

Лекция 9

Генетическая инженерия.

Генетическую инженерию можно трактовать как искусство использовать знание основ и методов молекулярной генетики и молекулярной биологии для конструирования организмов с заданными наследственными свойствами.

Генная инженерия методами *in vivo* или *in vitro* решает задачи введения в геном реципиентной клетки одного или нескольких (обычно чужеродных) генов либо создания в геноме новых типов регуляторных связей. В таких случаях видовая принадлежность реципиентных организмов не меняется, но появляются несвойственные им признаки.

Своими успехами генетическая инженерия растений обязана в первую очередь достижениям клеточной инженерии в разработке методов регенерации целых растений из единичных дифференцированных клеток или протопластов. Второй слагающей успеха явилось использование природной системы трансформации растений *Ti*-плазмидами *Agrobacterium tumefaciens* и создания на их базе векторов, способных интегрироваться в растительные хромосомы. Это дало возможность вводить в клетки растений чужеродные гены и получать из единственной клетки сформированные растения. Такие организмы, в которых чужеродные гены обнаруживаются во всех его клетках, включая половые, называются **трансгенными**. Они обладают свойством передавать приобретённые или новые признаки своему потомству. Встраивание трансгена может нарушить первичную структуру какого-либо хозяйского гена и тем самым вызвать его инактивацию.

1. Введение генов в растительные клетки. Векторы.

Ввести чужеродную ДНК в растения можно различными способами.

Для двудольных растений существует естественный вектор для горизонтального переноса генов: плазмиды агробактерий. Что касается однодольных, то, хотя в последние годы достигнуты определенные успехи в их трансформации агробактериальными векторами, все же подобный путь трансформации встречает существенные затруднения.

Для трансформации устойчивых ("рекальцитрантных") к агробактериям растений разработаны приемы прямого физического переноса ДНК в клетку, многие из которых взяты из практики работы с клетками бактерий или животных. Эти методы достаточно разнообразны, они включают: бомбардировку микрочастицами или баллистический метод; электропорацию; обработку полиэтиленгликолем; перенос ДНК в составе липосом и др.

Наиболее продуктивным и чаще всего используемым является метод бомбардировки микрочастицами. При достаточной скорости эти частицы могут непосредственно проникать в ядро, что сильно повышает эффективность трансформации. Этим же методом можно, впрочем, трансформировать и другие ДНК-содержащие клеточные органеллы - хлоропласты и митохондрии.

После проведения тем или иным способом трансформации растительной ткани ее помещают *in vitro* на специальную среду с фитогормонами, способствующую размножению клеток. Среда обычно содержит селективный агент, в отношении которого трансгенные, но не контрольные клетки приобретают устойчивость. Регенерация чаще всего проходит через стадию каллуса, после чего при правильном подборе сред начинается органогенез (побегообразование). Сформированные побеги переносят на среду укоренения, часто также содержащую селективный агент для более строгого отбора трансгенных особей.

Экспрессия генетического материала в трансгенных растениях

При изучении экспрессии чужеродных генов в растительных клетках исследователи столкнулись с рядом новых явлений. Выяснилось, что трансформированные идентичной конструкцией ДНК трансгенные клоны, полученные параллельно в одном и том же опыте, значительно различаются по уровню экспрессии введенного гена. Показано, что уровень экспрессии зависит от многих факторов и в значительной мере от того в какую область ядерного хроматина попал введенный ген.

Экспрессия трансгена, как правило высока при его попадании в область активного

хроматина. Кроме того, оказалось, что при встраивании в ядерный геном конструкция ДНК нередко претерпевает существенные изменения (перестройки, дупликации, инверсии и т.д.), что также приводит в основном к снижению экспрессии.

Было установлено также, что обычно применяемые процедуры трансформации вовсе не безразличны и для хозяйского генома.

Во-первых, встраивание трансгена может нарушить первичную структуру какого-либо хозяйского гена и тем самым вызвать его инактивацию. Это событие, по-видимому, не так редко, особенно с учетом того, что трансгены чаще встраиваются в транскрибируемые области хроматина (эухроматин). В последующих поколениях такой инактивированный ген может перейти в гомозиготное состояние, выражаясь в непредусмотренной и обычно нежелательной фенотипической мутации.

Во-вторых, при агробактериальном или физическом переносе генов в растительный геном в последнем нередко отмечаются разного рода перестройки, вплоть до транслокации фрагментов хромосом. Все это также может менять нормальное функционирование генома растения.

Еще одна важная проблема, которая открылась благодаря генетической инженерии растений - это проблема замолкания генов. Было обнаружено, что у достаточно заметной доли трансгенных растений интродуцированный ген через какое-то время теряет свою активность, хотя физически сохраняется в геноме. Таким образом, было установлено, что растение обладает способностью активно противостоять экспрессии чужеродной ДНК.

Проблема замолкания генов имеет большое практическое значение, так как у генетически трансформированных сельскохозяйственных культур трансгены должны функционировать стабильно. За последние годы удалось выяснить механизмы и некоторые условия, способствующие замолканию генов. Одним из основных факторов является число идентичных копий гена, встроенных в геном: чем больше таких копий и чем они протяженнее, тем больше вероятность замолкания генов. Откуда следуют практические рекомендации генным инженерам: трансгенные культуры должны содержать не более одного встроенного гена на гаплоидный геном; сигнальные части трансгена (промоторы, терминаторы и др.) не должны иметь длинных гомологии (более 100-300 п.о. ДНК) с участками хозяйского генома; фрагменты векторной плазмидной или вирусной ДНК должны быть по возможности полностью удалены из конструкции перед трансформацией.

Введение ДНК в клетки растений с помощью Ti- и Ri-плазмид

Agrobacterium tumefaciens вызывает образование опухолей стебля двудольных растений - так называемых корончатых галлов. Бактерии прикрепляются к клетками растения в местах повреждений. Как только бактерии прикрепилась к поверхности клеток растения, они начинают образовывать целлюлозные фибриллы. Фибриллы формируют сеть, покрывающую поверхность растительных клеток. Фибриллы служат более прочному закреплению бактерий на поверхности хозяина. За целлюлозные фибриллы могут зацепиться свободно плавающие клетки бактерий. Фиксируя их у поверхности растения, фибриллы увеличивают множественность заражения. В результате размножения образуются скопления бактерий на поверхности растения.

Клеточная стенка растения повреждается вследствие выделения бактериями пектолитических ферментов, что обеспечивает плотный контакт бактерий с плазмалеммой растительной клетки. Этот контакт необходим для передачи ДНК от бактерий в растительную клетку. Передача ДНК происходит без нарушения целостности мембраны растительной клетки, но требует определенного её состояния - компетентности.

Способность *A. tumefaciens* индуцировать у растений образование опухолей типа "корончатого галла" коррелирует с наличием у них Ti-плазмиды. Опухолевая трансформация проявляется в гипертрофии возникающей после проникновения агробактерий в пораненные участки (сайты) растений (рис. 47). Трансформация является результатом стабильного ковалентного включения (инсерции или интеграции) сегмента T-ДНК большой плазмиды бактерий в ядерную ДНК растительной клетки.

