мтДНК), Y-хромосому и аутосомные локусы. Полиморфизм этих маркерных систем определяется факторами микроэволюции (миграции, селекция, генетический дрейф, мутации), однако характер их вариабельности по-разному отражает действие и результат этих процессов.

Особенности маркерных систем

Митохондриальная ДНК представляет собой небольшую молекулу кольцевой формы размером 16569

п.н., содержащуюся в митохондриях эукариотических клеток. Число копий мтДНК в соматической клетке составляет до 10 тыс. Митохондриальная ДНК построена по принципу максимальной экономии — она практически лишена интронов, а кодирующие последовательности почти соприкасаются или даже слабо перекрываются. МтДНК характеризуется рядом особенностей в сравнении с ядерной: материнским характером наследования, отсутствием рекомбинации и относительно высокой скоростью накопления мутаций [1]. Все вышеперечисленные свойства делают мтДНК удобным и практически незаменимым средством в филогенетических исследованиях. Высокая скорость накопления мутаций в мтДНК связана:

- 1) с отсутствием в митохондриях гистонов — белков, которые компактизуют и защищают ядерную ДНК,
- 2) с большей вероятностью повреждения ДНК кислородными радикалами, образующимися при работе дыхательной цепи митохондрий,
- 3) с меньшей эффективностью работы репарационных систем митохондрий по сравнению с ядерными системами репарации.

В митохондриальном геноме мутации возникают в десятки раз быстрее, чем в ядерном. По сравнению с ядерными локусами мтДНК имеет в четыре раза меньшую эффективную численность в популяции, что определяет большую подверженность случайным флуктуациям и эффекту генетического дрейфа.

Соответственно мтДНК позволяет уловить эффекты основателя или эффекта «горлышка бутылки» в популяции, неразличимые на уровне ядерных локусов. В крайних ситуациях дрейф генов может полностью уничтожить в мтДНК сигналы этих событий в историческом прошлом популяции.

© 2010 г. Хуснутдинова Э.К., Федорова С.А.

* Автор для переписки:

Хуснутдинова Эльза Камилевна, д.б.н., профессор, зав. отделом геномики, Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики УНЦ РАН 450054 Уфа., пр. Октября, 71.
Тел.: (347) 235-60-88, моб. 8 (905) 358-38-09
E-mail: elzakh@rambler.ru

Передача мтДНК по материнской линии без рекомбинации (от матери ко всем ее потомкам и далее только дочерью) определяет то, что мутации, возникшие в мтДНК единожды, сохраняются и передаются неизменными в ряду поколений как единый локус (гаплотип). С возникновением новой мутации появляется новая линия. По спектру линий мтДНК в популяции можно проследить эволюционные взаимосвязи между древними и вновь возникающими линиями и, более того, реконструировать генетическую историю женского генофонда популяции.

В отличие от локусов ядерной ДНК, где эволюционные изменения прослеживаются главным образом по варибельности частот различных аллелей в популяциях, митохондриальная ДНК дает возможность восстановить действительную филогению, то есть последовательность возникновения носителей различных мт-гаплотипов в эволюционном ряду. Филогенетические взаимосвязи между линиями изображаются в виде дерева, имеющего корень, ствол, более древние большие ветви и мелкие веточки, возникшие в относительно недавнем прошлом.

Реконструкция эволюционного древа с учетом времени коалесценции линий и в совокупности с географическими, палеонтологическими и археологическими данными составляет основу филогеографического подхода, который в последнее время получил широкое распространение в исследованиях происхождения человека, рас и отдельных этносов [2].

Размер Y-хромосомы — около 60 млн. п.н. Уникальным отличием Y-хромосомы является то, что она определяет пол, специфична для мужчин и передается от отца к сыновьям без рекомбинации большей ее части. Нерекombинирующая часть Y-хромосомы (NRY — non-recombining region of the Y) не подвергается обмену участками с X-хромосомой в процессе мейоза и составляет 95% от общей длины. Мутации, возникшие в Y-хромосоме, сохраняются и передаются единым блоком в интактном виде от поколения к поколению. Нерекombинирующая часть наследуется как единый локус, и последовательность накопления в нем мутаций поддается расшифровке подобно записи исторических событий на древнем пергаменте, описывающей происхождение и эволюцию отцовских линий. С этой точки зрения, Y-хромосома является аналогом мтДНК, которая предоставляет информацию об эволюции материнских линий.

Но, в отличие от мтДНК, Y-хромосома имеет гораздо большие размеры, потенциально является более

полиморфной и, как следствие, более информативной системой. Резкое увеличение количества новых маркеров, открытых за последнее время, повысило уровень разрешения филогенетических исследований.

Помимо вышеперечисленных особенностей еще одной является то, что численность Y-хромосом в популяции составляет 1:4 по сравнению с аутосомами и 1:3 — по сравнению с X-хромосомами. Поэтому Y-хромосомы, так же, как и мтДНК, более подвержены эффекту генетического дрейфа, сильно меняющего частоты различных гаплотипов в популяциях с малой эффективной численностью. Как следствие, степень генетической подразделенности популяций по Y-хромосоме намного выше, чем по аутосомным локусам.

На географическое распределение вариантов Y-хромосомы, помимо генетических факторов (дрейф генов, эффект основателя в популяциях), сильное влияние оказывают демографические и социальные факторы. Примерно 70% современных обществ характеризуются патрилокальностью. Это означает, что мужчины живут ближе к месту их рождения, чем женщины: при заключении брака, как правило, женщина переезжает на место жительства мужа, а не наоборот.

Со временем этот фактор увеличивает различия в распределении вариантов Y-хромосом и может приводить к градиентному распределению линий в стабильных популяциях большого размера. Следствием патрилокальности объяснялись данные распределения типов Y-хромосомы в Европе [3] и на островах Юго-Восточной Азии [4]. Влияние социальных факторов может иметь прямо противоположный эффект. Например, поток генов при экспансии европейцев на территорию Америки или Океании за последние 500 лет происходил, в основном, за счет мужчин и сильно повлиял на спектр вариантов Y-хромосомы, но не мтДНК, в популяциях Полинезии, Гренландии и Южной Америки.

Если по полиморфизму митохондриальной ДНК и Y-хромосомы можно получить характеристики женского и мужского генного пула в популяциях, то исследование полиморфизма аутосомных локусов позволяет определить особенности разнообразия генома человека в популяциях в целом.

При использовании всех трех систем маркеров для характеристики структуры генофонда и филогенетических взаимоотношений между народами формируется целостное, более объективное представление. Различные системы маркеров значительно дополняют друг друга, особенно в тех случаях, когда вследствие стохастических процессов в популяциях и/или особенностей их форми-

рования та или иная система маркеров не может в достаточной мере ответить на поставленные вопросы.

Этапы развития популяционной генетики

За последние десятилетия произошла очень быстрая смена подходов, методов и объектов исследования в популяционной генетике человека.

1-й этап: 60–80-е гг. XX века. Популяционный подход (объект — популяция). Генетико-популяционные исследования в большей степени основывались на анализе иммунобиохимических маркеров — систем иммуноглобулинов, групп крови, белков и ферментов сыворотки крови. Генетические реконструкции базировались на основе изучения варибельности частот различных аллелей в популяциях. В результате этих работ был накоплен значительный массив данных по генетическому разнообразию в популяциях, генетическим взаимоотношениям и степени генетической дифференциации популяций отдельных регионов [5].

2-й этап: 90-е гг. XX века. Филогенетический подход (объект — нерекомбинантные участки генома (мтДНК и Y-хромосома). Анализ особенностей геномного полиморфизма на этом этапе был направлен на решение вопросов происхождения современного человека и определения магистральных путей расселения по планете. По данным полиморфизма мтДНК и Y-хромосомы, в популяциях были созданы модели «митохондриальной Евы» [6] и «Y-хромосомного Адама» [7], согласно которым, современные люди представляют собой потомков относительно недавно образовавшейся эволюционной ветви *Homo sapiens sapiens*, возникшей на территории юго-восточной Африки. Определение скорости возникновения мутаций в различных участках мтДНК и в Y-хромосоме сделало возможным расчет времени генерации разнообразия, то есть времени появления наименее древнего общего предка TMRCA (time of most recent common ancestor) — в пределах 200 тыс. лет по обеим маркерным системам. Было установлено, что предки современного человека покинули пределы Африки относительно недавно ~ 60–75 тыс. лет назад и населили планету, полностью вытеснив архаичных гоминид, существовавших до этого на других континентах, без смешивания с ними. Разработана классификация и определена базовая структура филогенетических деревьев мтДНК и Y-хромосомы. На основе изучения структуры и распределения линий мтДНК и Y-хромосомы в различных регионах составлена карта расселения людей с африканской прародины.

3-й этап: 2000-е гг. Филогеографический подход (объект — отдельные кластеры мтДНК и Y). Этот подход предполагает изучение географического распределения отдельных кластеров мтДНК и Y-хромосомы с определением времени коалесценции и в совокупности с географическими, палеонтологическими и археологическими данными [см. 2]. Накоплен большой массив данных об изменчивости мтДНК и Y-хромосомы в различных популяциях и этнических группах в глобальном масштабе. К настоящему времени разработана детальная классификация линий мтДНК (<http://www.phylotree.org>) и Y-хромосомы [8]. В достаточной мере на сегодняшний день классифицированы митохондриальные и Y-хромосомные гаплотипы у населения Западной и Восточной Евразии, Африки, Австралии и Америки. Установлено, что в распределении линий наблюдается выраженная региональная специфичность, что позволяет определять соотношения генетических компонентов различного происхождения в смешанных популяциях.

4-й этап. Современные методы и подходы в этногеномике (объект — индивид (популяция)). Совершенствование методов секвенирования делает возможным анализ уже на уровне индивидуальных геномов. Общепринятым становится полногеномное генотипирование небольших популяционных выборок с использованием сотен тысяч SNP. Особую актуальность приобретают работы, связанные с более глубоким изучением эволюционной и демографической истории отдельных регионов и этносов. Изучение генетических различий между популяциями становится чрезвычайно важным для проведения ассоциативных исследований (при поиске генов предрасположенности к определенным болезням), так как полученные ассоциации могут оказаться ложными в результате различий в частотах аллелей между популяциями.

Исследования российских ученых

Разработками в области этногеномики и молекулярной филогеографии в России занимается целый ряд известных научных коллективов.

Новосибирскими исследователями под руководством Р.И. Сукерника (Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск) получены фундаментальные данные по изменчивости и эволюции мтДНК, HLA-генов и Y-хромосомы на территории Сибири, от Приуралья до побережья Берингова и Охотского морей и низовьев Амура, расширены и уточнены существующие представления о генетической истории

народов Сибири — кетов, нганасан, манси, юкагиров, чукчей, азиатских эскимосов, коряков, ительменов и др., прояснен ряд вопросов, связанных со временем первоначального заселения и самим процессом колонизации Нового Света человеком, впервые определена филогения и разработана классификация типов мтДНК, характерных для Восточной Евразии [9–13].

М.В. Деренко (Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, г. Магадан) получены наиболее детальные представления о структуре генофондов этнических групп Южной Сибири [14–15]. Впервые в генофондах некоторых этнических групп Южной Сибири выявлены линии мтДНК, предковые по отношению к линиям-основательницам генофондов коренного населения Америки, и сделан вывод об участии древнейшего населения Алтае-Саянского и Байкальского регионов в процессах заселения Америки [16]. На основании данных об изменчивости 286 целых митохондриальных геномов у представителей 20 этнических групп Северной и Восточной Азии реконструирована филогения основных западно- и восточноевразийских групп мтДНК, оценено генетическое разнообразие и эволюционный возраст монофилетических кластеров [17]. Показано, что митохондриальные генофонды этнических групп Северной Азии представляют собой иерархические системы, представленные группами линий мтДНК различной этнорегиональной специфичности — от широко распространенных, маркирующих собой самые ранние этапы заселения Северной Азии, до узкорегиональных и этноспецифических, связанных с формированием этнолингвистических, этнокультурных и/или этнических общностей. Полученные результаты являются важным вкладом в решение проблем заселения Северной Азии и Америки, реконструкции концевых ветвей филогенетического дерева мтДНК, в уточнении и детальной классификации типов мтДНК, определении генетических взаимоотношений между народами Северной, Центральной, Восточной и Западной Азии.

Б.А. Малярчук (Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, г. Магадан) охарактеризована структура и разнообразие митохондриального генофонда западных, южных и восточных славян, проанализированы генетические взаимоотношения между различными группами, оценено генетическое положение славян среди европейских народов, реконструированы ранние этапы генетической истории [18–19]. На основании данных об изменчивости мтДНК в европейских популяциях сделан вывод о центрально-европейском происхождении предков восточных славян и о существен-

ной роли в этногенезе русского народа таких факторов, как межэтническая метисация и ассимиляция. Впервые проведен геногеографический анализ русских популяций, населяющих европейскую часть России, и показано трехзональное деление этнического ареала русских и различное — собственно славянское, смешанное и дославянское (финно-угорское) — происхождение населения этих зон.

Е.В. Балановской и О.П. Балановским (Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва) на обширном материале (14 популяций, $n=1228$) детально охарактеризован мужской генофонд русских [20]. Установлены: 1) незначительный вклад азиатских линий; 2) существование градиента частот специфических гаплогрупп в направлении север-юг в пределах исторической зоны; 3) существование выраженных генетических различий между северными, с одной стороны, центральными и южными популяциями, с другой; 4) генетическая близость северных популяций русских к северо-восточным и восточным неславянским (финно-угорским) народам, что предполагает интенсивные процессы ассимиляции или даже замены языка; 5) низкий уровень генетического разнообразия в центральных и южных популяциях, в отличие от северных; 6) генетическая близость центральных и южных русских с украинцами, белорусами и поляками.

В.А. Степановым с сотр. (Институт медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, г. Томск) проведено филогенетическое и филогеографическое исследование гаплотипов Y хромосомы человека и аутосомных локусов у населения Восточной и Юго-Восточной Европы, Средней Азии и Сибири [21–25]. Получены оценки уровня наследственного разнообразия и степени генетической дифференциации населения Северной Евразии на различных уровнях иерархической организации генетической структуры народонаселения — на уровне локальных популяций, этносов, территориальных и лингвистических групп, населения региона в целом. Исследована роль антропологических, лингвистических и географических факторов в формировании структуры генетической дифференциации популяций и показано, что влияние географической дифференциации на генетическую структуру популяций является гораздо более выраженным, чем роль лингвистических различий. Проведен анализ генетических взаимоотношений между современными этническими группами, проживающими на территории Сибири и Средней Азии, реконструирован процесс заселения современным человеком этой территории, выявлены пути, источники и ориентировочные датировки миграционных событий.

Исследователями Института биохимии и генетики УНЦ РАН (г. Уфа) получены детальные характеристики структуры генофонда народов Волго-Уральского региона, Кавказа и Средней Азии с использованием оценки генетического разнообразия мтДНК, Y-хромосомы и ауtosомных ДНК-локусов, проанализированы данные по 8000 индивидам из 60 популяций Евразии, сформирована целостная картина генетических взаимоотношений между популяциями [26–37]. Эти регионы представляют особый интерес в силу особенностей этнической истории населяющих эти территории народов, сложности антропологической и лингвистической структуры, уникальности географического положения. Различный паттерн распределения Alu-инсерций и наблюдаемый градиент частот мтДНК свидетельствует о древних миграциях преимущественно вдоль степного пояса Евразии в направлении восток-запад. Установлено, что региональная дифференциация выражена слабее, нежели дифференциация согласно языковым семьям, что свидетельствует о том, что, несмотря на общность языка анализируемых народов и известные исторические и этнографические данные об их общих исторических корнях, территориальная близость, по-видимому, привела к сглаживанию существовавших ранее этногенетических различий и большей генетической близости нынешних популяций, нежели их историческая лингвистическая и этнокультурная общность. По ауtosомным локусам популяции Волго-Уральского региона являются более дифференцированными, нежели популяции Средней Азии или Северного Кавказа, что согласуется с лингвистическими и антропологическими данными о сложности этногенеза народов данного региона России, в пределах которого проходил наиболее активный процесс контактов и взаимодействия групп с различными расовыми и антропологическими характеристиками.

Впервые проведен детальный филогеографический анализ гаплогрупп мтДНК и Y-хромосомы в 24 популяциях Кавказа, выявлены регионально-специфические маркеры. Установлено, что генетический пул популяций Кавказа сложился в большей степени за счет миграции с юга — с территории Ближнего Востока; при этом Кавказ может рассматриваться скорее как барьер для миграции анатомически современного человека на территорию Евразии после выхода из Африки, нежели как один из путей миграции. Результаты по распределению частот субкластеров гаплогрупп H1 мтДНК, R1a1a7 и I Y-хромосомы, а также их разнообразия в популяциях Европы, Кавказа и Ближнего Востока свидетельствуют также о существовании обратной миграции с территории

Европы на Кавказ, что не было показано ранее ни одним из авторов.

