



Модуль 4 Иммунный ответ растения и генетический анализ устойчивости к болезням

Лекция 8. Тема: “Расы фитопатогенов”

Вопросы:

1. Понятие определения «раса», классификация рас патогенов.

Расовый состав популяции патогена.

Методы определения рас. Сорто-дифференциаторы.

Гены устойчивости растений. Создание генной библиотеки.

Физиологические расы

Физиологические расы патогенов – это биотипы, которые различаются между собой по способности заражать разные виды сортов одного вида растения-хозяина. Расы паразитов поражают только определенные сорта растений-хозяев.

Различие между расами основано на различии в веществах, которые используют фитопатогены для установления взаимоотношений с растением-хозяином.

- Физиологические расы паразитов определяют по патогенности и отношению к стандартному набору сортов-дифференциаторов.
- Сорт-дифференциатор - растение, генотип которого несёт гены устойчивости против определенных рас патогенов.

Например, расы ржавчинного гриба *Rustinia graminis* были открыты американским ученым Стэкменом, расы *Phytophthora infestans* - шотландским селекционером Блэком в 1950-1960 гг.

Физиологические расы известны для патогенных бактерий, грибов и цветковых растений-паразитов. У вирусов различают штаммы, отличающиеся друг от друга по структуре ДНК и патогенности по отношению к растениям-хозяевам.

Физиологические расы

Физиологическая раса - группа патогенов внутри вида, способна вызвать заражение определённых сортов растений-хозяев. Физиологические расы отличаются генотипами, различия между расами основаны на различии в физиологии заражения, они определены генетически.

Способность одной и неспособность другой расы вызвать заражение одного сорта связаны с разными способами воздействия этих рас на растение, с различными физиологическими реакциями. На одном и том же сорте расы могут вести себя по-разному: одна раса устанавливает взаимоотношения с клетками растения-хозяина и получает от него питательные вещества, другая при попытке заражения вызывает в клетках защитную реакцию сверхчувствительности, в результате которой погибает и клетка, и патоген.

Состав рас патогена в разных странах и в разных регионах неодинаков и определяется сортами растения-хозяина, культивируемыми здесь. У *P. graminis* было обнаружено свыше 300 рас. Внутри рас существуют биотипы, они отличаются по патогенности от основной расы.

Например, у расы 15 *P. graminis* были выявлены биотипы 15А, которые образуют более мелкие пустулы, и 15В с высокой вирулентностью.

Физиологические расы обозначаются цифрами, биотипы - буквой, стоящей после цифрового обозначения расы.

Способность к образованию физиологических рас и биотипов свойственна патогенам, относящимся к различным систематическим категориям: она имеется у слизевиков, у грибов, у цветковых паразитов. У вирусов и бактерий имеются аналогичные расам группы - штаммы.

Классификация рас фитопатогенов

Биологические расы патогенов

Группы грибов-паразитов, обособившихся внутри вида или подвида в результате приспособления к узкому кругу питающих их растений и являющиеся физиологическими расами.

Расы по хозяину - биологические расы паразитов животных (например, нематод), образующих временные линии на организме хозяине. Предпочтение тех или иных видов хозяев обычно основано на генетической предрасположенности, а также на привыкании к одному хозяину.

Физиологические расы облигатных паразитов устанавливают по способности к восприимчивости или устойчивости группы сортов питающего вида (рода) растения при искусственном заражении изучаемыми биотипами патогена. В пределах расы могут быть биотипы, неодинаково реагирующие на метеорологические факторы.

При разработке методик определения рас паразитов следует решить три вопроса:

- выделение изолятов;
- выявление характера патогенности;
- выбор сортов-дифференциаторов.