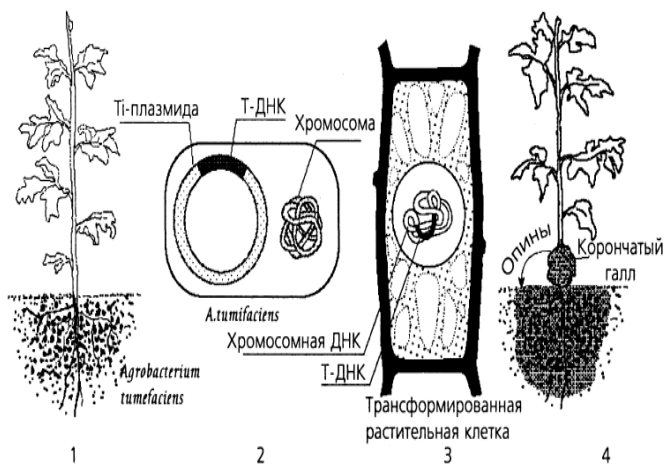


Рис. 47. Генетическая колонизация растения *A. tumefaciens*: 1- агробактерии существуют в ризосфере; 2 - строение *A. tumefaciens*; 3 – встраивание Т-ДНК в геном; 4 – образование опухоли

Другой вид агробактерий - *A. rhizogenes*, - вызывает заболевание, именуемое "бородатый корень", при котором в зоне повреждения корня образуется масса новых корешков.

В отличие от большинства тканей

взятых из нормальных растений, трансформированные ткани в культуре в асептических (стерильных) условиях способны неограниченно расти в отсутствие экзогенно добавленных ауксинов и цитокининов. Кроме того, трансформированные ткани часто синтезируют одну или более групп соединений, названных опинами, которые обычно не обнаруживаются в нетрансформированных растительных тканях.

Наиболее подробно изучены опухоли — корончатые галлы, индуцируемые *A. tumefaciens*. Они представляют собой истинно злокачественные опухоли, которые могут расти в культуральной среде в отсутствие стимуляторов роста — фитогормонов, необходимых для роста нормальных тканей.

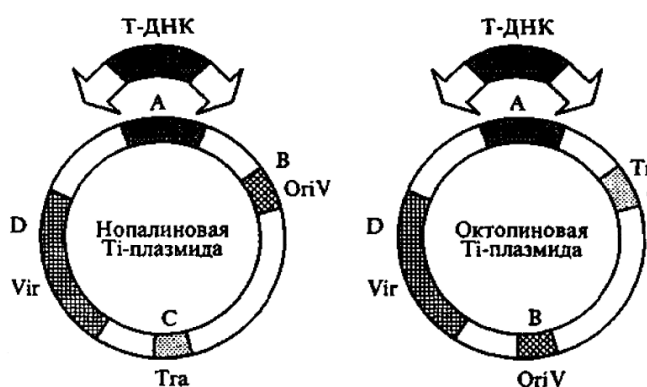
В природных условиях корончатые галлы образуются в месте соединения корня со стеблем (у корневой шейки), откуда и произошло их название корончатый галл. Однако корончатые галлы могут развиваться и на подземных частях растения, например на корнях плодовых деревьев, и на надземных, например на стебле винограда.

В лаборатории эти заболевания можно вызвать у здоровых растений экспериментально, путем инфицирования их бактериями. Растения перед инокуляцией должны быть поранены, при этом опухоли возникают в поврежденных сайтах растения, обычно на стебле или листьях растения. Кроме целых растений в качестве тест-объектов используются экспланты, например ломтики моркови и кусочки других органов растений.

Agrobacterium имеет очень широкий круг растений-хозяев и может инфицировать практически все двудольные растения. Долгое время считалось, что однодольные растения не чувствительны к агробактериальной инфекции. В настоящее время показано, что при соблюдении определенных условий агробактерии могут инфицировать однодольные растения.

Размер Ti-плазмид 140 – 250 000 полинуклеотидов. В процессе инфекции фрагмент этих плазмид размером около 25 000 полинуклеотидов, называемый Т-ДНК, переносится в растительные клетки и ковалентно связывается с ядерной ДНК. Трансформированные Ti-плазмидами клетки становятся опухолевыми и образуют корончатые галлы. Ткани корончатых галлов содержат более высокие уровни ауксина и цитокининов. Кроме неконтролируемого роста трансформированных растительных клеток, отмечено появление необычных аминокислот, – октопина, нопалина и других опин. Октопин состоит из аргинина и пировиноградной кислоты, а нопалин представляет собой соединение аргинина и α -кетоглутаровой кислоты. Эти аминокислоты могут использоваться бактериями *A. tumefaciens* в качестве источника углерода, азота и энергии. В зависимости от типа индуцируемой в опухоли опина штаммы агробактерий и находящиеся в них Ti-плазмиды получили соответствующее обозначение — октопиновые или нопалиновые.

Подробная информация о структуре плазмид *Agrobacterium* получена путем их рестрикционного или физического картирования. В результате исследований обнаружено четыре основных области гомологии между октопиновой и нопалиновой плазмидами. Две консервативные (области А и D) вовлечены в онкогенность, еще одна (В) соответствует области контроля репликации плазмиды, в то время как последняя (С) кодирует функции конъюгативного переноса (рис.).

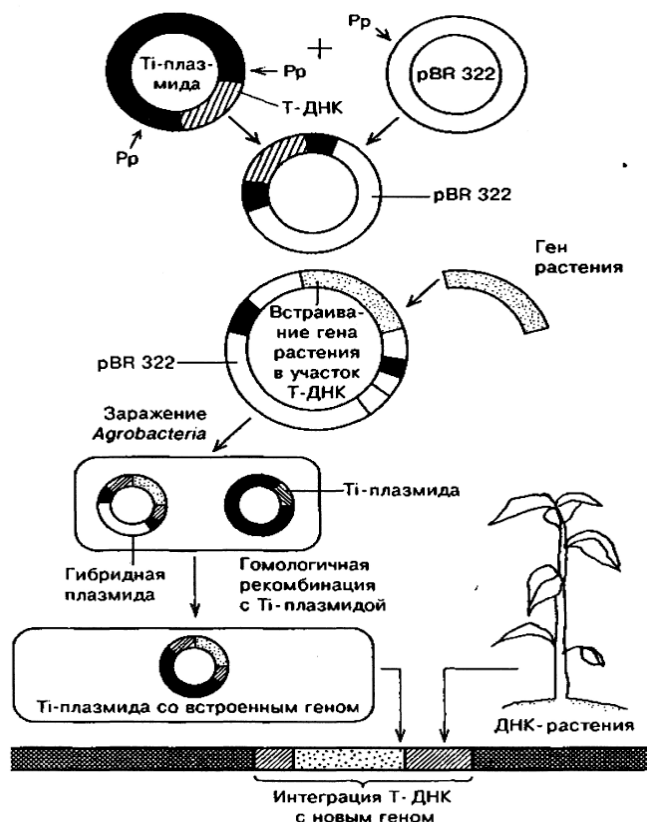


Т-ДНК не влияет на опухолеобразование, но удаление правой пограничной области приводит практически к полной утрате вирулентности. Показано, что делеция правого повтора или его части приводит к потере способности Т-ДНК включаться в растительную ДНК.