Федоровой С.А. и соавт. (Якутский научный центр комплексных медицинских проблем СО РАМН, г. Якутск) впервые проведено исследование структуры генофонда народов Якутии (якуты, эвенки, эвены, юкагиры и долганы) как целостной популяционной системы с использованием оценки генетического разнообразия митохондриальной ДНК, Y-хромосомы, ауtosомных локусов, сцепленных с наследственными болезнями. Полученные данные позволили охарактеризовать структуру генофонда коренного населения Якутии, получить генетические портреты отдельных этносов, проследить эволюционные процессы на примере основных типов мтДНК и Y-хромосомы, распространенных в Республике Саха (Якутия), сопоставить генетические реконструкции с историческими данными о происхождении коренных народов Якутии и получить однозначную генетическую оценку по некоторым спорным вопросам этногенеза [38–41]. Популяции Якутии имеют низкий уровень генетических различий, что отражает общность происхождения и/или достаточно интенсивный поток генов между популяциями. При этом особенности генетических портретов популяций Якутии по отцовским линиям намного более ярко выражены, чем по материнским. Различия в степени дифференцированности материнского и отцовского генофондов населения Якутии обусловлены эффектом основателя в популяциях саха и эффектом патрилокальности. Охарактеризованы генетические взаимоотношения между изученными популяциями и установлено положение генофонда народов Якутии в системе генофондов популяций соседних регионов (Чукотки, Камчатки, Дальнего Востока, Северного Китая, Монголии, Южной и Западной Сибири). Получены также новые данные по древней ДНК из погребений эпохи средневековья и позднего неолита Якутии [см. 40].

Проблемы и перспективы

Несмотря на существенный прогресс в этногеномных исследованиях, остается ряд нерешенных проблем: 1) исследована лишь малая часть генома на небольших популяционных выборках, 2) отсутствие маркеров Y-хромосомы с достаточной разрешающей способностью, 3) необходимость более точной калибровки молекулярных часов для разного набора маркеров мтДНК и Y хромосомы. Решению некоторых из перечисленных проблем может помочь применение нового подхода в этногеномике — полногеномного генотипирования. В

2008 г. появились первые статьи, посвященные полногеномному анализу однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), благодаря интенсивной разработке чиповых технологий разными компаниями [42]. Всего известно около 20 млн. SNPs. В настоящее время созданы чипы, которые позволяют одновременно анализировать от 96 тыс. до 1 млн. SNPs в одном образце; в перспективе предполагается увеличить их число до 5 млн.

Существует 2 подхода для оценки генетического предка каждого индивидуума: модельная оценка предка (model-based ancestry estimation) и алгоритмическая оценка предка (algorithmic ancestry estimation). Для модельной оценки предка индивидов разработаны 4 программы: STRUCTURE, FRAPPE, EIGENSTRAT, ADMIXTURE.

Все эти программы рассматривают каждый персональный геном как имеющий происхождение от K предковых гипотетических популяций, чье участие или вклад описывается K коэффициентом (K — количество предковых популяций).

Изучение 650000 SNPs у 1064 индивидуумов из 51 популяции мира — Африки, Европы, Ближнего Востока, Южной/Центральной Азии, Восточной Азии, Океании и Америки — позволило детально охарактеризовать генетическое разнообразие в мире, дифференцировать все популяции на отдельные континенты и регионы и отнести индивидов к определенным популяциям [см. 42]. Результаты анализа SNPs согласуются с гипотезой о последовательном эффекте основателя с единственным центром происхождения в Африке. Цитируемые авторы первыми показали возможность оценки генетического предка каждого индивида без знания его популяционной принадлежности. Сходные результаты были получены еще в 2002 году Розенбергом с соавт. при изучении 377 тыс. аутосомных микросателлитных локусов, но разрешающая способность такого подхода была намного ниже, чем при использовании полногеномного анализа SNP [43].

Более интенсивно в настоящее время исследуются популяции Европы. Несмотря на низкие средние уровни различий между европейскими популяциями было найдено полное соответствие между генетическими и географическими расстояниями при анализе генома 3192 человек по 500 тыс. SNPs (Affimetrix GeneChip Human Mapping 500 K Array Set) [44]. Индивиды из одного и того же географического региона образовывали один кластер и основные популяции четко разделялись. Различия по генетической структуре были обнаружены даже между группами людей, говорящими на французском, не-

мецком и итальянском языках и проживающими в одном регионе — в Швейцарии. Кроме того, было показано, что результаты важны в перспективе для индивидуального генетического тестирования предков. ДНК индивидов может быть отнесена к их географическому происхождению или положению с удивительной точностью — внутри нескольких сотен километров.

Эстонскими исследователями был проведен анализ генома более 3000 индивидов из 16 стран Европы по 270000 SNPs (Illumina Human 370 CNV chip) и показано, что генетическая структура популяций Европы тесно коррелирует с географией [45]. На РС-карте четко выделяются 4 кластера, образованные популяциями: 1) Финляндии; 2) Балтики, Польши и Западной России; 3) Италии; 4) Центральной и Западной Европы. Кроме того, обнаружена четкая дифференциация субпопуляций и показано, что субструктурированность популяций Эстонии, Чехии, Финляндии, Германии и Италии коррелирует с географией индивидуальных округов.

При полногеномном анализе 6000 индивидов из 13 популяций Европы по 300 тыс. SNPs обнаружен четкий восточно-западный градиент от России до Испании и северно-южный градиент от Норвегии и Швеции до Румынии и Испании [46]. Различия в частотах маркеров в трех отдельных геномных областях, окружающих локусы LCT, HLA, HERC2, были строго ассоциированы с этим градиентом. Основной вывод, сделанный в работе, — сильная корреляция между генетической и географической близостью. Авторы предложили метод предсказания этнического происхождения с помощью сравнения генотипов анализируемого образца с генотипами опорного набора образцов известного происхождения. Уменьшение числа SNPs уменьшает уровень разрешения при анализе структуры популяции и не позволяет предсказать происхождение образца. Результаты подобных исследований важны для проведения ассоциативных исследований, поскольку гетерогенность между изученными образцами может дать ложноположительные результаты в ассоциативных исследованиях. Ассоциация с признаком может быть результатом предковых различий в частотах аллелей между группами.

Adam Auton et al. (2009) представлены результаты генотипического и гаплотипического разнообразия среди 3845 индивидов из разных популяций мира, включая Латинскую Америку, Индию, Юго-Восточную Азию [47]. У мексиканцев найдено в среднем 33% европейских предков. В Восточной Азии четко дифференцируются японцы, популяции Тайваня и Китая. В случае индивидов из Мексики европейский

компонент имеет, очевидно, недавнее происхождение в результате смешения коренного населения с выходцами из Европы, в то время как небольшой европейский компонент в Южной Азии, скорее, отражает общее происхождение.

Различные исследования доказывают роль адаптации в современной эволюции человека, включая результаты с использованием полногеномного анализа SNP и анализа сигналов селекции в кандидатных генах [48]. В последние годы был открыт ряд локусов, важных для адаптации человека, были идентифицированы гены, вовлеченные в пигментацию кожи, морфологию волос, лактазную недостаточность. Доказана роль географии и популяционной истории в распространении селективно благоприятных аллелей. Обнаружено неафриканское распространение KTTLG гена, который отвечает за более светлый цвет кожи, западно-евразийское распространение гена SLC24A5, ответственного за более светлый цвет кожи, и восточно-азиатское распространение MC1R гена, отвечающего за цвет кожи и волос.

Полногеномный анализ 650000 SNP у 938 индивидов из 53 популяций мира позволил обнаружить сигналы недавней положительной селекции в генах NRG-ERBB4 сигнальных путей, вовлеченных в развитие тканей сердца, нервной ткани и молочной железы в неафриканских популяциях [49]. Варианты в этих генах ассоциированы с риском шизофрении и ряда психиатрических заболеваний. Обнаружено обширное перекрытие между популяциями в одном и том же континентальном регионе, но ограниченное перекрытие между популяциями за пределами этих групп.

Уже сегодня становится доступным ресеквенирование полных геномов человека и это даст возможность иметь доступ к аллелям с низкой частотой, а дальнейшее развитие статистических методов позволит нам использовать паттерны гаплотипического разнообразия. В настоящее время, когда завершен HarMap проект, позволивший идентифицировать 8 млн. SNPs, международное научное сообщество по изучению разнообразия генома человека развивает следующий грандиозный проект — 1000 Genome Project, по полногеномному секвенированию ДНК 2000 человек из 20 стран Африки, Европы, Азии и Америки [50]. Основная цель проекта — описать генетические полиморфизмы, частота которых в популяциях составляет более 1%.

Стоимость секвенирования генома одного человека сильно изменилась и стала намного дешевле. Так, затраты на секвенирование в 2003 году составили 300—400 млн. долл. (выполнено в течение 3650 дней,

то есть 10-летний период выполнения проекта «Геном человека»), в 2005 году — 10 млн. долл., в 2007 году — 1 млн. долл. (365 дней), в 2008 году — 70—100 тыс. долл. (100 дней), в 2009 году — 4400 долл. (1 месяц, Complete Genomics)

В перспективе ожидается стоимость секвенирования индивидуального генома — 1000 долларов за 1 день.

Задачи и перспективы в этногеномике:

- Каталогизация генетического разнообразия (маркеры / популяции).
- Детальный анализ региональных генофондов (изучение эволюции, происхождения, миграции).
- Уточнение глобальной картины, полученной по мтДНК, Y хромосоме и с помощью полных геномов.
- Изучение роли естественного отбора в формировании и структуризации генетического разнообразия человека.
- Молекулярная эпидемиология: географическое распределение генетической вариативности, связанной с распространенными болезнями. GWAS и ресеквенирование в разных популяциях.
- Оценка индивидуального предка популяций.
- Фармакогеномика и индивидуальная медицина.
- ДНК-идентификация. Создание Биобанков и Баз данных.

Заключение

Таким образом, изучение геномного разнообразия в популяциях человека внесло значительный вклад в популяционную генетику в целом и позволило обнаружить неизвестные ранее факты и явления в области эволюционного развития вида. Изучение генетической структуры популяций человека необходимо для понимания эволюционной истории человека и для тщательного дизайна медико-генетических исследований. Дальнейшее развитие этногеномики в сочетании с палео- и археогеномикой, а также с усовершенствованием современного оборудования и биоинформатических подходов значительно расширит наши представления о генофонде человека, внесет весомый вклад в понимание вопросов исторического развития и эволюции человечества.

Литература

1. Ingman M., Gyllenstein U. Analysis of the complete human mtDNA genome: methodology and inferences for human evolution // J. Hered. — 2001. — Vol. 92. — P. 454—461.

2. *Avise J.C.* Phylogeography: The History and Formation of Species. — Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 2000.
3. *Rosser Z.H., Zerjal T., Hurles M.E., Adojaan M., Alavantic D., Amorim A., Amos W. et al.* Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language // *Am. J. Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 67. — P. 1526–1543.
4. *Kayser M., Brauer S., Weiss G., Schiefenhovel W., Underhill P.A., Stoneking M.* Independent histories of human Y chromosomes from Melanesia and Australia // *Am. J. Hum. Genet.* — 2001. — Vol. 68. — P. 173–190.
5. *Спицын В.А.* Биохимический полиморфизм человека. — М.: Изд-во МГУ, 1985. — 214 с.
6. *Cann R.L., Stoneking M., Wilson A.C.* Mitochondrial DNA and human evolution // *Nature.* — 1987. — Vol. 325. — P. 31–36.
7. *Hammer M.F.* A recent common ancestry for human Y chromosomes // *Nature.* — 1995. — Vol. 378. — P. 376–378.
8. *Karafet T.M., Mendez F.L., Meilerman M.B., Underhill P.A., Zegura S.L., Hammer M.F.* New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree // *Genome Res.* — 2008. — Vol. 18. — P. 830–838.
9. *Starikovskaya E.B., Sukernik R.I., Derbeneva O.A., Volodko N.V., Ruiz-Pesini E., Torroni A., Brown M.D., Lott M.T., Hosseini S.H., Huoponen K., Wallace D.C.* Mitochondrial DNA diversity in indigenous populations of the southern extent of Siberia, and the origins of Native American haplogroups // *Ann. Hum. Genet.* — 2005. — Vol. 69. — P. 67–89.
10. *Starikovskaya Y.B., Sukernik R.I., Schurr T.G., Kogelnik A.M., Wallace D.C.* MtDNA diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: implications for the genetic history of Ancient Beringia and the peopling of the New World // *Am. J. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 63(5). — P. 1473–1491.
11. *Derbeneva O.A., Sukernik R.I., Volodko N.V., Hosseini S.H., Lott M.T., Wallace D.C.* Analysis of mtDNA diversity in the Aleut of the Commanders and its implication for the genetic history of Beringia // *Am. J. Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 71. — P. 415–421.
12. *Derbeneva O.A., Starikovskaya E.B., Wallace D.C., Sukernik R.I.* Traces of early Eurasians in the Mansi of northwest Siberia revealed by mitochondrial DNA analysis // *Am. J. Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 70(4). — P. 1009–1014.
13. *Volodko N.V., Starikovskaya E.B., Mazunin I.O., Eltsov N.P., Naidenko P.V., Wallace D.C., Sukernik R.I.* Mitochondrial Genome Diversity in Arctic Siberians, with Particular Reference to the Evolutionary History of Beringia and Pleistocene Peopling of the Americas // *Am. J. Hum. Genet.* — 2008. — Vol. 82. — P. 1084–1100.
14. *Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G.A., Wozniak M., Dambueva I., Dorzhu C., Luzina F., Miscicka-Sliwka D., Zakharov I.* Contrasting patterns of Y-chromosome variation in South Siberian populations from Baikal and Altai-Sayan regions // *Hum. Genet.* — 2006. — Vol. 118. — P. 591–604.
15. *Derenko M.V., Grzybowski T., Malyarchuk B.A., Dambueva I.K., Denisova G.A., Czarny J., Dorzhu C.M., Kakrapov V.T., Miscicka-Sliwka D., Wozniak M., Zakharov I.A.* Diversity of mitochondrial DNA lineages in South Siberia // *Ann. Hum. Genet.* — 2003. — Vol. 67. — P. 391–411.
16. *Derenko M.V., Grzybowski T., Malyarchuk B.A. et al.* The presence of mitochondrial haplogroup X in Altaians from South Siberia // *Am. J. Hum. Genet.* — 2001. — Vol. 69. — P. 237–241.
17. *Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T., Denisova G., Dambueva I., Perkova M., Dorzhu C., Luzina F., Lee H.K., Vanesek T., Villems R. & Zakharov I.* Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA in Northern Asian populations // *Am. J. Hum. Genet.* — 2007. — Vol. 81. — P. 1025–1041.
18. *Malyarchuk B., Derenko M., Grzybowski T., Lunkina A., Czarny J., Rychkov S., Morozova I., Denisova G., Miscicka-Sliwka D.* Differentiation of mitochondrial DNA and Y chromosome in Russian populations // *Human Biology.* — 2004. — Vol. 76. — P. 877–900.
19. *Malyarchuk B., Grzybowski T., Derenko M., Perkova M., Vanecek T., Lazur J., Gomolcak P., Tsybovsky I.* Mitochondrial DNA phylogeny in Eastern and Western Slavs // *Mol. Biol. Evol.* — 2008. — Vol. 25(8). — P. 1651–1658.
20. *Balanovsky O., Rootsi S., Pshenichnov A., Kivisild T., Churnosov M., Evseeva I., Pocheshkhova E., Boldyreva M., Yankovsky N., Balanovska E., Villems R.* // *Am. J. Hum. Genet.* — 2008. — Vol. 82(1). — P. 236–250.
21. *Степанов В.А.* Этногеомика населения Северной Евразии. — Томск: Издательство «Печатная мануфактура», 2002. — 243 с.
22. *Степанов В.А., Харьков В.Н., Пузырев В.П.* Эволюция и филогеография линий Y-хромосомы человека // *Вестник ВОГиС.* — 2006. — Т. 10. — С. 57–73.
23. *Харьков В.Н., Степанов В.А., Боринская С.А., Кожекбаева Ж.М., Гусар В.А., Гречанина Е.Я., Пузырев В.П., Хуснутдинова Э.К., Янковский Н.К.* Структура генофонда восточных украинцев по гаплогруппам Y-хромосомы // *Генетика.* — 2004. — Т. 40. — № 3. — С. 326–331.
24. *Харьков В.Н., Степанов В.А., Пузырев В.П., Фещенко С.П., Боринская С.А., Янковский Н.К.* Частоты диаллельных гаплогрупп Y-хромосомы у белорусов // *Генетика.* — 2005. — Т. 41. — № 8. — С. 1132–1136.
25. *Харьков В.Н., Степанов В.А., Медведева О.Ф., Спиридонова М.Г., Воевода М.И., Тадинова В.Н., Пузырев В.П.* Различия в структуре генофондов северных и южных