Образование новых рас

Причины образования новых рас:

1. **Мутации** – характерны для фитопатогенных грибов, бактерий и вирусов.
2. **Гибридизация** генетически разных особей микроорганизмов при половом процессе (характерен в основном для грибов).
3. **Гетерокариоз** (разноядерность) гаплоидных клеток: у грибов разноядерность возникает вследствие мутаций отдельных ядер, перехода ядер из разнокачественных гиф, рекомбинации генов при слиянии ядер и последующем их делении. У бактерий встречается также трансформация, при которой ДНК, выделенная одним штаммом бактерий, поглощается клетками другого штамма и включается в их геном.

При трансдукции отдельные сегменты хромосомы из одной бактерии переносятся в другую с помощью бактериофага (вируса бактерии).

У микроорганизмов образование рас идет постоянно. Многие из них погибают (низкий уровень агрессивности). В популяции, закрепляются более вирулентные расы (при наличии сортов и видов растений с генами устойчивости к существующим расам). При отсутствии конкуренции новая раса накапливается и распространяется (даже при слабой агрессивности).

Новые расы паразита возникают четырьмя основными путями:

- мутации в соматических клетках;
- рекомбинации ядерных генов в ходе полового процесса;
- перераспределение или обмен генетическим материалом в соматических клетках;
- мутации внехромосомных цитоплазматических генов.



Одной из форм неполной устойчивости является т.н. частичная устойчивость, при которой растение проявляет восприимчивость к инфекции, но развитие патогена замедленно или перед, или в процессе споруляции. Полная устойчивость обычно основана на качественной реакции, в то время как частичная устойчивость может быть оценена по количественной шкале.

Частичная устойчивость свойственна взаимодействию гороха с темнопятнистым аскохитозом (*M. pinodes*), который приносит существенные потери урожая во всех частях света, где возделывается горох.

Методы определения физиологических рас грибов

Определение расового состава патогена проводится по характеру реакций на заражение сортов-дифференциаторов (тест-сортов). Существуют стандартные наборы тест-сортов для определения рас у различных паразитов: у возбудителей фитофторы картофеля, бурой и стеблевой ржавчины пшеницы, мучнистой росы пшеницы.

В последнее время расовый состав патогенов определяют с помощью специально созданных изогенных линий. В ряде стран при анализе расового состава популяции ржавчинных грибов пользуются:

- международными наборами тест-сортов;
- изогенными линиями, имеющими по **одному гену расоспецифической (вертикальной) устойчивости**.

Для *P. graminis* созданы насыщающими скрещиваниями изогенные линии на основе сорта Маркиз, а для *P. recondita* — на основе сорта Тэтчер.

Типы поражений, вызываемых расами на сортах-дифференциаторах, служат показателем устойчивости или восприимчивости этих сортов.

Для определения рас используют **3 типа реакций:**

R - устойчив, S - восприимчив, M - гетерогенный.

Число определяемых физиологических рас зависит от числа используемых сортов-дифференциаторов. Зависимость эта выражается математически формулой A^n , где A - число реакций на заражение, n - число используемых сортов-дифференциаторов.

Расы и биотипы наиболее изменчивы. Появление и накопление новых рас может приводить к поражению сорта, ранее не поражаемого. Сорт может быть устойчив к одной расе и поражаться другой. Так, после районирования нового сорта и выращивания его на больших площадях, появляются расы возбудителя, способные

Изолят - это потомство генетически однородных генотипов в гаплоидной или диплоидной стадии (в диплоидной стадии потомство может быть гомо- или гетерозиготным)

После обоснования Г. Флором теории „ген-на-ген“ при выявлении рас паразита и сортов-дифференциаторов растения-хозяина в исследованиях преобладает генетический подход.

Расовое разнообразие фитопатогена устанавливают с помощью специально созданных моногенных линий растений с известными генами устойчивости.

Биологическую специализацию паразитов изучают по всему кругу растений-хозяев, включая дикие виды.

Для облигатных грибных возбудителей болезни изоляты анализируют, как правило, тремя наборами сортов-дифференциаторов:

- международным;
- изогенными линиями, имеющими по одному гену расоспецифической устойчивости;
- районированными сортами и донорами устойчивости из мировых коллекций различных генбанков.