Учитывая важную роль концов Т-области в переносе Т-ДНК, можно предположить, что любой сегмент ДНК, встроенный между этими концами, может быть перенесен в растения как часть Т-ДНК. Плазмиды модифицируют таким образом, чтобы удалить все онкогенные последовательности, так как они не принимают участие ни в переносе, ни в интеграции в геном клетки-хозяина. На место этих генов можно встроить чужеродную ДНК, а плазида теряет свои онкогенные свойства.

Разработаны два метода для введения Тi -плазмидных последовательностей, содержащих нужный ген, в растение.

Первый метод — метод «промежуточных векторов» (коинтегративных векторов) — основан на использовании плазмиды кишечной палочки pBR 322 (рис.).



Т-ДНК вырезают из Ti-плазмиды с помощью рестриктаз и встраивают в плазмиду pBR322 для клонирования в *E. coli*. Бактерии, содержащие плазмиду с Т-ДНК, размножают, после чего эту плазмиду выделяют. Затем в клонированную Т-ДНК с использованием рестриктаз встраивают нужный ген. Эту рекомбинантную молекулу, содержащую Т-ДНК со встроенным в нее геном, снова размножают в большом количестве, то есть клонируют в кишечной палочке. Затем с помощью конъюгации вводят в клетки агробактерии, несущие полную Ti-плазмиду.

Между Т-сегментами нативной Ti-плазмиды и промежуточного вектора происходит гомологичная рекомбинация. В результате этого Т-ДНК со встроенным геном включается в нативную Ti-плазмиду, замещая нормальную ДНК. Получаются клетки *Agrobacterium*, несущие Ti-плазмиды со встроенными в Т-сегмент нужными генами. Далее их перенос в клетки растения осуществляется обычным способом, характерным для агробактерии.

Второй метод основан на создании системы бинарных (двойных) векторов.

Последние исследования показали, что для заражения и трансформации не нужна целая Ti-плазида, а достаточны только пограничные области Т-ДНК и один участок Ti-плазмиды, ответственный за вирулентность. Причем эти два участка ДНК не обязательно должны находиться в одной и той же плазмиде. Если клетки агробактерий содержат Ti-плазмиду с сегментом VIR и другую плазмиду с Т-ДНК, эти бактерии могут трансформировать клетки растений. При этом Т-ДНК с любыми встроенными в нее генами интегрирует с геномом растения, для этого не нужна гомологичная рекомбинация в бактериальных клетках. Для осуществления экспрессии чужеродных генов, нужен специфический промотор из Т-ДНК, например, промотор нопалинсинтетазы.

Эффективность трансформации с помощью модифицированной Т-ДНК агробактерий превосходит на сегодняшний день все другие способы переноса генов в растение.

Для введения сконструированных Ti-плазмид в растительную клетку может быть использовано несколько методов. Наиболее простой из них природный способ — это инокуляция сконструированных штаммов в поврежденные (пораненные) области растения.

Другой метод состоит в трансформации протопластов путем кокультивирования их с агробактериями. Протопласты представляют собой голые клетки, окружённые цитоплазматической мембраной. Отсутствие клеточной стенки делает возможным поглощение протопластами органелл, микроорганизмов и чужеродного генетического материала. Протопласты выделяют чаще всего из мезофильных клеток молодых листьев или из суспензионной клеточной культуры. Препараты отдельных клеток получают механическим путём. Фрагменты листьев измельчают в стеклянном гомогенизаторе, разрушая ткань до отдельных клеток. Затем обрабатывают пектиназами для удаления межклеточных связей, а затем целлюлазами для удаления самой клеточной стенки. После этого их можно поместить на плотные среды, где через 5-10 дней происходит регенерация клеточной стенки и начинается деление клеток. Методика кокультивации может рассматриваться как индукция опухолей в искусственных условиях: вирулентные агробактерий временно совместно культивируются с протопластами. Если агробактерий добавляются к свежевыделенным или однодневным протопластам, не наблюдается ни присоединения бактерий, ни трансформации. Существенным условием для трансформации является наличие вновь образуемых клеточных стенок у 3-дневных протопластов. Это подтверждается применением ингибиторов образования клеточной стенки, которые ингибируют и присоединение бактерий. После периода кокультивации (более суток), в течение которого наступает агрегация протопластов с бактериями, свободные бактерии удаляются повторным отмыванием. Далее растительные клетки культивируются на среде с добавлением гормонов, а через 3—4 недели небольшие колонии высеваются на безгормональную среду. На этой среде выживают только колонии трансформированных клеток.

Так были получены трансформированные растения-регенеранты табака и петунии. Этот метод дает возможность существенно расширить круг хозяев агробактерий, включая виды семейства злаковых.

2. Выделение генов

Как известно, геном ядра клеток высших растений содержит большое количество ДНК. Выделение фрагмента ДНК с известной нуклеотидной последовательностью, составляющий определённый ген, из десятка миллионов подобных - представляет собой непростую задачу.

Существуют несколько способов решения:

1. Химический синтез гена.

Возможен при наличии подробной информации о нуклеотидной последовательности

соответствующей ДНК и, как правило, объектом синтеза являются гены, кодирующие относительно небольшие белки (например, соматостатин – 14 аминокислот).

2. Выделение полноразмерных генов из клонированных последовательностей ДНК (кДНК) с помощью зондов, созданных на основе химического синтеза (50 – 180 оснований). кДНК - это структурная часть гена, полученная путем обратной транскрипции с определенной иРНК.

При объединении фрагментов ДНК для клонирования в векторе возникает проблема совместимости концов объединяемых фрагментов.

Поэтому у вектора и у фрагмента геномной ДНК – (у лигируемых молекул ДНК) проводят ферментативную модификацию концов путём достраивания липких концов.

3. Маркеры.

Генетическая конструкция, вводимая в растительную клетку обычно включает: белок-кодирующую структурную последовательность, сигнальные элементы трансляции и транскрипции, а также маркерные гены.

Регулируемые и/или индуцибельные промоторы, контролирующие соответствующие гены, могут способствовать одновременному прохождению растениями основных стадий онтогенеза (переход к цветению, опадение листьев и др.), что важно для практики сельского хозяйства. Есть промотор, индуцирующийся при механическом стрессе (поранении) или при обработке растений элиситорами. Использование такого промотора, соединенного с целевым геном, дает возможность выращивать трансгенные растения как обычные вплоть до стадии уборки урожая, а далее срезка растений индуцирует экспрессию целевого гена, продукт которого накапливается в собранной биомассе.