- алтайцев по гаплогруппам Y-хромосомы // Генетика. — 2007. — Т. 43. — № 5. — С. 675–687.
26. Хуснутдинова Э.К. Молекулярная этногенетика народов Волго-Уральского региона. — Уфа.: Гилем, 1999. — 238 с.
 27. Хуснутдинова Э.К., Кутуев И.А., Хусаинова Р.И., Юнусбаев Б.Б., Юсупов Р.М., Виллемс Р. Этногеомика и филогенетические взаимоотношения народов Евразии // Вестник ВОГиС. — 2006. — Т. 10. — № 1. — С. 24–40.
 28. Хусаинова Р.И., Ахметова В.Л., Кутуев И.А. и др. Генетическая структура народов Волго-Уральского региона и Средней Азии по данным Alu-полиморфизма // Генетика. 2004. — Т. 40. — № 4. — С. 443–450.
 29. Бермишева М.А., Викторова Т.В., Хуснутдинова Э.К. Полиморфизм диаллельных локусов Y хромосомы у народов Волго-Уральского региона // Генетика. — 2001. — Т. 37. — № 7. — С. 833–837.
 30. Бермишева М., Викторова Т., Тамбетс К., Виллемс Р., Хуснутдинова Э. Разнообразие гаплогрупп митохондриальной ДНК у народов Волго-Уральского региона России // Молекулярная биология. — 2002. — Т. 36. — № 6. — С. 905–906.
 31. Салимова А.З., Кутуев И.А., Хусаинова Р.И., Ахметова В.Л., Святова Г.С., Березина Г.М., Хуснутдинова Э.К. Изучение этнотерриториальных групп казахов по данным полиморфизма ДНК ядерного генома // Генетика. — 2005. — Т. 41. — № 7. — С. 1–7.
 32. Kutuev I., Khusainova R., Karunas A., Yunusbayev B., Fedorova S., Lebedev Y., Hunsmann G., Khusnutdinova E. From east to west: patterns of genetic diversity of populations living in four Eurasian regions // Human Heredity. — 2006. — Vol. 61. — P. 1–9.
 33. Yunusbayev B., Kutuev I., Khusainova R., Guseinov G., Khusnutdinova E. Genetic structure of Dagestan populations: a study of 11 Alu insertion polymorphisms // Hum. Biol. — 2006. — Vol. 78(4). — P. 465–476.
 34. Roostalu U., Kutuev I., Loogvaeli E.L., Metspalu E., Tambets K., Reidla M., Khusnutdinova E.K., Usanga E., Kivisild T., Villems R. Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian perspective // Mol. Biol. Evol. — 2007. — Vol. 24(2). — P. 436–448.
 35. Khusnutdinova E., Bermisheva M., Kutuev I., Yunusbayev B., Villems R. Genetic landscape of the Central Asia and Volga-Ural region / In: Biosphere and Human Being. Part VI. — Springer, 2007. — P. 373–381.
 36. Jarve M., Zhivotovsky L., Rootsi S., Help H., Rogaev E., Khusnutdinova E., Kivisild T., Sanchez J. Decreased rate of evolution in Y chromosome STR loci of increased size of the repeat unit // PLoS ONE. — 2009 Sep. 30. — Vol. 4(9). — P. 1–9.
 37. Khusnutdinova E., Kutuev I. Genes and languages: is there correlations between mtDNA data and geography of Altay and Ural languages / In: Molecular Polymorphism of Man: Structural and Functional Individual Multiformality of Biomacromolecules. Ed. by Sergei D. Varfolomyev and Gennady E. Zaikov. — 2009. — С. 80–91.
 38. Федорова С.А., Бермишева М.А., Виллемс Р., Максимова Н.Р., Хуснутдинова Э.К. Анализ линий митохондриальной ДНК в популяции якутов // Молекулярная биология. — 2003. — Т. 37. — № 4. — С. 643–653.
 39. Федорова С.А., Хусаинова Р.И., Кутуев И.А., Сухомясова А.Л., Николаева И.А., Куличкин С.С., Ахметова В.Л., Салимова А.З., Святова Г.С., Березина Г.М., Платонов Ф.А., Хуснутдинова Э.К. Полиморфизм СТГ-повторов гена миотонинпротеинкиназы в популяциях Республики Саха (Якутия) и Средней Азии // Молекулярная биология. — 2005. — Т. 39. — № 3. — С. 385–393.
 40. Федорова С.А., Степанов А.Д., Адоаян М., Парик Ю., Аргунов В.А., Ozawa T., Хуснутдинова Э.К., Виллемс Р. Анализ линий древней митохондриальной ДНК в Якутии // Молекулярная биология. — 2008. — Т. 42. — № 3. — С. 445–453.
 41. Федорова С.А. Генетические портреты народов Республики Саха (Якутия): анализ линий митохондриальной ДНК и Y-хромосомы. — Якутск: Изд-во ЯНЦ СО РАН, 2008. — 235 с.
 42. Li J.Z., Absher D.M., Tang H., Southwick A.M., Casto A.M., Ramachandran S., Cann H.M., Barsh G.S., Feldman M., Cavalli-Sforza L.L., Myers R.M. Worldwide Human Relationships Inferred from Genome-Wide Patterns of Variation // Science. — Vol. 319. — P. 1100–1104.
 43. Rosenberg N.A., Pritchard J.K., Weber J.L., Cann H.M., Kidd K.K., Zhivotovsky L.A., Feldman M.W. Genetic structure of human populations // Science. — 2002. — Vol. 298. — P. 2381–2385.
 44. Novembre J., Johnson T., Bryc K., Kutalik Z., Boyko A.R., Auton A., Indap A., King K.S., Bergmann S., Nelson M.R., Stephens M., Bustamante K.D. Genes mirror geography within Europe // Nature. — 2008. — Vol. 456. — P. 98–103.
 45. Nelis M., Esko T., Maegi R., Zimprich F., Zimprich A., Toncheva D., Karachanak S., Piskachkova T., Balasçak I., Peltonen L., Jakkula E., Rehnstroem K., Lathrop M., Heath S., Galan P., Schreiber S., Meitinger T., Pfeuffer A., Wichmann H.-E., Melegh B., Polgar N., Toniolo D., Gasparini P., D'Adamo P., Klovins J., Nikitina-Zake L., Kucinskis V., Kasnauskiene J., Lubinski J., Debniak T., Limborska S., Khrunin A., Estivill X., Rabionet R., Marsal S., Julia A., Antonarakis S.E., Deutsch S., Borel C., Attar H., Gagnebin M., Macek N., Krawczak M., Remm M., Metspalu A. Genetic Structure of Europeans: A View from the North-East // PLoS ONE. — 2009. — Vol. 4(5). — e5472.
 46. Heath S.C., Gut I.G., Brennan P., McKay J.D., Bencko V., Fabianova E., Foretova L., Georges M., Janout V., Kabesch

- M., Krokan H.E., Elvestad M.B., Lissowska J., Mates D., Rudnai P., Skorpen F., Schreiber S., Soria J.M., Syvanen A.-C., Meneton P., Herberg S., Galan P., Szeszenia-Dabrowska N., Zaridze D., Genin E., Cardon L.R., Lathrop M.* Investigation of the fine structure of European populations with applications to disease association studies // *European J. of Human Genetics.* – 2008. – Vol. 16. – P. 1413–1429.
47. *Auton A., Bryc K., Boyko A.R., Lohmueller K.E., Novembre J., Reynolds A., Indap A., Wright M.H., Degenhardt J., Gutenkunst R.N., Kingz K.S., Nelson M.R., Bustamante C.D.* Global distribution of genomic diversity underscores rich complex history of continental human populations // *Genome Res.* – 2009. – Vol. 19(5). – P. 795–803.
48. *Coop G., Pickrell J.K., Novembre J., Kudaravalli S., Li J., Absher D., Myers R.M., Cavalli-Sforza L.L., Feldman M.W., Pritchard J.K.* The role of geography in human adaptation // *PLoS Genetics.* – 2009. – Vol. 5(6). – e1000500.
49. *Pickrell J.K., Coop G., Novembre J., Kudaravalli S., Li J.Z., Absher D., Srinivasan B.S., Barsh G.S., Myers R.M., Feldman M.W., Pritchard J.K.* Signals of recent positive selection in a worldwide sample of human populations // *Genome Res.* – 2009. – Vol. 19(5). – P. 826–837.
50. *Via M., Gignoux C. Burchard E.G.* The 1000 Genomes Project: new opportunities for research and social challenges // *Genome Medicine.* – 2010. – Vol. 2. – P. 3. URL: <http://genomemedicine.com/content/2/1/3>.

ETHNOGENOMICS POPULATION OF EURASIA: STATE, PROBLEMS AND PROSPECTS

E.K. KHUSNUTDINOVA, S.A. FEDOROVA

*Establishment of the Russian Academy of Sciences Institute of Biochemistry and Genetics,
Ufa Research Center RAS, Ufa; Yakut Scientific Center of Complex Medical Problems of SB RAMS, Yakutsk*

The review examines the current state of the problem ethnogenomics population of Eurasia. Is considered in detail the contribution of Russian authors in this issue. The prospects of development of this direction are also defined.

Keywords: ethnogenomics, Eurasia.

БИОТЕХНОЛОГИИ – ВАЖНЕЙШЕЕ НАПРАВЛЕНИЕ ПЕРЕХОДА К ЭКОНОМИКЕ ИННОВАЦИОННОГО ТИПА

В.А. ЧЕРЕШНЕВ*

*Государственная Дума Федерального Собрания Российской Федерации,
Москва*

Механизм формирования нового технологического уклада лежит на стыке новейших научных достижений в разных отраслях знания и реализуется на базе перекрестного использования нанотехнологий, биотехнологий, информационных технологий.

Стратегией национальной безопасности Российской Федерации, утвержденной Указом Президента Российской Федерации № 537 от 12.05.2009 г., предусмотрено вхождение России в среднесрочной перспективе в число пяти стран-лидеров по объему валового внутреннего продукта и достижение необходимого уровня национальной безопасности в экономической и технологической сферах.

Большая ставка сегодня делается на развитие производства по освоению нанотехнологий. Мы с вами являемся свидетелями широкомасштабного процесса запуска производства новой высокотехнологичной наукоемкой продукции на базе современных достижений и разработок этого направления.

Предметом настоящих парламентских слушаний является законодательная поддержка развития биотехнологии. Поэтому давайте посмотрим, в отношении чего мы должны совершенствовать наши законодательные акты, каков сегодня сектор биотехнологии? Я хочу это показать на примере рынка биотехнологии, то есть начинаю не с науки, а с практики. Вот эти семь основных направлений биотехнологического рынка.

Рынок биотехнологии Российской Федерации представлен следующими сегментами:

1. Биотехнологические фармацевтические продукты: антибиотики; иммунобиологические препараты; гормоны

(препараты, содержащие гормоны), витамины; препараты, содержащие культуры микроорганизмов; аминокислоты; БАДы; медицинские материалы; диагностическое оборудование.

2. Ферменты и ферментные препараты, включая: средства защиты растений и стимуляторы роста растений; пробиотики; вакцины ветеринарные; антибиотики кормовые; кормовой белок; аминокислоты; витамины; кормовые добавки (белково-витаминные комплексы).

3. Живые культуры микроорганизмов.

4. Дрожжи.

5. Биотехнологические препараты добывающих отраслей промышленности.

6. Биотехнологические препараты для сельского хозяйства, включая препараты для животноводства и растениеводства.

7. Биотехнологические препараты для защиты окружающей среды.

Это – наиболее распространенное разделение на сегменты. Теперь рассмотрим, какая экономическая составляющая стоит за некоторыми из них, наиболее значимыми. У нас данные 2007 года, пока по 2008 году просто результатов нет, но примерно чуть-чуть больше; поэтому соотношение существенно не изменится.

Начнем с объема биотехнологической фармацевтической продукции. Общая емкость рынка – 12,8 млрд. руб. Объем импорта – 11,3 млрд. руб. Объем отечественного производства – 1,5 млрд. руб. Таким образом, отечественная биоиндустрия в данном сегменте представляет ≈ 12%.

Объем продукции ферментов и ферментных препаратов. В этом сегменте объем импорта – 490 млн. руб. Объем отечественного производства – 300 млн. руб. Доля российской биотехнологической промышленности составляет ≈ 37%.

Теперь о рынке живых культур микроорганизмов. Здесь общая емкость рынка – 143 млн. руб. Объем импорта – 130 млн. руб. Объем отечественного про-

© 2010 г. Черешнев В.А.

* Автор для переписки:

Черешнев Валерий Александрович,

академик РАН и РАМН

председатель Комитета Государственной Думы

по науке и наукоемким технологиям

103265 Москва, Охотный ряд, 1

изводства — 12–13 млн. руб. То есть, отечественная биоиндустрия в этом сегменте вносит $\approx 9\%$.

Какие проблемы стоят сегодня перед биотехнологией в Российской Федерации?

Очень важной проблемой является то, что отечественная биотехнологическая продукция неконкурентоспособна по сравнению с китайской, американской, немецкой и японской. В экспорте фармацевтической продукции Россия значительно отстает даже от таких стран, как Эстония, Литва, Польша, Чехия, а отстаивание от мировых лидеров (США, ЕС, Китай, Индия) достигло огромных размеров.

Общий объем инвестиций в биотехнологические компании США составил около 20 млрд. долларов (это данные 2005 г., но они примерно воспроизводят ситуацию). Общемировой объем рынка биотехнологий оценивался приблизительно в 200 млрд. долларов. Ежегодный рост инвестиций составляет около 7–9%.

В данном контексте показателен сравнительный анализ долей стран в мировом объеме производства биотехнологической продукции (цифры 2007 г.):

- Россия — 0,2% (четверть века назад — 5%),
- США — 42%,
- ЕС — 22%,
- Китай — 10%,
- Индия — 2%.

Реализации идей и разработок в области биотехнологий мешает целый ряд «классических» для нашей страны причин:

- недостаточное финансирование научной и научно-технической деятельности;
- кадровые проблемы науки, включая внешнюю и внутреннюю миграцию;
- крайне низкий уровень приборного обеспечения научных организаций;
- низкая востребованность результатов научно-технической деятельности;
- пробелы в правовом обеспечении деятельности научных организаций.

В этой связи представляется целесообразным решить следующие вопросы:

1. Обеспечение связи между государством и бизнесом в части создания условий востребованности результатов научно-технической деятельности (РНТД).
2. Поддержка науки.
3. Кадровое обеспечение науки и высокотехнологичных отраслей экономики.
4. Обеспечение участия научных организаций в коммерциализации РНТД.

Продукция биотехнологии — это очень штучный товар. У нас есть несколько центров, которые могут готовить технологии и обеспечить высококвалифицированными кадрами. Хотел бы обратить внимание в этой связи на Пушино, на Пушинский центр, созданный именно как биотехнологическая Мекка, как биологический центр развития и академической прикладной науки. Правда, он сегодня не востребован. А ведь это — мощнейшая база и малотоннажного производства наукоемкой, безотходной, высокотехнологичной, экологически чистой продукции и кузница кадров: вот уже 50 лет, как создано это уникальное место. Там есть филиалы университетов, там есть производственная база. Замкнуть все на биотехнологию — и кадровая проблема в течение двух-пяти лет будет решена, и будут созданы прорывные отечественные технологии.

Большие надежды мы все возлагаем на недавно принятый Федеральный закон от 2 августа 2009 года № 217-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации по вопросам создания бюджетными учреждениями науки и образования хозяйственных обществ в целях практического применения (внедрения) результатов интеллектуальной деятельности». Он открывает беспрецедентные возможности для создания малых и средних предприятий при учреждениях науки и образования для реализации своих собственных результатов.

Конечно, процесс идет медленно, потому что прежняя система разрушена. Где эта цепочка: академический институт — проектно-конструкторское бюро — отраслевой институт — производство? Проектно-конструкторских бюро в большинстве своем давно нет, а уж отраслевые институты, которые призваны внедрять, — они полностью исчезли. Из 6 тысяч отраслевых институтов за прошедшие 18 лет осталось 1100, то есть их число уменьшилось в 6 раз. И поэтому на учреждения государственные, бюджетные (малое предприятие для этого и создано) возлагается несоответствующая им задача: академическим учреждениям создавать инновационные предприятия для производства продукции. Ведь это надо уметь, это же очень серьезное и тонкое дело. Вот почему при таком подходе очень многие в научно-исследовательских институтах развоят саму систему академической науки. Создать-то можно, но это другое, совершенно иное занятие, это — коммерциализация, то есть должны быть другие люди для этого, соответствующим образом подготовленные, с соответствующей сметкой, потому что то, что было в начале 90-х годов, дало отрицательный результат.