Типы реакции при заражении

При установлении типа реакции на заражение расами используют следующую шкалу:

- У – устойчивый, пятна отсутствуют или проявляется сверхчувствительная реакция (СВЧ);
- В – восприимчивый, пятна крупные, быстро увеличивающиеся в размерах с налётом мицелия или спороношением в виде поверхностных пикнид.

При изучении расового состава возбудителей, как правило придерживаются следующей последовательности работ:

- выделение патогена в чистую культуру;
- размножение на питательной среде;
- определение вирулентности клонов;
- идентификация расового состава возбудителя.

Типы реакции при заражении

Реакцию сортов-дифференциаторов, например у сои, на инокуляцию отдельными клонами пероноспороза (*P. manshurica*) учитывают по качественной шкале:

1. Иммунный;
 2. Мелкие пятна, менее 0,5 мм в диаметре;
 3. Заметные, ограниченные хлоротичные зоны неправильной формы до 2 мм в диаметре;
 4. Хлоротичные зоны до 4 мм в диаметре;
 5. Большие хлоротичные зоны, равномерно покрывающие большую часть листа.
- Показатели 1-2 рассматривают, как градации устойчивости, 3-5 -восприимчивости. В результате по реакции 11 сортов-дифференциаторов сои было идентифицировано 15 рас возбудителя.

Типы питания микроорганизмов и их трофность

В процессе жизни микроорганизмы получают питательные вещества, из других живых, ослабленных или погибших организмов.

По типу питания все микроорганизмы подразделяются на: облигатных или факультативных сапрофитов, облигатных или факультативных паразитов.

В зависимости от состояния организма-хозяина, **тип питания микроорганизмов делят на сапрофитный и паразитический.**

Патогены делятся: некротрофные, биотрофные или гемибииотрофные.

Трофность микроорганизмов:

- **сапротрофы**(сапрофиты): паразитируют на мертвых тканях, способны извлекать из них питательные вещества;
- **некротрофы**: потребляют питательные вещества из тканей, которые они умерщвляют своими токсинами, некротрофное питание наиболее примитивное.
- **биотрофы**: паразитируют на живых клетках.
- **гемибииотрофы**: тип переходного питания (смешанный), микроорганизмы поражают живые ткани, после их гибели способны получать питательные вещества некротрофно.
- Разница между формами паразитизма состоит в скорости потребления пораженных тканей и роста самих паразитов.

Определение физиологических рас

У облигатных паразитов определение физиологических рас производится только по характеру патогенности – **вирулентности.**

Для факультативных паразитов и сапрофитов применяется другой подход. Известно, факультативные паразиты хорошо произрастают на искусственных средах и действуют на растения сильными токсинами. Поэтому, вместе с оценкой вирулентности выделенных биотипов, анализируют также токсичность, особенности развития на искусственных средах, которые отличаются большей фенотипической изменчивостью, чем вирулентность у облигатных паразитов.

Классификация рас возбудителя ржавчины

Классификация рас возбудителя ржавчины пшеницы основана на группах реакций.

Три группы устойчивости: устойчивая (У), восприимчивая (В), мезотетическая (М). Таким образом, число возможных рас (N) определяют формулой.

Основание степени равно трем, потому что имеется три типа реакции в ответ на заражение.

Определение рас возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы обычно проводят в лабораторных условиях (температура 21 °С, освещенность около 10 000 лк).

Для поддержания влажности растения в вазонах покрывают специальными стеклянными колпаками. Изменение этих условий может несколько изменить тип реакции, например, привести к появлению мезотетических реакций.

Для определения рас используют и полевой метод: высаживают дифференциаторы в полевых условиях и оценивают их пораженность.