В случае использования неонкогенной Т-ДНК необходимы маркеры трансформирования растений. В этом качестве используют бактериальные селективные маркеры. Это неомицинфосфотрансфераза (neo, устойчивость к аминогликозидным антибиотикам канамицину и неомицину), гигромицинфосфат трансфераза (hpt, устойчивость к гигромицину), хлорамфениколацетилтрансфераза (cat, устойчивость к хлорамфениколу), дигидрофолатредуктаза (dhfr, устойчивость к метотрексату) и др.

Регуляторные сайты идентифицируют также с помощью присоединяемых к ним **генов-репортеров**. Так называют гены, чьи продукты определяются с помощью простых и чувствительных методов (колориметрия, флюорометрия, люминометрия, радиометрия) и чья активность в растительных клетках в норме отсутствует. Например, гены *lux* бактерий *Vibrio harveyi* и светлячка *Photinus pyralis*.

ХРОНОЛОГІЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

1972 – створено перший ГМО (бактерія, яка несла гени лямбда фага *Escherichia coli* і вірусу мавпи SV40) (Поль Берг (Стендфордський Університет, США))

1978 – перше промислове отримання білкового продукту – людський інсулін за допомогою *E. coli* (фірма Genetech)

1981 – отримано перший патент США на створення ГМО супербацили, яка несла плазміди, що зобумовлювали деградацію камфари, октана, саліцилата і нафталіна (для ліквідації нафтових забруднень), (Чакрабарті)

1983 – успішна трансформація рослин за допомогою Ti плазмід – отримання ГМР (генетично-модифікованих рослин),

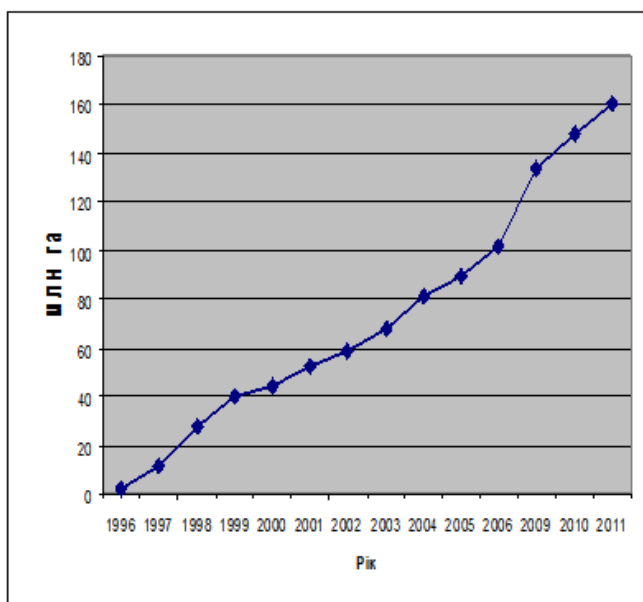
1988 – патент США на лінію мишей з підвищеною частотою виникнення пухлин, отриману генно-інженерними методами,

1990 – в США затверджено план випробувань генної терапії з використанням соматичних клітин людини

1996 – масове (комерційне) вирощування ГМР

1997 - вперше клоновано ссавця з диференційованої соматичної клітини (вівця Доллі)

2011 – ГМР промислово вирощували на площі 160 млн га



Рік	Соя	Кукурудза	Бавовник	Ріпак	Цукровий буряк	Картопля	Всього
1996	0,5	0,3	0,8	0,1	-	<0,1	1,7
1997	5,1	3,2	1,4	1,2	-	<0,1	11,0
1998	14,5	8,3	2,5	2,4	-	<0,1	27,8
1999	21,6	11,1	3,7	3,4	-	<0,1	39,9
2000	25,8	10,3	5,3	2,8	-	<0,1	44,2
2001	33,3	9,8	6,8	2,7	-	<0,1	52,6
2002	36,5	12,4	6,8	3,0	-	-	58,7
2003	41,4	15,5	7,2	3,6	-	-	67,7
2004	48,4	19,3	9,0	4,3	-	-	81,0
2005	54,4	21,2	9,8	4,6	-	-	90,0
2006	58,6	25,2	13,4	4,8	-	-	102,0
2009	69	42	16	6,4	0,5	-	134,0
2010	73,3	46,3	20,9	7,0	0,5	-	148,0
2011	75,4	51,0	24,7	8,2	0,5	-	160,0

Первая волна трансгенных растений, допущенных для практического применения, содержала дополнительные гены устойчивости (к болезням, гербицидам, вредителям, порче при хранении, стрессам).

Нынешний этап развития генетической инженерии растений получил название "метаболическая инженерия". При этом ставится задача не столько улучшить те или иные имеющиеся качества растения, как при традиционной селекции, сколько научить растение производить совершенно новые соединения, используемые в медицине, химическом

производстве и других областях. Этими соединениями могут быть, например, особые жирные кислоты, полезные белки с высоким содержанием незаменимых аминокислот, модифицированные полисахариды, съедобные вакцины, антитела, интерфероны и другие "лекарственные" белки, новые полимеры, не засоряющие окружающую среду и многое другое.

У цілому,

1 покоління – стійкість до комах та гербіцидів (підвищення урожайності) – зараз масово вирощуються

2 покоління – змінена харчова цінність (сорт ріпаку зі зміненим жирнокислотним складом, соя, збагачена омега-3 жирними кислотами), стійкість до дії кліматичних факторів, засолення ґрунтів, продовжений термін зберігання, відсутність алергенів (засухостійка кукурудза (2013 р.) Золотий рис (2013 р.) Трансгенні дерева зі швидким накопиченням деревини (топливо). Трансгенні дерева з пониженою кількістю лігніну для виробництва паперу

3 покоління (з 2015 р.) – зміна архітектури рослин (низькорослість), зміна часу цвітіння, плодоношення, підвищення ефективності фотосинтезу (ознак з більш складним генетичним контролем).

ОЗНАКИ, ЩО МОДИФІКУЮТЬСЯ У ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН

● стійкість до гербіцидів - гліфосату (Roundup), глюфосінату амонію (Liberty) (59% площ ГМР в 2011 р.

соя, кукурудза, ріпак бавовник, цукровий буряк, люцерна);

- стійкість до гербіцидів + стійкість до комах (26%)
- стійкість до комах (15%);
- стійкість до вірусів (<0,1%);
- стійкість до грибних і бактеріальних хвороб, нематод;
- стиглість плодів;
- зміна забарвлення квіток;
- зміна харчової цінності рослин;
- зміна смаку і зовнішнього виду плодів,
- рослини як біореактори (синтез антитіл, вакцин, медичних препаратів, полімерів)
- трансгенні дерева зі швидким накопиченням деревини (паливо);
- трансгенні дерева з пониженою кількістю лігніну для виробництва паперу
- біоремедіація забрудненого ґрунту

Улучшение качества запасных белков

В 1983 г. в США ген фазеолина бобов с помощью Ті-плазмиды был перенесен в геном подсолнечника. Результатом этого опыта было лишь химерное растение, получившее название санбин. Позднее ген фазеолина был передан клеткам табака: в растениях-регенерантах ген экспрессировался во всех тканях, хотя и в малых количествах. Неспецифическая экспрессия фазеолинового гена, так же как и в случае переноса его в клетки подсолнечника, сильно отличается от экспрессии этого гена в зрелых семядолях бобов где фазеолин составлял 25—50% от общего белка. Этот факт указывает на необходимость сохранения и других регуляторных сигналов этого гена при конструировании химерных растений и на важность контроля экспрессии генов в процессе онтогенеза растений.