Да, мы создавали малые предприятия. Вспомните, они получают первую прибыль, а вторая и третья прибыль идет на то, чтобы отделиться от академического или вузовского коллектива, забрать площади и все сделать для того, чтобы стать самостоятельными, не делаясь прибылью. Хотя цели были высокие: часть прибыли выделяли на оборудование, на реактивы, на добавку аспирантам и т.д.

Ничего же не получилось, так что второй раз не хотелось бы наступить на те же грабли. Очевидно, нужно брать на вооружение хорошо апробированные на Западе инновационные технологии с использованием венчурных и иных механизмов.

Но ведь и там предусмотрена активная государственная поддержка, особенно на первых стадиях — от института или университета к малому предприятию. По-

видимому, государству в нынешних условиях придется взять на себя часть рисков и реализовать специальные механизмы поддержки инноваций в биотехнологической отрасли. Мы говорим о создании государством соответствующего фонда или придания Фонду И.М. Бортника или Российскому фонду фундаментальных исследований возможности финансировать первые такие малые предприятия для производства инновационной продукции. То есть, государство должно обеспечить данный процесс, ничего только на хозрасчетных отношениях и просто на одном бизнесе не сделать.

Материалы доклада на парламентских слушаниях ГД ФС РФ «О совершенствовании законодательного обеспечения биотехнологической отрасли промышленности» 15 октября 2009 г.

ПЕРЕХОД ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ РФ НА ИННОВАЦИОННУЮ МОДЕЛЬ РАЗВИТИЯ

С.А. ЦЫБ*

*Департамент химико-технологического комплекса и биоинженерных технологий,
Министерство промышленности и торговли РФ, Москва*

В соответствии с решением Совета безопасности Российской Федерации и соответствующими поручениями Правительства Российской Федерации Министерством промышленности и торговли РФ совместно с заинтересованными ведомствами был разработан и согласован проект Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации до 2020 года. Основной целью данной Стратегии является создание условий для перехода отрасли на инновационную модель развития, что должно привести к росту обеспеченности населения лекарственными средствами отечественного производства, при общем увеличении обеспеченности нуждающихся в лекарствах до средневропейского уровня, как по количественным, так и по качественным показателям.

В СССР в 1988 году в производство лекарств было вложено 2,5 млрд. руб., произведено 4,15 млрд. упаковок.

В настоящее время российский фармацевтический рынок, имея относительно небольшой по сравнению с развитыми странами объем (11-е место в мире), занимает одно из лидирующих мест по темпу его роста — более 12% ежегодно. При этом по общему объему рынка мы опережаем Индию (9 млрд. долл.) и сравнимы с Китаем (22 млрд. долл.). Надо указать на то, что более 75% — это импорт лекарств.

Объем мировых продаж фармацевтической продукции в 2008 году превысил 700 млрд. долл., около половины из которых пришлось на США.

Финансово-экономический кризис и современные мировые тенденции накладывают новый отпечаток на

развитие фармацевтической отрасли в мире, что, в свою очередь, открывает новые возможности по развитию отечественной индустрии. Сейчас преобладают следующие экономические тенденции:

- сжатие крупнейших фармрынков (США, ЕС и т.д.) приводит к усилению процессов слияний и поглощений;
- миграция производственных и исследовательских мощностей в Китай и Индию;
- эволюция продукции компаний в сторону дженериков и биодженериков.

Эволюция структуры заболеваемости приводит к изменению приоритетов в разработке новых медицинских продуктов. Последние достижения в биотехнологиях позволят уже в ближайшем будущем коренным образом изменить подходы в медицине.

Произойдет смещение акцента с вопросов массового лечения к вопросам развития профилактических препаратов и персонализированной медицины.

Вместе с тем, учитывая текущую экономическую ситуацию, в нашей стране в ближайшие десятилетия обозначенные тенденции вряд ли станут доминантными.

Структура российского рынка значительно отличается от рынков развитых стран преобладанием «брендированных» дженериков, причем в основном иностранного производства.

В то же время основную часть портфелей продукции отечественных производителей составляют низкорентабельные дженериковые препараты. Это ограничивает расходы российских компаний на исследования и разработки 1–2% от выручки. У мировых лидеров это составляет примерно 20%.

На данный момент на российском фармрынке импорт занимает 80%, при доле госзакупок — 35%. На рынке медтехники — доля импорта 70%, а госзакупки составляют 90%. Таким образом, основными определяющими факторами на российском рынке являются импорт и спрос со стороны государства.

© 2010 г. Цыб С.А.

* Автор для переписки:

Цыб Сергей Анатольевич

Директор Департамента химико-технологического комплекса и биоинженерных технологий,

Министерство промышленности и торговли РФ

Министерство промышленности и торговли РФ, начав подготовку к реализации Стратегии развития фармацевтической отрасли, провело анализ государственных закупок лекарственных средств (ЛС) в 2008 году.

В нашей стране имеется значительный потенциал локализации дженериковых препаратов и препаратов, у которых в ближайшие годы истекает патентная защита.

В этой связи необходимо уделить особое внимание процессу государственных закупок ЛС. Прежде всего, речь идет о недопущении включения в конкурсную документацию условий и требований, дискриминирующих отечественных производителей. При этом на государственном уровне должны быть закреплены современные требования к качеству и безопасности поставляемой продукции.

Что касается препаратов, еще не производимых в России, то на их разработку и запуск в производство можно будет выйти с помощью создания специальной целевой программы.

Ожидаемое повышение уровня жизни населения и переход на страховую медицину должны привести к тому, что в 2020 году стандарты потребления лекарственных средств в Российской Федерации увеличатся в 4 раза и будут сопоставимы со средневропейскими показателями.

Однако в краткосрочной перспективе вследствие финансово-экономического кризиса и снижения затрат населения на ЛС надо ожидать снижения темпов роста рынка. В результате спрос может перераспределиться в сегмент более дешевых ЛС, что временно создаст дополнительные возможности для отечественных производителей.

Независимо от того, какое место и какое процентное соотношение биотехнологические лекарства занимают у нас в стране по сравнению с мировыми уровнями, доля биотехнологических препаратов в структуре лекарственных средств, которые потребляются в Российской Федерации, практически соответствует аналогичной для мирового рынка.

Каковы перспективы импортозамещения биотехнологических препаратов в рамках бюджетных закупок? Здесь имеется достаточно активное поле деятельности для российских компаний. Из разных источников мы взяли очень интересные данные, проанализировали их, из чего стало ясно, что имеются потенциал и перспективы импортозамещения именно биотехнологических препаратов в России.

Так, по международным непатентованным наименованиям (МНН) имеются следующие примеры:

1. Только у отечественных компаний закупаются 3 МНН (инсулина-цинк (человеческого полусинтетического) комбинированного суспензия, интерферон альфа и интерферон альфа-2).

2. Закупаются у отечественных и иностранных компаний 10 МНН (вакцина для профилактики краснухи, гепарин натрия, доцетаксел, инсулин растворимый [человеческий генно-инженерный], инсулин-изофан [человеческий генно-инженерный], интерферон альфа-2b, капреомицин, филграстим, фосфолипиды, эпоэтин альфа).

3. Закупаются только у иностранных, но разработка началась отечественными компаниями — 3 МНН (альтеплаза, ритуксимаб, бевацизумаб).

По объемам продукции (в упаковках) российские производители в 2 раза превосходят иностранных. Однако в стоимостном выражении доля российских фармпроизводителей составляет в целом около 22% и ежегодно только уменьшается. А в секторе бюджетных закупок она еще меньше:

- в госпитальном секторе — около 20%;
- обеспечение необходимыми лекарственными средствами (ОНЛС) — менее 6%;
- программа «7 нозологий» (льготное обеспечение ЛС больных гемофилией, муковисцидозом, гипофизарным нанизмом, болезнью Гоше, миелолейкозом, рассеянным склерозом, а также после трансплантации органов и (или) тканей) — менее 1%.

Текущая ситуация на российском рынке медицинской продукции во многом определяется историческими факторами. Это, прежде всего, доставшаяся нам в наследство жесткая система регулирования внутреннего рынка — гораздо более требовательная, с точки зрения процедур, к отечественному производителю, нежели к импортеру. Это стало логическим следствием попытки покрытия выпавшего после развала СССР предложения на рынке за счет поставок из развитых стран и сопутствующей либерализации доступа на рынок извне.

Кроме того, в силу функционировавшей годами схемы производственной кооперации и территориального разделения фармпредприятий: производство субстанций — в РСФСР, готовых лекарственных форм — в странах СЭВ, в начале 90-х годов XX века мы остались без современных заводов.

Все перечисленные аспекты были тщательно проанализированы и учтены при подготовке проекта Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации до 2020 года, главной целью

которой является перевод фармацевтической промышленности на инновационную модель развития.

Основные задачи, определенные в Стратегии:

- увеличение доли лекарственных средств отечественного производства;
- повышение конкурентоспособности отечественной фармацевтической индустрии на международном рынке;
- стимулирование разработки и производства инновационных лекарственных средств и поддержка экспорта российских лекарств.

Возникает вопрос, а сколько стоят все заложенные в Стратегии мероприятия и кто их будет финансировать в ближайшие 5–7 лет?

Произведенные расчеты с использованием, в том числе и математического моделирования развития отрасли, позволяют сделать следующие оценки:

- На решение кадрового вопроса необходимо более 24 млрд. рублей, и тут основная нагрузка должна лечь на государство.

- Переход отрасли на стандарты GMP оценочно стоит на сегодня 20–25 млрд. рублей — здесь нужна кредитная поддержка, о чем уже сейчас ведутся переговоры с институтами развития.

- И, наконец, запуск инновационного цикла стоит более 100 млрд. рублей, при этом господдержка должна быть не менее 50% на данный комплекс мероприятий.

Если предположить, что отечественные инновационные препараты будут продаваться в 2020 году с дисконтом 10% по отношению к импортным (в некоторых странах этот показатель достигает 30%), то общая экономия средств на инновационное лекарственное обеспечение только за один год составит 52,5 млрд. рублей.

Таким образом, все вышеперечисленные финансовые ресурсы по реализации Стратегии как бюджетного, так и внебюджетного характера окупятся менее чем за 3 года.

С учетом сложившейся структуры рынка и выявленных проблем Стратегия Фарма-2020 предусматривает несколько этапов реализации (рис. 1).



Рис. 1. Основные этапы, цели и индикаторы Стратегии Фарма-2020

На первом этапе необходимо провести структурные корректировки нормативно-правового поля, сфокусировать государственный заказ и придать ускорение процессам локализации производства и разработки лекарственных средств.

В дальнейшем — на втором этапе — локализация производства дженериков должна достичь 50%-ного уровня.

В свою очередь, целью третьего этапа является импортозамещение 50% инновационных препаратов.

Важно отметить, что запускать инновационный цикл нужно уже сейчас, чтобы к 2020 году появилось необходимое количество внедренных разработок.

Материалы доклада на парламентских слушаниях ГД ФС РФ «О совершенствовании законодательного обеспечения биотехнологической отрасли промышленности» 15 октября 2009 г.

РАЗВИТИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ – СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ПРИОРИТЕТ РОССИИ?

Р.Г. ВАСИЛОВ*

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова располагает достаточной информацией по всем сегментам современной биотехнологии. Однако не это мне хотелось бы проанализировать в своем докладе.

Сейчас, действительно, биотехнология переживает бум в мире, и чтобы быть предметным, целесообразно привести одну диаграмму, которая иллюстрирует динамику развития биотехнологии в мире, начиная с 2000 г. (рис. 1).



Рис. 1. Сравнение развития рынка биотехнологии в разных странах (2000–2008 гг.)

Здесь можно видеть, что не только страны, входящие в организации экономического сотрудничества и развития, США, Евросоюз, Япония, но и страны развивающиеся – Китай, Индия – имеют бурную динамику роста, чего нельзя сказать о России.

Это происходит потому, что в каждом из всех этих государств сегодня существует долгосрочная программа

развития биотехнологии. Ныне Россия – единственная страна из действительно серьезных крупных экономических держав, в которой нет такой программы.

Опыт развития этих стран показывает, что несмотря на перспективность и высокую рентабельность биотехнологических проектов отрасль развивается на основе четко определенной государственной стратегии и при поддержке государства.

У нас тоже биотехнология обозначена как приоритет, но в названии своего доклада я поставил вопрос, поскольку динамика у нас последняя. В чем причина такого положения? Особенно если сравнить с Индией, которая стартовала в 2000 году с того же уровня, что и Россия, и тем не менее демонстрирует фантастический подъем в последние годы в биотехнологии.

Буквально на наших глазах сегодня совершается прорыв в новом направлении биотехнологии – по сути дела, идет формирование новой экономики: инновационной биоэкономики, то есть экономики, основанной на широком применении биотехнологии во всех сферах деятельности.

Так что же у нас произошло с биотехнологией и какова государственная и общественная позиция по данному вопросу? В контексте проводимых парламентских слушаний, прежде всего, надо осветить отношение законодательной власти. Следует подчеркнуть, что за последние 10 лет Государственная Дума ФС РФ трижды обращалась к этому вопросу.

Особенно значимым был рубеж 2005 года, когда по инициативе Комитета по промышленности в Государственной Думе состоялся круглый стол по законодательному обеспечению развития биотехнологической отрасли промышленности. В число важных рекомендаций указанного круглого стола вошла идея формирования целевой программы развития биотехнологии.

В развитие этого по инициативе Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова и бизнес-сообщества был разработан документ под названием Национальная программа «Развитие биотехнологии в

© 2010 г. Василов Р.Г.

* Автор для переписки:

Василов Раиф Гаянович

профессор, президент Общества биотехнологов России

им. Ю.А. Овчинникова

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Российской Федерации на 2006–2015 гг.» (на основе государственно-частного партнерства). Это — первый системный и комплексный документ по развитию биотехнологии в нашей стране.

Хотя на федеральном уровне не было сформировано соответствующей программы, тем не менее государство, естественно, тоже начало работать в этом направлении. Надо сказать, что формально биотехнология включается во многие государственные решения как приоритетное направление, связанное с развитием высоких технологий.

Но самое главное, наверное, это то, что пришли в движение регионы, и целый ряд субъектов РФ уже начал разрабатывать собственные программы развития биотехнологии.

Перечень регионов, в которых сегодня идет разработка региональных программ развития биотехнологии, выглядит таким образом:

- Республика Татарстан (разработана);
- Чувашская Республика (в стадии завершения);
- Кировская область (в разработке);
- Республика Карелия (в разработке);
- Калининградская область (в перспективе);
- Пензенская область (в перспективе);
- Воронежская область (в перспективе);
- Томская область (в перспективе);
- Тюменская область (в перспективе).

Я хотел бы подробнее остановиться на уже разработанной и подготовленной к утверждению республиканским правительством региональной программе Республики Татарстан (РТ). Цель ее — создание в Республике инновационной биоэкономики, которая обеспечит современный уровень жизни, экологическое равновесие, энергетическую эффективность и высокий конкурентоспособный научно-технологический потенциал.

В региональной программе РТ ставятся следующие задачи:

- проведение экспертно-аналитической работы по оценке научно-методических, организационно-технических и экономических возможностей РТ для развития биотехнологии;
- определение приоритетных направлений и целевых проектов в области биотехнологии;
- формирование инновационной и производственной инфраструктуры биотехнологии в РТ (Центр трансфера технологии, Центр превосходства, Биотехнологический координационный центр, Фонд развития биотехнологии и др.);

- организация современных биомедицинских и биофармацевтических производств жизненно важных медицинских технологий и препаратов;
- внедрение новых методов агробиотехнологии и ветеринарной биотехнологии в Республике;
- организация биозаводов (biorefineries) по глубокой переработке биомассы;
- создание предприятий для развития лесной биотехнологии и аквакультур;
- реализация актуальных проектов по биоэнергетике.

В процессе реализации указанной программы на первом этапе (2010–2015 гг.) будет сформирован биотехнологический кластер РТ, включающий в себя существующие и вновь созданные предприятия биотехнологического профиля, выстроены взаимоотношения с научными, образовательными и производственными структурами Республики, отработаны механизмы менеджмента и маркетинга, определены потребители продукции и рынки сбыта. Предполагается участие в кластере не менее 100 профильных предприятий с общим объемом продукции 1–1,5% ВРП. Планируется вовлечение в реализацию Программы не менее 30% районов Республики.

