

ВВЕДЕНИЕ

Гуар *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. – однолетняя бобовая культура полуаридных зон Индии и Пакистана, перспективная для выращивания на юге России. Растения гуара используют в пищу и на корм скоту, однако наиболее ценный продукт переработки семян – гуаровая камедь, которую применяют в качестве стабилизатора консистенции, увеличивающего вязкость и желирующие свойства, в косметологии, пищевой, бумажной, текстильной, угольной и нефтебуровой промышленности.

Гуар повреждают насекомые и клещи; растения поражаются бактериальными, вирусными, грибными и нематодными заболеваниями, среди которых самыми вредоносными считаются бактериоз (возбудитель – *Xanthomonas axonopodis* pv. *cyamopsidis* (Patel) Vauterin) (Gandhi, Chand, 1985) и альтернариозная пятнистость листьев (возбудитель – *Alternaria cyamopsidis* Rangaswami & A.V. Rao) (Saharan, Saharan, 2004). Фитосанитарные обследования посевов гуара на Кубанской опытной станции ВИР (КОС ВИР) показали, что и в Краснодарском крае на вегетативных органах растений наиболее распространены бактериоз и альтернариоз. Анализ ризосферной патогенной микофлоры в лабораторных условиях выявил преобладание грибов из родов *Verticillium* Nees и *Fusarium* Link. Среди насекомых доминировали представители семейства Aphididae (настоящие тли): *Aphis craccivora* (Koch) и *A. fabae* Scopoli, выявлены также отдельные колонии *Myzus persicae* (Sulzer) и *Acyrtosiphon pisum* Harris (Радченко, Соколова, 2018).

Необходимо отметить, что диагностика в поле конкретных видов рода *Alternaria* по симптомам заболевания практически невозможна. О распространении этих грибов на посевах гуара можно судить лишь после идентификации патогенов с помощью лабораторных методов. При этом существенная вариабельность морфологических признаков *Alternaria* spp. усложняет проведение качественной идентификации вида возбудителя с использованием традиционных методов диагностики. В ряде случаев затруднена и диагностика насекомых: например, бывает непросто различить люцерновую (*A. craccivora*) и бобовую (*A. fabae*) тлей, которые сходны по морфологическим признакам. Для достоверной идентификации вредных организмов разработаны молекулярно-генетические методы, основанные на использовании ПЦР (полимеразной цепной реакции) со специфичными праймерами и секвенировании ДНК.

В предлагаемом пособии рассматривается идентификация вредных организмов гуара по результатам оценки нуклеотидного полиморфизма фрагментов митохондриального (для насекомых) и ядерного (для грибов) геномов. Данный подход предусматривает несколько этапов: выделение ДНК из насекомых или пораженных листьев (формирование суммарных проб ДНК), подбор специфичных праймеров и амплификацию полиморфных участков геномов, клонирование ПЦР-продуктов, подготовку проб для секвенирования, идентификацию патогенов и вредителей с использованием международных информационных баз нуклеотидных последовательностей.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр..
Введение	5
Пробоподготовка	6
Выделение суммарной ДНК из отобранного материала	6
Метод А. Выделение ДНК из насекомых	6
Метод Б. Выделение ДНК грибных патогенов из листьев гуара	7
Разработка праймеров	8
Постановка ПЦР	14
Оценка результатов ПЦР методом электрофореза	15
Выделение фрагмента из ПЦР-смеси	18
Клонирование ПЦР-фрагментов (общие положения)	19
Лигирование ампликонов в вектор pAL2-T	20
Трансформация рекомбинантной ДНК в <i>E. coli</i>	21
Подготовка проб для секвенирования	22
Идентификация полученных последовательностей с помощью информационно-поисковой системы BLAST	24
Приложение	29
Буферы и растворы	29
Среды и добавки	30
Протокол приготовления химически компетентных клеток	32
Список литературы	34