Ген, кодирующий запасной белок кукурузы - зеин, после интеграции его в Т-ДНК был перенесен в геном подсолнечника, однако присутствие зеинового белка в тканях подсолнечника не обнаружилось.

Более реальной задачей для генетической инженерии считается *улучшение аминокислотного состава белков*. Как известно, в запасном белке большинства злаковых наблюдается дефицит лизина, треонина, триптофана, у бобовых — метионина и цистеина. Введение в эти белки дополнительных количеств дефицитных аминокислот могло бы

ликвидировать аминокислотный дисбаланс. Однако, когда часть проламинов заменялась другими белками, содержащими много лизина у таких растений уменьшались размеры зерна и снижалась урожайность. По-видимому, проламины необходимы для формирования нормального зерна, и их замена другими белками отрицательно влияет на урожайность.

В другом эксперименте удалось после скрещивания трансгенных растений, в одном из которых был встроен ген гамма-субъединицы, а во втором - ген каппа-субъединицы иммуноглобулина, получить у потомства экспрессию обеих цепей. В результате растение формировало антитела, составляющие до 1,3% суммарного белка листьев. Это были антитела, специфичные для *Streptococcus mutans* - бактерий, вызывающих зубной кариес. Предполагается, что на основе таких моноклональных антител, продуцируемых трансгенными растениями, удастся создать действительно антикариесную зубную пасту.

Также показана продукция в растениях человеческого бета-интерферона.

Человеческий ген, несущий информацию о структуре инсулина, был внедрен в геном сафлора.

Разработаны также подходы, позволяющие получать бактериальные антигены в растениях и использовать их в качестве вакцин. Получен картофель, экспрессирующий олигомеры нетоксичной субъединицы бета-токсина холеры. Эти трансгенные растения могут быть использованы для получения дешевой вакцины от холеры. Получен банан, съев который получаешь прививку от тропических болезней.

Жиры

Получены трансгенные растения рапса с измененным составом растительного масла, включающего вместе с обычными 16- и 18-членными жирными кислотами также и до 45% 12-членной жирной кислоты - лаурата. Это вещество широко используется для производства стиральных порошков, шампуней, косметики.

Из других проектов, связанных с изменением состава жирных кислот, можно упомянуть работы, ставящие целью повышение или снижение содержания ненасыщенных жирных кислот в растительном масле. Интересными представляются эксперименты с петрозелиновой кислотой — изомером олеиновой кислоты, где двойная связь находится за шестым углеродным членом. Эта жирная кислота входит в состав масла кориандра и определяет его более высокую температуру плавления (33°C), в то время как при наличии олеиновой кислоты температура плавления составляет только 12°C. Предполагается, что после переноса генов, определяющих синтез петрозелиновой кислоты, в растения - продуценты растительного масла удастся производить диетический маргарин, содержащий ненасыщенную жирную кислоту.

Дальнейшее изучение специфики биохимического синтеза жирных кислот, по-видимому, приведет к возможности управлять этим синтезом с целью получения жирных кислот различной длины и различной степени насыщения, что позволит значительно изменить производство детергентов, косметики, кондитерских изделий, затвердителей, смазочных материалов, лекарств, полимеров, дизельного топлива и многого другого, что связано с использованием углеводородного сырья.

Полисахариды

Проводится работа по созданию трансгенных растений картофеля и других крахмалнакапливающих культур, в которых это вещество будет находиться в основном в виде амилопектина (разветвленной формы крахмала), или же в основном только в виде амилозы (линейных форм крахмала). Раствор амилопектина в воде более жидкий и прозрачный, чем у амилозы, которая при взаимодействии с водой образует гель. Так, например, крахмал, состоящий в основном из амилопектина, по-видимому, будет иметь спрос на рынке производителей различных питательных смесей, где сейчас в качестве наполнителя используется модифицированный крахмал.

Создание гербицидоустойчивых растений

Установлено, что признак гербицидоустойчивости является моногенным, то есть детерминируется чаще всего одним-единственным геном. Это очень облегчает возможность использования технологии рекомбинантной ДНК для передачи этого признака. Гены, кодирующие те или иные ферменты деструкции и модификации гербицидов, могут быть с

успехом использованы для создания гербицидоустойчивых растений методами генетической инженерии.

Традиционные методы селекции создания сортов, устойчивых к гербицидам, очень, длительны и малорезультативны. Наиболее широко применяемый за рубежом гербицид глифосат (коммерческое название Раундап) подавляет синтез важнейших ароматических аминокислот. Из устойчивых к глифосфату растений был выделен ген устойчивости и поставлен под промотор вируса мозаики цветной капусты. С помощью Ti-плазмиды эта генетическая конструкция была введена в клетки петунии. При наличии одной копии гена в регенерированных из трансформированных клеток растениях синтезировалось фермента в 20 - 40 раз больше, чем в исходных растениях, но устойчивость к глифосфату увеличилась только в 10 раз.

Гліфосат – інгібітор 5-енол пірувілшикимат-3-фосфатсинтази (EPSPS), який відіграє важливу роль у синтезі ароматичних амінокислот у бактерій і рослин.

Трансгенні рослини тютюну, томатів, картоплі, бавовника, цукрового буряку, ріпака, кукурудзи, що синтезують бактеріальну EPSPS в кількості, достатній для заміни інгібованого гербіцидом рослинного фермента стійкі до гліфосата і не гинуть при обробці, на відміну від бур'янів.

К числу наиболее распространенных гербицидов, используемых при обработке зерновых культур, относится атразин. Он подавляет фотосинтез, связываясь с одним из белков фотосистемы II и прекращая транспорт электронов. Устойчивость к гербициду возникает в результате точечных мутаций в этом пластохинон связывающем белке (замена серина на глицин), вследствие чего он теряет способность взаимодействовать с гербицидом. В ряде случаев удалось осуществить перенос гена мутантного белка в чувствительные к атразину растения с помощью Ti-плазмиды.

Создание растений, устойчивых к патогенам и вредителям

Устойчивость растений к тем или иным патогенам чаще всего является сложным мультигенным признаком.

Одновременная передача нескольких локусов трудна даже методами генной инженерии, не говоря о классических методах селекции. Более простым является другой путь. Известно, что у устойчивых растений при атаке патогенов изменяется метаболизм. Накапливаются такие соединения, как H_2O_2 , салициловая кислота, фитоалексины. Повышенный уровень этих соединений способствует противостоянию растения в борьбе с патогенами. Поэтому изменение генно-инженерным путем уровня салициловой кислоты или выработки в растениях в ответ на патоген H_2O_2 может быть перспективным для создания устойчивых трансгенных растений.