На втором этапе (2016–2020 гг.) на базе созданного биокластера будет сформирован биорегион со 100% вовлечением районов Республики. Доля биотехнологической продукции будет составлять 3–5% ВРП.

Среди других региональных программ следует отметить программу Чувашской Республики. Она формируется на протяжении последних двух лет и включает в себя наиболее актуальные для Республики проекты. К числу ее приоритетных задач практического плана надо отнести создание завода по производству лизина, который при разворачивании на полную мощность может обеспечить потребности всей страны в этом важном биотехнологическом продукте.

Другие вышеупомянутые субъекты РФ ищут пути внедрения биотехнологических производств в местную промышленность.

Итак, укажу на основные проблемы, основные препятствия развитию биотехнологии в Российской Федерации. Первое — это отсутствие государственной стратегии. И второе — несовершенство законодательной базы.

Главные направления законодательных инициатив для развития биотехнологии в РФ можно сформулировать таким образом:

- разработка и принятие Стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности до 2020 года;

- внесение изменений в действующие нормативно-правовые акты, регулирующие вопросы безопасности, интеллектуальной собственности, развития науки, государственно-частного партнерства, отдельных отраслей промышленности с целью поддержки инноваций;
- принятие новых нормативно-правовых актов, направленных на регулирование отдельных аспектов биотехнологии;
- подписание и ратификация ряда международных нормативно-правовых актов в сфере биотехнологии с целью гармонизации правовой базы.

Подчеркиваю, что на первом месте стоит разработка и принятие общей стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности до 2020 года, затем — внесение изменений в действующие нормативно-правовые акты, регулирующие различные вопросы, относящиеся не только к биотехнологии. Для развития биотехнологии необходимо развитие инновационной сферы вообще, нужна поддержка развития малого и среднего бизнеса, совершенствование механизма государственно-частного партнерства, различных отраслей промышленности и т.д.

Если мы говорим о стратегии развития биотехнологии, то фактически можно обозначить основные моменты. Первое — предстоит сформировать цепочку,

эффективный механизм прохождения от научных разработок до организации биотехнологических производств и создания биотехнологических кластеров. Второе — следует на основе анализа биоресурсного потенциала страны поставить задачу по разработке специальных биотехнологических программ в каждом регионе страны. И, наконец, нужно проработать взаимосвязь биотехнологии с другими секторами экономики.

По сути дела, имеется примерно десять секторов экономики, в которых биотехнология может сыграть ключевую роль, в частности, горнодобывающая отрасль — это один из примеров; безусловно, постоянный приоритет отводится фармацевтике, сельскому хозяйству. Приобретают актуальность лесная биотехнология, аквакультуры и т.д.

Конечно, главной задачей по-прежнему остаются прямые меры экономического стимулирования предприятий, работающих для биотехнологической отрасли. Тогда все это в совокупности приведет к тому, что в нашей стране и появится биотехнология, покрывающая всю ее огромную территорию.

Материалы доклада на парламентских слушаниях ГД ФС РФ «О совершенствовании законодательного обеспечения биотехнологической отрасли промышленности» 15 октября 2009 г.

БИОТЕХНОЛОГИЯ В РОССИИ: ПОПЫТКА ОБЪЕКТИВНОГО АНАЛИЗА

А.Л. КОНОВ*

УК «Биопроцесс Кэпитал Партнерс», Москва

Вся биотехнология делится в мире на три основных сектора: сектор красный — биотехнологии лекарств, зеленый — биотехнологии, главным образом, это генно-инженерные сельхозсорты и серый (или белый) — промышленная биотехнология. Поскольку вопросы биоиндустрии у нас здесь уже активно обсуждались, я сделаю акцент на первых двух секторах: медицинском и сельскохозяйственном.

Методически доклад будет построен на сравнении уровней биотехнологии в двух государствах — Индии и России, которые лет 10 назад имели одинаковые стартовые возможности, но РФ их почему-то растеряла, а Индия совершила беспрецедентный рывок.

Если сравнить объем средств в сфере биотехнологии за 2008–2009 гг., то в Индии эта цифра составляет 2,5 млрд. долл. США, а в России — 50–100 млн. долл. США. Причем, в Индии это вкладывается в производство, а в РФ — в основном в импорт. Интересно отметить, что объемы, приходящиеся на биофармацевтику, в пропорциональном отношении сходны (более 60%).

После изложения общей ситуации перейдем к конкретному анализу состояния биофармацевтики в Индии и РФ.

В Индии картина выглядит так:

1. В 1975 году не было НИЧЕГО.
2. В 2005 году:
 - 200 GMP фармзаводов, 70 производств сертифицированы FDA.
 - В биотехиндустрии занято 11800 высококвалифицированных ученых, лаборантов и менеджеров.
 - Крупнейший в мире производитель вакцины против гепатита В.

© 2010 г. Конов А.Л.

* **Автор для переписки:**

Конов Алексей Львович
вице-президент ГК «Биопроцесс»,
директор по инвестициям УК «Биопроцесс Кэпитал Партнерс»,
Москва

- Получена лицензия от Roche на производство дженериковой версии Tamiflu.
 - Самый высокий в мире Return of Investment в биотехнологии.
 - Несколько индийских фармкомпаний вошли в клуб «ведущих мировых игроков» фармрынка.
- В России положение не столь оптимистично:
1. В 1975 году — ВЕДУЩАЯ страна в ряде областей микробиологического и биотехнологического производств.
 2. СЕГОДНЯ:
 - Несколько мелких разрозненных производств биодженериков, НИ ОДНОГО крупного GMP-производства.
 - Самый крупный российский фармхолдинг — предприятие среднего размера по мировым меркам.
 - Россия в биотехнологических препаратах практически полностью зависит от импорта:
 - . технологическое отставание — 15–20 лет (вакцины, EU-Products);
 - . отсутствие собственных разработок мирового уровня на рынке;
 - . кадровый голод;
 - . отсутствие гармонизации требований с международными;
 - . ежегодные потери от импорта биотехнологических ЖНВЛС — не менее 7 млрд. руб.

Так что же делать в такой ситуации: восхищаться Индией или действовать, делать что-то нужное и обоснованное всей логикой развития научно-технического прогресса. Мне кажется, что следует реализовать нижеприведенный перечень стратегических направлений и мероприятий, для того чтобы действительно хоть что-то сдвинулось в нашей стране (табл. 1).

Целесообразно дать небольшой комментарий к приведенной таблице, содержание которой нами было тщательно продумано и оформлено. Прежде всего, не распылять усилия, а определить некие стратегические точки роста.

Таблица 1

Перечень стратегических направлений работ для технологического рывка в области (био)фарма

№ п/п	Наименование направления (мероприятия)
1.	Концентрация усилий на основных социально значимых и затратных нозологиях для создания российских разработок (продуктов) и способов их производства (технологий) — не распылять усилия!
2.	Импорт высокотехнологичных разработок всех стадий с переносом в Россию Интеллектуальной Собственности и ее развитием по мировым стандартам (разрешить cash out's, инвестиции в другие юрисдикции и т.п.).
3.	Импорт, точнее — реэкспорт «мозгов».
4.	Введение новой практики по закупкам («многолетние тендеры», «налоговые каникулы»).
5.	Формирование программы подготовки и обучения кадров на базе ведущих профильных вузов для фармацевтической и биофармацевтической промышленности.
6.	Интегрирование российских надзорных органов в профильные международные организации (ЕМЕА, ICH, PIC).
7.	Создание условий для вывоза российских продуктов на развитые рынки (через привлечение иностранных партнеров).
8.	Введение системы «лекарственного страхования»: процедуры государственных закупок лекарственных средств должны быть заменены на возмещение стоимости лекарственных средств, отпущенных гражданам в аптечных учреждениях по назначению врача (см. Франция, Германия).
9.	Разделение краткосрочных и стратегических задач.

Во-вторых, необходим импорт высокотехнологичных разработок всех стадий с переносом в Россию интеллектуальной собственности и развитие ее по мировым стандартам. В частности, предложение к законодателям, скажем, в те венчурные фонды, которые инвестируются, разрешить им делать cash out's, разрешить инвестиции в другие юрисдикции и т.п.

Далее, импорт, точнее реэкспорт мозгов. Именно за счет этого поднялась Индия и вырос Китай.

Существенным моментом является введение новой практики по закупкам: многолетние тендеры, налоговые каникулы и т.д. Не надо менять 94-й Федеральный закон. Уйдет много времени, пока его поменяем, уже

сейчас можно по механизму многолетних тендеров все это делать.

Теперь о формировании программы подготовки и обучения кадров. Когда говорят, что у нас есть кадровый потенциал, то это не так. У нас нет кадрового потенциала. Весь кадровый потенциал подготовлен по состоянию на 20 лет назад. Все же современные технологии находятся там, за границей.

Еще крайне важное обстоятельство. Интегрирование российских надзорных органов в международные организации — ключевая вещь, чтобы гармонизироваться с миром. Мы сейчас фактически живем за «железным занавесом», как это практиковалось десятилетия назад.

Создание условий для вывоза российских продуктов на развитые рынки — это следующий шаг. Наиболее действенный механизм — через привлечение иностранных партнеров, это вполне возможно.

Требуется также введение системы лекарственного страхования. Это может быть очень большим драйвером рынка: посмотрите, как это сделано во Франции или Германии.

Наконец, следующая — заключительная актуальная проблема, на которой следует остановиться. Нужно разделять краткосрочные задачи — импортозамещение, техперевооружение и т.д., и стратегические — постановку инновационных продуктов и технологий. Мы пока что нередко (а то и постоянно) заменяем стратегические задачи решением краткосрочных.

Краткосрочные и долгосрочные задачи необходимо решать разными инструментами и разными командами людей.

Сегодня под видом решения стратегических задач мы снова решаем тактические (то есть поддержку конкретных дженериковых компаний). Для решения краткосрочных задач можно использовать схему государственно-частного партнерства (ГЧП) — она позволит в краткосрочной перспективе достичь уровня разработок и технологий 15-летней давности.

Для решения стратегических задач необходимо создавать среду, в которой инновациям будет комфортно развиваться.

Один из возможных путей решения краткосрочной задачи: импортозамещение + перевооружение отрасли.

Здесь предстоит работа в три этапа:

I. ШАГ 1. Годы 1–3: переходный период.

Компания:

- Строительство и пуск завода (2–3 года). Свои или заемные средства.
- Освоение производства по лицензии.

Государство:

- Покупка лицензии на продукт + гарантия госзакупок на переходный период (например, через механизм долгосрочного инвестиционного тендера).
- Открытый тендер на поставку продукта после строительства и пуска завода.

II. ШАГ 2. Годы 4–7: период регулируемого рынка.

Компания:

- Выпуск лекарства, поставки тендерных объемов по оговоренной цене (2–3 года).

Государство:

- Гарантированные закупки. Механизм контроля (возможность отобрать лицензию при невыполнении условий).

III. ШАГ 3. Через 7 лет после начала программы.

Компания:

- Переход к ситуации свободного рынка.
- Необходимость ставить «новые продукты» для сохранения лидерства.

Государство:

- Механизм контроля (сохранение лицензии у себя). При использовании такого подхода к решению задач краткосрочного, недолговременного типа можно ожидать определенных позитивных результатов:

1. В краткосрочной перспективе (2–3 года):

- Сохранение импорта, строительство собственных заводов, покупка лицензий.

2. В среднесрочной перспективе (4–7 лет):

- Обеспечение россиян качественными и доступными фармацевтическими лекарственными средствами, избавление от импортной зависимости в части ряда дорогостоящих, но остро необходимых лекарственных средств.

- Улучшение качества медицинского обслуживания населения, повышение качества жизни людей, в особенности социально незащищенных групп пациентов, страдающих тяжелыми и хроническими заболеваниями.

3. В долгосрочной перспективе (после 7 лет):

- Создание платформы для разработки и принятия на производство First in class разработок.
- Получение средств для развития предметно-ориентированных НИР и кадров в России.
- Платформа для вывода продуктов на развитые рынки.

Один из возможных путей решения стратегической задачи: создание полностью инновационной фармацевтической компании.

1) КРИТЕРИИ:

- Портфель разрабатываемых продуктов должен быть значительного размера для минимизации рисков.
- Разрабатываемые лекарства должны продаваться на мировом рынке, а не только в России.
- В основе разрабатываемых продуктов должна быть наиболее перспективная интеллектуальная собственность, найденная и закупленная не только России, но и за ее пределами.

2) РЕШЕНИЕ:

- Должна использоваться наиболее эффективная сегодня модель фармацевтического бизнеса — дезинтегрированная фармацевтическая компания, осуществляющая исключительно отбор и менеджмент проектов, а также маркетинг своих разработок. Сами разработки и производство проводятся в специализированных лабораториях и предприятиях по контракту.

- На эту модель уже переходит БигФарма, и сегодня есть шанс создать IP-компанию, которая сможет стать российской БигФармой завтра (через 7–9 лет).

Здесь говорилось о перспективных мероприятиях и подходах. Но возникает резонный вопрос, а существуют ли у нас какая-либо реально функционирующая инфраструктура? Можно ответить, что такие инструменты уже есть:

- созданы инструменты развития (венчурные фонды, государственные корпорации), инвестирующие в высокие технологии, включая биотех;
- создание посевных фондов (Российская венчурная компания — РВК);
- создание и начало активной работы профильного департамента в Министерстве промышленности и торговли РФ;
- стратегия Фарма2020;
- принятие Федерального закона от 02 августа 2009 г. № 217-ФЗ о передаче интеллектуальной собственности из госучреждений науки и образования в малые компании;
- надежды на изменение стратегии ФЦП;
- создание рабочей группы по фарме и медтехнике в рамках комиссии по реформированию экономики.

Теперь обратимся к другому ключевому сектору — зеленой, или сельскохозяйственной, биотехнологии. Опять прибегнем к сравнению Индии и России.

Основные факты по биотехнологии в сельском хозяйстве Индии выглядят следующим образом:

1. В 1988 году не было НИЧЕГО.
2. В 2008 году:

- 7,6 млн гектар под трансгенным хлопчатником (4-е место в мире по объемам выращивания генно модифицированных культур — ГМ).
- 5 млн. фермерских хозяйств выращивают ГМ-культуры.
- 88% прирост эффективности по сравнению с традиционными технологиями.
- Налаженная система регистрации и испытаний.
- Мощные исследовательские институты, ведущие в том числе совместные проекты с ведущими мировыми компаниями.

Основные факты биотехнологии в сельском хозяйстве России:

1. В 1988—1995 гг. — на одном из первых мест в Европе по уровню исследовательских работ.
2. В 2000 г. — задел по ряду практических направлений, задел по системе испытаний и регистрации.
3. В 2008 году:
 - Все основные американские ГМ-сорта зарегистрированы для пищевого (кормового) использования, при этом «анти-ГМО» маркировка даже на дешевой водке.
 - Ни одного коммерческого ГМ-сорта на полях.
 - Отсутствует система регистрации для выращивания.
 - Сильное «химическое» лобби и сильные «зеленые» объединяются для борьбы с «ГМО».

- Несколько тыс. га «нелегальных» посевов (экспертная оценка).

Таким образом, из вышесказанного ясно видно, что программы государственного участия и регулирования вывели за 20 лет Индию из отсталых стран-импортеров в мировые лидеры.

Что же касается России, то с целью выхода из создавшейся неблагоприятной ситуации необходимо объединить усилия для реализации технологического рывка.

Долгосрочные программы развития отечественной биотехнологии могут выглядеть так:

- поддержка «местных» разработок;
- снижение/возврат налогов на новые производства;
- участие государства в финансировании hi-tech производств;
- регулирование вопросов интеллектуальной собственности;
- создание технопарков;
- программы по профессиональной подготовке и возвращению «мозгов».

Материалы доклада на парламентских слушаниях ГД ФС РФ «О совершенствовании законодательного обеспечения биотехнологической отрасли промышленности» 15 октября 2009 г.

РАЗРАБОТКА ОРИГИНАЛЬНЫХ ПЕПТИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ: СИТУАЦИЯ В РОССИИ И В МИРЕ

В.И. ДЕЙГИН*

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
ООО «Пептос Фарма», Москва*

Мне хотелось бы рассказать о некотором направлении в нашей биотехнологии, которое еще сохранилось и не только сохранилось, но и удержало приоритеты на мировом уровне. Эта область называется «пептидные лекарственные препараты».

Следует подчеркнуть, что старт и импульс к развитию этого важного научно-практического направления был дан в период расцвета отечественной биотехнологии, в конце 80-х годов прошлого века, когда академик Юрий Анатольевич Овчинников основал его в Институте биоорганической химии РАН и была организована первая фирма «Пептос Фарма», которой были поручены внедрение и разработка пептидных лекарственных препаратов. Это — типичный путь практической реализации передовых научных идей, ничего лучшего пока не придумано. ИБХ РАН является крупнейшим в мире учреждением биологического профиля, которое имело и имеет большие заделы в области фундаментальных исследований пептидов. Предстояло сделать конкретный практический продукт, востребованный народным хозяйством страны в наиболее актуальных пунктах, например, здравоохранении, ветеринарии и др.