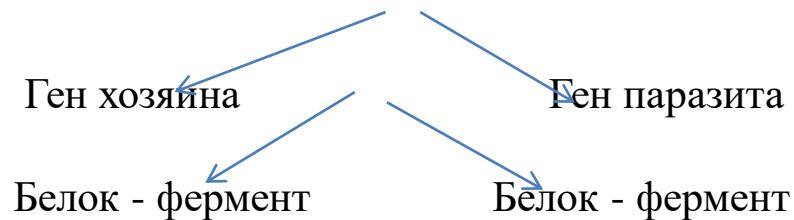
Генетические концепции взаимоотношений растений-хозяев и паразитов

Многообразие растений-хозяев и паразитов, сложность их взаимоотношений является причиной отсутствия единой теории иммунитета растений к болезням.

Все концепции взаимоотношений растений-хозяев и паразитов основаны на известных механизмах устойчивости к болезням:

- отсутствие в растениях питательных веществ нужных для паразита;
- сверхчувствительность;
- выделение растениями токсичных для патогенов антибиотических веществ;
- взаимодействие белков паразитов и растений-хозяев.

Гипотезы: Гарбер (1956) - «питательно-тормозящую» гипотеза иммунитета, Льюис (1957) - гипотезу сбалансированного паразитизма, Эфромсон (1961) - гипотеза «неполной среды». Эфромсон (1961) - генетическую модель (схему) иммунитета, согласно которой ген восприимчивости растения контролирует синтез фермента, ответственного за образование необходимых паразиту веществ:



НЕОБХОДИМЫЙ ПАРАЗИТУ СУБСТРАТ

Эта модель хорошо укладывается в систему Г.Флор «ген на ген», т. е. ген, определяющий вирулентность паразита комплементарен гену устойчивости хозяина.

Генетические концепции взаимоотношений растений-хозяев и паразитов

Вторая модель Laubseher, 1963 основана на теории регуляции белкового синтеза Жакоба и Моно.

Модель предполагает, что устойчивость контролируется функциональной системой, состоящей из генов регулятора, оператора, репрессора и индуктора.

Устойчивость определяется действием регуляторных генов растения, которые подавляют синтез необходимых патогену веществ.

Ген вирулентности патогена, контролирует синтез веществ, блокирующих репрессор, т.е. снимают подавление с синтеза необходимых для паразита метаболитов.

Дьяков Ю.Т.(1965) считает, что эту репрессию можно также снять средовыми воздействиями на растение, например, повышенными температурами.

Генетические концепции взаимоотношений растений-хозяев и паразитов

Реакция сверхчувствительности – это цепь биохимических превращений в клетке, приводит к образованию фитоалексина, она индуцирует специфическим метаболитом гриба. В незараженной клетке растения репрессор блокирует ген-оператор. При заражении авирулентной расой специфический метаболит гриба связывает репрессор и дает возможность оператору включить процесс синтеза специфических ферментов, участвующих в реакции сверхчувствительности (Дьяков, 1998).

По Фавре (1969), гены устойчивости сцепленные в блоки, контролируют синтез репрессоров. Наряду с генами, контролирующими синтез репрессоров, у растения имеется структурный ген, который контролирует синтез питательных веществ для паразита. В незараженной клетке репрессор подавляет транскрипцию структурного гена и питательные вещества не синтезируются. Паразит может развиваться если его метаболиты снимают репрессию со структурного гена и растение синтезирует для паразита питательные вещества. По Фавре, растение устойчиво ввиду отсутствия в клетках необходимых для паразита веществ, а вирулентность в результате снятия репрессии со структурного гена приводит к восприимчивости. Однако заражение авирулентной расой может индуцировать устойчивость к вирулентной, т.е. делает растение устойчивым к вирулентной расе. В н. время гипотезу Фавре рассматривают как частную, она соответствует некоторым случаям взаимоотношения растений и их паразитов.

Генетические концепции

Гипотеза «взаимной индукции» (Метлицкий, Дьяков, Озерецковский, 1973). Согласно этой гипотезе гены устойчивости растений контролируют синтез специфических веществ (индукторов), которые, соединяясь с рецепторами на мембранах паразита, освобождают выход метаболитов паразита (индукторы). Индукторы в зараженных клетках растения индуцируют фитоалексины. Синтез рецептора контролируется генами вирулентности. Гены устойчивости растения непосредственно не участвуют ни в синтезе, ни в регуляции синтеза фитоалексинов.

Гены вирулентности непосредственно не участвуют в синтезе индуктора, поскольку они имеются как у вирулентных, так и авирулентных рас. Устойчивость к паразиту определяется скоростью накопления фитоалексина в зараженных клетках до летальной для паразита концентрации. При заражении вирулентной расой растение не синтезирует веществ, повреждающих мембрану паразита, или паразит не имеет на мембранах рецептора связывающего индуктор растения. В этом случае индуктор паразита не будет вызывать образование фитоалексинов.

Генетические концепции

Ван дер Планк (1981) выдвинул гипотезу иммунитета – «белок на белок». Согласно гипотезе: белковые продукты генов «восприимчивости» растений и «вирулентности» паразита в процессе патогенеза способны полимеризоваться. Это обеспечивает паразиту биотрофный тип питания.

Мутация одного из генов «восприимчивости» изменяет структуру соответствующего белка. Белок теряет способность к полимеризации с белком паразита. Это вызывает защитные реакции у растения и определяет несовместимость растения и паразита.

Изменение гена «авирулентности» в ген «вирулентности» приводит к тому, что кодирующий белок паразита полимеризуется с белком растения и устанавливается совместимость. Эта гипотеза согласуется с концепцией Ван дер Планка о вертикальной и горизонтальной устойчивости и объясняет ее с позиций молекулярной биологии. Концепция «белок на белок» внедрила понятия о больших и малых, майор и минор генах, моно-, олиго- и полигенах и генах расоспецифической и расонеспецифической устойчивости.

Разработка генетической защиты растений

Разработка генетической защиты растений основана на:

- фундаментальных исследованиях механизмов изменчивости популяций фитопатогенных организмов,
- определении адаптационного потенциала патогенов, интенсивности генного потока, дрейфа генов;
- выявление генетического разнообразия устойчивости растений к болезням;
- использование биотехнологических методов в селекции устойчивых сортов растений.

Объекты исследований: облигатные, биотрофные, гемибитрофные возбудители болезней пшеницы, ячменя: стеблевая ржавчина пшеницы и ячменя, желтая пятнистость пшеницы, сетчатая и темно-бурая пятнистости ячменя.

Большинство возделываемых в мире сортов пшеницы находятся в «родственных отношениях», они защищены лишь небольшим количеством генов устойчивости.

Гены устойчивости у растений – R-гены

Гены устойчивости у растений – R-гены. В настоящее время известны последовательности более, чем у 40 R-генов: они определяют устойчивость к различным типам патогенов (вирусы, бактерии, грибы, животные), а их сходство свидетельствует об одинаковой природе возникновения сигнальных событий при формировании защитной реакции.

Все эти гены сгруппированы в 5 классов. Разнообразие R-генов напрямую связано с их геномной организацией. Различные R-локусы могут находиться в одном из четырёх состояний.

Первые имеют один ген с множеством аллелей.

В отдельных районах генома R-гены для грибных, бактериальных и вирусных патогенов локализованы на хромосоме на очень близком расстоянии друг от друга (1-2 н.п.). Так, у арабидопсиса выявлено пять R-ген-богатых районов. Такие ассоциации R-генов называются главными комплексами устойчивости (MRCs - major resistance complexes).

Гены устойчивости у растений

Разные экотипы дикорастущих растений одного вида могут содержать разное число генов в гомологичных локусах генов устойчивости.

Два полных гаплотипа (набора генов в сложном локусе) локуса *RPP5* (устойчивость к *Peronospora parasitica*), содержащего TIR-NBS-LRR-гены у *Arabidopsis*, были полностью секвенированы и проанализированы.

Девять генов найдены в устойчивом гаплотипе *Landsberg erecta* (*Ler-0*) и восемь генов найдены в восприимчивом (не имеющем функциональных генов *RPP5*) гаплотипе *Columbia* (*Col-0*).

Только один ген в *Ler*, кодирует полную длину гена *RPP5*. В гаплотипе *Col-0* в этом локусе два гена могут кодировать белки, обуславливающие *RPP4*-специфику устойчивости.

Другие содержат преждевременные терминирующие кодоны, отсутствующие инициаторные кодоны или ретротранспозоновые вставки.

- Ранее было проведено клонирование в этих же гаплотипах *Arabidopsis* локуса *RPP8* (также определяющего устойчивость к *Peronospora parasitica*).
- Гаплотип *RPP8* в устойчивом *Ler-0* содержит функциональный ген *RPP8-Ler* и нефункциональный гомолог, *RPH8A*. Напротив, *rpp8*-локус в восприимчивом *Col-0* содержит единственный химерный ген, который, вероятно, является продуктом неравного кроссинговера между передковыми генами *RPP8-Ler* и *RPH8A*.
- Приведенные примеры показывают **наличие в локусах генов устойчивости массивов нефункциональных генов или генов с неизвестной функцией**. Они могут обеспечивать средства поддержания благоприятных гаплотипов с множественными спецификами или могут служить резервом разнообразия последовательностей для генерации новых специфик распознавания при межгенном обмене последовательностями. Нельзя также исключить, что по крайней мере некоторые из них являются полноценными генами *R*, и определяют устойчивость к невыявленным патогенам.

Типы питания микроорганизмов и их трофность

В процессе жизни микроорганизмы получают питательные вещества, из других живых, ослабленных или погибших организмов.

По типу питания все микроорганизмы подразделяются на: облигатных или факультативных сапрофитов, облигатных или факультативных паразитов.

В зависимости от состояния организма-хозяина, **тип питания микроорганизмов делят на сапрофитный и паразитический.**

Патогены делятся: некротрофные, биотрофные или гембиотрофные.

Трофность микроорганизмов:

- **сапротрофы** (сапрофиты): паразитируют на мертвых тканях, способны извлекать из них питательные вещества;
- **некротрофы**: потребляют питательные вещества из тканей, которые они умерщвляют своими токсинами, некротрофное питание наиболее примитивное.
- **биотрофы**: паразитируют на живых клетках.
- **гембиотрофы**: тип переходного питания (смешанный), микроорганизмы поражают живые ткани, после их гибели способны получать питательные вещества некротрофно.
- Разница между формами паразитизма состоит в скорости потребления пораженных тканей и роста самих паразитов.

Основной источник пополнения новыми генами устойчивости - аборигенные образцы из центров генетического разнообразия культуры и дикие виды культурных растений.

В настоящее время созданы генетические коллекции источников устойчивости пшеницы и ячменя к облигатным и гемибiotрофным возбудителям болезней. В настоящее время проводится работа по идентификации и картированию новых генов устойчивости с использованием современных технологий картирования секвенированием. Использование методов биотехнологии в селекции устойчивых к болезням сортов зерновых культур связано с разработкой и использованием для скрининга генов устойчивости и для контроля передачи определенных генов устойчивости в элитный селекционный материал, а также применением технологии удвоенных гаплоидов для быстрой гомозиготизации селекционного материала.

В последние годы появились работы по трансформации элитных линий кассетами из нескольких клонированных R-генов, что позволяет использовать комбинации генов, которые не могут быть созданы традиционной селекцией, так как находятся в нерекombинирующих участках генома

Геномная библиотека

Геномная библиотека - это набор ДНК всего генома одного организма. Эту ДНК хранят в популяции идентичных векторов, каждый из которых содержит различные вставки ДНК.

Для построения геномной библиотеки ДНК экстрагируют из клеток, расщепляют рестриктазой, для разрезания ДНК на фрагменты определённого размера. Фрагменты далее встраивают в вектор с помощью фермента ДНК-лигазы. Вектор ДНК может быть встроен в организм-хозяин (в популяцию *E. coli* или дрожжей), где в каждой клетке содержатся копии вектора с одной, уникальной вставкой.

Для хранения вектора используют клетки хозяина, это дает возможность амплифицировать и находить определённые клоны из библиотеки для анализа. Геномную библиотеку можно хранить длительно в замороженном состоянии.

Отдельные бактериальные или дрожжевые клоны, содержащие фрагменты ДНК с нужными генами или другими элементами генома, выделяют и размножают (клонировать). Клонированные участки генома выделяют из клеток и используют.

Геномная библиотека

Поиск конкретного фрагмента ДНК среди других последовательностей (скрининг библиотеки), осуществляют методом ДНК-гибридизации при помощи ДНК-зондов.

Знание небольшой последовательности нуклеотидов с искомого участка, дает возможность синтезировать комплементарную последовательность (праймер около 20 нуклеотидов), метить её (флуоресцентная метка или радиоактивный изотоп).

С чашки Петри с колониями путем блоттинга делают реплику: прикладывают к чашке тонкую нитроцеллюлозную или иную мембрану, на которой остаётся отпечаток всех колоний. После этого осуществляют разрушение бактериальных клеток на отпечатке, освобождают ДНК от белков в щелочной среде и проводят денатурацию ДНК до одноцепочечной молекулы.

Далее все колонии обрабатывают зондом. В какой из колоний зонд присоединился по принципу комплементарности., эта колония и будет содержать нужный фрагмент ДНК.

Геномная библиотека

Если не известна последовательность ДНК, но имеется последовательность аминокислот исследуемого белка, готовится смесь зондов, которые могут распознать предполагаемую последовательность. Поскольку каждой аминокислоте может соответствовать несколько триплетов нуклеотидов (от одного до шести), то возможные кодирующие ДНК могут быть разными.

Методы скринирования геномных библиотек (в частности, изготовленных с помощью БАК-векторов) основаны на применении автоматизированного производства, в любом необходимом количестве копий, микропланшетов для хранения колоний (клонов), а также нитроцеллюлозных и нейлоновых мембран (фильтров), которые используют для гибридизации с ДНК-зондами. Для скрининга библиотек возможно применение ПЦР.

Разновидностью геномной библиотеки является микросателлитная библиотека, клоны которой содержат тандемные повторы. Их секвенирование дает возможность получить полиморфные ДНК-маркеры (микросателлитные локусы) для различных генетических и геномных приложений.

Если геном какого-либо организма разрезать, вставить в вирусные или плазмидные векторы, ввести в клетку, то его можно сохранить. При разрезании плазмидной или фаговой ДНК вероятность выпадения целых и неизмененных кусков генома довольно высока.

Этот способ получения геномной библиотеки называют «метод дробовика», поскольку геном представлен отдельными фрагментами.

Библиотека клоновой ДНК (кДНК)

Создание кДНК начинают с синтеза на матрице РНК с помощью обратной транскриптазы комплементарной нити ДНК. Далее создают щелочные условия, разрушают цепь РНК на нуклеотиды, и с помощью ДНК-полимеразы синтезируют комплементарную цепь ДНК. При этом образуется фрагмент ДНК с тупыми концами. Такую ДНК встраивают в плазмиды и вводят в клетки бактерий. При амплификации плазмиды образуется клон комплементарной копии ДНК (кДНК).

Преимущества клоновой ДНК перед клонами геномной ДНК в том, что *кодирующий белок нуклеотидная последовательность гена ничем не прерывается.*

Гены эукариот содержат интроны, они удаляются из транскриптной РНК перед превращением ее в матричную. Затем следует сплайсинг (сращивание). Бактериальные клетки не способны проводить такую модификацию РНК, которая образуется путем транскрипции гена эукариотической клетки. Поэтому если целью является получение белка путем экспрессии клонированного гена, то используют банк кДНК, полученной на основе матричной РНК.