В фитовирусологии широко известен феномен индуцированной перекрестной устойчивости растений к вирусным инфекциям. Сущность этого явления состоит в том, что заражение растения одним штаммом вируса предотвращает последующую инфекцию этих растений другим вирусным штаммом. Молекулярный механизм подавления вирусной инфекции пока неясен. Показано, что для иммунизации растений достаточно введения отдельных вирусных генов, например генов капсидных белков. Так, ген белка оболочки вируса табачной мозаики перенесли в клетки табака и получили трансгенные растения, у которых 0,1% всех белков листьев был представлен вирусным белком. Значительная часть этих растений при инфицировании вирусом не проявляла никаких симптомов заболевания. Возможно, что синтезирующийся в клетках белок оболочки вируса мешает вирусной РНК нормально функционировать и формировать полноценные вирусные частицы. Установлено, что экспрессия капсидного белка вируса табачной мозаики, вируса мозаики люцерны, вируса огуречной мозаики, X-вируса картофеля в соответствующих трансгенных растениях (табак, томаты, картофель, огурцы, перцы) обеспечивает высокий уровень их защиты от последующей вирусной инфекции. Причем у трансформированных растений не отмечалось снижения фертильности, нежелательного изменения ростовых и физиологических характеристик исходных экземпляров и их потомства. Полагают, что индуцированная

устойчивость растений к вирусам обусловлена особым антивирусным белком, очень похожим на интерферон животных.

Все большее внимание привлекают биологические средства борьбы с вредителями, обеспечивающие строгую избирательность действия и отсутствие адаптации вредителей к применяемому биопестициду.

Уже довольно давно известна бактерия *Bacillus thuringiensis*, продуцирующая белок (дельта-эндотоксин, CRY-белок), являющийся очень токсичным для многих видов насекомых. Безопасность токсина и его составных белков для человека и других млекопитающих полностью доказана. Встраивание гена этого белка в геном растений дает возможность получить трансгенные растения, не поедаемые насекомыми. Однако встраивание прокариотических генов дельта-токсинов в геном растений даже под контролем сильных эукариотических промоторов не привело к высокому уровню экспрессии. Предположительно такое явление возникло в связи с тем, что эти бактериальные гены содержат значительно больше адениновых и тиминового нуклеотидных оснований, чем растительная ДНК. Эта проблема была решена путем создания модифицированных генов, где из природного гена вырезали и добавляли те или иные фрагменты с сохранением доменов, кодирующих активные части дельта-токсина. Так, например, с помощью таких подходов был получен картофель, устойчивый к колорадскому жуку. Получены трансгенные растения табака, способные синтезировать токсин и нечувствительные к гусеницам *Mandula sexta*. Токсинообразование и обусловленная им устойчивость к насекомым передавалась по наследству как доминантный признак.

В настоящее время так называемые Bt-растения (от *B. thuringiensis*) хлопка и кукурузы занимают основную долю в общем объеме генетически модифицированных растений этих культур, которые выращивают на полях США.

Большой интерес к себе вызывают токсины растительного происхождения. Фитотоксины являются ингибиторами белкового синтеза и осуществляют защитную функцию, направленную против насекомых-вредителей микроорганизмов и вирусов. Лучшее среди них изучено рицин, синтезируемый в клещевине: его ген клонирован и установлена нуклеотидная последовательность. Однако высокая токсичность рицина для млекопитающих ограничивает генноинженерные работы с ним только техническими культурами, не используемыми в пищу человека и на корм животным.

Стійкість до вірусів

- Якщо в трансгенній рослині експресується ген, що кодує **білок оболонки** вірусу, який інфікує цю рослину, то здатність вірусу проникати в рослину і розповсюджуватись в ній значно зменшується.
- За допомогою цього підходу отримано стійкі до вірусів трансгенні рослини багатьох культур (тютюн, картопля, рис, томат, цукіні).
- В США промислово вирощуються стійкі до вірусів ГМ папайя, цукіні
- ГМ папайя, стійка до вірусу кільцевої плямистості папайї, різновид цукіні (squash) *Cucurbita pepo* зі стійкістю до вірусу мозаїки огірка, вірусу мозаїки кавуна, вірусу жовтої мозаїки цукіні, в США також зареєстрована трансгенна слива зі стійкістю до вірусу шарки сливи (сорт HoneySweet). В Китаї комерціалізованими вірус-стійкими ГМ культурами є солодкий перець та томати зі стійкістю до вірусу мозаїки огірка

Повышение устойчивости растений к стрессовым условиям

Устойчивость растений к тому или иному стрессовому фактору является результатом воздействия множества разных генов, поэтому говорить о полной передаче признаков толерантности от одного вида растения другому генноинженерными методами не приходится. Тем не менее у генетической инженерии имеются определенные возможности для повышения устойчивости растений. Это касается работы с отдельными генами, контролирующими метаболические ответы растений на стрессовые условия, например сверхпродукцию пролина в ответ на осмотический шок, на действие засоления, синтез особых белков в ответ на тепловой шок и т. д.

Пока можно отметить лишь косвенный подход для получения морозоустойчивых

растений, основанный на генноинженерных манипуляциях с *Pseudomonas syringae*. Этот микроорганизм, сосуществующий с растениями, способствует их повреждению ранними заморозками. Механизм явления связан с тем, что клетки микроорганизма синтезируют особый белок, локализующийся во внешней мембране и являющийся центром кристаллизации льда. Известно, что формирование льда в воде зависит от веществ, могущих служить центрами образования льда. Белок, вызывающий формирование кристаллов льда в различных частях растения (листья, стебли, корни), является одним из главных факторов, ответственных за повреждение тканей растений, чувствительных к ранним заморозкам. Многочисленные эксперименты в строго контролируемых условиях показали, что стерильные растения не повреждались заморозками вплоть до -6 — -8°C , тогда как у растений, имеющих соответствующую микрофлору, повреждения возникали уже при температурах $-1,5$ — -2°C . Мутанты этих бактерий, потерявшие способность синтезировать белок, вызывающий формирование кристаллов льда, не повышали температуру образования льда, и растения с такой микрофлорой были устойчивы к заморозкам. Штамм таких бактерий, распыленный над клубнями картофеля, конкурировал с обычными бактериями, что приводило к повышению морозоустойчивости растений. Возможно, такие бактерии, созданные с помощью методов генной инженерии и используемые в качестве компонента внешней среды, будут служить для борьбы с заморозками.

Получение растений с новыми свойствами

В последние годы ученые используют новый подход для получения трансгенных растений с "antisense RNA" (перевернутой или антисмысловой РНК), который позволяет управлять работой интересующего гена. В этом случае при конструировании вектора копию ДНК (к-ДНК) встраиваемого гена переворачивают на 180° . В результате в трансгенном растении образуется нормальная молекула мРНК и перевернутая, которая в силу комплементарности нормальной мРНК образует с ней комплекс и закодированный белок не синтезируется, то есть ген «отключается».