Итак, ООО «Пептос Фарма» существует с 1989 года и за это время основательно вошло в указанную перспективную сферу биотехнологии. Какова ситуация здесь сейчас в нашей стране и в мире?

На сегодняшний день известно около 5 тысяч лекарственных средств, которые продавались в 2006 году. На американском рынке объемом почти 280 млрд. продавалось на 28 млрд. соединений пептидных и белковых препаратов. То есть, 10% в экономическом выражении и всего лишь 1% в количественном выражении занимали пептидные и пептидно-белковые средства.

Однако следует отметить, что доходность современных лекарственных средств пептидно-белковой природы в 10 раз выше, чем обычных препаратов.

Если в мире с 1946 по 2009 гг. создано около 5 тысяч химических фармацевтических препаратов, то в нашей стране сделано всего лишь 7 препаратов — это 0,1% от мировой продукции. Если же подсчитать, сколько пептидных препаратов разработано в мире, то цифра составит всего лишь около 40 соединений. Следовательно, это очень новая область фармацевтической и биотехнологической промышленности, ей всего около 30 лет. И тем не менее за истекший сравнительно короткий период наша страна создала 12 оригинальных пептидных препаратов — более четверти мировой продукции (табл. 1). Это действительно факт, без всякого намека на саморекламу.

Таблица 1

**Оригинальные отечественные препараты,
созданные за период 1946–2009 гг.**

Химические фармпрепараты	Пептидные препараты
Фторафур	Даларгин
Мелдронат	Тимоген
Фенибут	Семакс
Этмозин	Ликопид
Полиоксидоний	Иммунофан
Арбидол	Тимодепрессин
Мексидол	Дельтаран
	Гепон
	Седатин (вет.)
	Бестим (аналог Тимогена)
	Ноопепт
	Стемокин

Между тем ситуация катастрофически меняется. В 2008 году уже было 46 соединений зарегистрировано в мире и более 360 соединений на различных стадиях их исследования. А в России остались все те же 12 препаратов

© 2010 г. Дейгин В.И.

* Автор для переписки:

Дейгин Владислав Исаакович, д.б.н., профессор
директор ООО «Пептос Фарма», Москва

и всего три оригинальных пептидных препарата находятся на стадии клинических исследований. То есть, мы можем в течение нескольких следующих лет просто потерять те приоритеты, которые наша страна завоевывала в течение двух с лишком десятилетий. Существует прогноз, согласно которому в мире после 2010 года будет разработано около 200 синтетических препаратов, причем из них планируется примерно 15 отечественных (менее 10%).

За 20 лет работы в Институте биоорганической химии РАН и ООО «Пептос Фарма» были разработаны и зарегистрированы четыре лекарственных препарата: один — для ветеринарии, второй — для медицины, и закончены доклинические испытания ещё двух препаратов. Расскажу и о препаратах, которые уже есть на рынке. Так, совсем новый препарат зарегистрирован только в этом году с абсолютно уникальным механизмом действия.

Хочется остановиться и на таком существенном аспекте производства лекарств, как интеллектуальная собственность. Хотя препаратов пептидной природы небольшое количество, но наши отечественные разработки востребованы в мире. За 60 лет существования нашей отечественной промышленности с точки зрения научных разработок всего на Запад проданы 4 лицензии: это — лицензия на этмозин и 3 лицензии на пептидные препараты, 2 из которых разработаны в нашем институте (табл.2).

Таблица 2

Зарубежные лицензии на оригинальные лекарственные препараты, проданные за период с 1946 по 2009 годы в СССР и России

Химические фармпрепараты	Пептидные препараты
Этмозин (1976 г., Дюпон, США)	Тимоген (1995 г., Сайтран, США)
	Тимодепрессин (2006 г., Апотекс, Канада)
	Бестим (аналог тимогена) (2006 г., Сайклон, США)

Специалистами будут оценены и другие данные, которые я приведу в отношении лицензирования. Так, на наши препараты было получено более 80 патентов в 30 ведущих странах мира. На один только тимодепрессин за 1996—1999 гг. было приобретено 20 патентов в таких странах, как США (4), Канада, Бразилия, Китай (по одному).

Что касается содержательного значения наших пептидных препаратов, их качества, то могу уверенно отметить, что такие как тимоген и тимодепрессин зареко-

мендовали себя с самой наилучшей стороны. Например, тимоген (L-Glu-L-Trp) — известный иммуномодулятор, тимодепрессин (γ -D-Glu-D-Trp) — иммунодепрессант. Разрешенный к медицинскому применению стемокин (L-Ile-L-Glu-L-Trp) является стимулятором гемопоэза.

Общее резюме о перспективах рассмотренного направления таково:

- Пептидная биотехнология — область отечественной науки и практического внедрения, которая еще не потеряла возможность быть конкурентоспособной на мировом уровне.

- Государственная поддержка биотехнологии позволит нарастить темпы научных исследований в приоритетных областях прикладной биотехнологии и успешно конкурировать в мировом научном сообществе.

- Практическим результатом в ближайшие 3—4 года может быть создание новых и возрождение ряда существующих научных коллективов, занимающихся инновационными разработками новых лекарственных препаратов и средств диагностики.

- Адекватное финансирование позволит осуществлять международную патентную защиту получаемых результатов и участвовать в международной кооперации по созданию дорогостоящих современных лекарств.

- Разработка и внедрение новых оригинальных лекарственных средств и методов диагностики укрепит научный авторитет и финансовое положение разработчиков и уменьшит стратегическую зависимость России от импорта современных зарубежных лекарственных и диагностических препаратов.

Особо хочу выделить организационно-финансовые проблемы:

- Отсутствие первоначального финансирования патентных исследований, подготовки и сопровождения российских и международных патентных заявок.

- Различия в экспериментальной материально-технической базе в России и в западных странах (США, Канаде, Европе) и, как следствие, несоответствие стандартам GLP при проведении исследований.

- Доступность (за большие деньги) методов скрининга, моделей *in vivo*, доклинических исследований в западных странах (США, Канаде, Европе) и полное отсутствие таких услуг в России. Отсутствие системы финансирования для создания таких услуг.

Материалы доклада на парламентских слушаниях ГД ФС РФ «О совершенствовании законодательного обеспечения биотехнологической отрасли промышленности» 15 октября 2009 г.

К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ВЫДАЮЩЕГОСЯ ФРАНЦУЗСКОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО БИОЛОГА ЖАКА МОНО

В.С. ВОРОБЬЕВ*

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва



В 2010 году исполняется 100 лет со дня рождения известного французского молекулярного биолога и микробиолога Жака Люсьена Моно (1910–1976). Ему вместе с еще двумя французскими учеными — Андре Львовым и Франсуа Жакобом — удалось в середине XX столетия выполнить ключевые исследования, укрепившие центральную догму молекулярной генетики в цепи «ДНК — белок» и таким образом обеспечить существенный вклад галльского духа в многолетнюю молекулярно-биологическую гонку, в которой доминировали в основном англосаксы.

Отдавая дань памяти знаменитому исследователю, вначале следует остановиться на биографических данных. Ж. Моно родился 9 февраля 1910 года в Париже. Отец его, Люсьен Моно, имел швейцарские корни, мать Шарлотта Тодд (МакГрегор) — американка шотландского

происхождения. Отец был художником и способствовал развитию у ребенка гуманитарных способностей. Когда Жаку исполнилось 7 лет, семья переехала в Канны, на средиземноморское побережье. Здесь он поступил в лицей, где получил очень хорошее образование.

Дальше, как и всякого талантливого француза, его ждал Париж. В 1928 г. Моно поступил в Сорбонну, на факультет естественных наук. Однако уровень преподавания в университете его не устраивал, и он искал выход своим устремлениям к прогрессивным знаниям. К счастью, ему посчастливилось найти выдающихся наставников, которые направили на путь научных исследований. Среди них были Андре Львов (будущий дольщик по Нобелевской премии), который привил вкус к микробиологии, Борис Эфрусси, познакомивший с основами генетики, Жорж Тесье, учивший количественным методам, Луи Рапкин, проповедывавший идею, что только химия дает полное объяснение жизненных явлений.

В 1931 году Жак Моно получил степень бакалавра, а в 1934 г. окончил Парижский университет и поступил в него на работу (здесь он трудился до 1945 года). Еще в студенческий период он был ассистентом в лаборатории органической жизни, а по окончании университетского курса перешел в зоологическую лабораторию на должность ассистента. Через 1 год был назначен доцентом в этой лаборатории.

Важным моментом в жизни начинающего ученого стала годичная стажировка в 1936–1937 гг. в США, у Т.Х. Моргана. Он попал сюда, в Калифорнийский технологический институт благодаря выделению Рокфеллеровской стипендии. Но самое главное — он приехал вместе с учителем Б. Эфрусси, что способствовало большей концентрации на научных проблемах и высокой эффективности обучения. В период работы в лаборатории Моргана Ж. Моно занимался биохимической генетикой дрозофилы. Примечательно и то, что он ознакомился со стилем деятельности моргановского научного коллектива, который существенно отличался от традиций Сорбонны, особенно в плане свободного обмена мнениями и т.д. По

© 2010 г. Воробьев В.С.

* **Автор для переписки:**

Воробьев Вадим Сергеевич

к.м.н., член Центрального Правления

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

E-mail: obr@biorosinfo.ru

возвращении из Америки в Париж он еще несколько месяцев поработал в лаборатории Эфрусси в Институте физико-химической биологии по дрожозфильной тематике, после чего вернулся к своим должностным обязанностям.

Начиная с этого времени, Моно начинает серию экспериментов с кишечной палочкой. Именно тогда он обнаружил феномен адаптации ферментов, заключающийся в том, что в зависимости от вида углевода активизировались разные ферменты. Результаты были обобщены в докторской диссертации — в 1941 году Моно стал доктором философии. Нужно подчеркнуть, что с тех пор началось тесное научное взаимодействие Моно с Андре Львовым. Собственно говоря, и тема адаптации ферментов была инспирирована последним.

Во время немецкой оккупации Ж. Моно стал активным участником сопротивления, даже был арестован гестапо, но ему удалось бежать. За это он был удостоен военных наград: звание Кавалера Ордена Почетного Легиона, Военный крест, Бронзовая звезда; ему присвоено звание почетного полковника запаса.

После 2-й Мировой войны в 1945 г. Моно начал работать в Парижском Институте Пастера в должности заведующего лабораторией физиологии микроорганизмов в департаменте, которым руководил Андре Львов. С этого времени до конца жизни он связал свою судьбу с этим знаменитым учреждением. В 1954 году Моно стал руководителем отдела биохимии клетки Пастеровского института, а с 1971 г. — директором данного института. Параллельно он занимал ряд других постов: с 1959 по 1967 гг. — профессор метаболической химии в Сорбонне, с 1967 по 1972 гг. — профессор в Коллеж де Франс.

Научные интересы Жака Моно были сосредоточены на экспериментальной разработке системы анализа биохимической генетики клетки. Он был в курсе выдающихся достижений в молекулярной биологии того времени, в частности, работ представителей «фаговой группы» — Макса Дельбрюка и Сальвадора Лурия. В 1946 году участвовал на симпозиуме в Колд Спринг Харборе (США), где смог познакомиться с Дельбрюком, Бэйли, Херши и другими исследователями.

Однако Моно шел своим собственным путем. Основные труды Моно посвящены изучению роста бактерий, индукции и репрессии ферментов, исследованию механизма регуляции синтеза белка у бактерий. Он разработал метод непрерывного культивирования бактерий.

Им в содружестве с Мадлен Жоли и Анн-Мари Торриани был обнаружен мутантный штамм *Escherichia coli*, содержащий бета-галактозидазу — фермент, активи-

ровавшийся в присутствии лактозы и расщеплявший ее на составляющие углеводы. Для объяснения данного факта были предложены две теории.

Согласно первой, происходило ингибирование фермента окружающей средой, а активация процесса являлась следствием устранения этого торможения. Вторая теория основывалась на предположении, что ингибируется ген, а активизация фермента связана с деингибированием гена.

Судьбоносной оказалась его встреча с Франсуа Жакобом, который так же, как и Ж. Моно, трудился в Институте Пастера. Она произошла в начале 50-х годов XX века и послужила началом их многолетнего плодотворного сотрудничества. Недавний выпускник и докторант (1954 г.) Сорбонны Ф. Жакоб был на 10 лет моложе Моно, тем не менее благодаря покровительству и научному воспитанию со стороны А. Львова, а также, несомненно, благодаря своему исследовательскому таланту уже в 1956 г. стал заведующим лабораторией генетики клетки. Таким образом, формальные стартовые позиции для совместной работы в прославленном медицинском учреждении Франции были сходными, а содержательная сторона не заставила себя долго ждать.

В 1958 году Ж. Моно предложил (совместно с Ф. Жакобом и А. Львовым) схему синтеза белка в бактериальной клетке. В 1961 г. он высказал гипотезу, а затем доказал факт переноса генетической информации с ДНК на рибосомы при участии особой РНК — информационной (матричной; мРНК) и перевода информации с языка нуклеотидов на язык аминокислот (синтез белка). Вместе с Ф. Жакобом они сформулировали концепцию оперона — генного комплекса, детерминирующего синтез определенных белков (например, ферментов, участвующих в биосинтезе какого-либо метаболита). Их работы по Лас орегон являются классикой молекулярной биологии. Серия его публикаций по данной проблеме приведена в списке литературы [9, 10, 11, 12, 19, 24, 26, 27, 28, 29]. Показательно, что одна из работ этого цикла была напечатана в первом томе нового журнала «Journal of Molecular Biology» [27](!).

Это были беспрецедентными для того времени открытия, которые вызвали немедленную реакцию Нобелевского комитета. В 1965 году Жак Моно вместе с Франсуа Жакобом и Андре Львовым были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине «за открытия, связанные с генетическим контролем синтеза ферментов и вирусов» (рис. 1).

Все трое выступили 10 декабря 1965 года на Нобелевских торжествах с традиционными лекциями —

каждый по своей тематике [13, 15] (доклад Ж. Моно: «От адаптации ферментов к аллостерическим переходам» [21]), а также с прочувствованными речами на французском языке на банкете, в которых говорили о значении науки и цитировали отечественных классиков (Паскаля, Монтеня). Ж. Моно был наиболее краток и подчеркнул, что Нобелевская премия является данью уважения меньше к его личности, чем к той научной дисциплине, которой он занимается [20].



Рис. 1. Нобелевские лауреаты: в центре — Жак Моно, справа от него — Андре Львов, слева — Франсуа Жакоб. Источник: <http://dic.academic.ru>

Надо отметить, что это присуждение состоялось через 3 года после вручения в 1962 г. Нобелевской премии Дж. Уотсону и Ф. Крику (вместе с М. Уилкинсом), но, учитывая, что две промежуточные премии 1963 и 1964 гг. не были связаны тематически с молекулярной генетикой, то получается, что Жакоб и Моно (совместно с А. Львовым) получили награду вслед за великими первооткрывателями двойной спирали ДНК.

Такое обстоятельство обеспечило французским исследователям небывалую славу. Две пары ученых царили в 60–70-е годы в научном мире: Уотсон — Крик и Жакоб — Моно. Их имена вызывали огромный пиетет и уважение. Воздавалось должное и именам работников-одиночек или руководителей научных коллективов (Эйвери, Чаргафф, Сенгер, Очоа, Корнберг, Ниренберг, Корана и др.), однако на указанные уникальные дуэты пришлось самый высокий пик популярности. При этом забывались не менее достойные третьи лица — участники процесса (Уилкинс и Львов), но так уж устроен ритуал прославления: или один, или, максимум, двое! Сыграло

свою роль и то, что они публиковались в связке «Жакоб — Моно», а пара «Уотсон — Крик» была впервые обнародована и исторически запечатлена в эпохальной статье в «Nature» 1953 г. Конечно, нельзя забывать главное: обе пары сделали самые яркие, базовые открытия XX столетия: одна выяснила строение ДНК, а другая — как считывается информация с ДНК на белок.

В 1965 году Ж. Моно вместе с коллегами предложил теорию аллостерии [17], что было использовано в энзимологии. Еще раньше к этой теме он обращался в 1963 г. [16].

После Нобелевского признания в 55 лет Ж. Моно недолго занимался активной научной деятельностью. В 1971 году, став директором Пастеровского института, он отошел от исследовательской работы и сосредоточился на усовершенствовании лабораторного оборудования.

В 1972 г. скончалась его супруга Одет Брюль (археолог по специальности), с которой они вместе прожили 34 года и воспитали двух сыновей. После этого Ж. Моно тяжело заболел и незадолго до своей смерти в 1976 г. переехал на юг, в Канны, которые он считал своей второй родиной (там же он и похоронен).

Жак Моно, по отзывам современников и лиц, близко знавших его, был разносторонней личностью, с философским складом ума и широкими интересами [18]. В своих философских построениях [23] он был ближе всего к экзистенциализму, что неудивительно, так как у ученого было общение с его адептами (например, Камю). Он любил афоризмы, и нередко они становились достоянием всего мирового научного сообщества, Так случилось с его изречением: «Что верно для кишечной палочки, то верно и для слона».

В своей известной работе «Случайность и необходимость» (Le Hasard et la Necessite, 1970) [22] Моно, основываясь на достигнутых к середине XX века знаниях, утверждал, что все формы жизни — это результат случайных мутаций (случайность) и дарвиновского отбора (необходимость). Он любил музыку и был в достаточной степени профессионалом в данной области: играл на виолончели в квартете и руководил хором. Известно также о его увлечении альпинизмом и парусным спортом.

Вполне понятно, что такой человек, как Моно, не был обделен вниманием научного сообщества и государственных структур. Он получил премию Монтиони по физиологии Академии наук Франции (1955), был награжден медалью Луи Рапкина (Лондон, 1958), был избран почетным иностранным членом Американской академии искусств и наук (1960), лауреатом премии

Шарля Леопольда Мейера Академии наук Франции (1962), почетным иностранным членом Германской академии естествоиспытателей «Леопольдина» (1965), почетным профессором Университета Чикаго (1965), иностранным членом Королевского общества (1968), иностранным членом Национальной академии наук США (Вашингтон, 1968), иностранным членом Американского философского общества (1969), почетным профессором Рокфеллеровского университета (1970). Естественно, что в своем отечестве ученый стал Кавалером Ордена Почетного Легиона (1963). О военных наградах сообщалось выше.

Биографические сведения о Жаке Моно имеются в справочниках, энциклопедиях, Нобелевских документах, специальных исследованиях и сборниках [3, 4, 6, 7, 8, 25, 31]. Существуют и информативные Интернет-источники [1, 2, 5, 14, 20, 30, 32]. Полная библиография трудов Ж. Моно приведена на сайте <http://www.pasteur.fr/infosci/biblio/ressources/histoire/monod.php>.

Литература

1. Жак Люсьен Моно [Электронный ресурс]. — Режим доступа: www.krugosvet.ru/.../MONO_ZHAK_LYUSEN.html. — Дата обращения: 14.03.2010.
2. Жак Моно [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://dic.academic.ru/>. — Дата обращения: 13.03.2010.
3. Лауреаты Нобелевской премии: Энциклопедии / Пер. с англ. В 2-х т. — М.: Прогресс, 1992. — Т. 2. — С. 107–110.
4. Марьянович А.Т., Князькин И.В. Взрыв и цветение. Нобелевские премии по медицине 1901–2002. — СПб.: Издательство ДЕАН, 2003. — С. 93–101.
5. Моно, Жак — Википедия [Электронный ресурс]. — Режим доступа: www.ru.wikipedia.org/wiki/Моно_Ж. — Дата обращения: 13.03.2010.
6. Bourdier Juliette. Jacques Monod, religion sans deux. — Paris, Gallimard, 1992.
7. Cohen G.N. A lifetime with microbes // Comprehensive Biochemistry. — 2005. — Vol. 44. — P. 133–164.
8. Debré Patrice. Jacques Monod. — Paris, Flammarion dans la collection «Grandes biographies», 1996.
9. Jacob F. and Monod J. Gènes de structure et gènes de régulation dans la biosynthèse des protéines // Compt. Rend. — 1959. — Vol. 249. — P. 1282–1284.
10. Jacob F. and Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins // J. Mol. Biol. — 1961. — Vol. 3. — P. 318–356.
11. Jacob F., Perrin D., Sanchez C., and Monod J. L'opéron: groupe de gènes à expression coordonnée par un opérateur // Compt. Rend. — 1960. — Vol. 250. — P. 1727–1729.
12. Jacob F., Ullmann A. and Monod J. Le promoteur, l'élément génétique nécessaire à l'expression d'un opéron // Compt. Rend. — 1964. — Vol. 258. — P. 3125–3128.
13. Jacob Francois. Genetics of the bacterial cell. Nobel Lecture, December 11, 1965 / In: Nobel Lectures. Physiology or Medicine, 1963–1970. — Elsevier, Amsterdam, 1972. — P. 148–171.
14. Jacques Monod. Biography / In: Nobel Lectures. Physiology or Medicine 1963–1970. — Elsevier, Amsterdam, 1972 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: www.Nobelprize.org. — Дата обращения: 15.03.2010.
15. Lwoff Andre. Interaction among virus, cell, and organism. Nobel Lecture, December 11, 1965 / In: Nobel Lectures. Physiology or Medicine, 1963–1970. — Elsevier, Amsterdam, 1972. — P. 172–187.
16. Monod J., Changeux J.P. and Jacob F. Allosteric proteins and cellular control systems // J. Mol. Biol. — 1963 Apr. — Vol. 6. — P. 306–329.
17. Monod J., Wyman J., Changeux J.P. On the nature of allosteric transitions. A plausible model // J. Mol. Biol. — 1965 May. — Vol. 12. — P. 88–118.
18. Monod J.L. From biology to ethics. — Salk Institute for Biological Studies, 1969.
19. Monod Jacques, Lwoff Andre, and Ullmann A. Selected papers in molecular biology. — Academic Press, 1979. — 765 p.
20. Monod Jacques. Banquet speech. Nobel Prize in Physiology or Medicine 1965 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1965/monod-speech.html. — Дата обращения: 20.03.2010.
21. Monod Jacques. From enzymatic adaptation to allosteric transitions. Nobel Lecture, December 11, 1965 / In: Nobel Lectures. Physiology or Medicine, 1963–1970. — Elsevier, Amsterdam, 1972. — P. 188–209 (перепечатка в Science. — 1966 Oct 28. — Vol. 154. — N 3748. — P. 475–483).
22. Monod Jacques. Le Hazard et la Necessite. Essai sur la philosophie naturelle de la biologie moderne. — Editions du Seuil, Paris, 1970. — 219 p. (имеется английский перевод: Monod Jacques, Wainhouse Austryn (translator). Chance and Necessity: An Essay on the Natural Philosophy of Modern Biology. — Vintage Books, 1972. — 199 p.; также издание: New York, Alfred A. Knopf, 1971).
23. Monod Jacques. Pour une ethique de la connaissance (Histoire des sciences). — La decouverte, 1988. — 169 p.
24. Monod, J. and F. Jacob. Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth and differentiation // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. — 1961. — Vol. 26. — P. 389–401.
25. Origins of Molecular Biology: a Tribute to Jacques Monod. Ed. by A. Ullmann. — ASM Press, 2003.
26. Pardée A.B., Jacob F. and Monod J. Sur l'expression et le role des allèles «inductible» et «constitutif» dans la synthèse

- de la β -galactosidase chez des zygotes d' *Escherichia coli* // *Compt. Rend.* – 1958. – Vol. 246. – P. 3125–3128.
27. *Pardée A.B., Jacob F. and Monod J.* The genetic control and cytoplasmic expression of inducibility in the synthesis β -galactosidase of *Escherichia coli* // *J. Mol. Biol.* – 1959. – Vol. 1. – P. 165–168.
28. *Perrin D., Jacob F. and J. Monod.* Biosynthèse induite d'une protéine génétiquement modifiée, ne présentant pas d'affinité pour inducteur // *Compt. Rend.* – 1960. – Vol. 250. – P. 155–157.
29. *Riley M., Pardee A.B. Jacob F. and Monod J.* On the expression of a structural gene // *J. Mol. Biol.* – 1960. – Vol. 2. – P. 216–225.
30. *Ullmann A.* Jacques Monod, 1910–1978: his life, his work and his commitments // *Research in Microbiology.* – 2009 Dec 31 (в печати) [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.unboundmedicine.com/medline/ebm/research/Ullmann_A_Research_in_Microbiology_journal_articles. – Дата обращения: 15.03.2010.
31. *Ullmann A.* The French school of molecular biology // *Research in Microbiology.* – 2008. – Vol. 159(1). – P. 15–20.
32. Video interview with Jacques Monod. Vega Science Trust [Электронный ресурс]. Режим доступа: www.en.wikipedia.org/wiki/Jacques_Monod.External_links. – Дата обращения: 22.03.2010.
33. *Willson C., Perrin D., M. Cohn, Jacob F. and Monod J.* Non-inducible mutants of the regulator gene in the «lactose» system of *Escherichia coli* // *J. Mol. Biol.* – 1964 Apr. – Vol. 8. – P. 582–592.

Резюме. В связи со 100-летием со дня рождения известного французского молекулярного биолога Жака Моно проводится анализ его жизни и деятельности.

Ключевые слова: история науки, молекулярная биология. мРНК, биография, Жак Моно.

TO THE 100 ANNIVERSARY OF THE BIRTH OF THE OUTSTANDING FRENCH MOLECULAR BIOLOGIST JACQUES MONOD

V.S. VOROBYEV

Ovchinnikov Society of Biotechnologists of Russia, Moscow

In connection with the 100th anniversary of the birth of the famous French molecular biologist Jacques Monod analyzes his life and work.

Keywords: history of science, molecular biology. mRNA, biography, Jacques Monod.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2010 ГОДА*

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

1800 — Карл Фридрих Бурдах (Karl Friedrich Burdach, 1776—1847), немецкий медик, анатом, физиолог, психолог, предложил термин «биология» — за два года до его введения французским естествоиспытателем Ж.Б. Ламарком (1744—1829) и германским натуралистом Г.Р. Тревиранусом (1776—1837), которым официально приписывается приоритет. Имеются и другие предшественники, среди них Гете (1796, запись в дневнике). Источник: Karl Friedrich Burdach. *Propraedeutik zum Studium der gesammten Heilkunst. Ein Leitfaden akademischer Vorlesungen.* — Leipzig, 1880. — S. 62 (§ 195).

1815 — русский химик К.Г.С. Кирхгоф (1764—1841) получил из пшеницы экстракт, способный превращать крахмал в сахар.

1830 — открытие белков.

1835 — немецкий ботаник Х. фон Мольте впервые наблюдал деление растительных клеток.

1840 — Ю. Либих сформулировал теорию минерального питания растений.

1855 — обнаружена кишечная палочка (*Escherichia coli*) — будущий главный «труженик» биотехнологии.

1865 — Грегор Мендель обнаружил на заседании общества естествоиспытателей в Брно результаты исследований о передаче по наследству признаков при скрещивании гороха.

1870 — немецкий цитолог В. Флеминг (1843—1905) обнаружил митоз.

1875 — Фрэнсис Гальтон продемонстрировал полезность близнецового метода для изучения наследственных свойств. Вышел в свет русский перевод его книги «Наследственность таланта».

1875 — Чарльз Дарвин выдвинул теорию существования «геммул» (наследственных частиц).

1880 — А. Коссель расщепил нуклеиновые кислоты на более мелкие составные части, включая фосфорную кислоту и сахар.

1880 — Луи Пастер напечатал работу об аттенуации микробов.

1895 — С.Н. Виноградский (1856—1953) показал процесс фиксации азота бактериями *Clostridia* в отсутствие кислорода.

1900 — повторное «открытие» законов Менделя Карлом Корренсом, Эрехом фон Чермаком и Гуго де Фризом и соответствующие публикации (на следующий год У. Бэтсон сделал перевод на английский язык).

1900 — начало работы на дрозофиле.

1905 — введен термин «генетика» (У. Бэтсоном: сначала — в письме, а в 1906 году — в печати).

1905 — Э. Вильсон и Н. Стивенс установили, что X- и Y-хромосомы определяют пол.

1905 — вручение Нобелевской премии Р. Коху.

1910 — создание Т.Х. Морганом линейной теории гена, согласно которой гены в хромосоме расположены в линейном порядке с образованием групп сцепления (один из базовых принципов хромосомной теории наследственности).

1910 — вручение Нобелевской премии по физиологии и медицине Альбрехту Косселю (1853—1927) за работы по белковым веществам, включая нуклеины.

1920 — открытие гормона роста (Эванс Г. и Лонг К.).

1925 — Н.И. Вавилов начал свою первую экспедицию по изучению генетических ресурсов земного шара.

1925 — К.Б. Бриджес (ученик Моргана) предложил балансовую теорию формирования пола: у дрозофилы пол развивающейся зиготы обусловлен соотношением числа аутосом и X-хромосом.

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

1925 — использование ультрацентрифуги для определения молекулярной массы (Теодор Сведберг).

1930 — вручение Нобелевской премии по химии Гансу Фишеру (1881–1945) за конструирование гемина и хлорофилла.

1930 — в США принят закон о патентах на растения.

1935 — А.Н. Белозерский первым в мире выделил чистую ДНК.

1935 — американский вирусолог и биохимик В. Стэнли получил в кристаллическом виде вирус табачной мозаики.

1940 — О. Эйвери в Рокфеллеровском институте изолировал чистую ДНК.

1940 — обнаружение резус-фактора (Ландштейнер К. с коллегами).

1945 — Нобелевская премия по физиологии и медицине (А. Флеминг, Э.Б. Чейни, Х.У. Флори) за открытие пенициллина.

1945 — Нобелевская премия по химии А.И. Виртанену (1895–1973) за исследования и открытия в области агрохимии и химии пищевых продуктов.

1945 — Макс Дельбрюк организовал в США курсы по молекулярной биологии.

1945 — основание Организации ООН по вопросам продовольствия и сельского хозяйства (ФАО) — Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations.

1950 — Э. Чаргафф создал свои знаменитые правила (соотношение в ДНК аденина и тимина 1:1 и гуанина и цитозина 1:1 постоянно у различных организмов).

1950 — Нобелевская премия Ф. Хенчу, Э. Кендаллу, Т. Рейхштейну за исследования гормонов коры надпочечников.

1955 — открыт фермент, синтезирующий РНК (Северо Очоа).

1955 — открытие нового класса фитогормонов — цитокининов (Скут Ф., Миллер К. и др.).

1955 — вручение Нобелевской премии по физиологии и медицине А.Х.Т. Теореллю (1903–1981) за исследование природы и способа действия окислительных ферментов.

1955 — Нобелевская премия по химии В. Дю Виньо за синтез полипептидного гормона.

1960 — открытие мРНК.

1960 — полный синтез хлорофилла (Вудворд Р.Б.).

1960 — разработка ферментативного метода получения изолированных протопластов (Кокинг Э.).

1960 — 50 лет со дня вручения Нобелевской премии Ф. Бернету (1899–1985) и П. Медавара (1915–1987) за исследования приобретенной иммунологической толерантности.

1965 — обнаружение С. Бреннером с соавторами стоп-кодонов.

1965 — Р. Холли определил полную нуклеотидную последовательность тРНК (тРНК аланина дрожжей).

1965 — гибридизация клеток мыши и человека (Г. Харрис и Дж. Уоткинс): Harris H., Watkins J.F. Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species // Nature. — 1965 Feb 13. — Vol. 205. — P. 640–646.

1965 — классификация плазмид.

1965 — Нобелевская премия по физиологии и медицине Андре Львову, Ф. Жакобу и Ж. Моно за открытие генетической регуляции синтеза ферментов и вирусов.

1965 — вручение Нобелевской премии по химии Р.Б. Вудворду за исключительный вклад в осуществление органического синтеза.