Такой подход использован для получения трансгенных растений томатов с улучшенным качеством плодов. Вектор включал к-ДНК гена PG, контролирующего синтез полигалактуроназы -фермента, участвующего в разрушении пектина в период созревания плодов томатов (увеличение его количества приводит к тому, что томаты становятся более мягкими, что значительно сокращает срок их хранения). Отключение этого гена в трансгенах позволило получить растения томатов с новыми свойствами плодов, которые не только значительно дольше сохранялись, но и сами растения были более устойчивы к грибным заболеваниям.

Такой же подход можно применить для регулирования сроков созревания томатов, а в качестве мишени в этом случае используют ген, продуктом которого является фермент, участвующий в биосинтезе этилена.

ПЕРСПЕКТИВНІ НОВІ ГМ ПРОДУКТИ В РОСЛИНИЦТВІ

- Засухостійка кукурудза (очікуються комерційні сорти в 2013 р. в Півн. Америці)
- Засухостійка кукурудза для тропіків (Африка, в 2017 р.)
- Золотий рис (синтез провітаміну А) (2013 р. реєстрація в Філіпінах) введено 2 гени – 35 мкг бета каротина на грам зерна рису
- Vt-рис (проходить польові випробовування в Китаї)
- Картопля зі стійкістю до шкідників/хвороб і зміненою якістю для промислового використання (до 2015) (крохмаль "амілопектинової" картоплі містить виключно амілопектин – для виробництва паперу, тесстилю). (Amyflora (BASF) – дозволена в 2010 Європі) На черзі 2 інших ГМР, в тому числі Fortuna зі стійкістю до фітофтори (для виробництва чіпісів) (2014-2015 р.)
- В 2007 р. Монсанто запатентована технологія використання мініхромосом для створення ГМР зі складними ознаками, для яких треба переносити комплекс генів

Проблемы биобезопасности трансгенных растений

1. Одним из главных возражений против употребления "трансгенных" продуктов

питания является наличие во многих из них маркерных генов устойчивости к антибиотикам (в частности, к канамицину), которые содержались в исходной конструкции ДНК в качестве селективных. Предполагается, что эти гены устойчивости могут при переваривании пищи передаваться эндогенной микрофлоре, в том числе патогенной, в результате чего микробы могут приобрести резистентность к данному антибиотику. Однако в реальности вероятность такого события ничтожно мала - многочисленные эксперименты и наблюдения в природе относительно подобного горизонтального переноса генов до сих пор давали только отрицательные результаты. Не стоит забывать, что встраиваемые в растения гены устойчивости "настроены" для экспрессии лишь в эукариотических, но не бактериальных клетках. Надо учесть и то, что эти селективные гены взяты из природных популяций микроорганизмов, где они сейчас широко распространены в результате активного применения антибиотиков в медицинской практике. Поэтому вероятность попадания гена устойчивости к антибиотикам в микрофлору человека из природного резервуара несравнимо реальнее, чем при употреблении трансгенных растений.

В большинстве случаев маркерные гены устойчивости к антибиотикам сейчас заменяют на гены устойчивости к гербицидам. Правда, применение "гербицидных" генов также встречает возражения, но уже защитников окружающей среды. Предложено несколько способов избирательной элиминации маркерного гена после получения желаемого трансгенного растения, когда он фактически уже не нужен.

2. Что касается возможной токсичности или аллергенности трансгенных растений, то здесь применяют те же жесткие стандарты, как и для полученных традиционным путем новых сортов культурных растений или новых видов продуктов питания.

3. Проблема возможного ущерба для окружающей среды имеет несколько аспектов. Во-первых, существует опасение, что устойчивые к гербицидам культурные растения могут при межвидовом опылении передавать эти гены близкородственным сорнякам, которые могут превратиться в неистребимые суперсорняки. Хотя вероятность такого нежелательного развития событий для большинства сельскохозяйственных культур очень мала, генные инженеры и ученые-агрономы активно разрабатывают подходы для исключения подобной опасности:

-В этом случае, чтобы отвести любые возражения от трансгенных растений, пробуют, например, вводить в растения не один, а сразу несколько генов устойчивости к разным гербицидам. Передача нескольких генов сорнякам гораздо менее вероятна, чем одного гена. Кроме того, мультигербицидная устойчивость позволит чередовать разные гербициды при обработке посевов, что не даст возможности для распространения какого-либо определенного гена устойчивости в сорняках.

-Предлагается также вводить гены устойчивости не в ядерный, а в хлоропластный геном. Это может предотвратить нежелательный дрейф генов с помощью пыльцы, так как хлоропласты наследуются только по материнской линии.

-Еще один генно-инженерный путь борьбы с сорняками без использования генов резистентности к гербицидам вообще - биотрансгенный. Речь идет об использовании мелких животных, например, кроликов, для поедания сорняков на полях. При этом, чтобы оградить от поедания культурные растения, в них можно ввести какой-либо ген, делающий их непривлекательными (запах, вкус) для данного животного.

Близкие по сути экологические возражения касаются трансгенных растений со встроенными "инсектицидными" генами, способных, как считают, спровоцировать у насекомых-вредителей возникновение массовой резистентности. Здесь также предложены действенные способы для уменьшения этой опасности, например, использование генов нескольких разных токсинов и/или индуцибельных промоторов, быстро активирующихся при нападении насекомых на растение. Данная проблема в общем не нова, так как многие из инсектицидов, используемых сейчас на "генном уровне", давно применяют в виде чистого вещества для опрыскивания посевов.

4. Еще одно нежелательное следствие использования трансгенных растений с генами инсектицидов заключается в том, что пыльца этих растений может быть токсичной и для полезных насекомых, которые данной пылью питаются. Некоторые экспериментальные

данные говорят о том, что такая опасность действительно существует, хотя о ее возможных масштабах говорить пока трудно. Однако и здесь уже предложены и испытаны адекватные генно-инженерные решения, например, использование трансгеноза через хлоропластную ДНК, или промоторов, не работающих в пыльце.

Критерии оценки риска ТР

1. Максимальное сходство с исходной изогенной формой - главное требование при регистрации ТР

Основные принципы, которыми руководствуются при оценке степени экологического риска ТР, заключаются в выяснение степени его **сходства** с аналогичным нетрансгенным (изогенным) растением, относительно которого существует полная уверенность в том, что оно безопасно; установление степени его **существенной эквивалентности** исходной и безопасной нетрансгенной форме растения.

2. ТР должно быть генетически стабильным

ТР должны стабильно продуцировать белки, кодируемые трансгенами, в течение ряда поколений. Для доказательства этого необходимы такие сведения, как уровень экспрессии белков, кодируемых трансгенами, так и степень генетической стабильности (наследуемости) признаков, ими обусловленных. Обычно для определения количественного уровня экспрессии белков трансгенами используются различные иммунологические методы. Если новое свойство ТР обусловлено не синтезом белков, а синтезом РНК (например, антисмысловой), то стабильность этого признака должна быть установлена путем анализа присутствия встроенной ДНК, ее кодирующей, либо наличием синтеза соответствующей РНК.

В специальных опытах ТР должно быть скрещено с соответствующим исходным не трансгенным растением, а у потомства должно быть определено как наличие или отсутствие как трансгена, так и его продуктов.

3. Негативные последствия экспрессии трансгенов

Для идентификации возможной опасности уровень экспрессии трансгена должен быть определен в каждом органе ТР (надземном и подземном). Обычно концентрация трансгенного белка в тканях ТР может быть весьма малой (значительно меньше, чем 0,1% от сухой массы). Этого может не хватать, например, для оценки острой токсичности ТР. Поэтому для этой цели используют эндотоксины, кодируемые тем же трансгеном, но экспрессируемые микроорганизмами (*Bt* и другими) в больших концентрациях. В этом случае должна быть доказана функциональная эквивалентность препаратов нативного или трансгенного белка-энтомотоксина бактериального и растительного происхождения (эквивалентность их физико-химических характеристик и биологической активности). Для демонстрации функциональной эквивалентности принято использовать специфические антитела. Следует принимать во внимание и возможность пост-трансляционной модификации трансгенного белка (в особенности, его гликозилирование), что может повлиять на аллергенность ТР.

4. Риск превращения ТР в сорняк

Сорняками принято считать те виды растений, которые легко колонизируют агроэкосистемы и могут вытеснять другие растения. Сорняки всегда имеют селективные преимущества по сравнению с традиционными сельскохозяйственными культурами. Таким образом, различные факторы устойчивости, обуславливаемые трансгенами, (например, устойчивость к вредным насекомым, неизбирательным гербицидам, другим биотическим или абиотическим стрессорам) могут, в принципе, повышать риск того, что соответствующее ТР может стать сорняком. Первое, что должно быть установлено - не повысился ли репродуктивный потенциал ТР в результате генетической модификации. С этой целью должно быть определено количество образуемых ТР семян, их полевая всхожесть, количество и жизнеспособность пыльцы. Совершенно неожиданным, как указывалось, стало

недавнее сообщение о том, что трансгенный Bt-защищенный подсолнечник образует на 50% больше семян, чем его исходный нетрансгенный аналог, и этот признак наследуется.

5. Риск переноса трансгенов в родственные растения

Интрогрессия трансгенов из ТР представляет реальную опасность только в том случае, если донорное и акцепторное растения способны к перекрестному опылению. Особую озабоченность могут вызывать ситуации, когда в результате интрогрессии нетрансгенное растение сможет приобрести новые экологические преимущества (устойчивость к гербициду, энтомоцидность, повышенная жизнеспособность).

6. Риск переноса трансгенов от ТР к бактериям

Несмотря на многочисленные попытки, перенос генов от растений к бактериям, происходящий, очевидно, в природных условиях, воспроизвести пока не удалось. Теоретически такое возможно, если:

1. ДНК, высвободившаяся из содержащихся в почве остатков ТР, будет способна к трансформации почвенных бактерий,

2. такие бактерии будут пребывать в компетентном для трансформации состоянии.

Действительно, как показано во многих исследованиях, ДНК растений может находиться в

почве в стабильном состоянии и быть способной к трансформации. Однако почвенные бактерии в реальных природных условиях могут быть компетентными к поглощению чужеродной ДНК в весьма редких случаях. Тем не менее, как известно, очень редкие события могут иметь весьма тяжелые последствия. Не возникнет ли в результате переноса генов от ТР к бактериям новый опасный микроорганизм?

7. ТР могут иметь новые свойства, опасные для агроэкосистемы

Экологический риск вызывается не самим трансгеном как таковым, а новизной ТР. Полезную информацию можно получить путем, например, оценки экспрессии трансгена (кодирующего, в частности, устойчивость к грибным фитопатогенам) влиять на другие виды устойчивости. При этом целесообразно проводить сравнение с аналогичными нетрансгенными растениями, устойчивыми к тем же самым фитопатогенам, но полученными методами традиционной селекции. Измененная агротехнология ТР как индуктор нарушений в агроэкосистемах Потенциальную опасность для агроэкосистем могут представлять не только ТР как таковые, но и изменения сельскохозяйственной и лесоводческой практики, вызванные спецификой их производства. Примером такого изменения может быть почти повсеместное возделывание канадскими фермерами масличного рапса, устойчивого к гербицидам. Наличие глифосатостойчивого трансгенного рапса позволило фермерам перейти не только к практике так называемого прямого стерневого посева, но и вообще отказаться от культивации. Это обеспечивает как противоэрозионную защиту верхнего слоя почвы (удерживаемого стерней от выдувания), так и сохранение в пахотном слое почвы влаги, поскольку стерня препятствует ее испарению.

ТР, устойчивые к абиотическим стрессорам, способны к эффективному росту, в частности, на засоленных или щелочных почвах, в условиях недостатка воды, при частых заморозках. Все это делает возможным крупномасштабное производство таких ТР в тех ареалах, где они ранее не выращивались. При этом нельзя исключать консортных нарушений в эндемичных экосистемах, для которых такие ТР будут "экзотическими" консорбентами.

В экосистеме может происходить:

1. нарушение трофических связей в цепях питания (растения > фитофаги);
2. нарушение функционирования первичных звеньев экосистемы хищник-жертва (насекомое > насекомое, фитофаг > энтомофаг);
3. нарушение численности и видового состава ризосферных микробных популяций;
4. уменьшение численности природных популяций бактерий, нуждающихся для своего развития в жизнеспособных личинках насекомых, чувствительных к Bt-токсину.

При действии ТР на нецелевых насекомых наибольшую опасность может представлять снижение численности:

1. насекомых (или других животных-хозяев), являющихся пищей для хищников;
2. насекомых, поражающих вредных членистоногих, в особенности переносчиков инфекций;
3. насекомых, необходимых для развития полезных микроорганизмов;
4. насекомых-опылителей.

8. Оценка риска негативного воздействия ТР на свойства почвы

Как оказалось, трансгены могут приводить к побочным биохимическим эффектам у растения-реципиента, в частности, вызывать увеличение содержания в его органах гликоалкалоидов, а также повышать синтез лигнина. В свою очередь, это уменьшало интенсивность микробной биodeградации биомассы кукурузы в почве, вследствие чего общая метаболическая активность почвы существенно снижалась.

Итак, современный мир движется в сторону трансгенной биотехнологии, и процесс этот не остановить. Как удалось показать, к настоящему времени методы оценки экологического риска производства ТР хотя и разработаны (в основном исследователями США и стран ЕС), но продолжают совершенствоваться. Базируясь на этих разработках, Украина, подобно другим агропромышленным странам, должна иметь отлаженный механизм государственного регулирования производства ТР, не допускающий коммерциализации или выпуска в агросферу страны ТР, представляющих экологическую угрозу. Однако государственные органы, которые должны были бы осуществлять подобное регулирование в полном объеме пока не функционируют. Доказательства биобезопасности ГМО должны опережать их коммерческое использование.