1970 — открытие обратной транскриптазы (Х. Темин, Д. Балтимор)

- 1970** — открытие рестриктазы (Гамильтон Смит).
- 1970** — открытие первого онкогена (SRC) в вирусе (P. Duesberg и P. Vogt, вирусологи из UCSE).
- 1970** — в США принят закон о защите сортов растений.
- 1975** — разработка Ф. Сенгером метода секвенирования ДНК.
- 1975** — получение Нобелевской премии по физиологии и медицине Р. Дульбекко, Х. Теминым и Д. Балтимором.
- 1975** — Нобелевская премия по химии — К. Прелог.
- 1975** — создание первых моноклональных антител (Георг Келер и Цезарь Мильштейн — Нобелевская премия 1984 г.).
- 1975** — конференция в Асиломаре с призывом наложить мораторий на эксперименты с рекомбинантной ДНК. Ее инициаторами были выдающиеся молекулярные биологи: П. Берг, Д. Балтимор, Дж. Уотсон и др.
- 1975** — правительственное постановление в США, регламентирующее эксперименты с рекомбинантными генами.
- 1975** — создание рекомбинантного инсулина.
- 1975** — разработаны методы гибридизация (colony hybridization) и Southern blotting для выявления специфических последовательностей ДНК.
- 1980** — Нобелевская премия по химии П. Бергу (половинная) — за фундаментальные исследования в области биохимии нуклеиновых кислот, в частности, рекомбинантной ДНК; другая половина вручена У. Гилберту и Ф. Сенгеру за их вклад в определение последовательности оснований в нуклеиновых кислотах.
- 1980** — Нобелевская премия по физиологии и медицине Б. Бенаддеррафу, Ж. Доссе, Дж. Снеллу за открытия генетически детерминированных структур поверхностей клеток, регулирующих иммунологические реакции.
- 1980** — в США принято решение о возможности патентования генно-инженерных организмов.
- 1980** — С. Коэн и Г. Бойер получили патент США на использование вирусных и плазмидных векторов для создания рекомбинантной ДНК.
- 1985** — клонирована полностью активная обратная транскриптаза мыши и экспрессирована в кишечной палочке.
- 1985** — компания Генентех получила разрешение FDA на применение протропина при дефиците гормона роста у детей.
- 1985** — первые полевые испытания генетически модифицированных растений, устойчивых к насекомым, вирусам и бактериям.
- 1985** — в журнале «Science» опубликовано сообщение о новой технологии, основанной на ПЦР, позволяющей генерировать миллиарды копий последовательности гена-мишени за несколько часов (Cetus Corporation).
- 1985** — вышло в свет руководство Национального института здоровья (США) для осуществления экспериментов по генотерапии на людях.
- 1985** — в Cal Bio клонирован ген, кодирующий белок сурфактанта легких человека.
- 1990** — начало реализации проекта «Геном человека» под руководством Дж. Уотсона.
- 1990** — первая в мире успешная генотерапия (спасена жизнь 4-летней девочки, страдавшей наследственным иммунным расстройством — ADA дефицит, вызывающий SCID).
- 1990** — первые успешные полевые испытания генетически модифицированного хлопка (Calgene Inc.).
- 1990** — FDA лицензировала тестирующее антитело к гепатиту С (Chiron).
- 1995** — завершено исследование полной генетической последовательности невирусного организма — бактерии *Haemophilus influenzae* (1,8 млн. пар нуклеотидов).

1995 — впервые пересажен костный мозг бабуина пациенту со СПИД.

2000 — объявлено об общем плане последовательностей в человеческом геноме, то есть о первой реконструкции его полного генома (фактическое завершение проекта «Геном человека» — 2003 г.).

2000 — сообщено о секвенировании генома дрозофилы (165 млн. пар оснований, 14 тыс. генов).

2000 — создание «золотого риса» — генномодифицированной культуры, вырабатывающей повышенное количество бета-каротина.

2000 — клонирование свиньи в эксперименте.

2000 — составление полной карты генома растения *Arabidopsis*.

ПЕРСОНАЛИИ

165 лет со дня рождения И.И. Мечникова (1845–1916).

150 лет со дня рождения Э. Бухнера (1860–1917).

145 лет со дня рождения и 70 лет со дня смерти А. Гардена (1865–1940) — Нобелевская премия по химии 1929 г.

120 лет со дня рождения Г. Меллера (1890–1967), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1946 г.

115 лет со дня рождения Х. Дама — лауреата Нобелевской премии 1943 г. за открытие витамина К.

115 лет со дня рождения А.И. Виртанена (1895–1973) — Нобелевский лауреат 1945 г.

110 лет со дня рождения Ганса Кребса (1900–1981).

110 лет со дня рождения Н.В. Тимофеева-Ресовского (1900–1981).

105 лет со дня рождения Северо Очоа (1905–1993).

100 лет со дня рождения французского молекулярного биолога Жака Моно (1910–1976), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1965 г. (совместно с Андре Львовым и Франсуа Жакобом).

95 лет со дня рождения П. Медавара (Нобелевская премия 1960 г.).

95 лет со дня рождения Э.У. Сазерленда (Нобелевская премия 1971 г. за изучение механизма действия гормонов, в т.ч. цАМФ).

90 лет со дня рождения американского биохимика Эдмонда Ганса Фишера (Нобелевская премия по физиологии и медицине 1992 г. за фосфорилирование белков) — не путать с немецкими учеными: 1) Эмилем Германом Фишером (1952–1919), лауреатом Нобелевской премии по химии 1902 г.; 2) Гансом Эйгеном Фишером (1881–1945), лауреатом Нобелевской премии по химии 1930 г.; 3) Эрнстом Отто Фишером (1918–2007), лауреатом Нобелевской премии по химии 1973 г.

90 лет со дня рождения П.Д. Митчелла (1920–1992), лауреата Нобелевской премии по химии 1978 г.

90 лет со дня рождения Б. Бенацерафа (Нобелевская премия 1980 г.).

85 лет со дня рождения М. Родбелла (Нобелевская премия 1994 года по физиологии и медицине за обнаружение G-белка — совместно с А. Гилманом).

85 лет со дня рождения Дж. Ледерберга, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1958 г. (вместе с Дж. Бидлом и Э. Тейтмом).

70 лет со дня рождения П. Догерти (Нобелевская премия 1996 г. за открытие Т-киллеров).

115 лет со дня смерти Луи Пастера (1822–1895).

100 лет со дня смерти Р. Коха (1843–1910).

65 лет со дня смерти Т.Х. Моргана (1866–1945).

1945 – 65 лет со дня смерти Ганса Фишера (1881–1945), лауреата Нобелевской премии по химии 1930 г.

55 лет со дня смерти А. Флеминга, первооткрывателя пенициллина.

55 лет со дня смерти Дж.Б. Самнера (1887–1955), лауреата Нобелевской премии по химии 1946 года.

40 лет со дня смерти Отто Варбурга.

40 лет со дня смерти Ф. Рауса (1879–1970), открывшего вирус саркомы, ныне носящей его имя.

35 лет со дня смерти английского химика Р. Робинсона (Нобелевская премия 1947 г.)

30 лет со дня смерти А.Н. Несмеянова.

30 лет со дня смерти У.Х. Стайна (Нобелевский лауреат 1980 г.).

25 лет со дня смерти Р.Р. Портера (1917–1985) – Нобелевская премия 1972 г. по физиологии и медицине за установление химического строения антител (вместе с Дж. Эдельманом).

15 лет со дня смерти К. Анфинзена (1916–1995) – Нобелевская премия по химии 1972 г.

СОБЫТИЯ ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЫ 2010 ГОДА*

**Девятые Вавиловские чтения
(Москва, 14 января 2010 г.)**

14 января 2010 года в Москве, в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН были проведены 9-е Вавиловские чтения. На этот раз с докладом выступил гость из США профессор Гэри Набхан. Его тема — «Вавиловские центры разнообразия культурных растений — изменения за 100 лет: эффекты климата, глобализации и перемен в землепользовании». Существенно, что автор спустя 75–80 лет после знаменитых экспедиций Н.И. Вавилова проследовал теми же маршрутами по местам мировых центров растений. Поэтому доклад и презентация были встречены с большим вниманием. Благодаря глубокому вхождению в тему (он установил контакт с сыном Н.И. Вавилова — Юрием Николаевичем Вавиловым, посетил ВИР, изучил книгу «Пять континентов» и т.д.) докладчику удалось реализовать задуманное нелегкое дело — повторить путь великого ученого по земному шару. Причем, он старался попасть в те же деревни и рынки, которые посетил и описал Николай Иванович. Благо, что глухота и отдаленность этих мест законсервировали ландшафт и образ жизни 20-х годов прошлого столетия. Однако не все обстоит так безоблачно. Г. Набхан подчеркнул, что везде — и в Эфиопии, и Мексике, и Казахстане и др. — отмечаются экологические сдвиги, приведшие к эрозии почвы, исчезновению отдельных видов (только в районе Алматы за 1930–2007 гг. исчезло около 70% диких экотипов). На Памире он отмечал влияние таяния ледников (в результате земледелие — в основном возделывание зерновых — поднялось на 400–500 м выше, чем при Н.И. Вавилове). Драматические изменения докладчик констатировал в Калифорнии: при Вавилове половина земель была занята фруктовыми деревьями, сейчас — только 4%: многое высохло. То же самое отмечается в штате Колорадо: 50% сортов утрачено в сравнении со временем Вавилова. Причины: изменения климата (засуха) и исчезновение фермеров и их сельскохозяйственных традиций. Вывод автора — перед человечеством стоит жизненно важная задача сохранения биоразнообразия. В качестве одного из выходов, по его мнению, — необходимо создание биоресурсных центров, как например, в Перу, где организован Национальный парк 20000 га для возделывания 1200 сортов картофеля.

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

3–6 февраля 2010 года в Хайдарабаде (Индия) состоялось важное комплексное мероприятие в области биотехнологии — «The Global Bio Business Forum». Это седьмой форум BioAsia 2010. В его рамках были проведены конференция, партнеринг по биобизнесу B2B, международная выставка, собрание «CEO Conclave», сессия «Bioparks» и др. Организаторами мероприятия являлись Федерация азиатских биотехнологических ассоциаций, Университет Хайдарабада, Всеиндийская биотехнологическая ассоциация, местное правительство (Андра Прадеш) и другие организации. Центральными ее направлениями были: медицинская биотехнология, биофармацевтика, агробиотехнология, биотехнология животных. В рамках этих ключевых линий были обсуждены наиболее актуальные вопросы биотехнологии: стволовые клетки, создание лекарств и вакцин, улучшение репродуктивных характеристик животных, молекулярная диагностика, индустрия семенного фонда, качество пищи, биобезопасность и т.д. В мероприятии участвовала делегация РФ, в основном от ОБР.

4 марта 2010 года в Гоянге (Южная Корея) состоялся важный международный бизнес-форум «Buy Korea 2010». Он ежегодно организуется под эгидой КОТРА (Korea Trade Investment Promotion Agency) и привлекает тысячи участников (потенциальных покупателей и корейских экспортеров). Были проведены следующие мероприятия: день общего партнеринга; презентация-конференция, посвященная деловому сотрудничеству с Кореей; двусторонние переговоры; запрограммированные деловые встречи; выставка. В форуме принимал участие президент ОБР профессор Р.Г. Васильев.

8–10 марта 2010 года в Барселоне (Испания) состоялась 4-я Годичная международная партнеринг-конференция «Bio-Europe Spring' 2010».

15–17 марта 2010 года в Москве в рамках Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» прошли Московская международная научно-практическая конференция «Биотехнология: экология крупных городов — 2010» и VIII Международная специализированная выставка «Мир биотехнологии — 2010».

ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2010 ГОДА

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

12–15 апреля 2010 года, в Москве, в Центре международной торговли состоится 2-й Международный конгресс и выставка EurasiaBio-2010. Организатор: Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Конгресс «ЕвразияБио-2010» является крупнейшим бизнес-форумом по биотехнологии на постсоветском пространстве. Оно включено в календарь важнейших международных событий Евросоюза и Европейской федерации биотехнологии, Федерации азиатских биотехнологических ассоциаций. Прибудут делегации из 40 стран Европы, Азии, Северной и Латинской Америки, в том числе из большинства стран СНГ и Прибалтики. Большие делегации ожидаются из стран Евросоюза (во главе с руководителем Директората ЕС по биотехнологии М. Руте), Индии (во главе с руководителем Департамента биотехнологии Правительства Индии д-ром Баном), Китая, Японии и др. Планируется участие делегаций не менее 30 регионов РФ. Ожидается участие около 700 делегатов и не менее 1500 посетителей Конгресса и выставки. Мероприятие включает в себя 3 основных блока: конгресс, выставку, партнеринг. Кроме того, имеется ряд спутных мероприятий, важнейшими из которых являются: 1) Форум «Биотехнология и Общество», посвященный общественному восприятию биотехнологии. В рамках этого Форума будут подводиться итоги всероссийского конкурса журналистов на лучшие работы по пропаганде достижений биотехнологии; 2) Конференция «Биоэтанол-2010»; 3) Интенсивные курсы по отдельным направлениям биотехнологии.

Центральной темой Конгресса «Евразия-Био-2010» явится обсуждение Стратегии развития биоиндустрии в Российской Федерации на 2010–2020 гг., а также презентация региональных программ развития биотехнологии. С этой целью на Конгресс приглашены ведущие отечественные и зарубежные эксперты, представители всех профильных министерств и ведомств. Тематика Конгресса охватывает все области применения современной биотехнологии: медицину и фармацевтику; сельское и лесное хозяйство, аквакультуры, пищевую промышленность; энергетику, химическую промышленность. Отдельные разделы программы посвящены вопросам инвестирования, трансфера технологий, подготовки

кадров и другим аспектам формирования биоэкономики. Состоятся заседания, посвященные национальным особенностям развития биотехнологии в разных странах (Россия, ЕС, США, Канада, Индия, Китай и др.), а также вопросам формирования биорегионов. Всего состоится свыше 50 секций, 2 пленарных заседания, на которых будет заслушано около 200 выступлений российских и зарубежных специалистов и экспертов в сфере биотехнологии.

На выставке биотехнологических компаний будут представлены свыше 60 экспонентов, среди которых ведущие отечественные и зарубежные биотехнологические и фармацевтические компании, экспозиции отдельных стран и регионов РФ.

В рамках партнеринга ожидается проведение не менее 200 деловых встреч и переговоров, направленных на поиск партнеров для совместной реализации биотехнологических проектов.

Подробнее см. <http://www.eurasiabio.ru>, а также на сайте ОБР <http://biorisinfo.ru>.

19–23 апреля 2010 года в г. Пушкино (Московская область) будет проходить 16-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология — наука XXI века». Организаторы: Пушкинский научный центр РАН, Институт биофизики клетки РАН, администрация г. Пушкино, Пушкинский государственный университет. В числе основных направлений школы: молекулярная биология, общая и функциональная биохимия, прикладная биотехнология, биология и экология микроорганизмов, фотобиология и физиология растений и др. Справки: E-mail: orgcom@biology2.ru; www.biology21.ru.

3–6 мая 2010 года в Чикаго (США) состоится очередной конгресс биотехнологов «BIO 2010 International Convention». Справки: <http://www.convention.bio.org>.

26–28 мая 2010 года в Глазго (Великобритания) будет организован конгресс «Biosensors 2010». Справки: Тел.: +44 1865 373625; Факс: +44 1865 412342; E-mail: biosensorscongress@elsevier.com.

7–10 июня 2010 года в Нутетале (Германия) состоится 8-й Европейский симпозиум «Биотехнология микроводорослей». Справки: Тел.: +49(0) 33200 89-0; +49(0) 33200 89-220; <http://www.microalgal-biotechnology.com>.

21–23 июня 2010 года во Франкфурте (Германия) состоится «The Biological Production Forum 2010». Справки: www.biologicalproduction.com.

23–24 июня 2010 года в Шанхае (Китай) пройдет «China BIO Partnering Forum 2010». Справки: www.ebdgroup.com/cbpf.

27–30 июня 2010 года в Вашингтоне (США) состоится Всемирный конгресс по промышленной биотехнологии и биопроцессингу. Справки: <http://www.bio.org>.

28–30 июня 2010 года в Париже (Франция) будет организован «Euro-Biotech Forum 2010». Справки: www.eurobiotechforum.com.

1–3 сентября 2010 года в Сеуле (Южная Корея) состоится Международная биотехнологическая выставка и конференция 2010 (BIO KOREA). Организатор: Korea International Trade Association – KITA). Справки: Tel.: +82 (0) 2/6000-5058; www.beventscom/.../34011-international-biotechnology-exhibition-amp-conference-2010-bio-Korea; <http://www.biokorea.org>.

14–18 сентября 2010 года в Римини (Италия) пройдет 14-й Международный биотехнологический симпозиум и выставка. Справки: E-mail: ibs2010@adriacongex.it; www.ibs2010.org.

21–22 сентября 2010 года в Хайдарабаде (Индия) будет проходить Первая годичная партнеринг-конференция «BIO India International Partnering Conference». Справки: <http://ableindia.org>.

5–7 октября 2010 года в Ганновере (Германия) состоится «BIO-IT World Conference & Expo' 2010 Europe». Справки: E-mail: eoregan@healthtech.com.

10–15 октября 2010 года в Эдинбурге (Великобритания) будет проведена Международная конференция по системной биологии (ICSB 2010). Справки: <http://www.icsb2010.org.uk>.

15–17 ноября 2010 года в Мюнхене (Германия) состоится «16th Annual BIO-Europe International Partnering Conference». Справки: www.ebdgroup.com/bioeurope.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научная степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикаций, со списком литературы, но без резюме; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные установки (Index Medicus и др.).
6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.

7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.



Подписано к печати 28.03.10
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Ежегодно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 55 регионах России и объединяет свыше 2000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основной организационной деятельностью ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 1190171 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: obr@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru