

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова
Российской академии наук**

На правах рукописи

**СУББОТИН
Сергей Александрович**

**Молекулярная систематика и филогеография
седентарных нематод отряда Tylenchida**

1.5.17. - Паразитология

Диссертация на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Москва, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	8
Глава 1. Обзор литературы	15
1.1. Филогения и классификация нематод отряда Tylenchida	15
1.2. Рениформные нематоды рода <i>Rotylenchulus</i> (Hoplolaimidae, Rotylenchulinae).....	17
1.3. Цистоидные нематоды семейства Heteroderidae.....	19
1.4. Цистообразующие нематоды семейства Heteroderidae	21
1.4.1. Цистообразующие нематоды из группы <i>Avenae</i>	22
1.4.2. Цистообразующие нематоды рода <i>Globodera</i>	24
1.5. Галловые нематоды семейства Meloidogynidae	26
1.6. Сферонематиды.....	27
1.7. Цитрусовая нематода и другие тиленхилусы.....	27
Глава 2. Материалы и методы	30
2.1. Популяции и виды	30
2.2. Выделение ДНК, ПЦР и секвенирование	30
2.3. ПЦР-ПДФ-рРНК	31
2.4. ПЦР со специфичными праймерами.....	31
2.5. Филогенетический и филогеографический анализ.....	31
2.6. Реконструкция вторичной структуры для молекулы рРНК	33
Глава 3. Филогенетический анализ нематод отряда Tylenchida и происхождение седентарного паразитизма	34
3.1. Филогенетический анализ.....	34
3.2. Консервативное выравнивание.....	35
3.3. Автоматические выравнивания	36
3.4. Проверка альтернативных гипотез.....	40
3.5. Филогенетический сигнал в данных D2-D3 28S рРНК гена.....	41
3.6. Филогения тиленхид.....	42
3.6.1. Про-тиленхиды.....	43
3.6.2. Подотряд <i>Hexatylinea</i>	43
3.6.3. Надсемейство <i>Anguinoidea</i>	44
3.6.4. Подотряд <i>Criconematina</i>	45
3.6.5. Подотряд <i>Hoplolaimina</i>	45
3.6.6. Подсемейство <i>Merliniinae</i> и семейство <i>Psilenchidae</i>	46
3.6.7. Род <i>Macrotrophurus</i>	47

3.6.8. Род <i>Radopholus</i>	47
3.6.9. Седентарные нематоды семейств Heteroderidae и Meloidogynidae	48
3.6.10. Надсемейство Tylenchoidea	49
Глава 4. Молекулярная характеристика видов рода <i>Rotylenchulus</i> Linford & Oliveira, 1940 (Hoplolaimidae: Rotylenchulinae) и филогения рода.....	52
4.1. Виды исследованных нематод.....	52
4.2. Филогенетические исследования	52
4.2.1. D2-D3 28S рРНК ген.....	52
4.2.2. ВТС1 рРНК ген	54
4.2.3. 5.8S и ВТС2 рРНК гены	57
4.2.4. Hsp90 ген.....	57
4.2.5. COI ген	58
4.3. ПЦР с видоспецифичными для <i>Rotylenchulus reniformis</i> праймерами	60
Глава 5. Молекулярная характеристика и филогенетические взаимоотношения цистоидных нематод семейства Heteroderidae.....	64
5.1. Идентификация видов	65
5.2. Молекулярная характеристика и филогенетические отношения.....	66
5.2.1. D2-D3 28S рРНК ген.....	66
5.2.2. ВТС1 рРНК ген	67
5.2.3. COI ген	70
5.3. Комбинированное выравнивание и конденсное дерево.....	71
5.4. Синонимизация <i>M. alni</i> с <i>M. sikhotealinensis</i>	72
5.5. Новые находки и роды цистоидных нематод.....	72
5.6. Филогения седентарных цистоидных нематод.....	74
5.7. Филогеография.....	78
Глава 6. Диагностика цистообразующих нематод с помощью ПЦР	79
6.1. ПЦР-ВТС-ПДРФ	79
6.1.1. Диагностика видов рода <i>Heterodera</i>	79
6.1.2. Диагностика видов родов <i>Globodera</i> и <i>Cactodera</i>	84
6.2. Традиционная ПЦР с видоспецифическими праймерами	86
6.2.1. Диагностика свекловичной цистообразующей нематоды	86
6.2.2. Диагностика соевой цистообразующей нематоды	88
6.3. ПЦР в реальном времени с видоспецифическими праймерами.....	91
6.3.1. Диагностика цистообразующей нематоды <i>Heterodera cajani</i>	92

Глава 7. Филогенетические отношения у цистообразующих нематод, выявленные на основе анализа последовательностей ВТС областей рибосомальной ДНК	96
7.1. Влияние методов построения деревьев и процедур выравнивания на результат филогенетического анализа	96
7.1.1. Анализ последовательности ДНК	98
7.1.2. Филогенетический анализ	100
7.1.3. Чувствительность филогении к процедурам выравнивания и построения деревьев	106
7.2. Влияния выбора моделей эволюции ДНК на результат филогенетического анализа ...	107
7.2.1. Вторичная структура ВТС2 и ее значение для филогении	110
7.2.2. Филогенетические отношения, полученные из анализа максимальной экономии и Байесовского анализа, используя вторичную структуру	111
7.3. Сходство молекулярных и немолекулярных филогенетических гипотез	114
7.4. Коэволюция цистообразующих нематод с растениями-хозяевами	119
7.5. Важность данных о последовательностях ВТС рРНК гена для филогенетических исследований гетеродерид	121
Глава 8. ДНК-баркодирование, филогения и филогеография нематод видов рода <i>Heterodera</i> группы <i>Avena</i>	123
8.1. Филогенетический анализ ВТС рРНК гена	123
8.1.1. Группа <i>Avena</i>	123
8.1.2. Видовой комплекс <i>Heterodera avenae</i>	124
8.1.3. <i>Heterodera hordecalis</i>	127
8.1.4. <i>Heterodera latipons</i> и <i>Heterodera</i> sp.	128
8.2. Филогенетический анализ COI гена	128
8.2.1. Группа <i>Avena</i>	128
8.2.2. <i>Heterodera avenae sensu stricto</i> и <i>H. arenaria</i>	129
8.2.3. <i>Heterodera filipjevi</i>	130
8.2.4. <i>Heterodera pratensis</i> и <i>H. sturhani</i>	130
8.2.5. <i>Heterodera aucklandica</i>	132
8.2.6. <i>Heterodera australis</i>	132
8.2.7. <i>Heterodera mani</i>	133
8.2.8. <i>Heterodera ustinovi</i>	134
8.2.9. <i>Heterodera hordecalis</i>	134
8.2.10. <i>Heterodera latipons</i> и неизвестный вид <i>Heterodera</i> sp.	136
8.3. Филогеографический анализ и молекулярные часы	136

8.4. Определение границ видов и ДНК-баркодирование.....	136
8.4.1. <i>Heterodera avenae</i> и <i>H. arenaria</i> , <i>H. pratensis</i> и <i>H. sturhani</i>	137
8.4.2. <i>Heterodera australis</i> из Китая.....	137
8.4.3. Неизвестный вид <i>Heterodera</i> из Турции и Сирии.....	138
8.5. Вариации ВТС рРНК гена.....	139
8.6. ДНК-баркодирование.....	139
8.7. Филогенетические взаимоотношения.....	139
8.8. Биогеография.....	140
8.9. Происхождение и распространение видов группы <i>Avenae</i>	141
8.10. COI гаплотипы и патотипы злаковых нематод.....	144
Глава 9. ДНК-баркодирование, филогения и филогеография видов цистообразующих нематод из рода <i>Globodera</i> (Tylenchida: Heteroderidae).....	147
9.1. Филогенетический анализ ВТС рРНК гена.....	147
9.1.1. Филогения глободер.....	147
9.1.2. Клада видов рода <i>Globodera</i> , паразитирующих на пасленовых.....	148
9.1.3. Клада видов рода <i>Globodera</i> , паразитирующих на непасленовых.....	149
9.2. Филогенетический анализ последовательностей COI гена.....	149
9.2.1. Филогения глободер.....	151
9.2.2. Клада видов рода <i>Globodera</i> , паразитирующих на пасленовых.....	152
9.2.3. Клада видов рода <i>Globodera</i> , паразитирующих на непасленовых.....	153
9.3. Филогенетический анализ последовательностей <i>cutb</i> гена.....	155
9.3.1. Клада видов рода <i>Globodera</i> , паразитирующих на пасленовых.....	156
9.4. Проблемы использования митохондриальных генов для ДНК-баркодирования и филогеографии глободер.....	160
9.5. Определение видов глободер.....	161
9.6. Данные по ДНК-последовательностям двух генов как обоснование синонимизации вида <i>G. bravoae</i>	162
9.7. Филогения рода <i>Globodera</i>	163
9.8. Происхождение и филогеография рода <i>Globodera</i>	163
9.9. Происхождение и популяционная структура картофельных нематод в Андах.....	166
9.10. Происхождение и распространение европейских и североамериканских популяций картофельных нематод.....	168
9.11. Происхождение и структура популяции <i>Globodera mexicana</i> из Мексики.....	169
9.12. Происхождение и специализация глободер в Южной Африке.....	169

Глава 10. Филогения галловых корневых нематод и молекулярная характеристика	
<i>Meloidogyne nataliei</i> Golden, Rose & Bird, 1981 (Nematoda: Tylenchida)	171
10.1. Молекулярный анализ	171
10.2. Филогенетические отношения в пределах рода <i>Meloidogyne</i>	173
10.3. Эволюционные отношения <i>Meloidogyne nataliei</i> с другими нематодами	179
10.4. Эволюционные тенденции внутри галловых нематод	180
Глава 11. Быстрая диагностика галловых корневых нематод рода <i>Meloidogyne</i> с использованием метода рекомбиназной полимеразной амплификации	182
11.1. Диагностика <i>Meloidogyne enterolobii</i>	182
11.1.1. Образцы нематод	183
11.1.2. Нематодные экстракты.....	184
11.1.3. РПА праймеры и тестирование	185
11.1.4. РПА анализ в реальном времени.....	186
11.1.5. РПА анализ полевых образцов в реальном времени	187
11.1.6. Обнаружение продуктов РПА	187
11.1.7. Обнаружение и чувствительность метода РПА в реальном времени.....	188
11.1.8. Специфичность РПА	190
11.1.9. РПА анализ полевых образцов	190
11.1.10. Обсуждение	190
11.2. Диагностика <i>Meloidogyne hapla</i>	191
11.2.1. Праймеры и пробы для РПА.....	192
11.2.2. Тестирование праймеров для РПА.....	192
11.2.3. РПА в реальном времени	193
11.2.4. РПА с иммунострипами	194
11.2.5. Обсуждение	196
Глава 12. Молекулярная филогения и характеристика видов рода <i>Tylenchulus</i>	199
12.1. Филогения рода <i>Tylenchulus</i>	199
12.2. Молекулярная диагностика видов рода <i>Tylenchulus</i>	202
12.2.1. ПЦР-ВТС-ПДРФ	202
12.2.2. ПЦР со специфическими праймерами.....	203
Глава 13. Молекулярная характеристика и филогенетическая позиция родов <i>Meloidoderita</i> и <i>Sphaeronema</i> (Sphaeronematidae)	206
Выводы.....	211
Список сокращений и условных обозначений.....	214
Список литературы	215

Приложение.....	251
Виды нематод из отряда Tylenchida, секвенированные и депонированные в Генный Банк	251
Таблица 1. Основные праймеры, использованные в настоящей работе.	255
Таблица 2. Положение некоторых клад в топологиях, полученных в результате анализа выравниваний D2-D3 фрагмента 28S рРНК гена методами максимальной экономии (МП) и Баесовой вероятности (БВ).	256
Таблица 3. Виды <i>Rotylenchulus</i> , анализированные в настоящем исследовании.	257
Таблица 4. Виды и популяции цистоидных нематод, использованные в настоящем исследовании.	258
Таблица 5. Положение некоторых клад в топологиях, полученных в результате анализа выравниваний ВТС рРНК секвинсов цистообразующих нематод методами максимальной экономии (МП), максимального правдоподобия (МЛ) и минимальной эволюции ^[1] _{SEP} (МЭ). 260	
Таблица 6. Виды и популяции цистообразующих нематод из группы <i>Avenae</i> , использованные в исследовании.	261
Таблица 7. Виды и популяции цистообразующих нематод из рода <i>Globodera</i> , использованные в исследовании.	266

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Фитопаразитические нематоды имеют большое экономическое значение, поскольку могут вызывать значительное снижение урожайности многих сельскохозяйственных культур. Большая часть этих потерь вызывается седентарными галловыми и цистообразующими нематодами. Седентарные нематоды, стимулируя образование питающих клеток в тканях растений, выработали совершенно особые трофические взаимоотношения с растением-хозяином. После проникновения в корни растений личинки нематод начинают питаться и после нескольких линек приобретают более или менее вздутую форму, вследствие чего теряется их способность к активной миграции, они становятся седентарными.

Нематодные болезни сельскохозяйственных культур трудно контролировать из-за отсутствия специфических диагностических симптомов, которые очень напоминают поражения, вызываемые другими патогенами растений и абиотическими факторами. Современные концепции защиты растений ориентированы на стратегии, которые ограничивают производственные затраты, повышают урожайность и защищают окружающую среду. В связи с запретом или ограничением использования многих нематодицидов, альтернативные методы борьбы с нематодами должны основываться на знании систематики и биологии этих организмов. Небольшие размеры тела нематод и ограниченное количество морфологических признаков, пригодных для диагностики, делают видовое определение этих паразитов сложной задачей. Правильное определение нематод является основой для разработки мер борьбы и внедрения эффективных карантинных правил.

Задачами систематики являются: (1) наименование, идентификация и каталогизация организмов (таксономия); (2) выявление родовых связей между организмами (филогения); (3) организация информации о разнообразии организмов в иерархическую систему (классификация). Молекулярная систематика – это применение знаний о геноме, особенно знаний о последовательности и структуре молекул ДНК, РНК и аминокислотных цепей, для решения проблем филогении и таксономии организмов. Последние достижения в области молекулярной биологии и широкое применение молекулярных методов произвели революцию в наших знаниях в области таксономии и филогении нематод. Использование таких методов становится обычной практикой в нематологии (Субботин, 2004, 2006; Subbotin & Moens 2006; Blok, 2005; Perry *et al.*, 2007; Чижов & Субботин, 2012; Subbotin *et al.*, 2013).

Использование биоинформатики, с ее возможностью анализа большого количества геномных данных, является одним из самых важных событий в развитии систематики за

последние десятилетия. Систематика, используя анализ всех имеющихся данных, включая информацию о фенотипических, генотипических и филогенетических трансформациях, становится важнейшей многогранной и интегрированной дисциплиной. Интегрированная систематика является во многом чисто эмпирической дисциплиной и приводит к решениям по типу консенсуса, удовлетворяющего большинство, но не обязательно всех пользователей таксономических результатов. Интегрированный анализ ведёт к систематике переходного типа, в которой компромисс может быть сформулирован на основе имеющихся в настоящее время результатов. Эти интегрированные подходы помогают открывать новые виды, точно помещать таксоны в древо жизни и решать важные вопросы о закономерностях и процессах формирования биоразнообразия и связанной с ним окружающей среды. Принципы интегрированной таксономии могут использоваться для решения таксономических проблем в нематологии. Молекулярные маркеры также широко используются в филогеографии – новой дисциплине, задачей которой является использование генетической информации для реконструкции истории видов и популяций. Методы филогеографии относительно недавно начали применяться в нематологии, и основные закономерности распределения нематод остаются еще плохо изученными. Настоящая диссертационная работа посвящена молекулярным исследованиям седентарных нематод и описывает подходы к использованию молекулярных данных для интегрированной таксономии и филогеографии этой группы.

Степень разработанности темы

В настоящее время описано всего около 4100 видов фитопаразитических нематод, и предполагается, что это только 15% от общего числа известных видов нематод. Все известные фитопаразитические нематоды относятся в настоящее время к четырем отрядам: Tylenchida, Aphelenchida, Dorylaimida и Triplonchida (Decraemer & Hunt, 2013). Самый многочисленный из них отряд Tylenchida, который содержит более 233 валидных родов и 2828 валидных видов, согласно второму изданию Siddiqi's (2000), или 211 валидных родов и 2876 валидных видов, согласно Andr assy (2007). В настоящее время седентарные нематоды включают более 270 валидных видов, из них 118 цистообразующих и 32 цистоидных нематод семейства Heteroderidae, 98 видов рода *Meloidogyne* и более 20 видов из надсемейства Tylenchuloidea.

Наиболее важным критерием для создания естественной классификации организмов является их филогенетическая связь, а именно общее происхождение. Blaxter *et al.* (1998) были первыми, кто представил общую филогению нематод на основе анализа последовательностей 18S рРНК гена. Holterman *et al.* (2006), Meldal *et al.* (2007) также реконструировали филогенетические взаимоотношения и выявили основные клады нематод на основе этого гена, но на более широкой выборке таксонов. Однако, как показали

дальнейшие исследования, ген 18S рРНК оказался недостаточно информативным, чтобы изучить взаимоотношения между близкими видами и родами, и исследователями были предложены другие гены и генные фрагменты, в частности 28S рРНК и ВТС рРНК ген, для решения этих задач. В пределах Tylenchina последовательности 28S рРНК гена были использованы для анализа взаимоотношений между надсемействами Cephaloidea и Panagrolaimoidea, но только несколько тиленхид было включено в такой анализ (Nadler *et al.*, 2006). ВТС рРНК ген был секвенирован для некоторых галловых нематод (Hugall *et al.*, 1999) и нескольких цистообразующих нематод (Ferris *et al.*, 1993, 1994, 1995; Ferris, 1998; Blok *et al.*, 1998). Таким образом, седентарные нематоды долго оставались плохо молекулярно изученной группой нематод. Значительный прогресс в области молекулярной систематики седентарных нематод был достигнут в результате наших совместных с коллегами исследований. Нами были получены сотни новых нуклеотидных последовательностей ДНК (секвенсов) рРНК и других генов и диагностические профили рестрикции для множества цистидных, цистообразующих и других седентарных нематод.

Личный вклад автора

Диссертационная работа является результатом многолетних исследований (1996–2021 гг.), выполненных автором лично и в рамках совместной деятельности с коллегами. Автором была определена цель и предложены основные задачи исследования, подготовлен текст диссертации и сформулированы выводы. Автор принимал участие во всех этапах исследования, включая сбор и обработку материалов, анализ данных, интерпретацию полученных результатов и подготовку публикаций. В статьях, написанных в соавторстве, молекулярные исследования, на которых базируется настоящая диссертация, выполнены лично автором или под его руководством.

Цель и задачи работы

Целью данной работы являлось изучение эволюционных взаимоотношений, происхождения и филогеографии седентарных нематод отряда Tylenchida и разработка их диагностики на основании молекулярно-генетических данных.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие основные задачи:

1. Амплификация и секвенирование последовательностей рибосомальных, митохондриальных и других генов у седентарных нематод, включая хозяйственно важные виды.

2. Определение родственных отношений видов, родов и семейств седентарных нематод с использованием различных методов филогенетического анализа.
3. Установление систематической принадлежности неясных или спорных таксонов и уточнение таксономического состава подсемейств и семейств седентарных нематод.
4. Исследование разнообразия, видовой структуры и определение видовых границ у седентарных нематод по комплексным молекулярно-генетическим и морфологическим данным.
5. Проведение филогеографических исследований с анализом особенностей географического распространения и истории распространения некоторых групп седентарных нематод с использованием молекулярных методов анализа.
6. Разработка надежных, быстрых и дешевых методов молекулярной диагностики основных видов цистообразующих и других седентарных фитопаразитических нематод на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и других методов.

Научная новизна

В ходе работы были секвенированы более чем 3400 ДНК-последовательностей рРНК, митохондриальных и других генов для более чем 300 видов тиленхидных нематод, включая свыше 860 нуклеотидных последовательностей для Heteroderidae и 306 последовательностей для Meloidogynidae. Были построены и проанализированы вторичные структуры молекул 5.8S и ВТС (внутренний транскрибируемый спейсер) рРНК и D2-D3 фрагмента 28S рРНК исследованных видов и разработаны две компьютерные программы для расчета и преобразования этих структур в филогенетическом анализе.

Впервые был проведен анализ филогенетических взаимоотношений внутри отряда Tylenchida с использованием данных по D2-D3 фрагменту 28S рРНК гена. Проведена ревизия семейства Heteroderidae и определены границы известных видов. Были впервые получены последовательности для нескольких генов у нескольких важных для сельского хозяйства нематод, представлены филогении и проанализированы филогенетические взаимоотношения между представителями семейств Heteroderidae, Meloidogynidae и надсемейства Tylenchuloidea. На основании построенных филограмм и анализа признаков даны предполагаемые направления морфологических эволюционных преобразований для этих групп нематод. Впервые молекулярно охарактеризованы цистообразующие нематоды в России.

Впервые предложена классификация митохондриальных гаплотипов и представлена филогеография цистообразующих нематод рода *Globodera* и группы *Avenae* рода *Heterodera*.

Были описаны и молекулярно охарактеризованы: один новый род цистообразующих нематод – *Paradolichodera*, десять новых видов цистообразующих нематод – *Heterodera australis*, *H. circaeae*, *H. persica*, *H. pratensis*, *H. ripae*, *H. scutellariae*, *H. sturhani*, *H. vallicola*, *Cactodera solani*, *C. torreyanae*, два новых вида седентарных нематод – *Rotylenchulus macrosomoides* и *Tylenchulus musicola*.

Представлены рестрикционные диагностические профили с целью определения важных для сельского хозяйства нематод, включая основных представителей цистообразующих нематод. Разработаны методы экспресс-диагностики с использованием ПЦР с видоспецифическими праймерами для идентификации *Heterodera glycines*, *H. schachtii*, *H. cajani*, *Rotylenchulus reniformis* и нескольких видов *Tylenchulus* и других нематод. Впервые разработан высокочувствительный метод экспресс-диагностики *Meloidogyne enterolobii* и *M. hapla* с использованием рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА).

Практическое значение

Настоящая работа расширяет представления об эволюции фитопаразитических нематод и способствует более объективной оценке биоразнообразия этих организмов на основе статистических методов. Разработанные диагностические методы и полученные последовательности используются для быстрой, надежной и дешевой диагностики этих паразитов во многих лабораториях (Центр по диагностике вредителей Департамента сельского хозяйства Калифорнии, Лаборатория гельминтологии Россельхознадзора, Нематологическая лаборатория Департамента сельского хозяйства и бытовых услуг Флориды и др.).

Основные положения диссертации используются в лекционных и практических университетских курсах по систематике нематод (Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева; Университет Гента, Бельгия; Университет Калифорнии, Дэвис и др.).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Основной тенденцией эволюционной специализации фитопаразитических нематод было становление седентарного паразитизма. Этот усложненный тип взаимоотношений паразит – хозяин формировался независимо в разных филогенетических линиях нематод отряда Tylenchida.
2. Молекулярная филогения седентарных нематод подтверждает предложенные гипотезы морфологической эволюции этих организмов. Использование интегрированного подхода к анализу морфологии и молекулярных маркеров

позволяет предложить усовершенствованную и наиболее близкую к естественной классификацию этих фитонематод.

3. Гены рибосомальной РНК, митохондриальной COI и гены *cutb* позволяют надежно дифференцировать виды седентарных нематод и являются информативными маркерами для реконструирования филогении и филогеографии этой группы.
4. Центры происхождения большинства седентарных нематод находились в так называемых горячих точках биоразнообразия, откуда эти нематоды расселились в другие регионы. Выявленные впервые разные центры происхождения, время возникновения видов и экологические барьеры, а также различная адаптивность видов к климатическим условиям объясняют существующую картину распределения седентарных нематод.
5. Седентарные нематоды, являясь высокоспециализированными паразитами, коэволюционировали со своими растениями-хозяевами. Эта эволюция была обусловлена двумя основными процессами: а) относительно медленной коэволюцией с растениями-хозяевами, с переходами на новые виды хозяев в рамках близкородственных семейств растений и б) более быстрым переходом и колонизацией растений из неродственных семейств, но произрастающих в экологически сходных условиях.

Степень достоверности и апробация работы

Полученные данные базируются на молекулярно-филогенетических методах, обработка результатов была проведена различными статистическими методами, все последовательности в настоящее время депонированы в Генный банк. Верификация правильности таксономического определения нематод проводилась в ходе совместной работы с ведущими систематиками нематод.

Материалы и основные результаты данного исследования были представлены в докладах на научных семинарах Центра паразитологии РАН, Департамента нематологии Калифорнийских университетов Риверсайда и Дэвиса, Департамента сельского хозяйства Калифорнии, Лаборатории нематологии Университета Гента, Бельгия, на многочисленных научных конференциях, организованных Российским нематологическим обществом (1995, 1999 – Санкт-Петербург, Зоологический институт РАН; 1997, 2001 – Москва, МГУ; 2005 – Москва, Институт паразитологии РАН; 2015 – Чебоксары), Обществом нематологов (2003 – Итака, 2004 – Колорадо, 2005 – Флорида, 2006 – Гавайи, 2007 – Калифорния, 2016 – Монреаль, Канада), Европейским нематологическим обществом (1994, 2018 – Гент, Бельгия, 1998 – Данди, Англия, 2016 – Брага, Португалия), международных конгрессах по нематологии

(1990 – Велдховен, Голландия, 1996 – Гваделупа, 2002 – Тенерифе, Испания, 2008 – Брисбен, Австралия), Организацией нематологов Тропической Америки (2012 – Канкун, Мексика, 2019 – Коста-Рика), Бразильским обществом нематологов, и других научных мероприятиях.

Благодарности

Я глубоко признателен моим коллегам: Марису Мунсу (Бельгия), Ливену Вайнбергу (Бельгия), Роланду Перри (Великобритания), Эстер Ван ден Берг (Южная Африка), Захре Танха Маафи (Иран), Пабло Кастилло (Испания), Игнасио Цид Дел Прадо Вера (Мексика), Ч. Н. Нгуен (Вьетнам), Роберту Роббинсу (США), Ренате Инсерра (США), Жанет Брито (США), Хавер Франко (Перу), Сергио Алиарез-Ортега (Испания), Мекгердату Мадани (Канада), Саиду Амири (Марокко), Николе Вовласу (Италия), Джеймсу Балдуину (США), а также многим другим, в сотрудничестве с которыми были выполнены эти исследования. Я глубоко благодарен моим коллегам и друзьям Светлане Васильевне Зиновьевой, Владимиру Николаевичу Чижову, Александру Юрьевичу Рыссу, Сергею Эдуардовичу Спиридонову и моей жене Татьяне Владимировне Рубцовой, оказавшим неоценимую помощь в написании этой диссертации. Работы, представленные в диссертации, были выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Немецкого научного общества, Королевского научного общества (Лондон), Департамента сельского хозяйства США, Национального научного фонда США и некоторых других.

Публикации

По материалам диссертации автором опубликована 51 научная статья в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, 13 глав в коллективных монографиях и две монографии.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Филогения и классификация нематод отряда Tylenchida

Отряд Tylenchida Thorne, 1949 включает самую большую и наиболее экономически важную группу фитопаразитических нематод (Siddiqi, 2000; Subbotin, 2013). Хотя нематоды этого отряда паразитируют на всех органах растений, включая листья, стебли, цветы и семена, большинство тиленхид в основном поражает корни. Этот отряд также включает в себя группу микофагов и большую группу энтомопаразитических нематод. За многие годы исследований было предложено несколько классификаций и филогений для тиленхид (Chitwood & Chitwood, 1950; Maggenti, 1971, 1981; Andr assy, 1976; Skarbilovich, 1978, 1980; Siddiqi, 1980, 1986, 2000; Ryss & Krall, 1981; Luc *et al.*, 1987; Maggenti *et al.*, 1987; Чижов и Березина, 1988; Чижов и Кручина, 1988, 1989, 1992; Ryss, 1993; Чижов, 2004). Однако в настоящее время в основном используются только две классификации Tylenchida, отличающиеся подразделением на подотряды. Классификация, предложенная Maggenti *et al.* (1987), выделяет четыре подотряда: Tylenchina, Aphelenchina, Sphaerulariina и Hexatyline, тогда как классификация Siddiqi (1980, 1986, 2000) подразделяет отряд на четыре подотряда: Tylenchina, Hoplolaimina, Criconematina и Hexatyline и также рассматривает Aphelenchida как отдельный отряд.

Настоящие классификации отражают противоречия относительно взглядов на происхождение Tylenchida и в оценке различных эволюционных тенденций в этой группе (Baldwin *et al.*, 2004a). Филиппев (1934) был первым, кто предположил, что тиленхиды произошли от рабдитид-диплогастрид. Парамонов (1962, 1970) провел более детальную работу по филогенезу тиленхид, предполагая, что путем тщательного изучения эколого-морфологических признаков и онтогенеза современных нематод можно вывести филогенетические отношения различных групп. Основываясь на эволюционных тенденциях, Парамонов (1970) предположил, что отряд Tylenchida произошел от предков, питающихся грибами, и предложил гипотетического предка, близкого к современному *Psilenchus*. Эту точку зрения в дальнейшем разделили Чижов и Березина (1988) и Рысс (1993). Другая концепция эволюции тиленхид была разработана Siddiqi (1980, 1986, 2000), который использовал кладистические методы для изучения взаимоотношений между группами тиленхид. Он предполагал, что тиленхиды произошли из «комплекса Cephalobida-Oxyurida», и считал, что *Hexatylus* наиболее близок к гипотетическому предку тиленхид. Он также представил кладограмму, описывающую взаимоотношения между подотрядами тиленхид. Хотя Чижов и Кручина (1988) и Рысс (1993) в целом согласились с классификацией Сиддики, они разошлись с ним во мнении о филогенетических отношениях между основными группами тиленхид. Относительно недавно классическая морфологическая информация и

молекулярные данные были использованы в качестве основы для разработки новой классификации нематод, включая тиленхид с новым инфраотрядом *Tylenchomorpha* и надсемействами *Aphelenchoidea*, *Criconematoidea*, *Sphaerularioidea*, *Tylenchoidea* и *Myenchoidea*. Подробно эта система была представлена в работе De Ley и Blaxter (2002). Несмотря на то что подразделение на семейства и роды не было представлено в этой классификации, тем не менее этот новый взгляд на эволюцию нематод дает новые гипотезы для тестирования филогений.

Рассмотрев строение пищевода, половой системы и биологические особенности представителей *Tylenchoidea* и *Hoplolaimina* (или *Hoplolaimoidea*), Рысс (1987) пришел к заключению, что возрастание специализации к паразитизму на растениях в различных филогенетических линиях гоппололаймоидей и тиленхоидей произошло независимо друг от друга. Становление *Hoplolaimina* связано с переходом от питания за счет клеток эпидермиса, характерного для низших тиленхоидей, к облигатному питанию внутри растения. Рысс (1987) также полагает, что развитие паразитизма шло несколькими независимыми линиями, одну из которых представляет собой *Rotylenchulidae*, другую – группа гоппололаймоидные семейства *Hoplolaimidae*, *Meloidoderidae*, *Ataloderidae*, *Heteroderidae*, в пределах которой произошло становление высших стационарных эндотрофических-эктотрофических нематод от временных эндотрофов-эктотрофов – гоппололаймид. Третья филогенетическая ветвь включает семейства *Meloidogynidae* и *Pratylenchidae*. Развитие в пределах этой ветви привело к возникновению стационарного эндотрофического-эндотрофического паразитизма галловых нематод семейства *Meloidogynidae* и ложно-галловых нематод рода *Nacobbus*.

Филогенетическая реконструкция *Tylenchida* на основе частично секвенированного фрагмента гена 18S рРНК для более чем 35 видов была представлена в обзоре Baldwin *et al.* (2004a). Хотя в этом исследовании филогенез 18S рРНК генов для *Tylenchida* не был детально проанализирован, некоторые тенденции внутри этой группы были отчетливо прослежены, включая конвергентную эволюцию седентарного эндопаразита и возникновения механизма индукции паразитом питающих его клеток у цистообразующих и галловых нематод. Skantar и Carta (2004) проанализировали филогенетические взаимоотношения в пределах пяти родов тиленхид на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *hsp90*. Scholl и Bird (2005) использовали EST-данные для реконструкции филогении с использованием 47 ортологичных генов, но в это исследование были включены только три рода седентарных нематод-тиленхид.

На основе анализа литературы можно заключить, что филогенетические отношения между основными группами тиленхид и седентарными нематодами, основанные на совокупности молекулярных или морфологических данных, не были достаточно изучены с

использованием строгих кладистических или других филогенетических методов. До проведения наших исследований общая картина филогенетических взаимоотношений внутри тиленхид и положение седентарных нематод внутри отряда оставались неизвестными. Первая подробная молекулярная филогения отряда Tylenchida на основе анализа D2-D3 фрагмента 28S рРНК гена была опубликована нами в 2006 году (Subbotin *et al.*, 2006). Было показано, что седентарный паразитизм возник несколько раз в эволюции этих нематод. Эти выводы были подтверждены в последующие годы при анализе филогении тиленхид с использованием последовательностей 18S рРНК гена (Bert *et al.*, 2008; van Megen *et al.*, 2009). Согласно современным знаниям о филогении тиленхид, можно заключить, что существует несколько групп седентарных нематод, независимо возникших в процессе эволюции. Это рениформные нематоды рода *Rotylenchulus* (Rotylenchulidae), цистоидные и цистообразующие нематоды (Heteroderidae), галловые и ложно-галловые нематоды (Meloidogynidae и Pratylenchidae с подсемейством Nacobboderinae), все принадлежащие подотряду Hoplolaimina и тиленхулоидные нематоды из надсемейства Tylenchuloidea. Как отметил Siddiqi (2000), построение филогении тиленхид, хотя и является чрезвычайно трудной задачей, крайне важно для создания стабильной и естественной системы классификации этой важной группы.

1.2. Рениформные нематоды рода *Rotylenchulus* (Hoplolaimidae, Rotylenchulinae)

Рениформные нематоды рода *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940 включают десять валидных видов (Рисунок 1.1). Эти нематоды являются полуэндопаразитами многочисленных травянистых и древесных корней растений и распространены в основном в тропических и субтропических регионах. *Rotylenchulus reniformis* является наиболее важным видом в этом роде и считается основным нематодным вредителем на хлопчатнике и других культурах в США и в других странах (Robinson *et al.*, 1997).

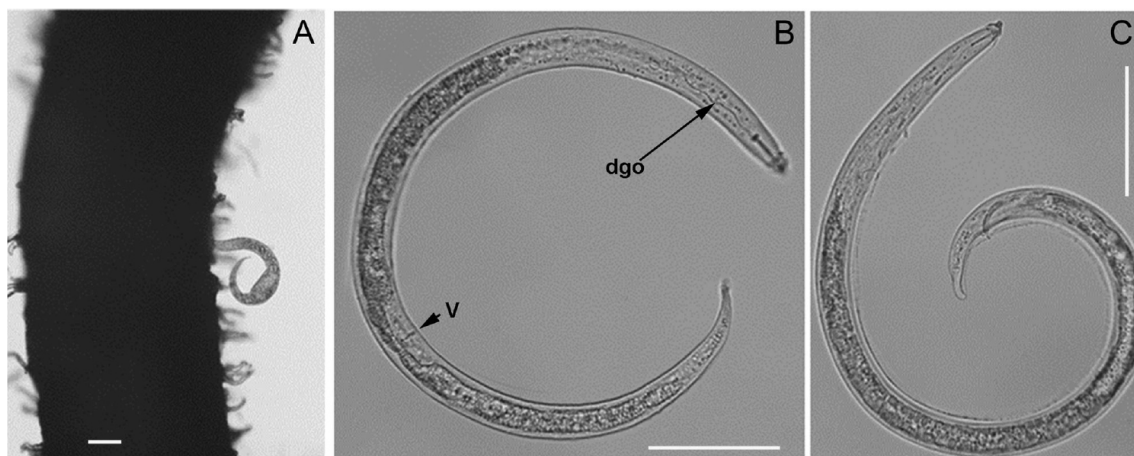


Рисунок 1.1. *Rotylenchulus macrosoma*. А: седентарная самка на корнях; В: мигрирующая самка; С: самец.

В настоящее время для диагностики видов *Rotylenchulus* используются некоторые морфологические признаки самок (Loof & Oostenbrink, 1962; Dasgupta *et al.*, 1968; Germani, 1978; Van den Berg, 1978; Lehman & Inserra, 1990; Robinson *et al.*, 1997; Siddiqi, 2000). Однако высокая внутривидовая изменчивость диагностических признаков делает идентификацию этой группы только по морфологии трудной задачей. В последние десятилетия было проведено несколько исследований для характеристики генов ядерной рибосомальной РНК (рРНК) *R. reniformis* (Agudelo *et al.*, 2005; Subbotin *et al.*, 2006; Tilahun *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Nyaku *et al.*, 2013a, b; Deng *et al.*, 2015). Одним из интересных результатов этих работ было обнаружение высокого уровня изменчивости генов рРНК у особей одного вида и даже на уровне одной особи. Так, было выявлено два различных типа гена 18S рРНК и два типа гена ВТС рРНК. Типы ВТС рРНК гена также различались по длине: ВТС1S (короткий) и ВТС1L (длинный) (Nyaku *et al.*, 2013a, b). Обычная ПЦР и ПЦР в реальном времени с видоспецифическими праймерами были разработаны для диагностики *R. reniformis* с учетом различий между видами с использованием последовательностей генов рРНК и β -тубулина (Showmaker *et al.*, 2011; Sayler *et al.*, 2012). Несколько исследований также выявили другие интересные особенности организации генома у этого вида. Генетический анализ с использованием микросателлитов выявил высокий уровень генетического разнообразия между популяциями *R. reniformis* из нескольких штатов США и префектур Японии (Arias *et al.*, 2009; Leach *et al.*, 2012). Размер генома *R. reniformis*, основанный на цитометрии, оценивался в 190 Мб, что почти в два раза больше, чем геном *Caenorhabditis elegans*, и в 3-4 раза больше, чем геном галловых нематод (*Meloidogyne incognita*). Недавно геном этого вида был полностью секвенирован (Nyaku *et al.*, 2014), и последовательность митохондриальной ДНК (мтДНК) была также депонирована в Генный банк.

Несколькими работами было показано, что 18S, ВТС и D2 и D3 фрагменты 28S рРНК генов являются информативными маркерами для изучения филогенетических взаимоотношений в семействе Hoplolaimidae (Subbotin *et al.*, 2007; Cantalapiedra-Navarrete *et al.*, 2013). Было также показано, что мтДНК, в частности ген, кодирующий субъединицу 1 цитохром-оксидазы (COI), может использоваться как надежный маркер для точной идентификации видов и оценки филогенетических взаимоотношений в семействе Hoplolaimidae (Cantalapiedra-Navarrete *et al.*, 2013; Van den Berg *et al.*, 2013). Хотя *R. reniformis* был интенсивно секвенирован из-за его экономической важности, информация о молекулярных маркерах для других видов *Rotylenchulus* практически отсутствует. Частичные последовательности 18S рРНК гена были приведены для *R. borealis* Loof & Oostenbrink, 1962 (van Megen *et al.*, 2009) и *R. cf. anamictus* Dasgupta, Raski & Sher, 1968 (Powers *et al.*, unpubl.), и D2 и D3 последовательности 28S рРНК были предоставлены для *R. macrodoratus* Dasgupta,

Raski & Sher, 1968 (Subbotin *et al.*, 2006). Таким образом, филогенетические отношения видов *Rotylenchulus* не были должным образом проанализированы и оставались до настоящего времени неизвестными.

1.3. Цистоидные нематоды семейства Heteroderidae

Фитопаразитические нематоды семейства Heteroderidae подразделяются на две основные группы: цистообразующие (тело самки превращается в твердостенный мешок, или цисту) и цистоидные (тело самки не превращается в твердостенную цисту) нематоды. В то время, когда цистообразующие нематоды являются важными вредителями многих сельскохозяйственных культур и изучались многими исследователями, цистоидным нематодам уделялось значительно меньше внимания из-за меньшей экономической значимости этих видов для сельского хозяйства. Исследования видообразования, распределения, диапаузы и формирования питательных клеток у хозяев цистоидных нематод могут внести значительный вклад в наше понимание этих процессов для эволюции цистообразующих нематод. Более того, реконструкция эволюции цистоидных нематод имеет важное значение для разработки естественной и устойчивой классификации всего семейства Heteroderidae (Таблица 1.1) (Turner & Subbotin, 2013; Handoo & Subbotin, 2018).

Таблица 1.1. Классификации семейства Heteroderidae Filipjev & Schuurman Stekhoven, 1941

Кралль и Кралль (1978)	Wouts (1985)	Siddiqi (2000)	Handoo & Subbotin (2018)
Heteroderinae Filipjev & Schuurman Stekhoven, 1941	Heteroderinae Filipjev & Schuurman Stekhoven, 1941	Heteroderinae Filipjev & Schuurman Stekhoven, 1941	Heteroderinae Filipjev & Schuurman Stekhoven, 1941
<i>Bidera</i> Krall & Krall, 1978	<i>Afrodera</i> Wouts, 1985	<i>Afenestrata</i> Baldwin & Bell, 1985	<i>Heterodera</i> Schmidt, 1871
<i>Cactodera</i> Krall & Krall, 1978	<i>Bidera</i> Krall & Krall, 1978	<i>Cactodera</i> Krall & Krall, 1978	
<i>Globodera</i> Skarbolovich, 1959	<i>Heterodera</i> Schmidt, 1871	<i>Dolichodera</i> Mulvey & Ebsary, 1980	
<i>Heterodera</i> Schmidt, 1871	<i>Hylonema</i> Luc, Taylor & Cadet, 1978	<i>Globodera</i> Skarbolovich, 1959	
		<i>Heterodera</i> Schmidt, 1871	
		<i>Punctodera</i> Mulvey & Stone, 1976	
Punctoderinae Krall & Krall, 1978	Punctoderinae Krall & Krall, 1978		Punctoderinae Krall & Krall, 1978
<i>Punctodera</i> Mulvey & Stone, 1976	<i>Cactodera</i> Krall & Krall, 1978		<i>Betulodera</i> Sturhan, 2002
	<i>Dolichodera</i> Mulvey & Ebsary, 1980		<i>Cactodera</i> Krall & Krall, 1978
	<i>Globodera</i> Skarbolovich, 1959		<i>Dolichodera</i> Mulvey & Ebsary, 1980
	<i>Punctodera</i> Mulvey & Stone, 1976		<i>Globodera</i> Skarbolovich, 1959
			<i>Paradolichodera</i> Sturhan, Wouts & Subbotin, 2007
			<i>Punctodera</i> Mulvey & Stone, 1976
			<i>Vittatidera</i> Bernard, Handoo, Powers, Donald & Heinz, 2010
	Meloidoderinae Golden, 1971	Meloidoderinae Golden, 1971	Meloidoderinae Golden, 1971
	Cryphoderinae Cooman, 1978		
	Ataloderinae Wouts, 1973	Ataloderinae Wouts, 1973	Ataloderinae Wouts, 1973
	Verutinae Esser, 1981		
Sarisoderinae Krall & Krall, 1978			
<i>Sarisodera</i> Wouts & Sher, 1971			

Siddiqi (2000) выделил девять родов цистоидных нематод: *Atalodera* Wouts & Sher, 1971, *Bellodera* Wouts, 1985, *Camelodera* Krall, Shagalina & Ivanova, 1988, *Cryphodera* Colbran, 1966, *Ekphymatodera* Baldwin, Bernard & Mundo-Ocampo, 1989, *Hylonema* Luc, Taylor & Cadet, 1978, *Meloidodera* Chitwood, Hannon & Esser, 1956, *Rhizonemella* (Cid del Prado, Lownsbery & Maggenti, 1983) Andrásy, 2007, *Sarisodera* Wouts & Sher, 1971. В настоящее время из 30 валидных видов, отмеченных в этой группе и перечисленных Siddiqi (2000), только три вида цистоидных нематод: *Meloidodera floridensis* Chitwood, Hannon & Esser, 1956, *M. charis* Hooper, 1960 и *M. mexicana* Cid del Prado, 1991 – считаются сельскохозяйственными вредителями. На юго-востоке США *M. floridensis* повреждает сосны, особенно те, которые выращиваются в питомниках (Insera & Vovlas, 1986). *Meloidodera mexicana* паразитирует на культурных растениях, таких как красный перец (*Capsicum annuum*), кукуруза (*Zea mays*), томат (*Solanum lycopersicum*), тыква (*Cucurbita pepo*) и бобы (*Phaseolus vulgaris*) (Cid del Prado Vera, 1991; Fuentes *et al.* 1997). Этот вид вызывал значительное снижение массы побегов, высоты растений, объема корней и урожайности растений красного перца (Fuentes *et al.*, 1997). Вид *Meloidodera charis* был обнаружен паразитирующим на кукурузе и бамии (*Abelmoschus esculentus*) в штатах Небраска и Техас и, по-видимому, является также патогенным (Heald, 1984; Insera & Vovlas, 1986; Baldwin & Mundo-Ocampo, 1991).

Несколько классификаций цистоидных нематод были предложены и используются в настоящее время. Кралль и Кралль (1978) включили цистоидных нематод в подсемейство Sarisoderinae Krall & Krall, 1978 семейства Heteroderidae Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941, и в два семейства Meloidoderidae Golden, 1971 и Ataloderidae Wouts, 1973. Wouts (1985) выделяет четыре подсемейства цистоидных нематод в Heteroderidae: Meloidoderinae Golden, 1971, Cryphoderinae Coomans, 1979, Ataloderinae Wouts, 1973, Verutinae Esser, 1981. Baldwin и Schouest (1990) не различали подсемейства среди цистообразующих и цистоидных нематод, но предложили следующие трибы у Heteroderinae: Heteroderini, Verutini, Meloidoderini, Cryphoderini, Sarisoderini Husain, 1976 и Ataloderini, или четыре группы, основанные на филогенетическом анализе морфологических признаков: i) цистообразующие нематоды; ii) аталодерины с *Atalodera* и *Camelodera*; iii) сарисодерины с *Sarisodera*, *Rhizonemella*, *Bellodera*, *Hylonema*, и *Ekphymatodera*; iv) гетеродериды, включая представителей *Verutus*, *Meloidodera* и *Cryphodera* (Baldwin & Mundo-Ocampo, 1991). Siddiqi (2000) поместил цистоидных нематод в два подсемейства, Meloidoderinae и Ataloderinae, в семействе Heteroderidae, тогда как Verutinae считался принадлежащим семейству Rotylenchulidae Husain & Khan, 1967. Эта классификация была также принята Decraemer и Hunt (2013). Andrásy (2007) также считал, что цистоидные нематоды находятся в двух подсемействах: Meloidoderinae и Ataloderinae, хотя он поместил *Verutus* и *Bilobodera* в Meloidoderinae.

Филогении цистоидных нематод реконструировали несколько авторов с использованием морфологических признаков (Кралль и Кралль, 1978; Coomans, 1979; Ferris, 1979; Wouts, 1985; Baldwin & Schouest, 1990). В последние годы новое понимание филогении этой группы и ее отношений с другими Heteroderidae также было предложено с использованием анализа последовательностей рРНК генов (Subbotin *et al.*, 2001, 2006; Ferris *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2011; Vovlas *et al.*, 2013; Zhuo *et al.*, 2014).

1.4. Цистообразующие нематоды семейства Heteroderidae

Цистообразующие нематоды являются экономически важными фитопаразитами. Некоторые цистообразующие нематоды являются высокопатогенными вредителями для многих сельскохозяйственных культур. В настоящее время цистообразующие нематоды разделяются на два подсемейства: Heteroderinae, Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 и Punctoderinae, Krall & Krall, 1978 с общим количеством валидных видов в 121 и 8 родов: *Heterodera* (85 видов), *Globodera* (14 видов), *Cactodera* (14 видов), *Dolichodera* (1 вид), *Paradolichodera* (1 вид), *Betulodera* (1 вид), *Punctodera* (4 вида) и *Vittatidera* (1 вид) (Siddiqi, 1986; Baldwin & Mundo-Ocampo, 1991; Evans & Rowe, 1998; Wouts & Baldwin, 1998; Subbotin *et al.*, 2010; Turner & Subbotin, 2013; Handoo & Subbotin, 2018) (Рисунок 1.2).

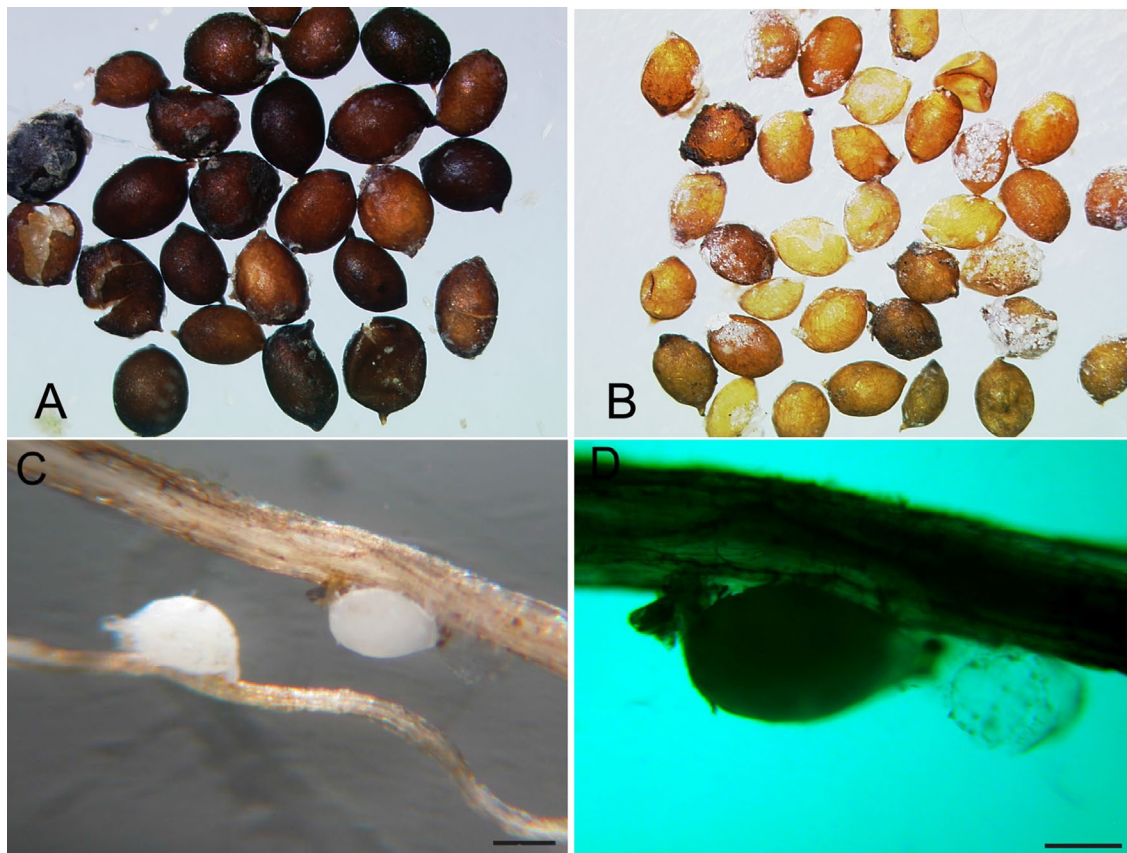


Рисунок 1.2. А: Цисты *Heterodera australis*; В: Цисты *Heterodera filipjevi*; С, D: Белые самки *Cactodera torreyanae*.

Исследования филогенетических взаимоотношений среди нематод не только важны для таксономии, но и позволяют более полно понять биологию нематод как сельскохозяйственных вредителей. Гипотезы филогенетических взаимоотношений для Heteroderidae, основанные на традиционных морфологических признаках, морфологии поверхности сканирующей электронной микроскопии, ультраструктуре кутикулы, трофической специализации, ответе клеточного хозяина и коэволюции с хозяевами, были предложены несколькими авторами (Кралль и Кралль 1970, 1973, 1978; Wouts, 1972, 1973, 1985; Stone, 1975, 1979; Ferris, 1979, 1985, 1998; Krall, 1990; Baldwin, 1986, 1992; Baldwin & Schouest, 1990). Несмотря на использование сходных признаков и подходов, некоторые различия были получены в филогенетических реконструкциях, предложенных этими авторами. Очевидно, что гомоплазическое сходство морфологических и биологических признаков может затруднить филогенетический анализ. Использование молекулярных данных для филогенетического анализа обеспечивает независимый подход, который может пролить новый свет на эволюцию таких признаков и организмов.

Ferris *et al.* (Ferris *et al.*, 1993, 1994, 1995; Ferris, 1998) были первыми, кто продемонстрировал, что нуклеотидные последовательности ВТС1 и ВТС2 рРНК гена могут быть успешно использованы для филогенетического анализа цистообразующих нематод. Эти авторы проанализировали филогенетические связи между ограниченным числом видов из родов *Heterodera*, *Cactodera* и *Globodera*, а также из групп Goettingiana, Avenae и Schachtii. В работе Ferris (1998) сравнила последовательности 15 таксонов, используя МП метод. Положение видов *G. tabacum virginiae*, *H. carotae* и *H. bifenestra* на этом филогенетическом дереве находилось в противоречии с морфологическими данными. Тот же автор указал на две основные проблемы, которые возникли в результате использования последовательностей рРНК генов: (1) некоторые близкородственные виды из группы Schachtii могут иметь схожие последовательности рРНК гена, что не позволяет дифференцировать виды, (2) филогенетически отдаленные таксоны могут иметь слишком различные рРНК гены, что не позволяет создать надежное выравнивание и может приводить к неверным результатам последующего филогенетического анализа.

1.4.1. Цистообразующие нематоды из группы Avenae

На основании анализа морфологических признаков и молекулярных характеристик виды рода *Heterodera* были разделены на девять групп (Subbotin *et al.*, 2010; Handoo & Subbotin, 2018). Группа Avenae является одной из крупнейших и содержит виды, которые паразитируют только на однодольных. Виды этой группы характеризуются лимоновидной

формой цисты, имеющей бифенестральный конус с короткой вульварной щелью и наличием хорошо развитых булл.

В настоящее время группа *Avenae* содержит 12 видов, в частности: *H. latipons* Franklin, 1969 и *H. hordecalis* Andersson, 1975, а также десять видов *H. avenae* комплекса: *H. arenaria* Cooper, 1955, *H. avenae* Wollenweber, 1924, *H. aucklandica* Wouts & Sturhan, 1995, *H. australis* Subbotin, Sturhan, Rumpfenhorst & Moens, 2002, *H. filipjevi* (Madzhidov, 1981) Stelter, 1984, *H. mani* Mathews, 1971, *H. pratensis* Gäbler, Sturhan, Subbotin & Rumpfenhorst, 2000, *H. riparia* (Kazachenko, 1993) Subbotin, Sturhan, Rumpfenhorst & Moens, 2003, *H. sturhani* Subbotin, 2015, *H. ustinovi* Kirjanova, 1969. Пять видов из этой группы считаются вредителями сельского хозяйства и в совокупности называются «злаковыми» или «овсяными» нематодами (Smiley *et al.*, 2017). Четыре вида злаковых нематод: европейская овсяная нематода *H. avenae*, овсяная нематода Филиппева *H. filipjevi*, китайская злаковая нематода *H. sturhani* и австралийская злаковая нематода *H. australis* – являются основными экономически важными вредителями нематод в районах выращивания зерновых культур, тогда как остальные шесть видов комплекса *H. avenae* паразитируют на различных видах трав и не являются вредителями сельского хозяйства. *Heterodera avenae* и *H. filipjevi* были обнаружены во многих странах Европы, Азии и Северной Америки, где они часто встречаются в смешанных популяциях, тогда как *H. australis* имеет ограниченное распространение и до сих пор зарегистрирована была только в Австралии. *Heterodera sturhani* встречается только в Китае. Средиземноморская злаковая нематода *H. latipons* также считается вредителем зерновых культур в Средиземноморском регионе. Ячменная нематода *H. hordecalis* в основном встречается на злаковых, произрастающих на лугах и прибрежных участках, а также обнаружена на полях зерновых (Philis, 1997, 1999; Subbotin *et al.*, 2010; Smiley *et al.*, 2017).

Одной из основных эффективных мер по контролю злаковых нематод является использование устойчивых сортов зерновых культур. Однако различные виды злаковых нематод проявляют различную патогенность и вирулентность, что усложняет борьбу с ними. Надежная видовая диагностика злаковых нематод является обязательной для рекомендации устойчивого использования сортов. Традиционные диагнозы видов цистообразующих нематод, принадлежащих к группе *Avenae*, основаны на морфологических и морфометрических характеристиках цист и личинок второй стадии и требуют тщательного изучения многих экземпляров нематод. Одной из основных проблем в использовании морфологии для идентификации является значительное сходство морфологических признаков и перекрытие значений морфометрических признаков между видами, что делает их идентификацию трудоемким и часто ненадежным процессом. В течение последних нескольких десятилетий внедрение молекулярных методов разрешило эту проблему. Наличие

данных о последовательностях ВТС рРНК гена почти для всех видов группы *Avenae* позволило распознать виды этих нематод (Ferris *et al.*, 1994, 1999; Subbotin *et al.*, 2001, 2003). С использованием биохимического и молекулярного подходов было также описано несколько новых видов. В настоящее время разработаны молекулярно-диагностические инструменты, такие как ПЦР-ПДРФ (Bekal *et al.*, 1997; Subbotin *et al.*, 1999, 2003; Gäbler *et al.*, 2000; Rivoal *et al.*, 2003; Tanha Maafi *et al.*, 2003; Abidou *et al.*, 2005; Ou *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2011), обычная ПЦР (Qi *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2013; Toumi *et al.*, 2013a, b; Yan *et al.*, 2013) и ПЦР в реальном времени (Toumi *et al.*, 2015) с видоспецифическими праймерами, которые позволяют дифференцировать важные для сельского хозяйства виды как от близких видов патогенов, так и от менее экономически важных видов. Во многих из этих технологий ВТС рРНК ген использовался в качестве маркера для специфической диагностики. Несколько молекулярных инструментов вместе с прямым секвенированием гена рРНК ВТС были использованы во многих региональных обследованиях для идентификации видов.

Недавно митохондриальный ген COI был также применен для идентификации нескольких видов злаковых нематод. Было показано, что гены мтДНК гораздо быстрее эволюционировали, чем ген ВТС рРНК. Кроме того, в гене COI также выявлена высокая вариабельность, которая может быть использована в качестве мощного маркера для ДНК-баркодирования. Эффективность последовательностей генов COI для идентификации некоторых видов из группы *Avenae* была показана Toumi *et al.* (2013b) и Subbotin (2015), но в этих исследованиях было проанализировано лишь ограниченное число образцов. Анализ митохондриальной ДНК также оказался мощным инструментом для оценки внутривидовых генетических закономерностей и филогеографии у паразитических нематод. Этот подход не был ранее рассмотрен для представителей группы *Avenae* рода *Heterodera*.

1.4.2. Цистообразующие нематоды рода *Globodera*

В настоящее время род *Globodera* Skarbilovich, 1959 включает 13 валидных видов: *G. agulhasensis* Knoetze, Swart, Wentzel & Tiedt, 2017, *G. artemisiae* (Eroshenko & Kazachenko, 1972) Behrens, 1975, *G. capensis* Knoetze, Swart & Tiedt, 2013, *G. ellingtonae* Handoo, Carta, Skantar & Chitwood, 2012, *G. leptonepia* (Cobb & Taylor, 1953) Skarbilovich, 1959, *G. mali* (Кирьянова и Борисенко, 1975) Behrens, 1975, *G. mexicana* Subbotin, Mundo-Ocampo & Baldwin, 2010, *G. millefolii* (Kirjanova & Krall, 1965) Behrens, 1975, *G. pallida* Stone, 1973, *G. rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Skarbilovich, 1959, *G. sandveldensis* Knoetze, Swart, Wentzel & Tiedt, 2017, *G. tabacum* (Lownsbery & Lownsbery, 1954) Skarbilovich, 1959 и *G. zelandica* Wouts, 1984, а также три ещё не описанных и предположительно новых вида:

один вид из Португалии и два вида из Новой Зеландии (Subbotin *et al.*, 2010, 2011; Handoo & Subbotin, 2018). Вид *G. bravoae* Franco, Cid del Prado & Lamothe-Argumedo, 2000 был описан из растения *Jaltomata procumbens* в Мексике и сведён в синоним с *G. mexicana* в нашей работе Subbotin *et al.* (2019). Из тринадцати видов *Globodera* только три картофельные цистообразующие нематоды (КЦН) *G. rostochiensis*, *G. pallida* и *G. ellingtonae* и табачная цистообразующая нематода (ТЦН) *G. tabacum* важны для сельского хозяйства. Золотистая цистообразующая нематода картофеля *G. rostochiensis* и бледная цистообразующая нематода картофеля *G. pallida* являются серьезными вредителями картофеля во всем мире и объектами строгих карантинных и регуляторных мер во многих странах.

Правильная диагностика цистообразующих нематод имеет важное значение для выбора эффективных мер борьбы с ними. Молекулярная диагностика с использованием генных маркеров ВТС рРНК и мтДНК обеспечивает наиболее эффективное и точное определение видов из этой группы нематод. ПЦР-ВТС-ПДРФ, обычная ПЦР и ПЦР в реальном времени с видоспецифичными праймерами и анализ последовательности генов ВТС рРНК и мтДНК были разработаны и в настоящее время стали полезными инструментами для идентификации видов *Globodera* (Subbotin *et al.*, 2010). Анализ популяций *G. pallida* в Южной Америке выявил высокий уровень их генетического разнообразия (Picard *et al.*, 2007, 2008). Grenier *et al.* (2010) отметили важность разработки новых и доступных методов молекулярной диагностики в связи с новым знанием о более широком генетическом разнообразии в популяциях этих нематод из Южной Америки. Было показано, что популяции КЦН из Южной Америки генетически отличаются от популяций в Европе. Franco и Evans (1978) показали, что большинство южноамериканских популяций способны размножаться на сортах картофеля, содержащих гены устойчивости к европейским популяциям. Появление и распространение таких популяций в Европе, Азии и Северной Америке будет представлять угрозу для использования устойчивых сортов как основного метода борьбы с распространением этих видов и сокращения ущерба, наносимого ими (Hockland *et al.*, 2012).

Получение молекулярных данных для рода *Globodera* оказало значительное влияние на систематику этой группы, изменив наши представления о видовых отношениях и происхождении этих нематод. Значительные генетические различия между популяциями *G. pallida*, распространенных в Европе и других регионах, и популяциями, обнаруженными в Южной Америке, были выявлены с помощью анализа последовательностей ДНК и филогенетического анализа ВТС рРНК гена (Blok *et al.*, 1998; Subbotin *et al.*, 2000, 2011; Madani *et al.*, 2010; Skantar *et al.*, 2011; Hoolahan *et al.*, 2012b), *cytb* гена (Picard *et al.*, 2007, 2008; Plantard *et al.*, 2008; Pylypenko *et al.*, 2008; Madani *et al.*, 2010; Geric Stare *et al.*, 2013) и COI гена (Chitambo *et al.*, 2019). Анализ неполных последовательностей гена *cytb* и

микросателлитов у образцов *G. pallida*, собранных в разных регионах, позволил с высокой степенью достоверности определить происхождение популяций, обитающих в настоящее время в Западной Европе (Picard *et al.*, 2007, 2008; Plantard *et al.*, 2008). Анализ показал, что все эти популяции происходят из одной и достаточно ограниченной местности на крайнем юге Перу, расположенной между северным берегом озера Титикака и городом Куско. Plantard *et al.* (2008) обнаружили, что в Западной Европе зарегистрировано только четыре гаплотипа *cytb*, один из которых также обнаружен в некоторых популяциях этого района на юге Перу. Voucher *et al.* (2013) опубликовали исследование о генетическом разнообразии *G. rostochiensis* с использованием двенадцати новых микросателлитных маркеров и пришли к выводу, что боливийские популяции имеют более высокое генетическое разнообразие, чем популяции, происходящие из Европы и Северной Америки. Это исследование показало, что указанный вид КЦН был завезен в Европу из Перу или Чили. Hockland *et al.* (2012) уже отметили, что данные о популяциях КЦН из Южной Америки остаются неполными и необходимо еще изучить генетический состав вида *G. pallida* как к югу от Перу, так и на север до Эквадора и Колумбии, а для *G. rostochiensis* необходимо провести детальные исследования, чтобы выявить филогеографическую картину этого вида в таких странах, как Боливия, Чили и Аргентина.

1.5. Галловые нематоды семейства *Meloidogynidae*

Корневые галловые нематоды рода *Meloidogyne* являются высокоадаптированными и облигатными паразитами растений. Их глобальное распространение, широкий спектр хозяев и способность паразитировать почти на всех видах высших растений дают им статус наиболее экономически важной группы среди фитопаразитических нематод. В настоящее время в роде насчитывается около ста видов, большинство из которых распространены в достаточно теплых и тропических регионах (Subbotin *et al.*, 2021).

Tandingan De Ley *et al.* (2002) были первыми, кто использовал последовательности 18S рРНК гена для реконструкции филогении мелойдогин. Этот анализ, который включал только 12 видов *Meloidogyne* и четыре внегрупповых таксона, выявил три клады (I, II и III) в пределах рода. Tigano *et al.* (2005), Holterman *et al.* (2009), Kiewnick *et al.* (2014) и Janssen *et al.* (2017), использующие тот же ген, но большее количество видов, подтвердили наличие этих трех основных клад в пределах рода *Meloidogyne*. Несколько других генов также были успешно использованы для реконструкции филогении рода *Meloidogyne*: ВТС рРНК ген (De Ley *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 2003, 2009; Landa *et al.*, 2008; McClure *et al.*, 2012; Trisciuzzi *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2017; Archidona-Yuste *et al.*, 2018; Trinh *et al.*, 2019),

D2-D3 28S рРНК ген (Castillo *et al.*, 2003, 2009; Tenente *et al.*, 2004; Landa *et al.*, 2008; McClure *et al.*, 2012; Kiewnick *et al.*, 2014; Trisciuzzi *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2017; Archidona-Yuste *et al.*, 2018; Trinh *et al.*, 2019); ген РНК-полимеразы II (rpb1) (Lunt, 2008; Rybarczek-Mydlowska *et al.*, 2014), область между генами COII и 16S рРНК мтДНК (McClure *et al.*, 2012; Humphreys-Pereira *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2017; Archidona-Yuste *et al.*, 2018; Trinh *et al.*, 2019); hsp90 ген (Nischwitz *et al.*, 2013), COI ген (Kiewnick *et al.*, 2014; Garcia *et al.*, 2015; Janssen *et al.*, 2017; Powers *et al.*, 2018; Archidona-Yuste *et al.*, 2018; Trinh *et al.*, 2019) и MC рРНК ген (Onkendi & Moleleki, 2013), COII ген (Kiewnick *et al.*, 2014). Huggall *et al.* (1999) показали, что ВТС рРНК ген для видов из тропической группы может содержать высокополиморфные копии, которые могут усложнять реконструкцию филогении и приводить к ложным выводам. Несколько авторов реконструировали филогению галловых нематод на основе нескольких генов, используя два подхода: i) консенсус деревьев, полученных из разных генов – супердерево (Adams *et al.*, 2009), ii) дерево, полученное из комбинированного выравнивания нескольких генов – суперматрикс (Brito *et al.*, 2015; Janssen *et al.*, 2017). Хотя такие исследования привели к лучшему выявлению взаимоотношений между видами, однако только ограниченное количество видов включалось в такие исследования, поэтому общая филогения рода оставалась плохо изученной.

1.6. Сферонематиды

Седентарные нематоды семейства Sphaeronematidae включают в себя подсемейство Sphaeronematinae с тремя родами: *Sphaeronema* (7 видов), *Goodeyella* (1 вид) и *Tumiota* (1 вид) и подсемейство Meloidoderitinae с одним родом *Meloidoderita*. Род *Meloidoderita* включает три валидных вида: *Meloidoderita kirjanovae* Poghossian, 1966, *M. polygoni* Golden & Handoo, 1984 и *M. safrica* Van den Berg & Spaull, 1982, которые отличаются друг от друга рядом морфометрических признаков. Одной из особенностей этого рода является то, что самки *Meloidoderita* удерживают яйца в гипертрофированной матке, которая становится защитным и цистоидным мешком после смерти нематоды. Филогенетический анализ этого семейства не проводился до нашего исследования.

1.7. Цитрусовая нематода и другие тиленхилусы

До проведения настоящих исследований род *Tylenchulus* Cobb, 1913 содержал четыре вида: *T. semipenetrans* Cobb, 1913, *T. furcus* Van den Berg & Spaull, 1982, *T. graminis* Inserra, Vovlas, O'Bannon & Esser, 1988a и *T. palustris* Inserra, Vovlas, O'Bannon & Esser, 1988a. В

результате наших исследований нами был описан пятый вид этого рода – *T. musicola* (Рисунок 1.3). Наиболее известным видом этого рода является цитрусовая нематода *T. semipenetrans*, которая распространена по всему миру и является одним из наиболее распространенных и важных паразитов цитрусовых. *Tylenchulus semipenetrans* паразитирует на большинстве видов цитрусовых, *Poncirus trifoliata* и на других представителях семейства Rutaceae. Несколько растений, не принадлежащих к семейству Rutaceae, таких как виноград, оливковое дерево и хурма, также считаются хорошими хозяевами для этого вида. В настоящее время на основе тестирования специфичности к растениям-хозяевам выделяют несколько биотипов у цитрусовой нематоды (Inserra *et al.*, 1980). В течение многих лет *T. semipenetrans* считался единственным видом этого рода, способным паразитировать на широком круге растений-хозяев (Chawla *et al.*, 1980; Inserra *et al.*, 1988a). Нематологические обследования и подробный морфологический анализ популяций *Tylenchulus* из разных хозяев выявил присутствие других видов (Рисунок 1.4). Вид *Tylenchulus furcus* был описан в Южной Африке из корней сахарного тростника и растений рода *Saccharum* (Van den Berg & Spaul, 1982). Формы цитрусовой нематоды, известные как травяная и кустарниковая, были описаны во Флориде, США как виды *T. graminis* и *T. palustris* (Inserra *et al.*, 1988a, b). Вид *T. palustris* был обнаружен и описан из корней персика в Алабаме, Арканзасе, Джорджии и Вирджинии, а также из ризосферы некоторых растений, в том числе *Borrchia arborescens* и *B. frutescens*, произрастающих вдоль береговой линии Флориды и Бермудских островов (Dow *et al.*, 1990; Inserra *et al.*, 1990; Eisenback & Reaver, 2007).

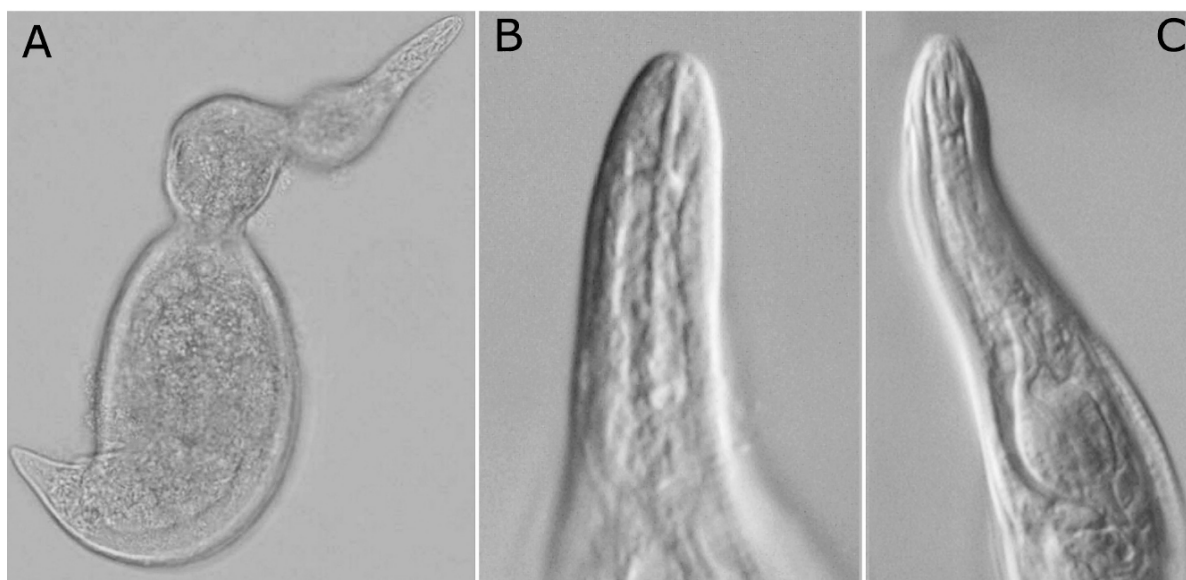


Рисунок 1.3. Самки *Tylenchulus musicola*.

Современная диагностика видов *Tylenchulus* основана на анализе некоторых морфологических признаков самцов, самок и личинок второй стадии (Inserra *et al.*, 1988a, c, 1994) и требует от исследователя специальных таксономических знаний. Личинки второй

стадии *Tylenchulus* могут быть ошибочно идентифицированы как личинки близкородственных родов *Sphaeronema*, *Trophonema* и *Trophotylenchulus* или даже могут быть перепутаны с личинками галловых нематод *Meloidogyne* spp. Процедура идентификации также может быть осложнена присутствием нескольких видов *Tylenchulus* в образце. Например, во Флориде *T. semipenetrans* встречается в почве вместе с несколькими другими видами рода *Tylenchulus* (Inserra *et al.*, 1994).

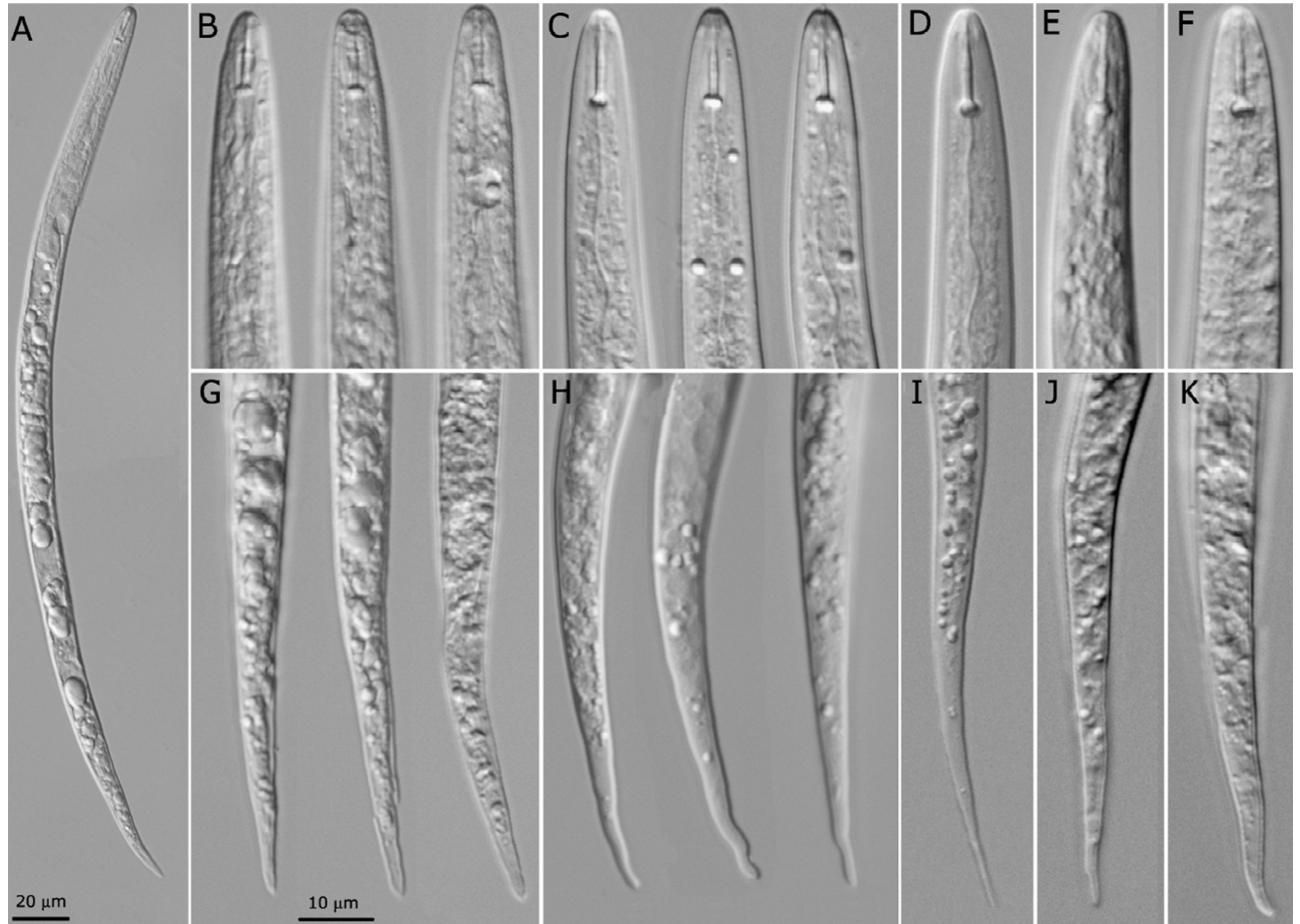


Рисунок 1.4. Личинки второй стадии. А, В, G: *T. musicola*; С, H: *T. semipenetrans*; D, I: *T. furcus*; E, J: *T. graminis*; F, K: *T. palustris*.

Wang *et al.* (2004) и Park *et al.* (2009) разработали диагностический протокол ПЦР-ВТС-ПДРФ для *T. semipenetrans*. Liu *et al.* (2011) были первыми, кто предложил видоспецифичные наборы праймеров для обнаружения этой нематоды. Однако эти праймеры были протестированы только с несколькими популяциями этих нематод. Разработка быстрых, чувствительных и надежных методов определения *T. semipenetrans* и других видов *Tylenchulus* является важной и актуальной задачей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Популяции и виды

Виды и популяции, использованные в этом исследовании, приведены в приложении и указаны в опубликованных статьях. Нематод извлекали из образцов почвы с помощью стандартных методов флотации и просеивания. Определение границ видов и изучаемых популяций осуществлялось путем интеграции результатов морфологических и морфометрических исследований, филогенетического анализа и анализа последовательностей ДНК, а также анализа специфичности нематод к растениям-хозяевам и географического распределения исследуемых образцов (Subbotin *et al.*, 2010).

2.2. Выделение ДНК, ПЦР и секвенирование

ДНК экстрагировали из личинок, эмбриональных яиц или взрослых особей. Из каждого образца использовали один или несколько экземпляров. Разрезанных нематод в водной суспензии переносили в пробирку Эппендорфа 0,2 мл, затем в каждую пробирку добавляли 3 мкл протеиназы К (600 мкг/мл) (Промега) и 2 мкл 10 × PCR-буфера (Taq PCR Core Kit, Qiagen). Пробирки инкубировали при 65°C (1 час) и 95°C (15 минут). После инкубации пробирки центрифугировали и выдерживали при -20°C, сохраняя до использования.

Несколько фрагментов митохондриальных и рибосомальных РНК генов были амплифицированы и секвенированы. Для исследования рРНК генов 2 мкл экстрагированной ДНК переносили в 0,2 мл пробирке Эппендорфа, содержащей 2,5 мкл 10 × ПЦР-буфера, 5 мкл Q раствора, 0,5 мкл dNTPs (Taq PCR Core Kit, Qiagen), 0,15 мкл каждого праймера (1,0 мкг мкл⁻¹) (синтезированного Integrated DNA Technologies), 0,1 мкл Taq-полимеразы и 12,6 мкл дистиллированной воды. Данные о праймерах приведены в Приложении (Таблица 1, Приложение), а также в наших публикациях. Протокол амплификации ПЦР состоял из 4 мин при 94°C, 35 циклов от 1 до 94°C, 1 мин при 30°C и 2 мин при 72°C с последующей заключительной стадией 10 мин при 72°C. Для амплификации митохондриальных генов 3 мкл экстрагированной ДНК переносили в 0,2 мл пробирку Эппендорфа, содержащую 10 мкл DreamTaq Green PCR Master Mix (2 ×) (Thermo Fisher Scientific), 10 мкл воды и 0,15 мкл каждого праймера (1,0 мкг мкл⁻¹). Профиль амплификации ПЦР для митохондриальных генов состоял из 4 мин при 94°C с последующими 40 циклами 1 мин при 94°C, 1 мин при 45°C и 1 мин 30 с при 72°C с окончательным удлинением при 72°C в течение 10 мин. Два мкл продукта ПЦР проводили на 1%-ном забуференном ТАЕ агарозном геле (100 В, 40 мин).

Продукты ПЦР очищали с помощью набора для очистки QIAquick PCR (Qiagen) и затем секвенировали. Некоторые продукты ПЦР клонировали в вектор pGEM-T и трансформировали в компетентные клетки JM109 (Промега). Секвенирование было выполнено Quintara Biosciences (Сан-Франциско, США) или другими компаниями. Новые последовательности были депонированы в Генный банк, номера депонирования указаны в таблицах в Приложении и на представленных филогенетических деревьях.

2.3. ПЦР-ПДФ-рРНК

Три-пять мкл очищенного продукта, полученного после амплификации фрагмента, обрабатывали одним из следующих рестрикционных ферментов: *AluI*, *AvaI*, *BamHI*, *BglI*, *BsiZI*, *BsuRI*, *Bsh1236I*, *Bsp143I*, *CfoI*, *DdeI*, *EcoRI*, *HpaII*, *HindIII*, *HinfI*, *KpnI*, *MvaI*, *PstI*, *PvuII*, *RsaI*, *Sall*, *SduI*, *SfuI*, *SspI*, *ScrFI*, *TaqI*, *Tru9I*, и *XbaI* в буфере, предусмотренном производителем. Расщепленную ДНК загружали в 1% ТАЕ-забуференном агарозном геле, окрашивали бромидом этидия, визуализировали на ультрафиолетовом трансиллюминаторе и фотографировали. Точная длина каждого рестрикционного фрагмента из продуктов ПЦР была получена путем виртуального расщепления последовательности с использованием программы WebCutter 2.0 (www.firstmarket.com/cutter/cut2.html).

2.4. ПЦР со специфичными праймерами

Видоспецифичные праймеры были сконструированы с использованием выравнивания последовательностей области D2-D3 28S рРНК или ВТС рРНК генов. Несколько видов были использованы для проверки специфичности ПЦР. Смесь для ПЦР получали, как описано Tanha Maafi *et al.* (2003). Профиль амплификации ПЦР состоял из 4 мин при 94°C; 30 циклов: 1 мин при 94°C, 1 мин при 55°C и 1,5 мин при 72°C, после чего следует заключительный этап 10 мин при 72°C. Два мкл продуктов ПЦР обрабатывали в 1,4% ТАЕ-забуференном агарозном геле, окрашивали и фотографировали.

2.5. Филогенетический и филогеографический анализ

Выравнивания последовательностями генов были получены с использованием ClustalX 1.83 (Chenna *et al.*, 2003) с параметрами по умолчанию или с изменёнными параметрами. Новые последовательности были выровнены с соответствующими опубликованными последовательностями генов. Попарное расхождение между таксонами рассчитывалось как

абсолютное значение расстояния и процент среднего расстояния с корректировкой на отсутствие данных, с использованием программы RAUP * 4b10 (Swofford, 2003).

Последовательности генов были проанализированы методами максимальной вероятности (МЛ) и максимальной экономии (МП) с использованием RAUP * и Байесовским анализом (БВ) с использованием программы MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Лучшие модели эволюции ДНК были выбраны с помощью программы jModeltest.0.1.1 (Posada, 2008) или jModelTest2 (Darriba *et al.*, 2012). Значения поддержки бутстрепа (БС) для деревьев МЛ и МП вычислялись эвристическим поиском из 100 и 1000 выборок соответственно. Анализ БВ для каждого гена инициировался со случайным стартовым деревом и выполнялся с четырьмя цепями для $1,0 \times 10^6$ или $3,0 \times 10^6$ поколений. Цепи Маркова отбирались с интервалом в 100 поколений. Для каждого анализа выполнялись два прогона. После отбраковки образцов сжигания и оценки конвергенции оставшиеся образцы были сохранены для дальнейшего анализа. Топологии полученных деревьев использовались для генерации одного консенсусного дерева, полученного методом 50% большинства. Апостериорные вероятности (АП) приводятся для соответствующих клад на филогенетических деревьях. Деревья были визуализированы с помощью программы TreeView 1.6.6 (Page, 1996) и отредактированы с помощью Adobe Illustrator v.10.

Альтернативные топологии были протестированы с помощью МЛ-тестов Шимодайра-Хасегава (Shimodaira-Hasegawa, SH) и Кишино-Хасегава (Kishino-Hasegawa, KH), используя RAUP* с загрузкой установки RELI для 1000 повторов.

Идентичные последовательности были удалены с использованием DNACollapser (<http://users-birc.au.dk/biopv/php/faboh/dnacollapser.php>) (Villesen, 2007). В некоторых исследованиях плохо выровненные и сильно дивергированные области были удалены, используя онлайн-версию программы Gblocks 0.91b60 (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html) (Castresana, 2000) или редактировались и удалялись вручную с помощью программы GenDoc (Nicholas *et al.*, 1997).

Выравнивания для последовательностей генов ВТС и СОI для некоторых нематодных групп использовали для построения филогенетической сети с помощью метода статистической парсимонии (СП), реализованной в программе POPART (<http://popart.otago.ac.nz>) (Bandelt *et al.*, 1999).

Тестирование для глобальных молекулярных часов с выравниванием последовательности генов СОI выполнялось с помощью RAUP*. Использовалась НКУ85 модель замены нуклеотидов (Hasegawa *et al.*, 1985) с вариацией скорости участка с гамма-распределением.

Время дивергенции было рассчитано с помощью программы BEAST 2.4.5 (Bouckaert *et al.*, 2014) с использованием выравнивания последовательности COI и моделью Юле с частотой генома замещения митохондрий, равной $7,2 \times 10^{-8}$ на сайт за поколение, как это было рассчитано Howe *et al.* (2010) для *Caenorhabditis briggsae*. Жизненный цикл с одним поколением в год рассматривался для всех видов группы Avenae и *Globodera* (Subbotin *et al.*, 2010). Анализ проводился для 1×10^8 поколений и отбирался каждые 1000 поколений. Сходимость контролировалась с помощью Tracer 1.6. TreeAnnotator (Bouckaert *et al.*, 2014) и используется для суммирования набора деревьев после отжига (с первыми 20% образцов, отброшенными как сжигание) и их параметров для получения хронограммы максимальной вероятности кладовой (MCC), которая показала средние оценки времени дивергенции с 95%-ными верхними интервалами плотности.

Статистический дисперсионно-викариантный анализ (S-DIVA), реализованный в RASP 4.0 (Yu *et al.*, 2010, 2015), использовался для оценки альтернативных диапазонов анцестральных областей на каждом узле деревьев.

Распределение растений-хозяев цистообразующих нематод на филогенетических деревьях производили с помощью программы MacClade 3.07 (Maddison & Maddison, 1993).

2.6. Реконструкция вторичной структуры для молекулы рРНК

Версия 3 программы Mfold (Zuker, 2003) (<http://mfold.Rna.albany.edu/?q=mfold/rna-folding-form>) была использована при прогнозировании вторичных структур для областей расширения рРНК с использованием подхода минимизации энергии и ковариационного анализа (Ma *et al.*, 2008). Полученные структуры были визуализированы с использованием программы VARNA (Darty *et al.*, 2010) и нарисованы с помощью Adobe Illustrator CS6 и Adobe Photoshop CS6. Консенсусная последовательность была получена с помощью Consensus Maker (http://www.hiv.lanl.gov/cgi-bin/CONSENSUS_TOOL/consensus.cgi). Коды названий спиралей модели рРНК вторичной структуры были даны в соответствии с Subbotin *et al.* (2007). Статистика нуклеотидного состава в стеблях и петлях, вычисление консенсусной последовательности, кодирование последовательностей и преобразование отдельных последовательностей в формат РНК структуры были выполнены с использованием нашей новой программы – RNAtat (<http://www.ssubbotin.com/software.html>).

Подробное описание методов молекулярной диагностики и программного обеспечения для проведения филогенетических исследований приводится в наших статьях и публикациях (Субботин 2006; Perry *et al.*, 2007; Hallmann & Subbotin, 2018; Subbotin, 2021 a,b).

ГЛАВА 3. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕМАТОД ОТРЯДА TYLENCHIDA И ПРОИСХОЖДЕНИЕ СЕДЕНТАРНОГО ПАРАЗИТИЗМА

В этой главе для изложения результатов используется классификация, согласующаяся с таксономическими категориями Tylenchida, предложенными Siddiqi (2000), включая Aphelenchida в качестве отдельного отряда. Несколько подходов было использовано для выявления филогенетических взаимоотношений между тиленхидами. Первый подход включал серию филогенетических анализов D2-D3 фрагмента 28S рРНК гена для последовательностей 77 видов Tylenchida, а также нескольких видов Aphelenchida Siddiqi, 1980, выбранных среди нескольких возможных вариантов, как наиболее вероятные таксоны для внешней группы. Виды, включенные в это исследование, были отобраны исходя из широты известного таксономического и морфологического разнообразия тиленхид. Этот анализ был основан на методах максимальной экономии, или парсимонии (МП), максимального правдоподобия (МЛ) и Баесовой вероятности (БВ). Девять выравниваний, полученных при различных параметрах, и одно консервативное выравнивание были проанализированы в нашем исследовании (Таблица 3.1., Рисунки 3.1 и 3.2). Подробно результаты этого исследования опубликованы в работе: Subbotin *et al.* (2006). Второй анализ включал более 100 таксонов и все основные группы седентарных нематод и был произведен методом БВ (Рисунок 3.3). Более 300 видов тиленхид были впервые секвенированы нами в результате нашей многолетней работы. Основными задачами данного исследования являлись: i) оценка филогенетических отношений в пределах Tylenchida на уровне подотрядов, а также между надсемействами и семействами; ii) проверка соответствия существующих морфологически и биологически обоснованных классификаций тиленхид с филогениями, реконструируемых на основе молекулярных данных; iii) выявление происхождения и взаимоотношения между седентарными нематодами.

3.1. Филогенетический анализ

D2-D3 фрагмент 28S рРНК гена, использованный в настоящем анализе, варьировал у тиленхид от 577 до 854 п.н. Для фрагментов D2-D3 самая длинная последовательность длиной 749 п.н. была выявлена для энтомопаразитической нематоды *Wachekitylenchus boviени*, а самая короткая – 501 п.н. – была у седентарной нематоды *Trophotylenchulus arenarius* (= *Trophonema arenarium*). Широкий диапазон G + C содержания наблюдался среди изученных тиленхид, и проценты содержания нуклеотид значительно различались по таксонам. Максимальное содержание T + A было обнаружено у двух видов из надсемейства Iotonchioidea (Таблица 3.2).

Критерий хи-квадрат стационарной базовой частоты показал значительную вариацию среди таксонов тиленхид ($\chi^2 = 877,70$, d.f. = 255, $P < 0,0001$). Поскольку существенное смещение нуклеотидного состава может потенциально влиять на филогенетические результаты, мы проанализировали набор данных D2 и D3 для автоматического выравнивания 5 и консервативного выравнивания с помощью LogDet метода, реализованного в RAUP*, чтобы оценить влияние смещения нуклеотидного состава на полученную филогению. Топология дерева, полученная в результате LogDet анализа, в значительной степени согласуется с топологией Байесовского метода (не показано), что указывает на то, что данный нуклеотидный состав не оказал значительного влияния на результаты по анализу филогении.

3.2. Консервативное выравнивание

Консервативное выравнивание было создано вручную из автоматического выравнивания номера 5 после удаления 268 положений нуклеотидов. Филогенетический сигнал в этих данных был значимым ($P < 0,01$) и был определен на основании значения статистики $g1$ (-0,308) (Таблица 3.1). Консенсусное дерево, полученное в результате БВ, указывало на деление Tylenchida на семь основных клад (Рисунок 3.1). Клада I (АП = 99%) включала двух представителей надсемейства Iotonchioidea, а клада II (АП = 99%) включала три вида семейства Allantonematidae и *Parasitylenchus* sp. Эти клады занимали базальное положение внутри тиленхид. Клада III (АП = 99%) включала большинство видов семейства Anguinidae (исключая *Ditylenchus destructor*) и неопределенный вид, найденный у насекомого. Отношения *Eutylenchus excetorius* или *D. destructor* с другими Anguinidae не были выявлены. Представители семейств Tylenchidae (клада V) и Psilenchidae с подсемейством Merlininae (клада IV) образуют хорошо поддерживаемую кладу (АП = 96%). Клада VI (АП = 99%) включала все виды подотряда Criconematina с ранним расхождением седентарной нематоды *Sphaeronema alni*. Клада VI (АП = 96%) состояла из всех Hoplolaimina, кроме Psilenchidae и подсемейства Merliniinae. Монофилия таксонов Heteroderidae, Hoplolaiminae, Pratylenchinae, Meloidogynidae была хорошо поддержана (АП > 90%). Взаимоотношения в пределах видов Rotylenchoidinae оставались невыявленными. *Radopholus* был объединен с представителями родов *Meloidodera* и *Cryphodera* (АП = 84%). *Meloidogyne*, *Pratylenchus* и *Hirschmanniella* были сгруппированы в хорошо поддерживаемую кладу (АП = 99%). Их родственные отношения с Telotylenchinae + Macrotriphurinae были ярко выражены (АП = 97%). Группировка клад VI и VII получила надежную поддержку (АП = 96%). МП анализ позволил получить 63 дерева с высокой поддержкой для клад I (БС = 100%), IV (БС = 92%), VI (БС = 99%) и умеренной поддержкой для клады VII (БС = 75%). Отношения между основными

кладами на МП дереве не были хорошо разрешены по сравнению с теми, которые наблюдались на БВ дереве.

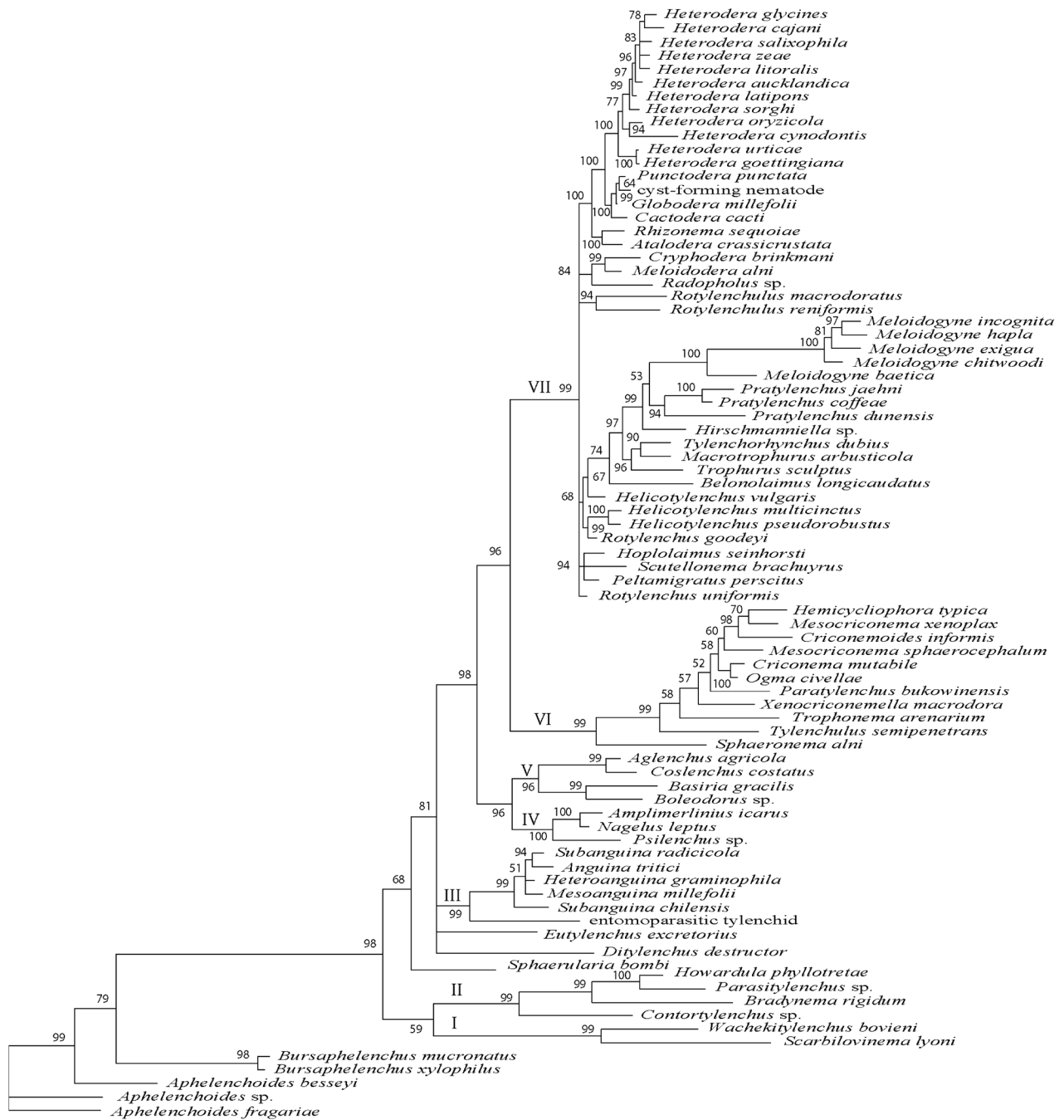


Рисунок 3.1. Консенсусное дерево, полученное по правилу большинства в 50% в результате Байесовского анализа с использованием модели GTR + I + G для консервативного выравнивания с 82 ДНК-последовательностями D2-D3 участка 28S рРНК гена нематод отрядов Tylenchida и Aphelenchida. Апостериорная вероятность дана в процентах для каждой клады.

3.3. Автоматические выравнивания

Статистика g1 показала значительный филогенетический сигнал во всех выравниваниях (Таблица 3.1). Общая тенденция к формированию семи основных клад у

Таблица 3.1 – Параметры выравниваний и статистика деревьев, полученных МП методом из D2-D3 фрагмента для Tylenchida и Aphelenchida

Н	ГО	ГЛ	Д	КИ	КП	ТЛ	ТН	CI	HI	RI	RC	g1
	КВ		629	415	167	4917	63	0.2077	0.7923	0.5555	0.1202	-0.308
1	10	3	936	514	340	5979	94	0.2138	0.7862	0.5504	0.1248	-0.379
2	10	6.66	898	515	295	6113	1	0.2248	0.7752	0.5444	0.1224	-0.369
3	10	10	814	525	226	6196	6	0.2235	0.7865	0.5463	0.1121	-0.372
4	15	3	910	506	301	6213	12	0.2220	0.7780	0.5487	0.1218	-0.374
5	15	6.66	897	509	293	6258	45	0.2044	0.7956	0.5464	0.1193	-0.372
6	15	10	807	512	226	6299	41	0.2183	0.7817	0.5494	0.1199	-0.366
7	20	3	896	503	291	6322	24	0.2178	0.7822	0.5486	0.1195	-0.377
8	20	6.66	897	508	295	6371	6	0.2152	0.7848	0.5472	0.1178	-0.370
9	20	10	798	517	212	6401	8	0.2176	0.7824	0.5477	0.1192	-0.395

Примечание. Н – номер выравнивания, ГО – штраф для открытия разрыва, КВ – консервативное выравнивание, ГЛ – штраф для длины разрыва, Д – длина выравнивания, КИ – количество информативных признаков, КП – количество постоянных признаков, ТЛ – длина дерева, ТН – количество деревьев.

Таблица 3.2 – Соотношение нуклеотидов и длина D2-D3 фрагмента для тиленхид и внешней группы

Таксоны	D2 и D3 фрагмент				
	A%	C%	G%	T%	Длина
Hoplolaimina	17.2 (14.5-25.6)	23.5 (16.3-28.0)	34.1 (23.4-37.2)	25.0 (21.5-27.6)	553 (533-561)
Criconematina	16.7 (15.5-19.1)	25.3 (23.7-26.5)	33.5 (31.3-36.9)	24.4 (22.9-26.7)	537 (501-548)
Tylenchidae	18.0 (15.1-21.1)	23.2 (20.9-26.4)	33.2 (30.4-36.2)	25.5 (22.2-27.7)	546 (545-549)
Anguinidae (without <i>D. destructor</i>)	21.3 (21.0-22.8)	20.9 (19.3-22.1)	31.0 (30.5-31.5)	26.7 (25.6-27.6)	555 (553-557)
Allantonematidae	18.1 (15.5-20.7)	21.4 (19.0-22.5)	32.6 (29.8-36.1)	27.8 (25.7-30.2)	582 (573-593)
Iotonchioidea (<i>Wachekitylenchus</i> + <i>Skarbilovinema</i>)	30.1, 33.7	13.0, 13.2	19.4, 18.1	37.2, 34.9	749, 712
Tylenchida	18.2 (14.5-33.7)	22.9 (13.0-28.0)	32.9 (18.1-36.9)	25.8 (19.2-37.2)	557 (501-749)
Aphelenchida (внешняя группа)	16.9 (14.5-20.6)	21.7 (18.8-22.2)	33.9 (31.2-35.9)	27.3 (25.0-29.3)	551 (534-557)

тиленхид наблюдалась в филогенетических анализах для девяти автоматических выравниваний, хотя и с разными уровнями статистической поддержки. Апостериорные вероятности и значения бутстрепа для деревьев с использованием БВ и МП анализов для основных клад, полученных после анализа девяти автоматических выравниваний, приведены в Таблице 3.1 Приложения. Топология деревьев зависела от параметров выравнивания и применяемого филогенетического метода. На БВ деревьях, построенных на основе выравниваний, полученных с наименьшими параметрами штрафов за разрыв и длину разрыва, Allantonematidae и Iotonchioidea образуют отдельную группу с умеренным или высоким АП; на других БВ деревьях они не были родственными таксонами, и Iotonchioidea (без *Parasitylenchus* sp.) помещалась в базальное положение внутри тиленхид. Клада III, в том числе фитопаразитические Anguinidae и неизвестные энтомопаразитические тиленхиды, а



Рисунок 3.2. Консенсусное дерево, полученное по правилу большинства в результате Байесовского анализа с использованием модели GTR + I + G для выравнивания с 82 ДНК-последовательностями D2-D3 участка 28S-рРНК гена нематод отрядов Tylenchida и Aphelenchida, полученного при параметрах программы ClustalX по умолчанию. Апостериорная вероятность дана в процентах для каждой клады.

также *Eutylenchus excretorius* и *Sphaerularia bombi* появились на МП и БВ деревьях, соответственно в трех и четырех выравниваниях. Родственные отношения Anguininae и неопределенной энтомопаразитической нематоды были очевидны из всех анализов, но с различными уровнями поддержки. Клада IV (Merliniinae, Psilenchidae и Tylenchidae) поддерживалась от умеренной до высокой (АП = 89-99%) степени на БВ деревьях, полученных от пяти автоматических выравниваний, и слабо поддерживалась на МП деревьях



Рисунок 3.3. Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное с использованием модели GTR + I + G для выравнивания D2-D3 участка 28S-rРНК гена нематод отрядов Tylenchida, содержащих основные группы седентарных нематод. Апостериорная вероятность дана в процентах для каждой клады. Группы седентарных нематод отмечены серым цветом. Возможное происхождение седентарного паразитизма у определенных клад тиленхид отмечено стрелками.

из двух выравниваний. На других деревьях эти взаимосвязи не наблюдались. Родственные отношения между Tylenchinae и Voleodorinae (клада V) поддерживались на БВ деревьях по всем выравниваниям, тогда как они были обнаружены только на МП деревьях из трех выравниваний с низкой статистической поддержкой. Сестринские отношения между Merliniinae и Psilenchidae (клада IV) были высоко поддержаны среди большинства деревьев. Клада VI, включавшая всех представителей подотряда Criconematina, была умеренно или сильно поддержана МП и БВ анализами. Базальная позиция *Sphaeronema alni* ко всем остальным Criconematina была очевидна у всех деревьев. Клада VII, включавшая нематод из подотряда Hoplolaimina (за исключением Psilenchidae и Merliniinae), имела слабую, умеренную или сильную поддержку, в зависимости от параметров выравнивания и методов построения деревьев (Таблица 2, Приложение). Молекулярные данные подтвердили монофилию подсемейств Heteroderinae и Punctoderinae sensu Wouts (1985) и монофилию гетеродер, а также монофилию *Meloidogyne*. Родственные связи между родами *Cryphodera* и *Meloidodera*, а также между *Rhizonemella* и *Atalodera* были поддержаны с высокими значениями (Таблица 2, Приложение). На большинстве деревьев *Meloidogyne*, *Pratylenchus* и *Hirschmanniella* были сгруппированы вместе, однако взаимосвязи между этими родами не были хорошо разрешены в большинстве наборов данных. *Radopholus* обычно был сгруппирован с Hoplolaimidae или Heteroderidae, хотя во многих случаях их связь с другими родами оставалась неопределенной. МП анализ дал более низкую поддержку и не позволил разрешить отношения между основными группами тиленхид.

3.4. Проверка альтернативных гипотез

В этом исследовании мы использовали консервативное и автоматическое выравнивания и программу RAUP, чтобы сгенерировать несколько деревьев, топологии которых поддерживают некоторые традиционные взгляды на взаимоотношения тиленхид. Эти деревья были использованы затем для МЛ тестирования. Тесты методом максимального правдоподобия для обоих наборов данных категорически отвергли ряд традиционных гипотез: i) монофилия надсемейства Dolichodoroidea sensu Siddiqi (2000); ii) размещение *Radopholus* в семействе Pratylenchidae; iii) родственные связи между цистообразующими (Heteroderidae) и галловыми нематодами (Meloidogynidae); iv) *Eutylenchus* как родственный таксон *Macrotrophurus* (Таблица 3.3). Более того, МЛ тест на дереве, полученном из консервативного выравниванием, отверг гипотезу родственных отношений между *Psilenchus* и *Basiria*. Результаты теста КХ для других четырех гипотез, выбранных априори, также были значительными, в то время как тест ШХ не отвергал их (Таблица 3.3). Тест КХ отклонил:

v) размещение *Eutylenchus* в семействе Tylenchidae; vi) родственные отношения *Psilenchus* и *Basiria*; vii) *Ditylenchus destructor* в качестве сестринского таксона для Anguininae; viii) базальное положение *Psilenchus* в пределах тиленхид. Дерево, ограничивающее монофилию Hexatylinea sensu Siddiqi (2000), не может быть отклонено тестированием, в котором использовано консервативное или автоматическое выравнивание (Таблица 3.3).

Таблица 3.3. Результаты Шимодайра-Хасегава (ШХ) и Кишино-Хасегава (КХ) тестов альтернативных топологий для филогении отряда Tylenchida

Топология	Консервативное выравнивание					Автоматическое выравнивание				
	N	Лучшие log likelihood	$\Delta\ln L$	КХ-тест	ШХ-тест	N	Лучшие log likelihood	$\Delta\ln L$	КХ-тест	ШХ-тест
МЛ дерево	1	13098.853	лучшие	-	-	1	16155.808	лучшие	-	-
МП дерево	2	13122.881	24.028	0.073	0.412	2	16179.382	23.574	0.095	0.393
Монофилия Hexatylinea sensu Siddiqi (2000)	2	13122.739	23.886	0.074	0.419	5	16183.235	27.427	0.077	0.289
Клада со всеми энтопаразитическими нематодами	2	13123.963	25.110	0.073	0.382	2	16193.020	37.212	0.017*	0.123
Монофилия Dolichodoroidea sensu Siddiqi (2000)	1	13193.440	94.587	0.000*	0.00*	1	16240.667	84.859	0.000*	0.004*
Клада <i>Eutylenchus</i> + Tylenchidae sensu Siddiqi (2000)	10	13133.841	34.988	0.028*	0.188	1	16211.372	55.564	0.003*	0.034*
Клада <i>Eutylenchus</i> + <i>Macrotrophurus</i> (Tylogorinae) sensu Maggenti et al. (1987)	3	13189.770	90.917	0.000*	0.001*	1	16253.832	98.023	0.000*	0.000*
Клада <i>Psilenchus</i> и <i>Basiria</i> (Boleodorinae) sensu Maggenti et al. (1987)	3	13154.765	55.912	0.000*	0.023*	2	16198.844	43.036	0.005*	0.077
<i>Psilenchus</i> в базальной позиции к Tylenchida	3	13148.423	49.570	0.001*	0.052	1	16192.467	36.659	0.010*	0.152
Клада <i>Ditylenchus destructor</i> + Anguinidae	2	13130.754	31.902	0.027*	0.198	2	16188.039	32.231	0.036*	0.211
Клада <i>Radopholus</i> sp. + все другие Pratylenchidae	3	13173.096	74.243	0.003*	0.007*	1	16252.810	97.002	0.000*	0.000*
Клада Heteroderidae + Meloidogynidae sensu Maggenti et al. (1987)	1	13156.836	57.982	0.002*	0.026*	2	16216.692	60.884	0.001*	0.013*

Примечание. * – гипотеза отвергнута при $P < 0.05$.

3.5. Филогенетический сигнал в данных D2-D3 28S рРНК гена

Различные факторы, включая гетерогенность нуклеотидного состава среди таксонов, могут оказывать влияние на результат филогенетических исследований. Данные, полученные в этом исследовании, выявили значительные различия в нуклеотидном составе среди таксонов (Таблица 3.2). При оценке влияния композиционного смещения на результаты филогенетических взаимоотношений с использованием модели LogDet для консервативного и автоматического выравнивания мы обнаружили, что эти деревья в значительной степени

совпадают с данными анализа БВ. Отсутствие влияния композиционного смещения на наши филогенетические результаты также может быть подтверждено довольно высокой вариацией наблюдаемого нуклеотидного состава в кладах. Как показали недавние исследования, смещение нуклеотидного состава, необходимое для появления аномалий в филогенетических результатах в смоделированных наборах данных, намного выше, чем обычно встречается в природе (Conant & Lewis, 2001), и выше, чем в наших данных.

Точность филогений, полученных из молекулярных данных, в решающей степени зависит от точности выравнивания последовательностей, а процесс выявления областей неоднозначного выравнивания для их последующего включения или исключения из окончательных данных является несколько субъективным. Один из подходов по снижению ошибок на этом этапе сводится к применению вторичной структуры рРНК молекулы для выравнивания. Недавно в нескольких работах мы продемонстрировали влияние использования вторичной структуры D2-D3 фрагментов 28S рРНК на выравнивание на примере филогении Criconematina и Hoplolaimidae (Subbotin *et al.*, 2005, 2008). Основным недостатком этого подхода является то, что он отнимает много времени и не гарантирует однозначного выравнивания для сильно расходящихся последовательностей, что также обнаружено в нашем настоящем наборе данных. Чтобы преодолеть эту проблему, мы применили стратегию анализа серии автоматических выравниваний, генерируемых с разной длиной разрыва и штрафами за разрыв. Хотя положение некоторых клад зависело от параметров выравнивания, некоторые тенденции в таксономической группировке были очевидны при реконструкции из всех наборов данных, а также из результатов различных методов построения деревьев.

Наши результаты МП анализа в целом были эквивалентны результатам Байесовского анализа. Некоторые исследования по моделированию предполагают, что Байесовский анализ может иногда давать неоправданно высокие значения поддержки сомнительным или неправильным ветвям. С другой стороны, БВ анализ часто может давать более точные оценки филогении, чем МП, потому что он включает в себя явные модели эволюции последовательности ДНК и может быть менее чувствительным к так называемому феномену «притяжения длинных ветвей» (Alfaro *et al.*, 2003).

3.6. Филогения тиленхид

Во многих аспектах филогенетические картины взаимоотношений тиленхид, которые мы получили из анализа частично секвенированного 28S рРНК гена, согласуются с картиной эволюции, полученной из морфологических данных. Наши результаты МП и БВ анализов

показывают, что отряд Tylenchida включает семь основных линий, которые в основном соответствуют таксономическим подразделениям, предложенным Siddiqi (2000). К ним относятся подотряд Hoplolaimina (клада VII) и подотряд Criconematina (клада VI), а также семейство Iotonchiidae с *Wachekitylenchus* (клада I) и семейство Allantonematidae с *Parasitylenchus* sp. (клада II), семейство Tylenchidae (клада V), семейство Psilenchidae с представителями подсемейства Merliniinae (клада IV) и семейство Anguinidae (в нашем случае исключая *Ditylenchus destructor* и с неопределенной энтомопаразитической нематодой (клада III). Анализ показывает, что седентарный паразитизм возникает как минимум пять раз в процессе эволюции тиленхид (Рисунок 3.3).

3.6.1. Про-тиленхиды

Две основные гипотезы, касающиеся предковой формы тиленхид, изложены и обсуждены в настоящей главе. Гипотеза о том, что современные псиленхиды наиболее похожи на предка тиленхид, была предложена Парамоновым (1962, 1970), а затем разработана Чижовым и Березиной (1988), Чижовым и Кручиной (1988) и Рыссом (1993). Чижов и Березина (1988), изучив женскую половую систему Tylenchida, определили *Psilenchus* как наиболее примитивную форму тиленхид, имеющую анцестральные характеристики, включая дидельфную половую систему. Luc *et al.* (1987) также предположили, что *Psilenchus* наиболее близок к предкам Tylenchida. Siddiqi (2000) полагал, что *Psilenchus*-подобные формы могут рассматриваться как предки Hoplolaimina, но не для других подотрядов. Эта точка зрения согласуется с нашими результатами, показывающими, что молекулярные данные отвергают базальное положение *Psilenchus* в пределах тиленхид. Согласно гипотезе Siddiqi (1980, 2000), *Hexatylys* может быть ближе всего к гипотетическому предку тиленхид. Хотя в настоящем исследовании мы не анализировали представителей рода *Hexatylys*, базальное положение в наших деревьях других энтомопаразитических нематод может быть косвенным подтверждением гипотезы Siddiqi .

3.6.2. Подотряд Hexatylina

Гексатилины имеют достаточно сложную структуру строения тела и сложные жизненные циклы. Siddiqi (2000) различал два надсемейства гексатилин: Sphaerularioidea и Iotonchioidea. Несколько последних находок позволяют предположить, что существуют не две, а три основные эволюционные линии у Hexatylina. Чижов (2004) предложил три надсемейства: Sphaerularioidea, Allantonematoidea и Iotonchioidea, которые в основном

соответствуют нашим молекулярным деревьям. К сожалению, связи между тремя основными тиленхидными линиями энтомопаразитических нематод до сих пор остаются неопределенными даже после анализа D2-D3 последовательностей, и гипотеза о едином происхождении энтомопаразитизма среди тиленхид не может быть отвергнута МЛ тестами. Дополнительные таксоны, а также другие фрагменты генов должны быть включены в последующие анализы, чтобы реконструировать более надежную филогению для энтомопаразитических тиленхид, а также для проверки их происхождения. Как отметил Siddiqi (2000), существует вероятность того, что паразитизм в гемецеле насекомого возник независимо, и Sphaerulariina, Allantonematina и Heterotylenchina могут оказаться действительными кладами и с полным основанием считаться подотрядами.

В нашей работе Chizhov *et al.* (2012) было проанализировано больше представителей Hexitulina и было выявлено, что использование последовательностей фрагмента D2-D3 гена 28S рРНК и частичных последовательностей гена 18S рРНК группирует род *Skarbilovina* с родом *Fergusobia*. Наши результаты также не разделили гексатилин на два основных надсемейства.

3.6.3. Надсемейство Anguinoidea

Siddiqi (1986) классифицировал Anguinoidea в Hexitulina, но впоследствии поместил это надсемейство отдельно от Tylenchoidea в новый инфраотряд – Anguinata (Siddiqi, 2000). Считалось, что основанием для дифференциации Anguinoidea от Tylenchoidea является простой жизненный цикл без энтомопаразитической фазы и наличие профазмид. В кладограмме тиленхид (Siddiqi, 2000) Anguinata разделяет несколько синапоморфий с Hexitulina. Maggenti *et al.* (1987), Чижов и Кручина (1988) и Рысс (1993) сходятся во мнении, что существует тесная связь между энтомопатогенными гексатилинами и Anguinoidea. На некоторых деревьях, полученных БВ методом, Anguinoidea сгруппированы в базальной позиции с Hexitulina, и возможность родственных связей между этими двумя группами не может быть исключена, исходя из анализа наших наборов данных.

Филогенетические взаимоотношения между родами и видами галлообразующих нематод подсемейства Anguininae были проанализированы с использованием последовательностей ВТС рРНК гена (Powers *et al.*, 2001; Subbotin *et al.*, 2004). Настоящее исследование позволяет определить положение *Subanguina chilensis* среди других ангвинид. Этот вид уникален среди Anguininae, поскольку он вызывает образование галлов на листьях дерева *Nothofagus obliqua*. Отношения внутри Anguininae все же остаются не очень хорошо разрешены ни в случае с данными по D2 и D3, ни данными по ВТС рРНК генов (Subbotin

et al., 2004). Интересно, что *S. chilensis* находится в базальной позиции у большинства деревьев. Удивительно, но, по нашим данным, *D. destructor* не появляется в качестве родственного таксона Anguininae, хотя родственное положение этого таксона с Anguininae отвергается тестом КХ. Однако тест ШХ все же не исключает такую взаимосвязь. Некоторыми исследованиями было показано, что тест ШХ является более подходящим для сравнения деревьев, чем тест КХ (Goldman *et al.*, 2000).

3.6.4. Подотряд Criconematina

Деревья, построенные в результате МП и БВ анализов, в настоящей работе полностью соответствуют деревьям, построенным с использованием этих методов для модели нуклеотидного замещения GTR, используя расширенный набор данных для Criconematina (Subbotin *et al.*, 2005). В этом исследовании было показано, что монофилия Tylenchuloidea (включая Paratylenchidae, Tylenchulidae и Sphaeronematidae) не поддерживается ни на одном из молекулярных деревьев, хотя тест МЛ по-прежнему не может отклонить обоснованность этого надсемейства. Все анализы помещали *Sphaeronema* в базальную позицию с различными уровнями статистической поддержки относительно всех других групп. Положение других родов Tylenchuloidea было менее четко определено на большинстве деревьев, но там, где это было, статистическая поддержка была высока, род *Tylenchulus* был второй базальной линией после *Sphaeronema*. Применение различных моделей, включая модель дублета с 16 состояниями, не позволило разрешить взаимоотношения внутри Criconematoidea. В работе Subbotin *et al.* (2005) отмечено, что если дальнейшие филогенетические анализы, в том числе основанные на более длинном фрагменте 28S рРНК гена или комбинации нескольких генов, явно подтвердят монофилию Tylenchuloidea, то следует серьезно обсудить классификацию с пятью семействами (Criconematidae, Hemicycliophoridae, Paratylenchidae, Sphaeronematidae и Tylenchulidae), по Geraert (1966).

3.6.5. Подотряд Hoplolaimina

Нематоды подотряда Hoplolaimina (клада VII), состоящие из надсемейства Dolichodoroidea и Hoplolaimoidea, включают фитопаразитических нематод, которые характеризуются сложными взаимоотношениями в системе паразит – хозяин и имеют наибольшее экономическое значение для сельского хозяйства. Клада Hoplolaimina умеренно или высоко поддерживается в большинстве анализов, но не в своем традиционном составе. Интересно, что результаты показывают парафилию надсемейства Dolichodoroidea и

исключают из него представителей Merliniinae и Psilenchidae, которые на деревьях помещаются в кладу IV.

3.6.6. Подсемейство Merliniinae и семейство Psilenchidae

В настоящем исследовании *Amplimerlinius* и *Nagelus* (Merliniinae) являются родственными таксонами, образующими кладу с *Psilenchus* (Psilenchidae), и эти три таксона (дидельфные половые системы) часто встречаются на некоторых деревьях в пределах одной клады вместе с *Basiria*, *Boleodorus*, *Aglenchus*, *Coslenchus* (монодельфные половые системы). Это противоречит традиционным взглядам на классификацию этих групп. В пределах Tylenchoidea Maggenti *et al.* (1987) признали семейство Belonolaimidae, включив в него подсемейства Telotylenchinae и Belonolaiminae. Эта классификация не признавала подсемейство Merliniinae sensu Siddiqi (1971). Хотя Siddiqi (2000) включил Merliniinae в семейство Telotylenchidae (Dolichodoroidea), он отметил, что строение половой системы Merliniinae отличается от половых систем у Telotylenchinae. Более того, Ryss (1993) считал, что этот таксон следует рассматривать на уровне семейства, то есть как Merliniidae Siddiqi, 1971. В то время как положение представителей Merliniinae вне состава Hoplolaimina хорошо поддерживается нашим набором D2-D3 данных, а также анализом 18S рРНК данных, как показывают наши неопубликованные результаты (Subbotin *et al.*, unpubl.), монофилия этой разнообразной группы должна быть проверена более детальным филогенетическим анализом с включением дополнительных видов.

Maggenti *et al.* (1987) считали, что *Psilenchus* находится в пределах Boleodorinae (также включая *Boleodorus* и *Basiria*) Tylenchidae / Tylenchoidea, но Siddiqi (1986, 2000) и Ryss (1993) выделяли отдельное семейство Psilenchidae, в пределах Dolichodoroidea. У Psilenchidae есть представители, которые напоминают Tylenchidae, включая тонкий стилет и удлинённый хвост, но отличаются некоторыми другими признаками. В настоящем исследовании родственные отношения между Psilenchidae и Merliniinae поддерживаются на большинстве деревьев. Сестринские таксоны *Amplimerlinius*, *Nagelus* и *Psilenchus*, которые отличаются парной женской половой системой, объединены со многими Tylenchoidea, например наличием дейридов в шейном отделе и фазмидов на хвосте. В частности, Ryss (1993), пытаясь понять филогенез тиленхид, определил морфологический латеральный комплекс (амфид, фазмид, дейрид, боковое поле и сенсорные органы, расположенные на голове) и предположил, что существует только несколько родов, которые, по его определению, имеют полный набор этих структур. *Psilenchus*, *Atetylenchus* и *Antarctenchus* в Psilenchidae и такие роды, как *Merlinius*, *Amplimerlinius*, *Geocenamus*, *Hexadorus* (впоследствии синонимизирован с *Geocenamus*),

Nagelus и *Scutylenchus*, были включены совместно с *Pratylenchoides* в семейство Merliniidae. Хотя морфологические подходы Рысса явно имеют свои достоинства, необходима более надежная филогенетическая основа для решения проблем распознавания сходства и установления полярности в серии морфологических признаков для вывода об их синапоморфии.

3.6.7. Под *Macrotrophurus*

Настоящее исследование поддерживает размещение *Macrotrophurus arbusticola* в соответствии с Siddiqi (1986) в пределах клады, в которую входят и другие Dolichodoridae, включая *Trophurus*, *Tylenchorhynchus* и *Belonolaimus*. Siddiqi (2000) поместил *Macrotrophurus* в подсемейство, отдельное от *Trophurus*, но, тем не менее, в пределах Dolichodoridae. Это находилось в противоречии с мнением Luc *et al.* (1987), где *Macrotrophurus* был «условно» помещен в Tylenchidae (Geraert & Raski, 1987). Морфологические признаки, которые могут указывать на неопределенное положение *Macrotrophurus*, включают задние удлинённые отверстия амфидов в сравнении с передними маленькими, более округлыми амфидами у большинства таксонов Belonolaimidae sensu Luc *et al.* (1987).

3.6.8. Под *Radopholus*

Важным результатом нашего исследования является указание на размещение *Radopholus* внутри Noplolaimidae или Heteroderidae, а также отсутствие поддержки его широко распространенного традиционного размещения в семействе Pratylenchidae (Siddiqi, 1986, 2000; Maggenti *et al.*, 1987; Чижов и Кручина, 1992). Luc (1987) отметил, что Pratylenchidae является сборным семейством, потому что его роды отличаются друг от друга довольно большим количеством признаков, и что *Radopholus* отличается от других родов Pratylenchidae своим вторичным половым диморфизмом и характерным строением головы, как показал сравнительный анализ с использованием сканирующей электронной микроскопии. Общая клада *Radopholus* с Noplolaimidae и Heteroderidae была также получена в результате наших анализов последовательностей генов 18S для тиленхид (Subbotin *et al.*, unpubl.). Отношения этого рода с гоппололаймидами и гетеродеридами требуют дальнейшего изучения.

3.6.9. Седентарные нематоды семейств *Heteroderidae* и *Meloidogynidae*

Данные D2-D3 28S гена дают дополнительную информацию о давно обсуждаемом происхождении семейства *Heteroderidae* (включая цистообразующих нематод) и рода *Meloidogyne* (корневых галловых нематод). Наши молекулярные данные подтверждают, что эти группы не имеют единого общего предка.

Хотя с 1909 по 1949 г. (Chitwood, 1949) цистообразующие и галловые нематоды обычно включались в один род, последующая информация все чаще давала основания думать, что предполагаемое сходство является результатом конвергенции, а не общего происхождения (Baldwin, 1992). Различие между цистообразующими и галловыми нематодами было детально сформулировано Wouts (1973), который предложил поместить их в отдельные семейства, *Meloidogynidae* и *Heteroderidae*, но сохраняя их в одном и том же надсемействе. Таким образом, предложенные классификации отражают общую родословную этих таксонов нематод, как и система Luc *et al.* (1988), в которой их ранг снижен до подсемейств *Meloidogyninae* и *Heteroderinae* в семействе *Heteroderidae*. Другие авторы, которые принимали два этих семейства, помещали их в исключительно более высокий ранг, что, на наш взгляд, лучше отражает независимую эволюцию этих различных групп седентарных нематод (Siddiqi 1986, 2000; Чижов и Кручина, 1992).

Интересным новым результатом нашего анализа стало филогенетическое положение двух представителей рода *Meloinema* (*Meloinema chitwoodi* и *M. odesanens*) рядом с галловыми нематодами и представителем рода *Nacobbus* в кладе с *Dolichodoridae* (Subbotin & Kim, 2020). Siddiqi (2000) помещал *Meloinema* в подсемейство *Nacobboderinae* семейства *Meloidogynidae*, а *Nacobbus* – в подсемейство *Nacobbinae* семейства *Pratylenchidae*. Наш филогенетический анализ показал, что *Meloinema* и *Nacobbus* не являются близкородственными таксонами.

Морфологическое сходство *Rotylenchulus* (*Hoplolaimidae*) с другими представителями *Heteroderinae* отмечалось ранее (Wouts, 1973, 1985) в связи с тем, что в примитивные *Heteroderinae*, по-видимому, включаются таксоны с удлинённой, иногда почковидной, формой тела самок. Результаты молекулярных исследований могут свидетельствовать о том, что такая форма тела самок простирается за пределы классических гетеродерид до *Rotylenchulus*. Молекулярная филогения *Verutus* и других *Heteroderidae* подробно описывается в нашей недавней работе Subbotin *et al.* (2018) и в главе 7 настоящего исследования, а филогения рода *Rotylenchulus* – в главе 4.

В то время как общее происхождение *Hoplolaimidae* и *Heteroderidae* давно предлагалось различными авторами, рассмотрение вопросов о том, что тогда является сестринским таксоном для галловых нематод, остается наиболее интересным предметом для

исследований. Результаты настоящего исследования выявили родственные связи *Meloidogyne* с Pratylenchidae (*Pratylenchus* и *Hirschmanniella*), которые наблюдались на большинстве деревьев. Этот результат согласуется с гипотезой, предложенной Ryss (1988), заявившим, что среди Noplolaimoidea пратиленхиды наиболее сходны с *Meloidogyne* деталями строения области головы и пищевода. Рысс полагал, что эти морфологические сходства указывают на общее происхождение Meloidogynidae и Pratylenchidae.

Хотя ранее утверждалось, что *Meloidodera* служит промежуточным звеном между гетеродеридами и мелойдогинами (Chitwood *et al.*, 1956), в настоящее время считается, что мелойдодеры относятся к гетеродеридам. В этом исследовании *Meloidodera* образует кладу с *Cryphodera*. Среди гетеродерид Wouts (1985) выделяет шесть подсемейств: Verutinae; Meloidoderinae; Cryphoderinae; Heteroderinae; Ataloderinae; и Punctoderinae. Baldwin и Schouest (1990), поддерживая более низкий ранг для гетеродерид, различали трибы Verutini, Meloidoderini, Cryphoderini, Sarisoderini, Ataloderini и Heteroderini, но позже Baldwin (1992) предложил классифицировать семейство, используя только три трибы: Heteroderini, Ataloderini и Sarisoderini. С другой стороны, Siddiqi (2000) распознал в Heteroderidae три подсемейства: Heteroderinae, Ataloderinae и Meloidoderinae. Наши молекулярные данные убедительно свидетельствуют о монофилии цистообразующих нематод, а также выделяют две группы, подтверждающие правомерность выделения Heteroderinae и Punctoderinae, что также подтверждается филогенией на основе ВТС рРНК последовательностей (Subbotin *et al.*, 2001).

Во всех наших анализах цистоидные Heteroderidae (*Atalodera* и *Rhizonemella*) обозначены как сестринская группа для цистообразующих нематод. Эта связь частично согласуется с филогенией на основе морфологии, предложенной Baldwin и Schouest (1990), описывающей кладу, отражающую монофилию триб Ataloderini-Heteroderini. Ранее *Rhizonemella* была синонимизирована с *Thecavermiculatus* Siddiqi (1986), но восстановлена Luc *et al.* (1988) и Siddiqi (2000) на том основании того, что *Rhizonemella* отличается наличием влагалищного конуса, D-слоя кутикулы стенки тела, отсутствием хвоста у самцов и способностью индуцировать в растении одну неядерную гигантскую питающую клетку. Два других гетеродеридных рода, *Meloidodera* и *Cryphodera*, показаны в настоящем исследовании как сестринские таксоны. Подробный анализ филогений цистоидных нематод изложен в главе 9.

3.6.10. Надсемейство Tylenchoidea

Как было показано Siddiqi (2000), Tylenchoidea проявляет широкий спектр биологических и морфологических признаков, включая монодельфность самок и наличие

постдейридов. В этом исследовании, хотя мы и включили только нескольких представителей Tylenchoidea, их кластеризация, основанная на молекулярных данных, за исключением *Eutylenchus*, совпадает с морфологическими группировками по Siddiqi (2000). Размещение *Eutylenchus* в Tylenchoidea примечательно тем, что этот род вместе с *Atylenchus* (Atylenchidae) характеризуется наличием четырех головных щетинок, в отличие от других тиленхид (Siddiqi, 2000). Филогенетическая позиция Atylenchidae требует дальнейшего изучения с использованием дополнительных генов и таксонов. Положение *Eutylenchus* подробно обсуждается в нашей статье Palomares-Rius *et al.* (2009).

Молекулярные филогении предоставляют возможность проанализировать независимые наборы признаков, с помощью которых можно также проверить морфологически обоснованные филогении. Этот тест на конгруэнтность между различными наборами признаков особенно важен для выявления сложной картины филогенетических взаимоотношений между представителями отряда Tylenchida. В значительной степени морфологически обоснованные филогении, распознающие по меньшей мере четыре основные группы отряда (Siddiqi, 1980, 1986, 2000), также поддерживаются молекулярным анализом. Очень часто классические морфологические признаки могут вести к ошибкам в реконструкции некоторых традиционных классификаций. Такие ошибки в интерпретации филогении могут быть отчасти связаны с неправильной интерпретацией признаков (для морфологии – часто из-за ограничений разрешения светового микроскопа) или гомологий этих признаков, на основе общих плезиоморфий. Перед лицом этих трудностей молекулярные филогении могут предоставить предварительную основу для выявления морфологической полярности (т. е. направлений эволюции признаков). В настоящем исследовании примеры конвергенции включают: независимое происхождение паразитирующих седентарных нематод растений, происходящих как минимум трижды у Hoplolaimina и дважды у Criconematina. Дополнительные примеры конвергенции могут включать низкую сплюсненную переднюю часть головы и тенденцию к монодельфности самок, которые вместе с другими признаками использовались в классификации Pratylenchidae.

Особая трудность возникает при интерпретации морфологических связей между тиленхидами, у которых есть признаки, которые могут быть плезиоморфными (наличие дейридов и базального бульбуса глотки, дидельфность самок), и хотя может возникнуть соблазн сгруппировать эти таксоны на основе указанных сходств, на самом деле они могут быть представителями различных эволюционных линий. В этом отношении *Amplimerlinius* и *Nagelus* внешне выглядят как нематоды, похожие, например, на *Tylenchorhynchus* и другие рода из Dolichodoroidea / Dolichodoridae sensu Siddiqi (2000). Однако молекулярный анализ помещает *Amplimerlinius* и *Nagelus* далеко от *Tylenchorhynchus* и в качестве родственного

таксона *Psilenchus* в надсемействе Tylenchoidea, что соответствует семейству Psilenchidae внутри отряда Tylenchida по классификации Siddiqi, (2000), как группу, сохранившую плезиоморфную дидельфность. Этот же анализ помещает эти два рода в кладу с монодельфными *Basiria*, *Boleodorus*, *Aglenchus*, *Coslenchus*. *Amplimerlinius*, *Nagelus* и *Psilenchus* делят кладу с этими Tylenchidae, объединяясь с ними по наличию дейрида, и их удаление из Dolichodoridae может привести к тому, что пересмотренная кладка (*Tylenchorhynchus*, *Macrotriphurus*, *Trophurus*, *Belonolaimus*) объединится и в конечном счете включит в себя всех представителей клад VI и VII, у которых дейрид редуцирован. Признаки, которые кажутся очень мозаичными (конвергентными) при определении этих клад, могут включать длину и форму хвоста, некоторые особенности строения губ, а также, в некоторой степени, положение и форму амфидных отверстий. Tylenchoidea были частично определены наличием постдейридов (= prothasmsids sensu Siddiqi), в отличие от типичных фазмидов Dolichodoroidea, но размещение Merliniinae (с типичными фазмидами) внутри Tylenchoidea предполагает необходимость тщательного рассмотрения полярности признака и потенциальной конвергенции этих органов. Таким образом, молекулярные филогении Tylenchidae выявляют требующие дальнейшего изучения вопросы морфологической эволюции и заставляют нас использовать появляющиеся новые методы, чтобы разгадать сложные картины эволюции, и в конечном счете ведут к усовершенствованию классификации.

ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ВИДОВ РОДА *ROTYLENCHULUS* LINFORD & OLIVEIRA, 1940 (НОПЛОЛАИМИДАЕ: РОТЫЛЕНЧУЛИНАЕ) И ФИЛОГЕНИЯ РОДА

В задачи настоящего исследования входило: i) охарактеризовать виды рода *Rotylenchulus*, включая новый вид *Rotylenchulus*, выделенный из почвы и корней сахарного тростника в Южной Африке, с использованием последовательностей ВТС рРНК, D2-D3 28S рРНК, COI и hsp90 генов; ii) изучить филогенетические отношения в пределах рода с использованием этих генов; iii) разработать ПЦР с видоспецифичными праймерами для быстрой и надежной диагностики *R. reniformis*. Подробное морфологическое описание исследованных видов, включая описание нового вида, приводится в нашей работе Van den Berg *et al.* (2016). Описание известных видов из Средиземноморья и дополнительное исследование филогенетических отношений между этими видами также опубликовано в нашей работе Palomares-Rius *et al.* (2018).

4.1. Виды исследованных нематод

В изученных образцах мы выделили и молекулярно охарактеризовали семь известных валидных видов: *R. clavicaudatus*, *R. leptus*, *R. macrodoratus*, *R. macrosoma*, *R. parvus*, *R. reniformis*, *R. sacchari* и один новый вид, *R. macrosomoides* (таблица 3, приложение).

4.2. Филогенетические исследования

4.2.1. D2-D3 28S рРНК ген

В настоящем исследовании были получены 29 новых последовательностей D2-D3 28S рРНК гена для *Rotylenchulus*. В общей сложности 121 последовательность D2-D3 28S рРНК гена видов *Rotylenchulus* была первоначально включена в набор данных. Окончательное выравнивание последовательностей D2-D3 28S рРНК гена содержало 95 последовательностей видов *Rotylenchulus* и два таксона внешней группы и имела длину 759 п.н. Филогенетические взаимоотношения внутри *Rotylenchulus*, реконструированные в результате БВ анализа, представлены на Рисунке 4.1. Последовательности *R. reniformis* были распределены на дереве между двумя отдельными кладами, которые были названы как тип А (образцы из Китая, США и Японии) и тип В (образцы из Китая). В настоящем исследовании только последовательности типа А были получены из всех образцов *R. reniformis* из США в результате прямого

секвенирования продуктов ПЦР. Тип А *R. reniformis* показал родственные отношения с *R. macrosoma*, а тип В показал родственные отношения с *R. macrosomoides*.

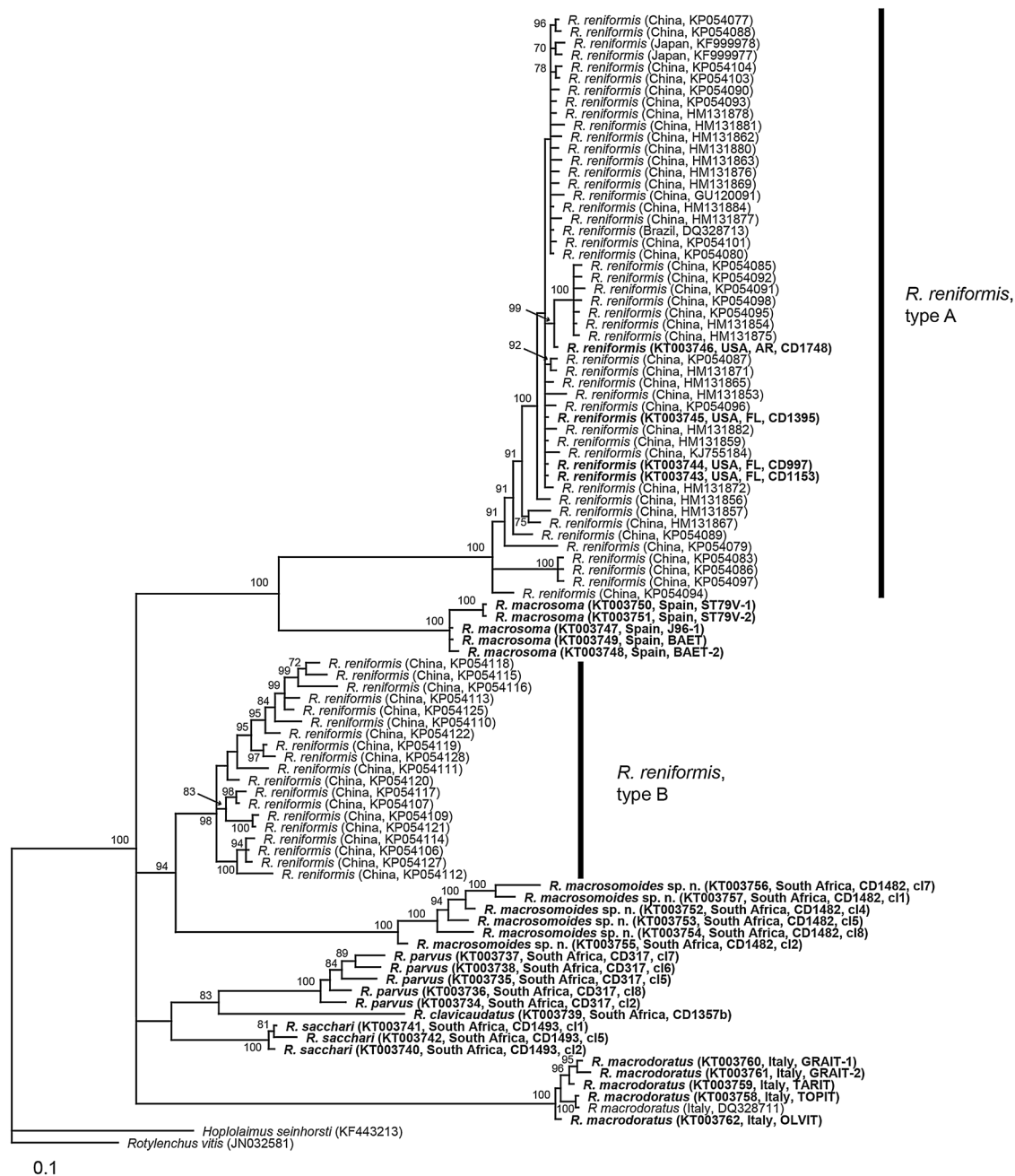


Рисунок 4.1. Филогенетические взаимоотношения между видами *Rotylenchulus*. Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа D2-D3 28S рНК гена по модели GTR + I + G. Апостериорные вероятности более 70% приведены для соответствующей клады. Новые последовательности выделены жирным шрифтом.

Rotylenchulus parvus показал близкородственные отношения с *R. clavicaudatus*. Отношения между другими видами не были хорошо разрешены. Различия в последовательностях между *R. reniformis* типа А и *R. reniformis* типа В D2-D3 28S рНК гена составили 13,6-15,6% (98-116 п.н.), в пределах типа А 0,1-4,8% (1-40 п.н.) и в пределах типа В 0,1-4,6% (1-34 п.н.). Содержание GC (гуанин-цитозин) для типа А составило 54,7%, а для

типа В – 58,8%. Предполагаемые вторичные структуры для сегмента расширения D2 28S рРНК молекулы для типа А (Рисунок 4.2А) и типа В (Рисунок 4.2В) для *R. reniformis*, реконструированные с использованием программы Mfold 3.0 и структурного сравнительного анализа, показали сходное строение. Картирование мутаций в обоих типах показало, что они были в основном компенсаторными.

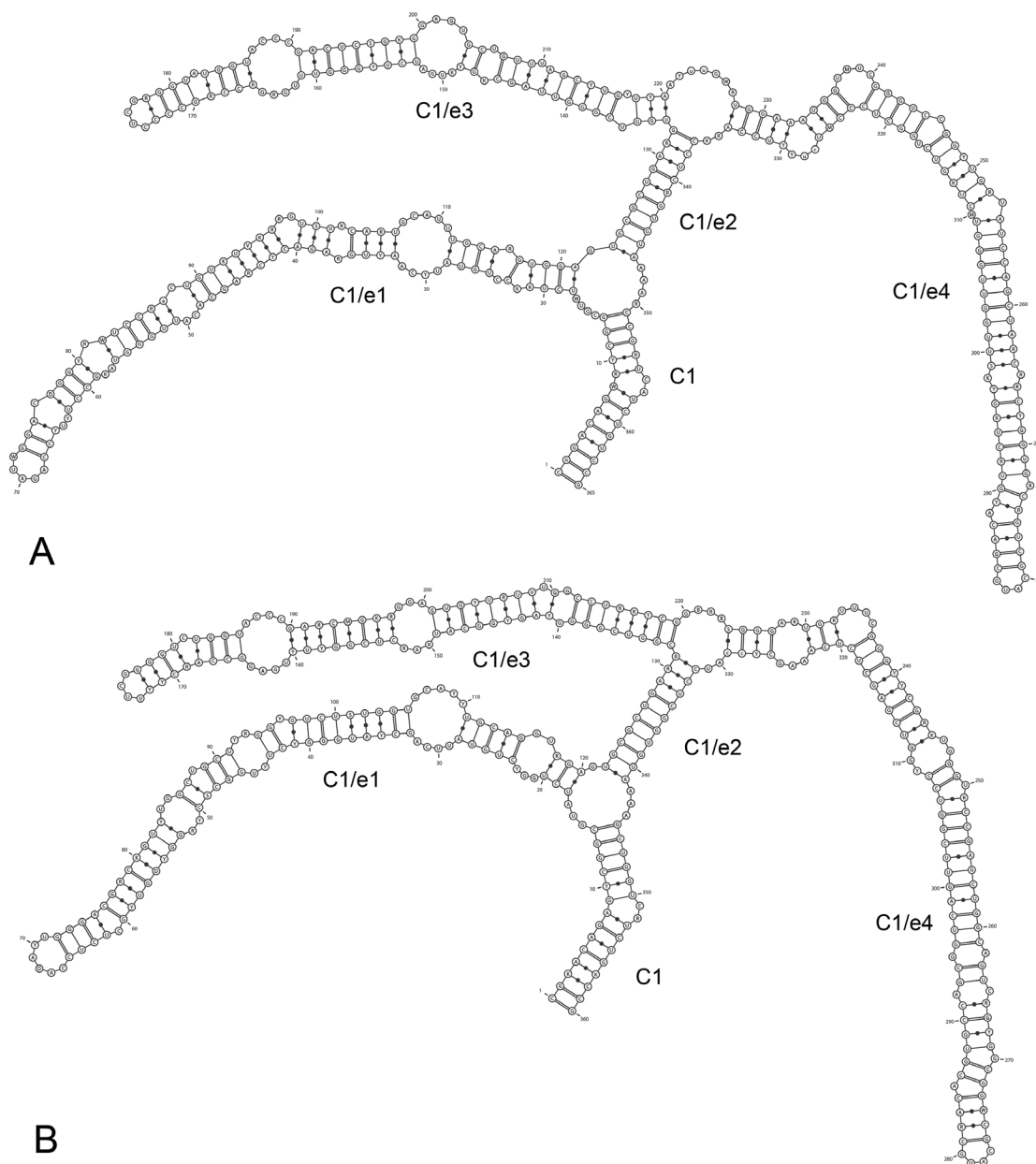
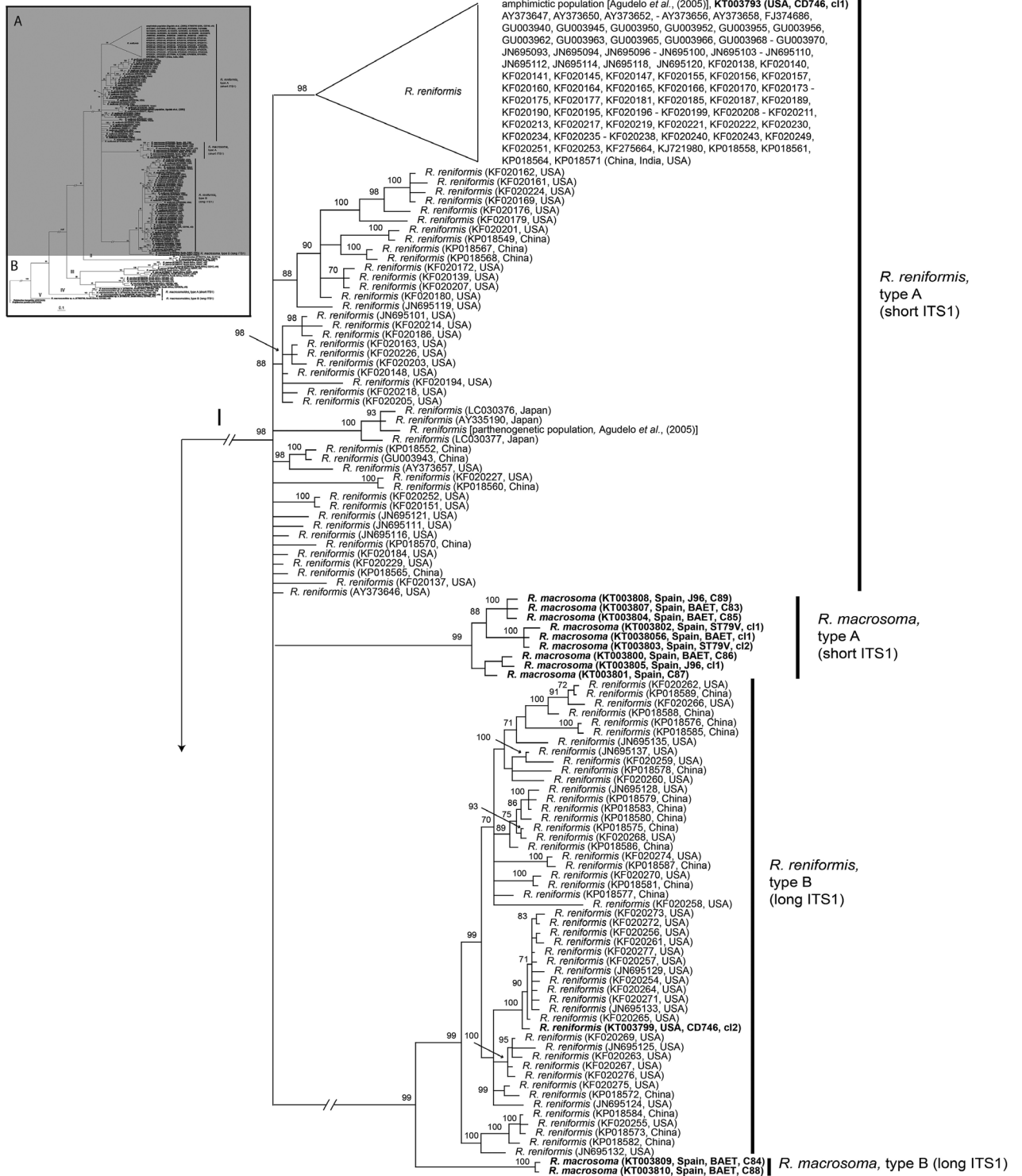


Рисунок 4.2. Предполагаемые консенсусные вторичные структуры сегмента расширения D2 28S рРНК молекулы для *R. reniformis*. А: Тип А; В: Тип В.

4.2.2. BTC1 рРНК ген

Сорок одна новая последовательность рРНК BTC1-5,8S-BTC2 гена была получена в настоящем исследовании для *Rotylenchulus*. В общей сложности 322 последовательности BTC1 рРНК гена для видов рода *Rotylenchulus* были первоначально включены в набор

данных, а затем объединены в выравнивание с 229 уникальными последовательностями. Две последовательности видов рода *Rotylenchus* были использованы в качестве внешних групп. Длина выравнивания ВТС1 рРНК гена составляла 884 п.н.



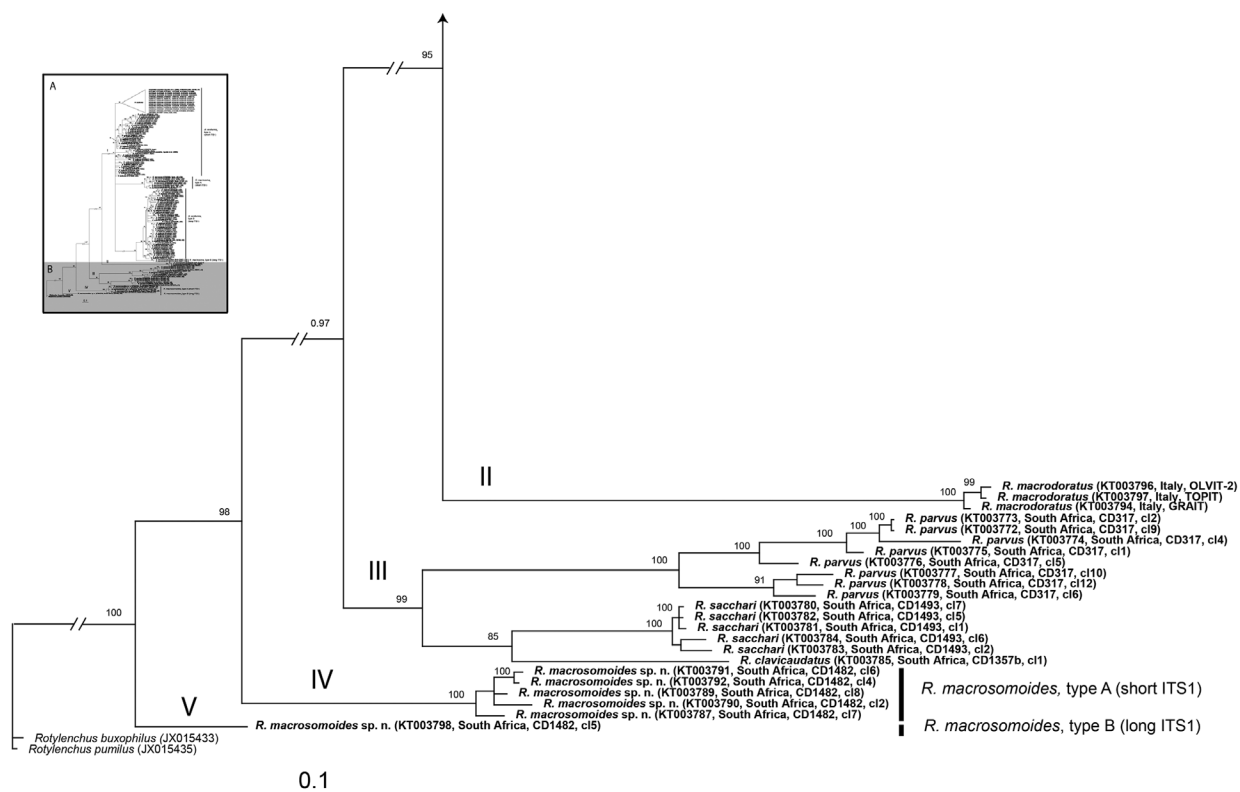


Рисунок 4.3. Филогенетические взаимоотношения между видами *Rotylenchulus*. Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа BTC1 рНК гена по модели GTR + I + G. Основная клада *R. reniformis* с неразрешенными взаимоотношениями между последовательностями указывается в виде треугольника. Апостериорные вероятности более 70% приведены для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом.

Филогенетическое дерево, полученное в результате БВ анализа выравнивания последовательностей BTC1 рНК гена, приведено на Рисунке 4.3. Последовательности *Rotylenchulus reniformis* и *R. macrosoma* образовали основную кladу I. *Rotylenchulus reniformis* тип А, содержащий короткий BTC1 участок (ITS1S) (323-336 п.н.), который включал как амфимиктические, так и партеногенетические популяции (Agudelo *et al.*, 2005), был распределен по нескольким субкладам. *Rotylenchulus reniformis* типа В, содержащий длинный BTC1 участок (ITS1L) (488-502 п.н.), был сгруппирован с длинным BTC1 геном *R. macrosoma* (тип В). Вариация последовательности у *R. reniformis* типа А достигла 17,6% (62 п.н.), а у *R. reniformis* типа В достигла 11,4% (60 п.н.), эти типы отличались до 24,5% (75 п.н.) друг от друга. Последовательности *R. macrosoma* были распределены по двум группам в основной кlade I: тип А (ITS1S), который варьировался от 301-307 п.н., и тип В (ITS1L), который составлял 497 п.н. в длину. Различия в последовательностях между двумя группами достигали 20,4% (71 п.н.).

Клада II включала только последовательности *R. macrodoratus*, тогда как клада III содержала последовательности *R. parvus*, *R. sacchari* и *R. clavicaudatus*. Длина последовательности BTC1 гена для *R. macrodoratus* составляла 335-337 п.н. (внутривидовое различие 1,0%), для *R. parvus* – 427-511 п.н. (до 20%), для *R. sacchari* – 517-518 п.н. (до 4,1%)

и для *R. clavicaudatus* – 542 п.н. (0%). *Rotylenchulus macrosomoides* был парафилетическим и занимал базальную позицию (клады III и IV). Последовательности у клонов, полученных из одной популяции *R. macrosomoides*, были также распределены на две группы: длина типа А (ITS1S) варьировала от 501 до 507 п.н., а тип В (ITS1L) составлял около 660 п.н. Различия у последовательностей в типе А достигали 5,4% (28 п.н.). Различия у последовательности между этими двумя группами составляли 20,5-21,8% (104-110 п.н.).

4.2.3. 5.8S и ВТС2 рРНК гены

В общей сложности 130 последовательностей 5.8S и ВТС2 рРНК генов видов рода *Rotylenchulus* были первоначально включены в набор данных, а затем были приведены в 94 уникальные последовательности. Две последовательности видов рода *Rotylenchus* были использованы в качестве внешних групп. Выравнивание имело 448 п.н. в длину. Филогенетические взаимоотношения внутри *Rotylenchulus* приведены на Рисунке 4.4 Последовательности *R. reniformis* были распределены по двум кладам I и II (тип А и тип В) и отличались до 22,9% (73 п.н.) друг от друга: в пределах типа А – 0,2-7,7% (1-29 п.н.), типа В – 0,2-8,4% (1-28 п.н.). Последовательности *R. macrosoma* были распределены по трем группам (А, В, С) в пределах двух клад I и II. *R. macrosoma* тип А отличался на 27,1-29,4% (89-92 п.н.) и 27,0-27,9% (82-89 п.н.) от типа В и типа С соответственно, а тип В отличался до 26,0% (84 п.н.) от типа С. *R. reniformis* типа А и типа В были сгруппированы с соответствующими типами *R. macrosoma*. *Rotylenchulus macrosoma* тип С сформировал хорошо поддерживаемую кладу с *R. macrosomoides* типа А. ВТС последовательности типа А и В для *R. macrosomoides* были распределены в две отдаленные клады (II и IV) и отличались друг от друга на 24,1% (74 п.н.).

4.2.4. Hsp90 ген

Восемь новых последовательностей hsp90 гена были получены в настоящем исследовании для *Rotylenchulus*. Выравнивание hsp90 гена содержало восемь последовательностей *Rotylenchulus* и две последовательности *Rotylenchus*, использованные в качестве внешней группы, и имело длину 217 п.н. (исключая интроны). Филогенетические отношения в пределах рода, полученные в результате БВ анализа, представлены на Рисунке 4.5. Последовательности *Rotylenchulus reniformis* были сгруппированы с *R. macrosoma* с высоким значением АП, тогда как взаимоотношения между другими видами не были разрешены.

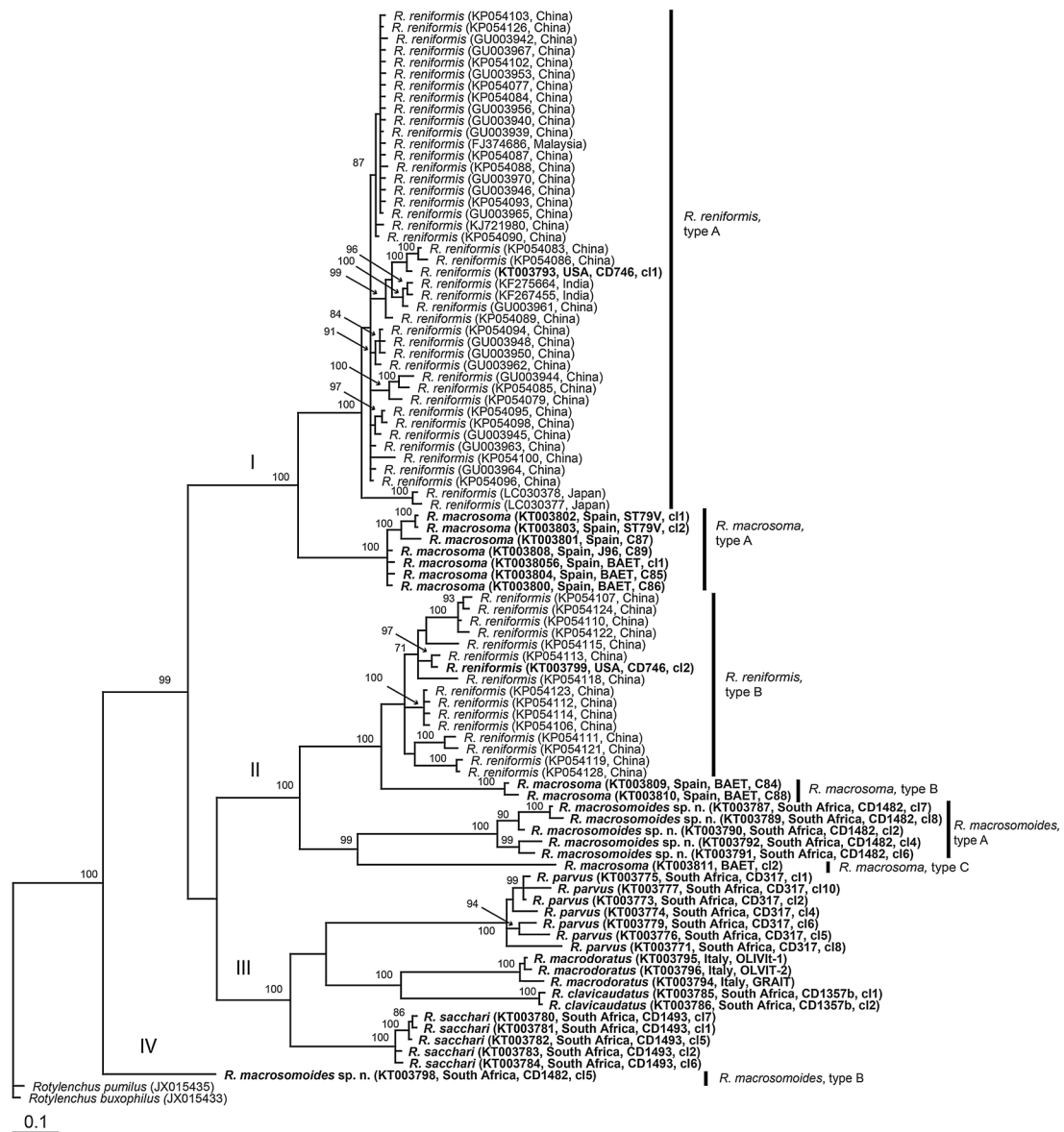


Рисунок 4.4. Филогенетические взаимоотношения между видами *Rotylenchulus*. Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа 5.8S + BTC2 рНК гена по модели GTR + I + G. Апостериорные вероятности более 70% приведены для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом.

4.2.5. COI ген

Выравнивание COI гена содержало 15 новых полученных последовательностей *Rotylenchulus* и две последовательности *Rotylenchulus*, использованные в качестве внешней группы, и имело длину 393 п.н. Внутривидовая вариабельность последовательностей для *R. reniformis* достигала 0,8% (3 п.н.). Филогенетическое дерево, реконструированное с использованием БВ анализа, представлено на рисунке 4.6. Филогенетические взаимоотношения между видами не были хорошо прояснены.

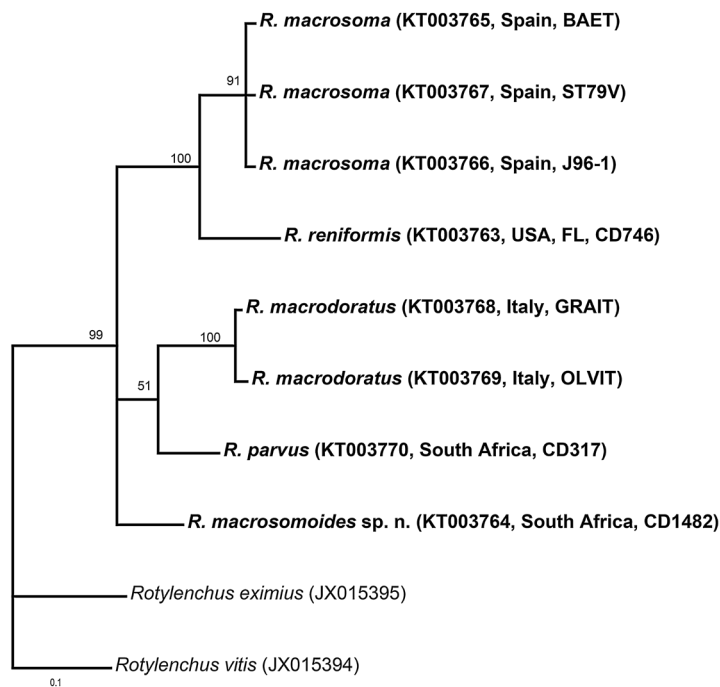


Рисунок 4.5. Филогенетические взаимоотношения между видами *Rotylenchulus*. Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа *hsp90* гена по модели GTR + G. Апостериорные вероятности более 70% приведены для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом.

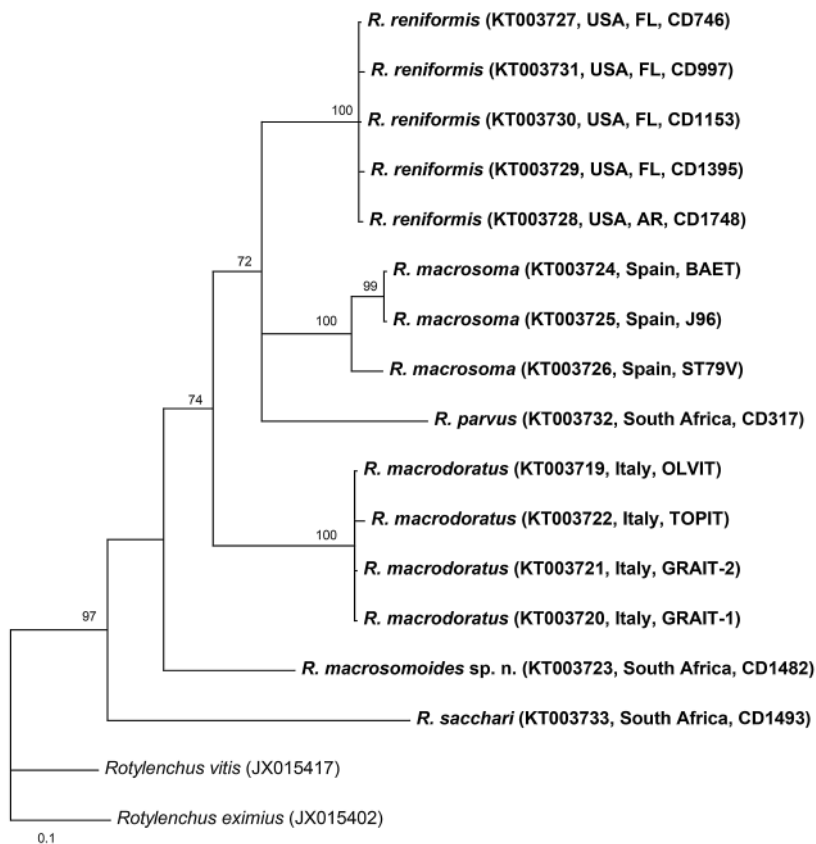


Рисунок 4.6. Филогенетические взаимоотношения между видами *Rotylenchulus*. Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа COI гена по модели GTR + G. Апостериорные вероятности более 70% приведены для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом.

4.3. ПЦР с видоспецифичными для *Rotylenchulus reniformis* праймерами

Видоспецифичные праймеры были разработаны для *R. reniformis* на основе различий в последовательностях D2-D3 28S рРНК генов (Таблица 1, Приложение). Результаты ПЦР с видоспецифичными праймерами приведены на Рисунке 4.7. Комбинации универсального праймера D2A с видоспецифическим праймером R_genif_R1A или R_genif_R2A давал один продукт ПЦР приблизительно в 142 п.н. (Рисунок 4.7А) и 320 п.н. (Рисунок 4.7В) соответственно для всех изученных образцов *R. reniformis*. Эти праймеры амплифицировали фрагменты типа А для D2-D3 28S рРНК гена. Праймер R_genif_R1B был разработан для амплификации типа В D2-D3 28S рРНК гена. Мультиплексная ПЦР с универсальным праймером D2A и видоспецифическими праймерами R_genif_R1B и R_genif_R2A давала два продукта длиной в 179 п.н. и 320 п.н. для всех изученных популяций *R. reniformis* (данные не показаны).

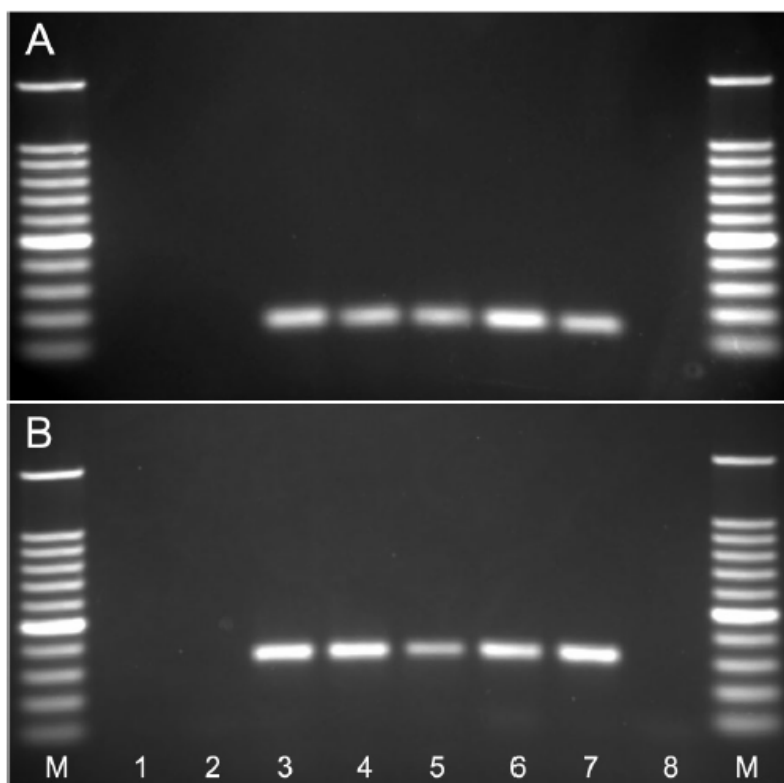


Рисунок 4.7 ПЦР с видоспецифическими праймерами для *Rotylenchulus reniformis*. А: комбинация праймеров D2A и R_genif_R1A; В: комбинация праймеров D2A и R_genif_R2B. Дорожка: М = 100 п.н. ДНК маркер (Promega); 1 = *R. sacchari*; 2 = *R. macrosomoides*; 3 = *R. reniformis* (CD997); 4 = *R. reniformis* (CD1153); 5, 6 = *R. reniformis* (CD1395); 7 = *R. reniformis* (CD747); 8 = контроль без ДНК.

В этом исследовании мы представляли молекулярную характеристику восьми видов *Rotylenchulus*. Молекулярная характеристика пяти видов, в том числе нового вида *R. macrosomoides*, была сделана впервые. Анализ нуклеотидных последовательностей генов,

кодирующих рибосомную рРНК и один белок, позволил четко отделить все изученные виды *Rotylenchulus* друг от друга, а также выделить новый вид *R. macrosomoides*. Филогенетический анализ поместил последовательность ВТС гена этого вида на базальные позиции на обоих ВТС деревьях, и такая позиция согласуется с его позицией на hsp90 дереве. Базальная позиция *R. macrosomoides* на филогенетических деревьях поддерживает мнение Siddiqi о том, что род *Rotylenchulus* происходит из Афротропического (Эфиопского) зоогеографического региона, включающего Африку к югу от Сахары, южную часть Аравийского полуострова и различные острова, включая Мадагаскар. В этом регионе предположительно сформировалось большинство видов рода *Rotylenchulus* (Siddiqi, 2000). Наше исследование показало, что филогенетические взаимоотношения между многими видами *Rotylenchulus* все еще остаются невыясненными, за исключением родственных отношений между *R. reniformis* и *R. macrosoma*, которые сгруппированы вместе на деревьях, полученных из анализов последовательностей hsp90, D2-D3 28S рРНК и ВТС генов. Dasgupta *et al.* (1968) поместили эти виды в группу III и группу IV соответственно, т. е. в две из пяти морфологических групп, которые были предложены для рениформных нематод на основе строения области губ в сочетании с формой хвоста у незрелых самок. Обе эти группы характеризуются высокой и коноидальной областью губ. *Rotylenchulus reniformis* и *R. macrosoma* также индуцируют один и тот же тип питающих клеток в корнях растений-хозяев – синцитий (Castillo *et al.*, 2003b), в отличие от *R. macrodoratus*, который индуцирует одноядерную гигантскую клетку (Vovlas & Inserra, 1976; Cohn & Mordechai, 1977).

О наличии двух различных типов гена малой субъединицы рРНК в одном геноме сообщалось для организмов, принадлежащих ко всем трем доменам жизни. Например, геномы термофильного актиномицета *Thermomonospora chromogena*, эукариотического паразита *Plasmodium berghei* и планарии *Schmidtea mediterranea* содержат два типа генов 16S или 18S рРНК, различающихся соответственно на 6,0, 3,5 и 8,0% нуклеотидов (Gunderson *et al.*, 1987; Carranza *et al.*, 1996; Yap *et al.*, 1999; Torres-Machorro *et al.*, 2010). В большинстве этих исследований сравнение последовательностей в значительной степени ограничивалось только 18S рРНК, и поэтому неясно, распространяется ли этот уровень гетерогенности последовательностей на другие рРНК гены (Yap *et al.*, 1999). Наше настоящее исследование подтвердило результаты предыдущих исследований Nyaku *et al.* (2013a, b) и Deng *et al.* (2015), которые обнаружили два разных типа оперонов рРНК (18S, ВТС и 28S) в геноме *R. reniformis*. Насколько нам известно, *R. reniformis* является первой нематодой, для которой это явление было описано. Эти типы рРНК показали существенные различия в последовательностях: 18S рРНК – 5,5% (Nyaku *et al.*, 2013b), D2-D3 28S рРНК – 15,6%, ВТС рРНК – до 24,5% (настоящее исследование). В нашем исследовании мы также обнаружили различные типы у

других видов: два различных типа ВТС рРНК гена у *R. macrosomoides* и три типа ВТС гена у *R. macrosoma*.

Реконструкция моделей вторичной структуры для двух типов D2 28S рРНК молекулы для вида *R. reniformis* и картирование ее мутаций показали, что обе модели имеют одинаковую консервативную структуру и большинство точечных мутаций были компенсаторными, таким образом подтверждая, что оба типа рРНК генов являются функциональными. Nyaku *et al.* (2013b) также установили, что оба типа 18S рРНК экспрессируются в тканях нематод, поскольку их последовательности присутствовали в ESTs данных. Wang *et al.* (1997) высказали предположение, что наличие различных типов гена рРНК в одном организме может быть на самом деле обычным явлением в природе. В нашем исследовании два типа рРНК были обнаружены по крайней мере у трех видов *Rotylenchulus*. Скорее всего, это явление можно также обнаружить и у других видов этого рода. Примечательно, что, используя универсальный набор праймеров D2A и D3B, мы амплифицировали только тип А D2-D3 28S рРНК гена в *Rotylenchulus*, но не тип В. Однако результаты ПЦР со специфическими праймерами *R. reniformis*, нацеленными на амплификацию типов А и В, отчетливо показали наличие обоих типов во всех исследованных образцах *R. reniformis*. Отрицательный результат ПЦР с универсальными праймерами с амплификацией типа В можно объяснить наличием некоторых несовпадений в последовательностях универсального праймера D2A и соответствующих последовательностей гена типа В. Мы предполагаем, что дальнейшие исследования методом ПЦР с использованием различных новых универсальных праймеров для гена рРНК и секвенирование всего генома должны быть использованы для изучения и выявления типов гена рРНК в геномах видов *Rotylenchulus*.

В нескольких статьях происхождение различных типов оперонов рРНК в одном геноме объяснялось либо дивергентной эволюцией после дубликации генов, либо латеральным переносом генов между разными видами (Gunderson *et al.*, 1987; Mylvaganam & Dennis, 1992; Carranza *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997). По нашему мнению, это явление могло произойти на ранней стадии эволюции *Rotylenchulus* либо в результате дубликаций генома у их предков, либо, как предположили Deng *et al.* (2015), в результате межвидовой гибридизации с последующей быстрой дивергенцией рРНК генов. Эти копии не подверглись так называемой согласованной эволюции, которая обычно приводит к гомогенизации различных копий генов в геноме.

Настоящее исследование также предоставило больше информации о внутривидовой изменчивости рРНК генов для видов *Rotylenchulus*. Эти данные могут помочь в установлении границ видов этой группы нематод. Agudelo *et al.* (2005) сообщали о расхождении 11,8% в

последовательностях ВТС1 между партеногенетической формой из Японии и 20 амфимиктических популяциями *R. reniformis* из США, Бразилии, Колумбии и Гондураса. Эти авторы предположили, что значительные различия последовательностей ВТС1 служат подтверждением валидности вида *R. nicotiana* из Японии (Yokoo & Tanaka in Tanaka & Tsumagori) Baker, 1962, таксона, который в настоящее время рассматривается многими авторами как младший синоним *R. reniformis* (Siddiqi, 2000). Наш анализ ВТС рРНК гена показал, что последовательности партеногенетических и амфимиктических форм, изученные Agudelo *et al.* (2005), сгруппированы с последовательностями типа А, и различия в последовательностях между этими формами не превышают внутривидовой изменчивости для вида *R. reniformis*. Таким образом, наш молекулярный анализ рРНК генов не предоставляет доказательств, подтверждающих валидность вида *R. nicotiana*.

Результаты настоящего исследования имеют большое значение для понимания общих проблем филогенетических анализов с использованием последовательностей рРНК генов и показывают, что для выявления надежных филогенетических связей между таксонами следует использовать не один, а несколько генов.

ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ЦИСТОИДНЫХ НЕМАТОД СЕМЕЙСТВА HETERODERIDAE

В ходе наших исследований личинки второй стадии неизвестных цистоидных нематод были обнаружены в образцах почвы, собранных в естественных ценозах в Калифорнии, Вашингтоне и Флориде (США), а также во Вьетнаме, Мексике, России и Германии. Чтобы идентифицировать этих нематод, мы провели сравнительное молекулярное исследование образцов с известными видами цистоидных, описанными из Европе, Азии и Америке.

В ходе исследования решались следующие задачи: i) провести молекулярную характеризацию нескольких валидных и неизвестных видов цистоидных нематод с использованием последовательностей D2-D3 участка 28S рРНК и ВТС рРНК генов и участка митохондриального COI гена; ii) проанализировать филогенетические взаимоотношения между цистоидными нематодами семейства Heteroderidae, используя эти три генных фрагмента; iii) оценить границы видов для цистоидных нематод с использованием морфологического и молекулярного критериев. Результаты этих исследований и подробное обсуждение результатов опубликованы в наших статьях: Nguyen *et al.* (2011) и Subbotin *et al.* (2017, 2018).

Популяции нематод, использованные в этом исследовании, были получены из образцов почвы, собранных в разных местах Германии, в Мексике, России, США и Вьетнаме (Таблица 4, Приложение). Несколько самок и личинок *Meloidodera sikhotealiniensis* Eroshenko, 1978 были идентифицированы и предоставлены для этого исследования А.С. Ерошенко из Приморского края России. *Atalodera carolynae* (Robbins, 1986) Souza & Huang, 1994, *Rhizonemella sequoiae* Cid del Prado Vera, Lownsbery & Maggenti, 1983 и *M. astonei* Cid del Prado Vera & Rowe, 2000 были собраны и идентифицированы морфологически из их типовых мест обитания – соответственно в Калифорнии, США и Мексике. *Meloidodera floridensis* была собрана и морфологически идентифицирована из Северной Флориды с *Pinus elliotii*, от того же хозяина и из той же местности, откуда были собраны и описаны типовые образцы. Один неопределённый *Rotylenchulus* sp. из Аризоны, неопределённый вид рода *Verutus* из Германии, а также два вида цистообразующих нематод были также включены в это исследование.

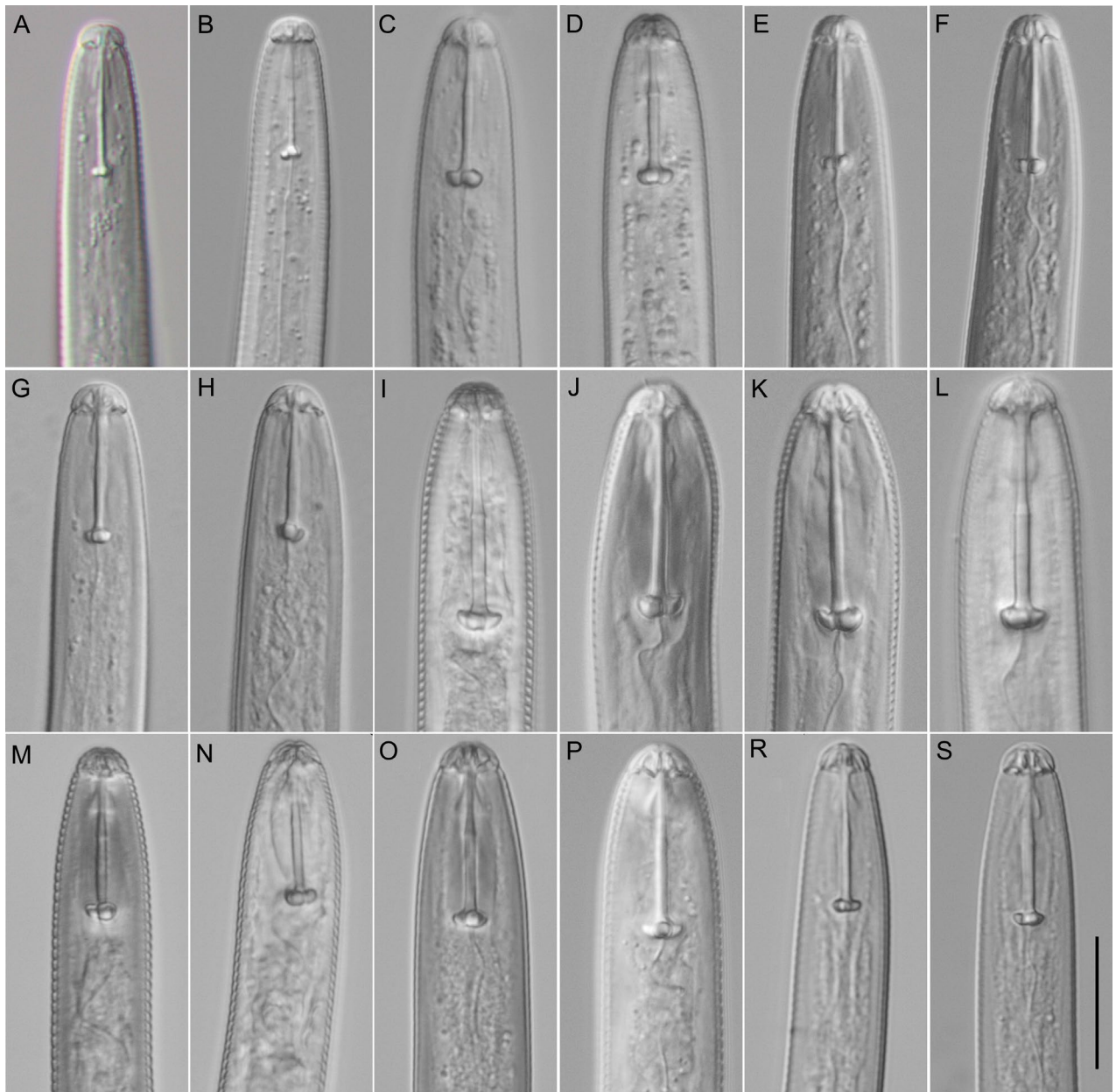


Рисунок 5.1. Головные концы личинок второй стадии. А, В: *Atalodera carolynae* (CD882); С, D: *Atalodera* sp. А (CD1355); Е, F: *Atalodera* sp. В (CD922); G, H: *Atalodera* sp. В (CD837); I: *Rhizonemella* sp. А (CD875); J, K: *Rhizonemella* sp. В (CD780); L: *Rhizonemella* sp. С (CD890); M, N: *Meloidodera mexicana* (CD238); O, P: *M. floridensis* (CD1957); Q, R: *Cryphodera* sp. D (CD2310). (Масштаб = 20 мкм.).

5.1. Идентификация видов

В этом исследовании нами были также изучены морфологические признаки личинок и взрослых особей. Используя интегрированный подход, позволяющий комплексно проанализировать морфологические и молекулярные признаки, мы выделили семь валидных и одиннадцать неизвестных видов цистоидных нематод семейства Heteroderidae в исследованных образцах: *Atalodera carolynae*, *Cryphodera sinensis*, *Meloidodera astonei*, *M. floridensis*, *M. mexicana*, *M. sikhotealiniensis*, *Rhizonemella sequoiae*, два неопределенных вида *Atalodera* (sp. А и sp. В), шесть неопределенных видов *Cryphodera* (sp. В, sp. С, sp. D,

sp. E, sp. F и sp. G), три неопределенных вида *Rhizonemella* (sp. A, sp. B., sp. C) (Рисунок 5.1) и один вид *Verutus*. Из-за ограниченного количества личинок и отсутствия взрослых особей в некоторых образцах мы не смогли идентифицировать некоторые популяции до уровня вида. Также мы не смогли провести морфологическое и морфометрическое сравнение *Atalodera* sp. A и sp. B, *Cryphodera* spp. B-G, *Rhizonemella* spp. A-C и *Verutus* с описаниями известных видов из этих родов. Эти нематоды рассматриваются в нашем исследовании как неидентифицированные виды. *Rotylenchulus* sp. морфологически соответствовал описанию *R. parvus* (Williams, 1960) Sher, 1961 из Аризоны. Цистообразующая нематода *Betulodera* sp. была идентифицирована только до уровня рода. *Heterodera guangdongensis* Zhuo, Wang & Liao, 2014b была нами впервые обнаружена во Вьетнаме (Таблица 4, Приложение).

Светомикроскопические фотографии передних областей личинок для *Atalodera carolynae*, *Meloidodera mexicana*, *M. floridensis*, двух предполагаемых и неопределенных видов *Atalodera*, трех неопределенных видов *Rhizonemella* и одного неопределенного вида *Cryphodera* sp. D приведены на Рисунке 5.1 и на фотографиях в нашей статье Subbotin *et al.* (2017).

После сбора дополнительного материала мы включили *Verutus volvingentis* из типового местонахождения, неопределенный изолят *Verutus* sp. из США, *Cryphodera* sp. D из Таиланда, *Zelandodera* sp. из Новой Зеландии и неизвестный и предположительно новый род семейства Verutinae из Борнео, Малайзия в отдельное исследование (Subbotin *et al.*, 2018).

5.2. Молекулярная характеристика и филогенетические отношения

5.2.1. D2-D3 28S рРНК ген

Выравнивание D2-D3 имело длину 689 п.н. и состояло из 90 последовательностей, включая *Scutellonema brachyurus* и *Helicotylenchus pseudorobustus*, используемые в качестве внешних групп. Тридцать восемь новых последовательностей D2-D3 фрагментов 28S рРНК гена были получены в настоящем исследовании. Филогенетические взаимоотношения внутри Heteroderidae и Rotylenchulidae, полученные в результате анализа этих последовательностей, представлены на Рисунке 5.2. Полученное филогенетическое дерево содержало пять высоко поддерживаемых основных клад: i) Heteroderinae, содержащие виды рода *Heterodera* с представителями Punctoderinae Krall & Krall, 1978, которые были разделены на две подклады с видами, относящимися к родам а): *Globodera*, *Paradolichodera*, *Punctodera*, *Cactodera* и б): *Vittatidera*, *Betulodera*; ii) Ataloderinae, содержащие виды родов *Atalodera* и *Rhizonemella*; iii) Rotylenchulinae Husain & Khan, 1967, содержащий виды *Rotylenchulus*; iv) Meloidoderinae,

содержащие представителей родов *Meloidodera* и *Cryphodera*; v) Verutinae, содержащий неидентифицированный вид *Verutus*. Клада I с цистообразующими нематодами группировалась с кладой II с высокой поддержкой (АП = 100), тогда как взаимоотношения между другими кладами остались неразрешёнными.

Монофилия Heteroderinae и монофилии родов *Atalodera*, *Rhizonemella* и *Rotylenchulus* получили высокую поддержку (АП = 100) на этом дереве. Клада II, содержащая подсемейство Meloidoderinae, состояла из двух подклад с представителями, определенными по их географическим местоположениям: i) американская подклада (АП = 100) – *Meloidodera floridensis*, *M. mexicana*; ii) азиатская и европейская подклада (АП = 94) – *Cryphodera* spp. и *M. sikhotealiniensis*. Таким образом, род *Meloidodera* был немонофилетическим на этом дереве. Род *Verutus* образовывал отдельную кладу, отличную от родов Heteroderidae, а также от рода *Rotylenchulus*.

Meloidodera sikhotealiniensis с Дальнего Востока России образовывала кладу с нематодой, ранее идентифицированной нами как *M. alni* Turkina & Chizhov, 1986 (DQ328706), и их последовательности отличались на 0,4% (3 п.н.). *Meloidodera astonei* из Мексики была сгруппирована с *M. mexicana* из США, Техас. Внутривидовые различия в последовательностях для *Cryphodera brinkmani* Karssen & van Aelst, 1999 были в 0,9-1,2% (6-8 п.н.), *C. sinensis* – 0,3-1,0% (3-7 п.н.), *Rhizonemella* sp. A – 0,4-0,9% (3-6 п.н.). Межвидовая разница в последовательностях между *A. carolynae* и *A. crassicrustata* составила 1,0% (7 п.н.); *M. floridensis* и *M. mexicana* – 4,3-4,9% (29-33 п.н.); *Rhizonemella sequoiae* и *Rhizonemella* sp. A – 5,2-5,5% (31-36 п.н.).

5.2.2. ВТС1 рРНК ген

Из-за неоднозначности в выравнивании у ВТС2 рРНК гена только последовательности ВТС1 и 5.8S рРНК генов были включены в анализ. Выравнивание было длиной в 872 п.н. и содержало 52 последовательности. Двадцать четыре новые последовательности были получены в результате нашего исследования. Филогенетическое связи внутри Heteroderidae и Rotylenchulidae, полученные в результате анализа последовательностей ВТС рРНК генов, представлены на Рисунке 5.3. Полученное филогенетическое дерево содержало четыре основные клады с высокой поддержкой (АП = 100): i) *Rhizonemella* и *Atalodera*; ii) азиатские и европейские мелойдодерины; iii) американские Meloidoderinae; iv) *Bilobodera* (Verutinae). Взаимоотношения между кладами остались неразрешенными (АП < 80). Монофилия родов *Atalodera* и *Rhizonemella* была высоко поддержана (АП = 100), тогда как род *Meloidodera* был парафилетическим.

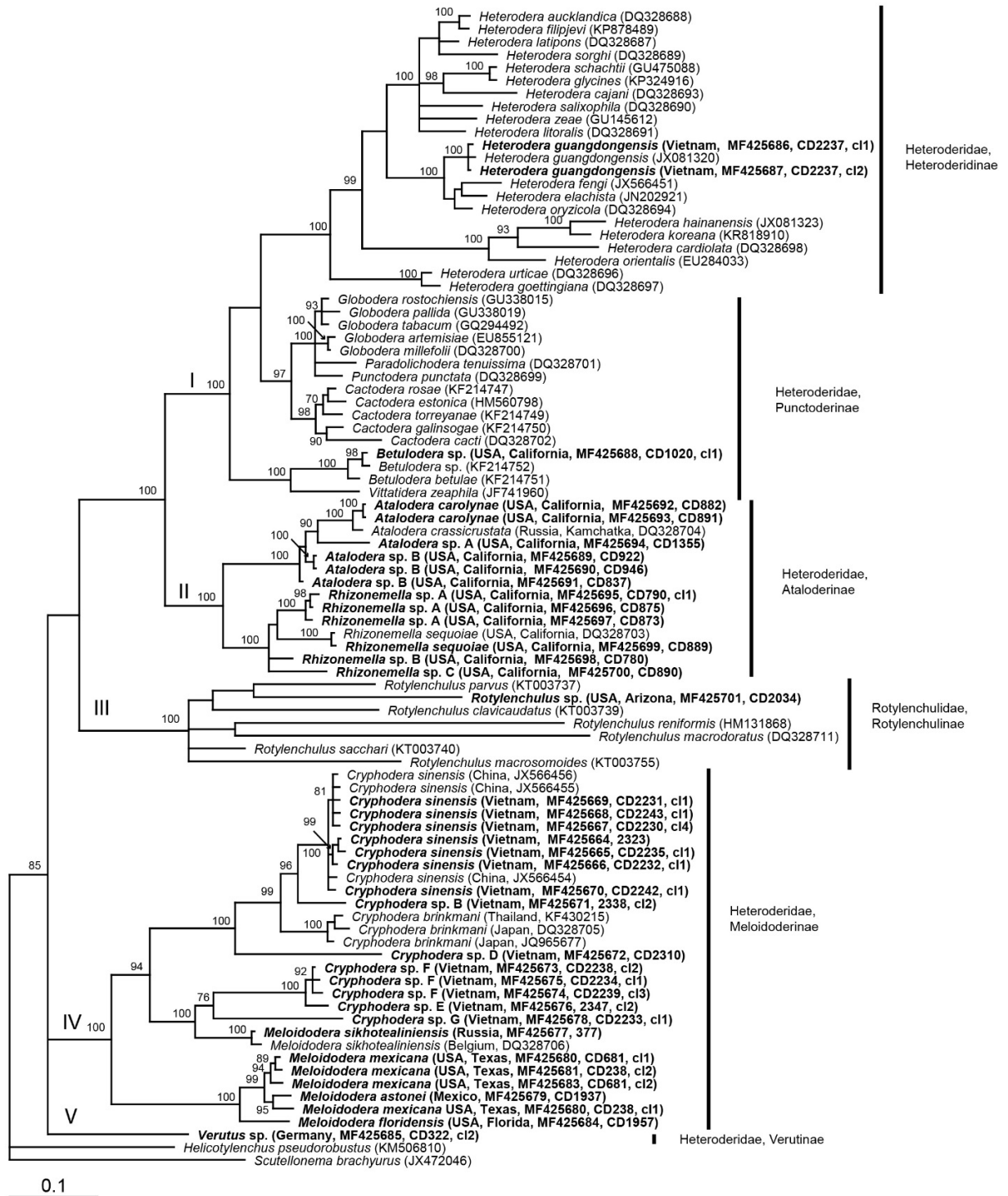


Рисунок 5.2. Филогенетические взаимоотношения внутри Heteroderidae: Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа выравнивания последовательностей D2-D3 28S рРНК гена по модели GTR + I + G. Апостериорные вероятности, равные или более 70%, приведены для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом.

Meloidodera sikhotealiniensis с российского Дальнего Востока была также сгруппирована с нематодой, ранее идентифицированной нами как *M. alni* из Бельгии (AF274419), и их последовательности отличались на 1,3% (9 п.н.). *Meloidodera astonei* из

Мексики была сгруппирована с образцами *M. mexicana* из США, Техаса, и их последовательности отличались на 7,0-7,8% (39-41 п.н.). Внутривидовые вариации между последовательностями для *Cryphodera brinkmani* были в 1,6-3,6% (11-15 п.н.), *C. sinensis* – 0,4-2,8% (3-18 п.н.), *Rhizonemella* sp. A. – 0-1,5% (0-10 п.н.). Межвидовые различия между *A. carolynae* и *A. crassicrustata* составляли 1% (6 п.н.), *Rhizonemella sequoiae* и *Rhizonemella* sp. A различались на 9,7-10% (62-64 п.н.).

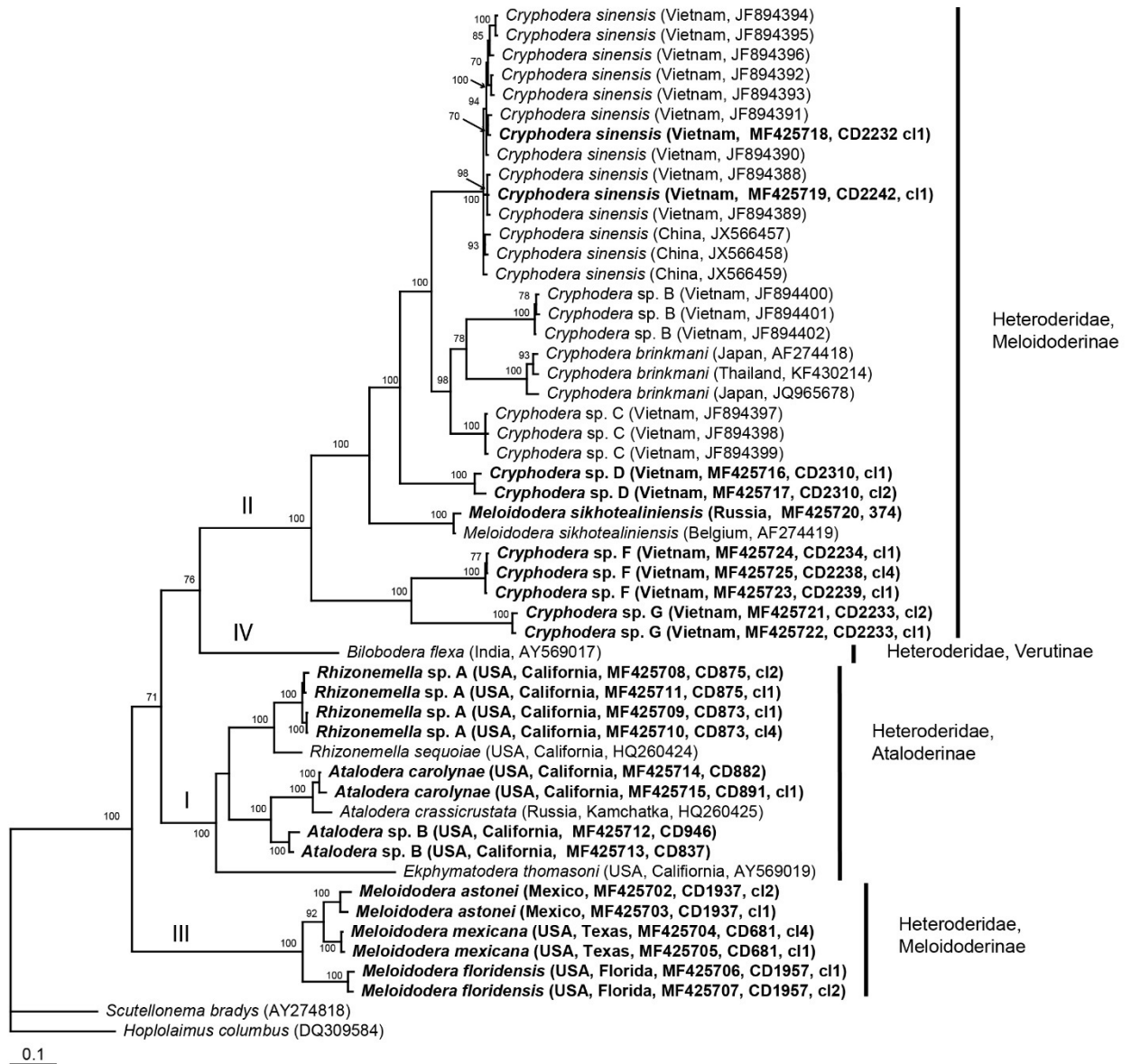


Рисунок 5.3. Филогенетические взаимоотношения внутри Heteroderidae: Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа выравнивания последовательности ВТС рПНК ген по модели GTR + I + G. Апостериорные вероятности, равные или более 70%, приведены для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом.

5.2.3. COI ген

Выравнивание имело длину в 472 п.н. и содержало 32 последовательности, включая две последовательности *Rotylenchus*, используемые в качестве внешних групп. Двадцать семь новых последовательностей COI гена были получены в настоящем исследовании. Филогенетические отношения внутри Heteroderidae, полученные в результате анализа этих частичных последовательностей генов COI, представлены на Рисунке 5.4. Полученное филогенетическое дерево содержало три основные клады с высокой степенью поддержки (АП = 92-100): i) Ataloderinae; ii) Punctoderinae и Heteroderinae; iii) Meloidoderinae.

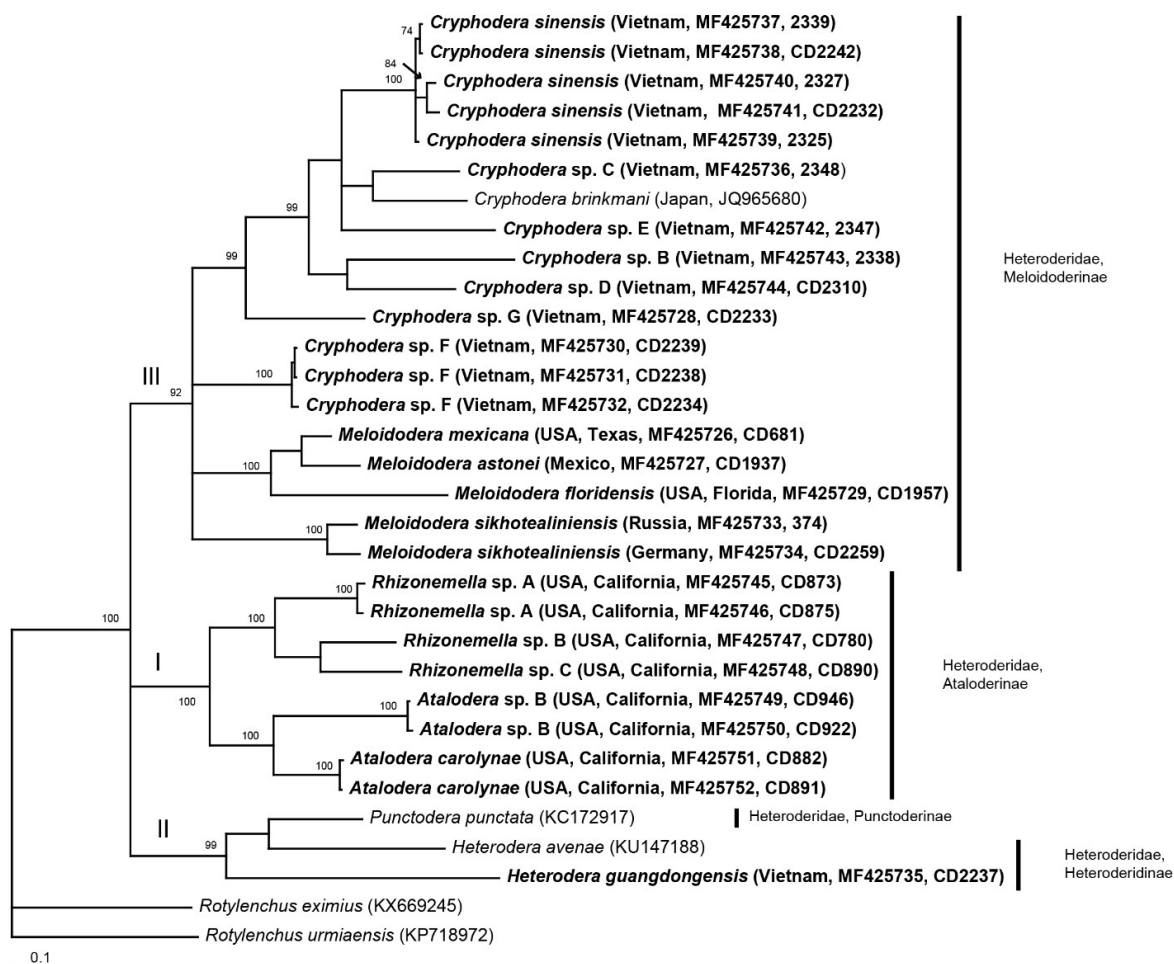


Рисунок 5.4. Филогенетические взаимоотношения внутри Heteroderidae: Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа выравнивания последовательности мтДНК COI гена по модели GTR + I + G. Апостериорные вероятности, равные или более 70%, приведены для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом

Meloidodera sikhotealiniensis с российского Дальнего Востока была сгруппирована с *M. alni* из Германии, и их последовательности отличались на 6,6% (29 п.н.). *Meloidodera astonei* из Мексики образовывала кластер с *M. mexicana* из Техаса, США, и их последовательности отличались на 8,1% (38 п.н.). Внутривидовые вариации для *C. sinensis*

были 0-2,7% (0-13 п.н.). Межвидовые различия между *Cryphodera brinkmani* и *Cryphodera* sp. C – 11,5% (48 п.н.); *Rhizonemella* sp. B и *Rhizonemella* sp. C – 10,8% (51 п.н.).

5.3. Комбинированное выравнивание и конденсное дерево

Выравнивание включало 36 последовательностей и составляло 2078 п.н. в длину. Конденсное филогенетическое дерево с АП более 80% представлено на Рисунке 5.5. Дерево состояло из шести основных клад: i) Rotylenchulidae; ii) *Verutus* sp.; iii) *Bilobodera flexa*; iv) *Meloidodera* и *Cryphodera*; v) *Atalodera* и *Rhizonemella*; vi) *Ekphymatodera thomasoni* с цистообразующими нематодами. Клады *Atalodera* и *Rhizonemella* были сгруппированы с кладой *E. thomasoni* и цистообразующими нематодами.

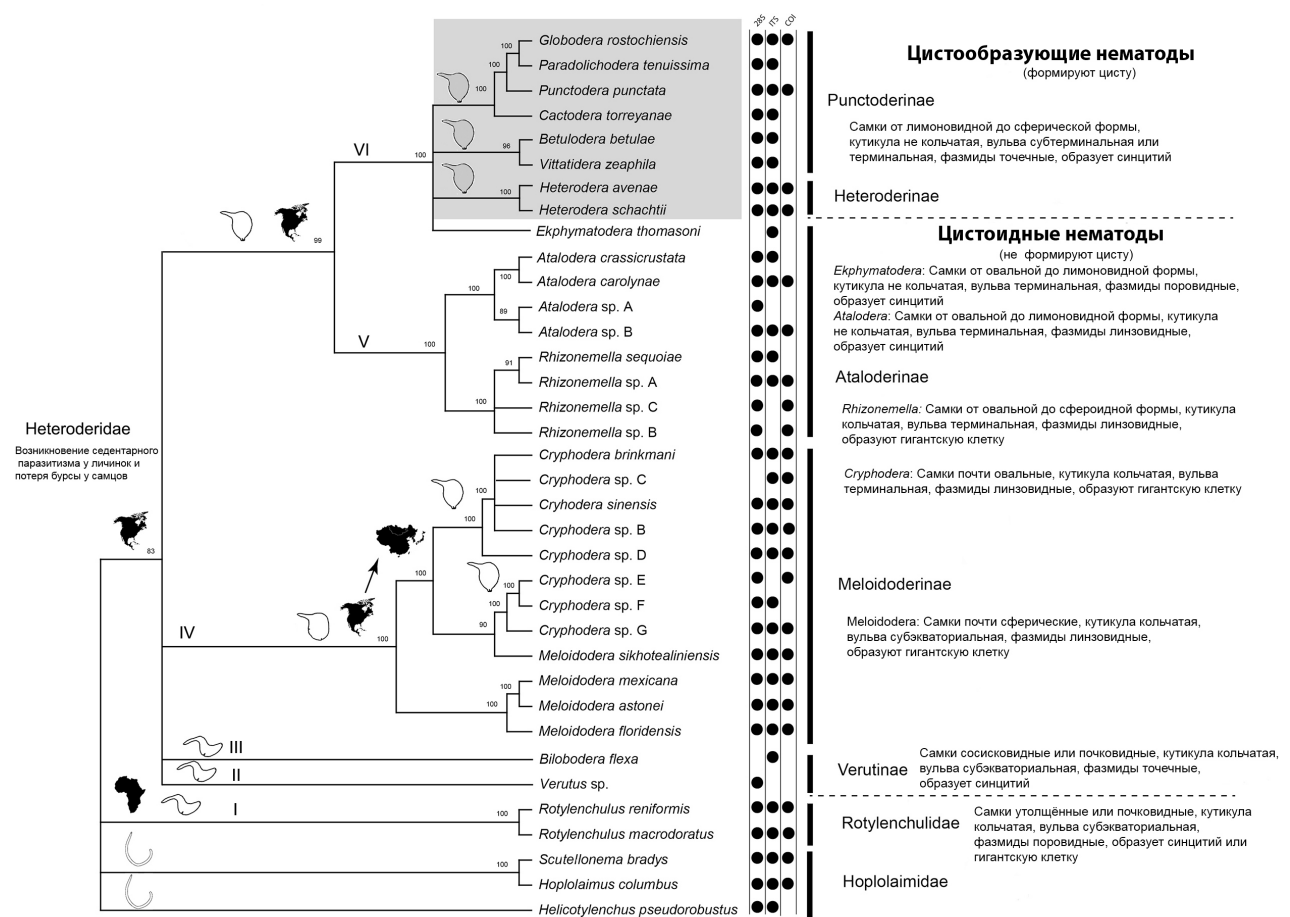


Рисунок 5.5. Филогенетические взаимоотношения внутри Heteroderidae. Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа выравнивания последовательностей, содержащих фрагменты трех генов, по модели GTR + I + G. Апостериорные вероятности, равные или превышающие 80%, приведены для соответствующих клад. Для некоторых клад дано картирование географических регионов (Африка, Северная Америка и Восточная Азия), формы женского тела и краткий таксономический диагноз. Также представлены фрагменты генов (частичная 28S рРНК, ВТС и частичная COI), включенные в набор данных для каждого таксона.

5.4. Синонимизация *M. alni* с *M. sikhotealiniensis*

Учитывая тот факт, что различия в последовательностях COI и ВТС рРНК генов между *M. sikhotealiniensis* и *M. alni* были невелики и находятся в пределах диапазона внутривидовых изменений, а различия в морфологических и морфометрических признаках, используемые для дифференциации этих видов, были незначительны и они паразитировали на сходных растениях-хозяевах, мы предложили рассматривать *M. alni* как младший синоним *M. sikhotealiniensis*.

5.5. Новые находки и роды цистоидных нематод

В настоящее время род *Cryphodera* содержит семь валидных видов, три из которых встречаются в Азии: *C. kalesari* Ваяж, Walia, Dabur & Bhatti, 1989 (Индия), *C. brinkmani* (Япония, Таиланд) и *C. sinensis* (Китай, Вьетнам), один из Австралии: *C. eucalypti* Colbran, 1966 и три из Новой Зеландии: *C. podocarpi* (Wouts, 1973) Luc, Taylor & Cadet, 1978, *C. nothophagi* (Wouts, 1973) Luc, Taylor & Cadet, 1978, *C. coxi* (Wouts, 1973) Luc, Taylor & Cadet, 1978. После анализа образцов седентарных нематод из Вьетнама и изучения морфометрии личинок второй стадии Nguyen *et al.* (2011) пришли к выводу, что по крайней мере пять видов *Cryphodera* может присутствовать в изученных материалах. В нашем исследовании мы повторно проанализировали результаты Nguyen *et al.* (2011) и вместе с новыми образцами определили семь видов рода *Cryphodera*. *Cryphodera sinensis* был идентифицирован в большинстве образцов, а шесть изолятов *Cryphodera* мы рассматриваем как предполагаемые новые виды.

Род *Rhizonemella* содержит только один вид, *R. sequoiae*, описанный Cid del Prado Vera *et al.* (1983) из корней красного дерева *Sequoia sempervirens* у озера Лагунитас, округ Марин, Калифорния, США. Эти авторы сообщили, что в том же месте зрелые самки были также обнаружены, но в меньшем количестве: на дубе (*Lithocarpus densiflora*), *Umbellularia californica* и мадроне (*Arbutus menziesii*). Интересно отметить, что наш молекулярный анализ выявил предполагаемый новый вид – *Rhizonemella* sp. А, паразитирующий на неизвестном дереве, расположенном в нескольких сотнях метров от типового места заражения *R. sequoiae*. Кроме того, два предполагаемых новых вида *Rhizonemella* sp. (В и С) были также обнаружены нами в Северной Калифорнии.

Два валидных вида: *Atalodera crassicrustata* из Камчатки, Россия и *A. carolynae*, а также два неопределенных вида из Калифорнии были включены в настоящее исследование. *Atalodera crassicrustata* и *A. carolynae* оказались родственными таксонами и показали только

1% различий для обеих рРНК генов, что находится в пределах внутривидового варибельного диапазона для этой группы нематод. Однако эти виды можно четко дифференцировать по некоторым морфометрическими измерениями, включая длину стилета у личинки второй стадии (Bernard, 1981; Ерошенко и Волкова, 2005).

В этом исследовании мы сравнили последовательности рРНК гена для *M. sikhotealiniensis* с последовательностями, идентифицированными и ранее опубликованными нами вида *M. alni* (Subbotin *et al.* 2001, 2006). *Meloidodera sikhotealiniensis* был описан Ерошенко (1978) из корней *Betula mandshurica* в Приморском крае России. Этот вид был также обнаружен в нескольких других местах на Дальнем Востоке, в том числе на *Spiraea salicifolia*, *Ulmus japonica*, *Coryllus* sp., *Populus* sp. и *Chosenia arbutifolia* (Ерошенко, 1978; Ерошенко & Волкова, 2005; Волкова и Казаченко, 2010). Siddiqi (1986, 2000) рассматривал *M. sikhotealiniensis* как невалидный вид (*species inquirendum*). Другой вид, *M. alni*, был описан Туркиной и Чижовым (1986) из *Alnus incana* в Московской области, и позднее был обнаружен во многих регионах России и Европы на видах родов *Betula*, *Populus* и *Alnus*. *Meloidodera alni* отличается от *M. sikhotealiniensis* по круговой форме влагалищной области и расстоянию отверстия протока дорсальной пищеводной железы и от основания стилета (DGO) у самок, по расположению гемизонида у самцов и отношению длины гиалиновой зоны хвоста к длине хвоста у личинок второй стадии (Туркина и Чижов, 1986). Учитывая тот факт, что эти морфологические признаки имеют незначительное таксономическое значение для Heteroderidae, а спектры растений-хозяев для этих видов перекрываются, и что различия между последовательностями этих видов находятся в пределах диапазонов внутривидовых вариаций, мы предлагаем рассматривать *M. alni* как младший синоним *M. sikhotealiniensis*. Таким образом, географический ареал для *M. sikhotealiniensis* может быть распространен с российского Дальнего Востока до Западной Европы. Мы полагаем, что недавно обнаруженная, но неопределенная *Meloidodera* из ризосферы тополя и березы в Томске (Антропова и Карташев, 2016) скорее всего является видом *M. sikhotealiniensis*.

На филогенетических деревьях вид *M. astonei* демонстрирует тесную родственную связь с *M. mexicana*. На D2-D3 28S рРНК гена этот вид образует кластер с *M. mexicana*, вероятно, из-за анцестрального полиморфизма этого гена. Наши результаты анализа последовательностей ВТС и COI генов показывают четкое разделение между этими видами. *Meloidodera astonei* сходна с *M. mexicana*, но отличается незначительными таксономическими морфологическими признаками, включая форму хвоста и число колец в области губ у личинок (Cid del Prado Vera & Rowe, 2000). Мы сохраняем *M. astonei* в качестве валидного вида, хотя его таксономический статус должен быть тщательно проверен с включением

дополнительных представителей рода *Meloidodera*. Другой вид *Meloidodera floridensis* хорошо дифференцируется от всех видов *Meloidodera* на всех филогенетических деревьях.

5.6. Филогения седентарных цистоидных нематод

В этом исследовании мы впервые представляем филогенетический анализ семейств Heteroderidae и Rotylenchulidae. С использованием комбинированного набора данных в нашей работе подсемейство Verutinae, с двумя родами *Bilobodera* и *Verutus*, было сгруппировано с представителями семейства Heteroderidae, и, таким образом, наши исследования подтверждают мнение нескольких авторов (Wouts, 1985; Luc *et al.*, 1988; Baldwin & Mundo-Ocampo, 1991; Andrásy, 2007), предполагающих, что подсемейство Verutinae следует рассматривать в пределах Heteroderidae, а не в составе семейства Rotylenchulidae. Представители подсемейства Verutinae имеют морфологические и биологические характеристики, частично принадлежащие видам как из семейства Heteroderidae, так и из семейства Rotylenchulidae. Esser (1981) предложил включить типовой вид *V. volvingentis* в новое подсемейство Verutinae семейства Heteroderidae. Эта классификация была принята многими таксономистами, включая Otham и Baldwin (1985), Luc *et al.* (1988), Baldwin *et al.* (1989), Sturhan (2018). Другие таксономисты, такие как Siddiqi (1986, 2000), Decraemer & Hunt (2013), не поддержали эту точку зрения и включили подсемейство Verutinae в семейство Rotylenchulidae. В своем дополнительном исследовании (Subbotin *et al.*, 2018) мы включили три вида рода *Verutus* и один неописанный род из этого подсемейства в молекулярный анализ. Представители Verutinae располагались в составе клады Heteroderidae на большинстве деревьев (Рисунки 5.6 и 5.7).

Молекулярный анализ показал, что семейство Ataloderinae группируется в сестринскую кладу с цистообразующими нематодами. Конденсное дерево также показало, что вид *Ekphymatodera thomasoni* сгруппирован с цистообразующими нематодами, что делает подсемейство Ataloderinae парафилетическим. Тесная связь *E. thomasoni* и *B. betulae* была также ранее отмечена Ferris *et al.* (2004) при анализе последовательностей рРНК генов. Интересно заметить, что некоторые морфологические признаки *E. thomasoni* аналогичны тем, которые обнаруживаются у некоторых цистообразующих нематод. Например, это слияние губ с губным диском, наличие выпуклых спикул и поровидных фазмид. Изучив ультраструктуру сперматозоидов у *E. thomasoni*, Cares и Baldwin (1994) предположили, что сперматозоиды этого вида больше напоминают по количеству филоподий, наличию корковых микротрубочек и фиброзных тел сперматозоиды цистообразующих нематод, чем сперматозоиды любых других уже исследованных цистоидных Heteroderidae. Baldwin *et al.* (1989) предположили, что

род *Ekphymatodera* может происходить от общих предков сарисодерин и аталодерин. Baldwin и Schouest (1990) также поместили *Hylonema* и *Ekphymatodera* в отдельную трибу Hylonemini. Результаты, полученные в нашем исследовании, основаны на анализе только одного гена у *Ekphymatodera*, и мы полагаем, что необходимо провести дополнительные молекулярные исследования родственных таксонов с большим количеством генов, чтобы подтвердить положение этого рода в семействе Heteroderidae. Мы также не можем исключить возможность того, что подсемейство Ataloderinae нуждается в ревизии и необходимо выделить новое подсемейство для вида *E. thomasoni*.

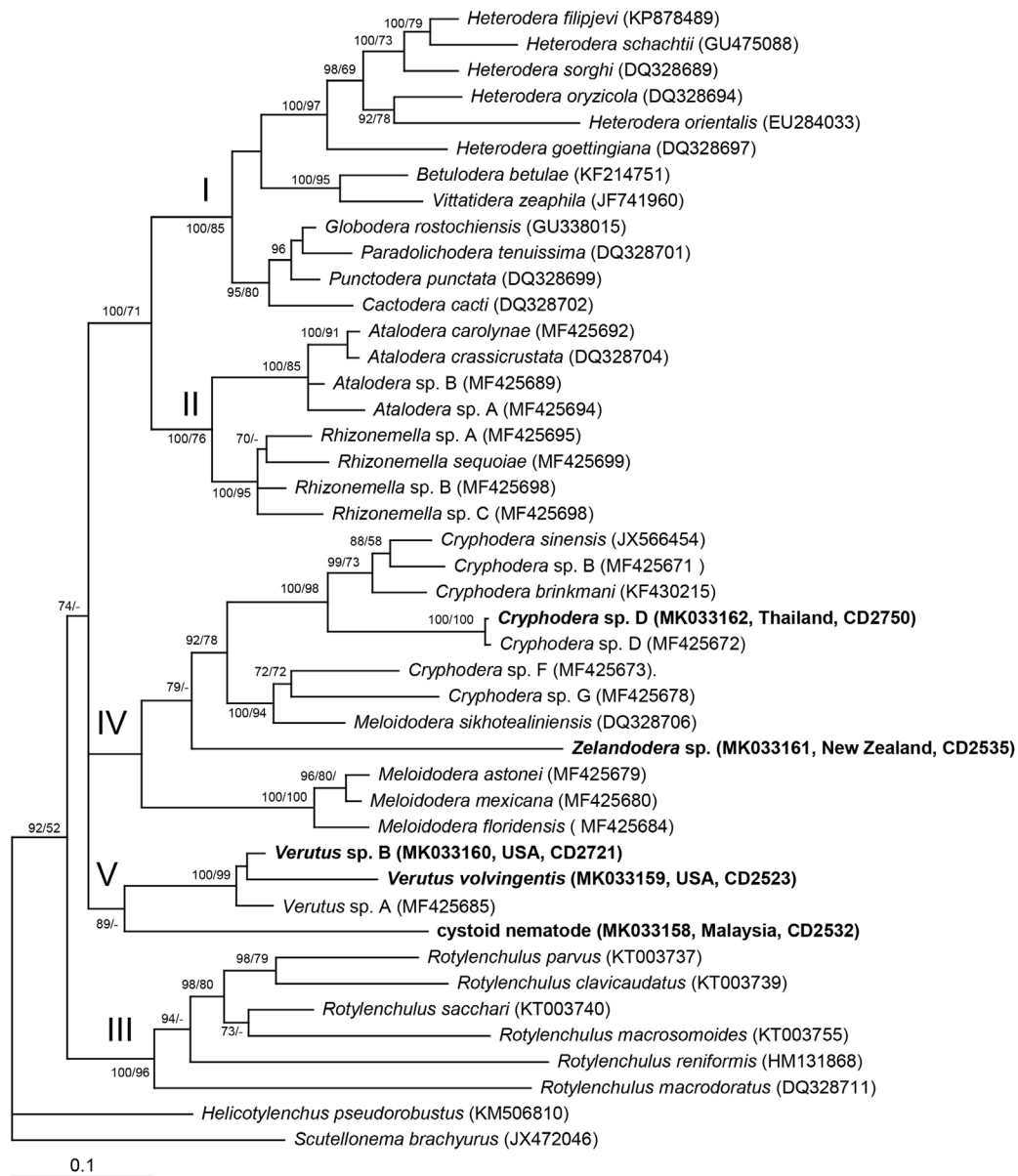


Рисунок 5.6. Филогенетические взаимоотношения внутри Heteroderidae: Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа выравнивания последовательности D2-D3 28S рРНК гена по модели GTR + I + G. Апостериорные вероятности, равные или более 70%, приведены для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом.

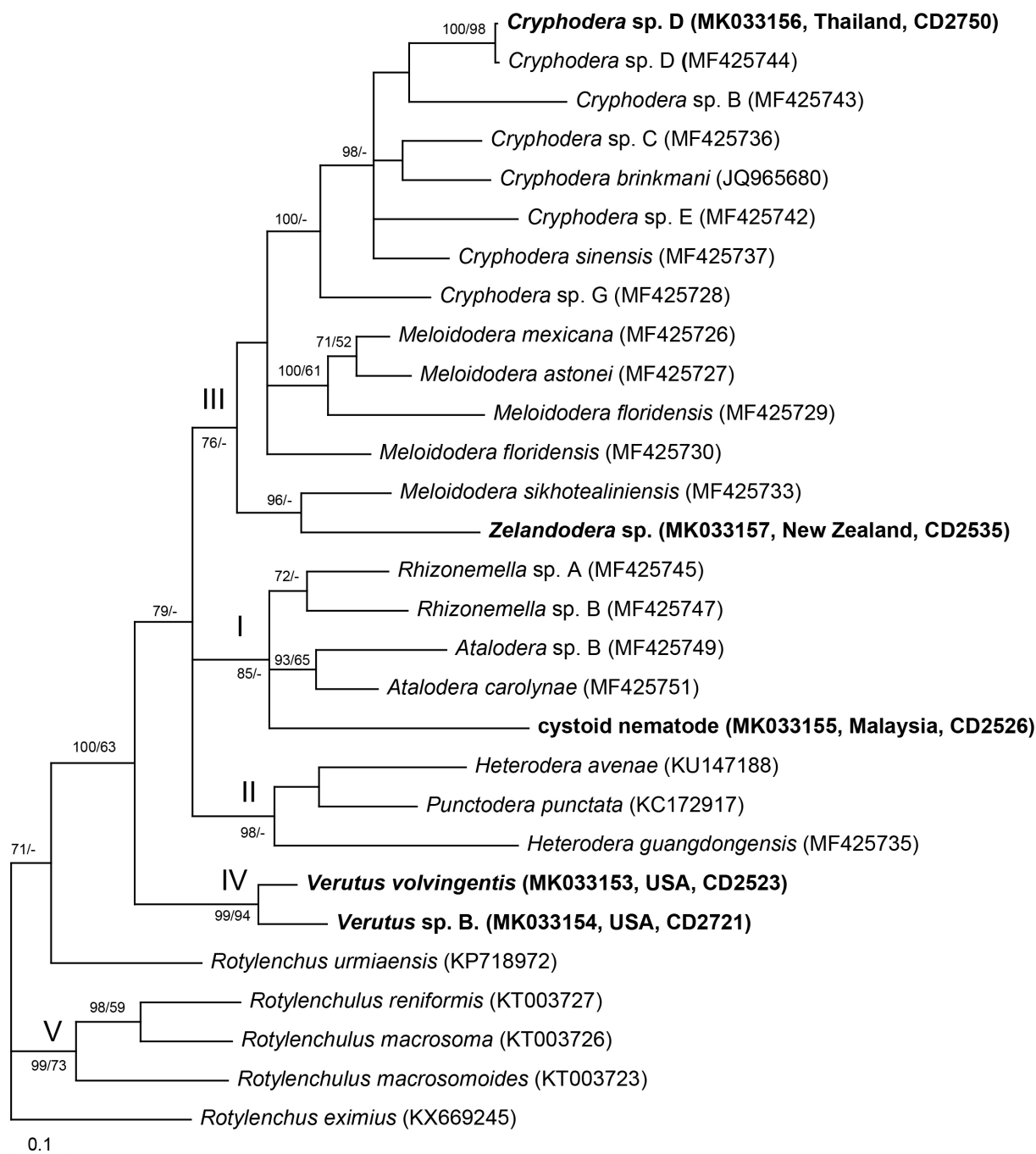


Рисунок 5.7. Филогенетические взаимоотношения внутри Heteroderidae: Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа выравнивания последовательности мтДНК COI гена по модели GTR + I + G. Апостериорные вероятности, равные или более 70%, приведены для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом.

Наш филогенетический анализ подтвердил положение родов *Atalodera* и *Rhizonemella* в подсемействе Ataloderinae. Согласно молекулярным результатам, род *Cryphodera* следует рассматривать в подсемействе Meloidoderinae, а не в подсемействе Ataloderinae. Несколько авторов уже подчеркивали тесную связь между *Meloidodera* и *Cryphodera* (Wouts, 1973; Кралль и Кралль, 1978). Wouts (1973) поместил эти роды в подсемейство Meloidoderinae и предположил, что *Cryphodera*, вероятно, эволюционировала от предков *Meloidodera*, у

которых произошло смещение вульвы в терминальное положение (Wouts & Sher, 1971). Sturhan (2016) выявил, что фазмиды у самцов, по-видимому, отсутствуют у всех видах родов подсемействам Heteroderinae и Ataloderinae, но присутствуют в родах *Cryphodera* и *Meloidodera* подсемейства Meloidoderinae. Тесные родственные связи между этими родами подтверждаются нашим молекулярным анализом. Однако некоторые результаты нашего исследования указывали, что род *Meloidodera* может быть не монофилетическим, поскольку его представители были распределены между двух клад. Первая клада на наших деревьях включает *M. sikhotealiniensis* из Азии и Европы и *Cryphodera* spp. из Азии, а вторая клада содержит *M. astonei*, *M. floridensis* и *M. mexicana*, которые являются североамериканскими видами. Исследования изменчивости структуры фазмидов и области губ у личинок и самцов также привели Baldwin (1986) к выводу, что *Meloidodera* может быть полифилетическим родом. Рассмотрев структуру кончиков мужских спикул и фазмид у личинок, Штурхан (лич. сообщение) пришел к выводу, что этот род может быть также парафилетическим. Однако МЛ тестирование, проведенное нами с использованием последовательностей трех генов и с включением нами секвенированного представителя рода *Zelandodera*, не дает оснований в настоящее время рассматривать род *Meloidodera* как парафилетический (Subbotin *et al.*, 2018).

Цистоидная нематода из Новой Зеландии была предварительно морфологически идентифицирована Дитером Штурханом как *Cryphodera* sp., но в нашем исследовании она была определена как представитель рода *Zelandodera*, близкий к роду *Cryphodera*. Wouts (1973) предложил род *Zelandodera* и дифференцировал его от *Cryphodera* на основании различий в положении ануса у самок, наличия менее выраженных влагалищных губ, большего количества губных колец (4-5 против 3) у личинок второй стадии и наличием самцов с большим количеством инцизур в боковом поле (4 против 3). Luc *et al.* (1978) сочли эти различия недостаточными для обоснования нового рода и синонимизировали *Zelandodera* с *Cryphodera*. Эта синонимия была поддержана Siddiqi (1996, 2000), но не была принята Wouts (1985) и Краллем (1989). Sturhan (2018) также не признал род *Zelandodera* как отдельный таксон, но выделил группу видов *Zelandodera* в пределах рода *Cryphodera*. Наш молекулярный анализ показывает, что *Zelandodera* представляет отдельную эволюционную линию внутри Meloidoderinae, и, таким образом, этот род имеет право на существование.

В нашем исследовании мы провели картирование нескольких биологических и морфологических признаков на молекулярном филогенетическом дереве, что позволяет оценить некоторые эволюционные изменения у цистоидных нематод. Распределение признаков у цистоидных нематод, таких как тип питающей клетки (гигантская клетка или синцитий), индуцированной у хозяина, и наличие кольчатости у самок (присутствует или отсутствует), по-видимому, являются мозаичными, в то время как серия трансформаций в

расположении вульвы от субэкваториального до терминального может быть более информативным признаком для интерпретации фенотипической эволюции.

5.7. Филогеография

Мы полагаем, что Северная Америка является, скорее всего, основным центром происхождения цистоидных нематод. Из 12 родов цистоидных нематод, рассмотренных в настоящей работе, представители семи родов: *Atalodera* (семь видов), *Bellodera* (один вид), *Ekphymatodera* (один вид), *Meloidodera* (семь видов), *Rhizonemella* (один валидный и три неописанных вида), *Sarisodera* (один вид) и *Verutus* (два вида) – встречаются в Северной Америке; пять родов: *Atalodera* (один вид), *Bilobodera* (два вида), *Camelodera* (один вид), *Cryphodera* (три валидных и шесть неопределенных видов) и *Meloidodera* (три вида) – встречаются в Азии; два рода: *Meloidodera* (один вид) и *Verutus* (один неописанный вид) – встречаются в Европе; один род *Zelandodera* (четыре вида) встречается в Австралии и Новой Зеландии; один род *Atalodera* (два вида) встречается в Южной Америке, и один род *Hylonema* (один вид) встречается в Африке. Анализ видового и генетического разнообразия позволил выявить локальные первичные центры разнообразия и происхождения для цистоидных нематод, которые совпадают с основными зонами мирового биоразнообразия: Мезоамерика с горами Сьерра-Мадре (Мексика) для *Meloidodera* и Флористическая Калифорнийская провинция с Сьерра-Невада и другими горами для аталодер и ризонемелл. Молекулярный анализ также выявляет прочные родственные связи между североамериканскими и азиатскими таксонами: *Atalodera carolynae* из Калифорнии и *A. crassicrustata* с Камчатки и североамериканскими мелойдодерами с азиатским *Cryphodera*, что свидетельствует о древнем распространении цистоидных нематод из Северной Америки в Азию. Важный вторичный центр происхождения и разнообразия цистоидных нематод может быть расположен в горах Северного Вьетнама и Южного Китая в зоне биоразнообразия Индо-Бирмы. Высокий уровень видового разнообразия *Cryphodera* вместе с наличием местных эндемиков и нескольких неописанных новых гетеродеридных родов (Nguyen *et al.*, 2011; Sturhan, личное сообщение) может указывать на относительно высокую скорость видообразования у данной группы нематод в этом регионе.

ГЛАВА 6. ДИАГНОСТИКА ЦИСТООБРАЗУЮЩИХ НЕМАТОД С ПОМОЩЬЮ ПЦР

6.1. ПЦР-ВТС-ПДРФ

Диагностика нематод на основе анализа их ПЦР-ПДРФ-ВТС рРНК гена имеет много преимуществ. Быстрота получения профилей и ясность результатов позволяют легко идентифицировать множество видов нематод. Кроме того, этот метод относительно простой в применении и достаточно дешевый. Он особенно подходит для определения карантинных нематод, где часто необходимо выполнить идентификацию на очень небольшом количестве образцов и где неправильная идентификация может иметь серьезные экономические последствия (Vrain & McNamara, 1994; Szalanski *et al.*, 1997). Однако, чтобы иметь возможность надежно применять этот метод в качестве рутинной диагностики для карантинных инспекций или служб защиты растений, необходимо создать каталог ПДРФ-ВТС профилей для широко распространенных видов нематод. Наше исследование подтверждает, что ПЦР-ВТС-ПДРФ позволяет четко дифференцировать важные для сельского хозяйства цистообразующие виды нематод друг от друга и от родственных им видов-двойников, не имеющих экономического значения.

6.1.1. Диагностика видов рода *Heterodera*

В нашем исследовании мы использовали праймеры TW81 и AB28 для амплификации ВТС рРНК гена для видов рода *Heterodera*. Большинство видов дали один ПЦР-амплифицированный продукт размером примерно 1060 п.н. Однако ампликон для вида *H. cyperi* был около 1100 п.н., а для *H. orydicola* – около 1010 п.н. Не обнаружили продукты от ПЦР в отрицательном контроле без ДНК. ПДРФ метод с использованием только семи рестрикционных ферментов (рестриктаз) позволил дифференцировать 21 вид цистообразующих нематод. В нашей монографии по цистообразующим нематодам приводится таблица с рестрикционными профилями для 45 видов цистообразующих нематод (Subbotin *et al.*, 2010).

Рестрикционные профили для всех изученных видов были получены после использования 23 из 26 рестриктаз. Рестриктазы *BamHI*, *HindIII* и *KpnI* не расщепляли продукты ПЦР. Ни одна рестриктаза не смогла генерировать такие профили, которые позволили бы различить все виды в этом исследовании, однако некоторые из них давали достаточно информативные картины. Например, рестриктаза *CfoI* (Рисунок 6.1G) дала

16 полиморфных профилей, позволяющих отличить 12 из 26 видов нематод. *AluI* (Рисунок 6.1А), *BsuRI* (Рисунок 6.1F), *BshI236I* (Рисунок 6.1С) и *ScrFI* (Рисунок 6.2F) каждый продуцировал по 15 полиморфных профилей и различал девять, десять, одиннадцать и девять видов нематод соответственно. Комбинация профилей, полученных с помощью семи отдельных рестриктаз, позволила дифференцировать большинство изученных видов.

В некоторых случаях сумма длины полученных рестрикционных фрагментов составляла менее 1060 п.н. Это может быть связано с получением нескольких фрагментов одинаковых размеров или/и фрагментов размером менее 100 п.н., которые были плохо различимы на агарозных гелях. Иногда сумма длин фрагмента была больше, чем длина нерасщепленного продукта. Повторное расщепление с удлинённым периодом инкубации рестриктазы позволяет предположить, что в геноме таких видов, вероятно, присутствует ВТС с гетерогенностью.

ПЦР-ВТС-ПДРФ метод позволил четко дифференцировать наиболее важные в сельском хозяйстве виды цистообразующих нематод друг от друга и от родственных и не важных для сельского хозяйства видов. Некоторые рестриктазы продуцировали профиль ПДРФ, специфичный для видовой группы. Например, профили, полученные после расщепления эндонуклеазами *AluI* (Рисунок 6.А), *BshI236I* (Рисунок 6.1С), *BsuRI* (Рисунок 6.1F), *DdeI* (Рисунок 6.1Н), *HinfI* (данные не показаны) и *EcoRI* (Рисунок 6.2А), позволяли дифференцировать виды группы *Schachtii* от всех других видов. Рестриктаза *EcoRI* расщепляла ПЦР продукт только видов из этой группы. *BglI* (данные не показаны), *BsiZI* (Рисунок 6.1D), *BspI43I* (Рисунок 6.1E), *BsuRI* (Рисунок 6.1F) и *PstI* (Рисунок 6.2D) отделяли виды группы *Goettingiana*, (*H. carotae*, *H. cruciferae*, *H. goettingiana* и *H. urticae*) от других видов. Некоторые рестриктазы оказались мало полезными для идентификации большого числа видов, но были чрезвычайно уникальными для дифференциации отдельных видов. *SspI* (данные не показаны), например, только расщеплял продукты ПЦР от *H. latipons* и *Meloidodera sikhotealinensis*. *BsiZI* (Рисунок 6.1D) и *DdeI* (Рисунок 6.1Н) расщепляли продукты у всех видов, кроме *H. litoralis*.

Европейские популяции *H. avenae* (тип А) легко дифференцировались от других видов рестриктазой *AluI* (Рисунок 6.1А), который расщеплял ПЦР продукты всех изученных нематод группы *Avenae*. Ни один из ферментов не позволил отличить европейские популяции *H. avenae* от *H. arenaria*. Вид *Heterodera filipjevi* можно легко отличить от всех других видов по картинам рестрикции *PstI* (Рисунок 6.2D), *BsuRI* (Рисунок 6.1F) и *TaqI* (Рисунок 6.2Н), которые дали уникальные ПДРФ профили для этого вида. *H. aucklandica* также дифференцировалась ферментом *CfoI* (Рисунок 6.1G) от других видов. *BshI236I* (Рисунок 6.1С), *CfoI* (Рисунок 6.1G) и *ScrFI* (Рисунок 6.2F) продуцировали уникальные профили для

H. ustinovii. *Heterodera latipons* дифференцировалась от других видов рестриктазами *AluI* (Рисунок 6.1А), *Bsh1236I* (Рисунок 6.1С), *BsuRI* (Рисунок 6.1F), *CfoI* (Рисунок 6.1G), *DdeI* (Рисунок 6.1H), *PvuII*, *RsaI* (Рисунок 6.2Е) и *SspI*. Вид *H. hordecalis* отличался по профилям рестрикции, полученных от *Bsh1236I* (Рисунок 6.1С), *BsuRI* (Рисунок 6.1F), *MvaI* (Рисунок 6.2С) и *ScrFI* (Рисунок 6.2F).

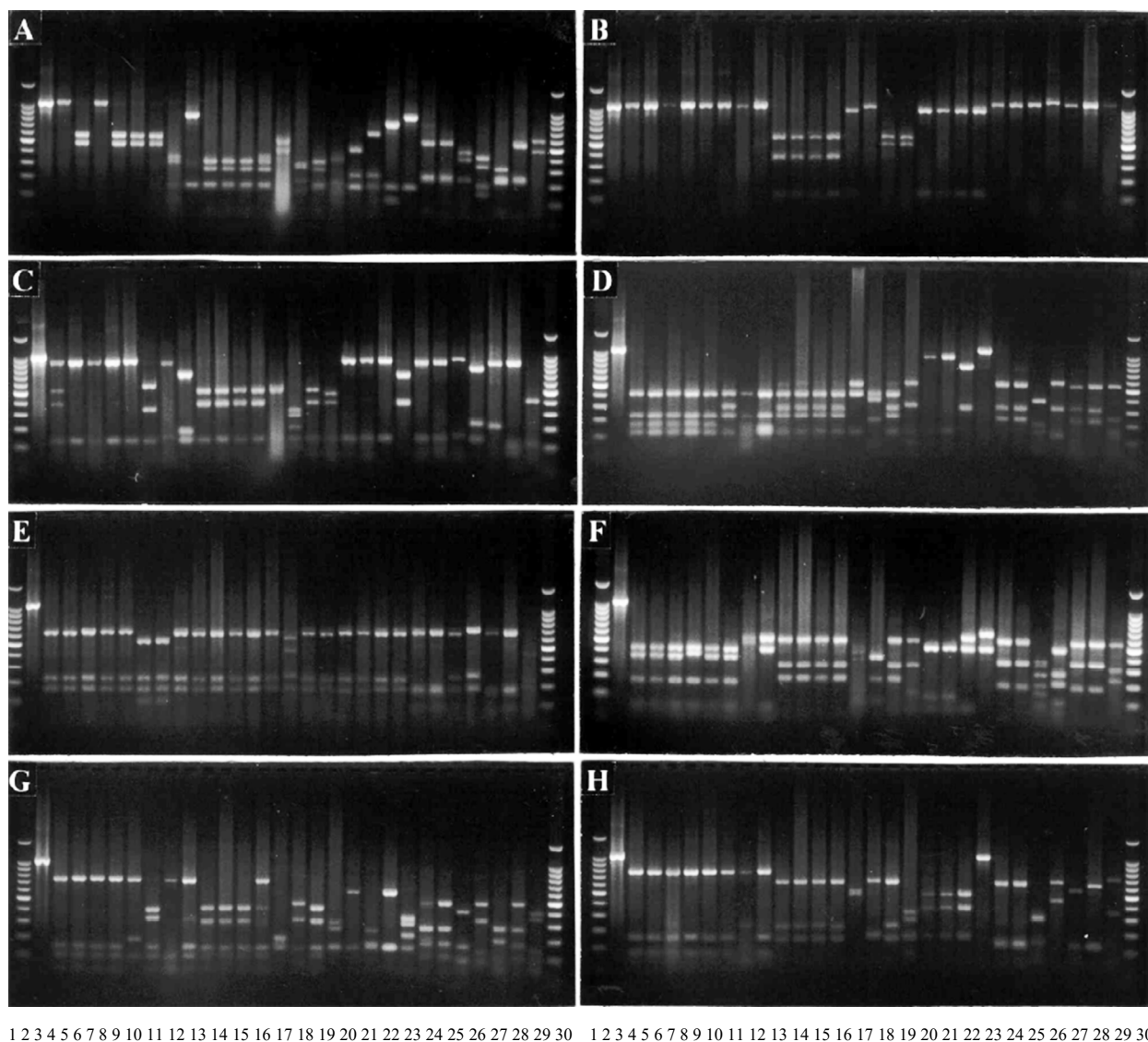


Рисунок 6.1. ПЦР-ВТС-ПДРФ. А: *AluI*; В: *AvaI*; С: *Bsh1236I*; D: *BsiZI*; Е: *Bsp143I*; F: *BsuRI*; G: *CfoI*; H: *DdeI*. Дорожки: 1 и 30 - 100 п.н. ДНК маркер, 2 - нерасщеплённый продукт, 3 - *H. avenae* (тип А), 4 - *H. avenae* (тип В), 5 - *H. arenaria*, 6 - *H. filipjevi*, 7 - *H. aucklandica*, 8 - *H. ustinovii*, 9 - *H. latipons*, 10 - *H. hordecalis*, 11 - *H. schachtii*, 12 - *H. trifolii*, 13 - *H. medicaginis*, 14 - *H. ciceri*, 15 - *H. salixophila*, 16 - *H. oryzicola*, 17 - *H. glycines*, 18 - *H. cajani*, 19 - *H. humuli*, 20 - *H. ripae*, 21 - *H. fici*, 22 - *H. litoralis*, 23 - *H. carotae*, 24 - *H. cruciferae*, 25 - *Heterodera* sp., 26 - *H. cyperi*, 27 - *H. goettingiana*, 28 - *H. urticae*, 29 - *Meloidodera sikhotealiniensis*.

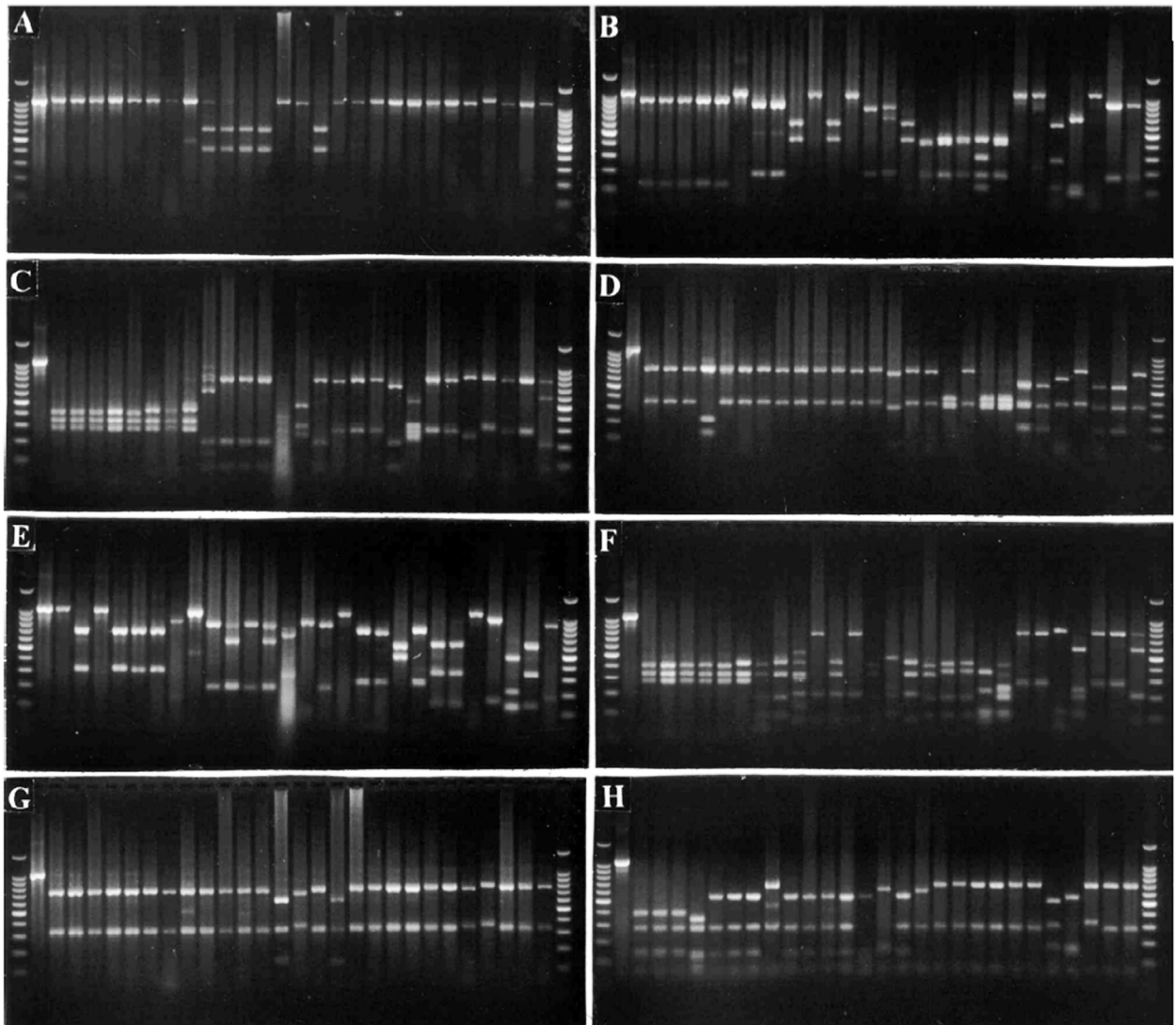
Рестриктазы *AluI*, *AvaI*, *CfoI*, *HpaII*, *MvaI*, *RsaI* и *ScrFI* отделили близкородственные и морфологически плохо различимые виды группы *Schachtii* (*H. schachtii*, *H. glycines*, *H. trifolii*, *H. medicaginis* и *H. ciceri*) друг от друга и всех других видов. *MvaI* (Рисунок 6.2С), *PvuII*, *RsaI* (Рисунки 6.2Е, 6.3) и *ScrFI* (Рисунок 6.2F) продуцировали уникальный профиль для

H. schachtii, который дифференцировал этот вид от всех других видов. Расщепления с помощью ферментов *MvaI*, *RsaI*, *HpaII* или *PvuII* не показали внутривидовой вариации в профилях рестрикции между тремя популяциями *H. schachtii* (Рисунок 6.3). Суммирование размеров фрагментов, полученных *MvaI* (Рисунок 6.2С, 3), *RsaI* (Рисунок 6.2Е, 3), *PvuII* (Рисунок 6.3) или *ScrFI* (Рисунок 6.2F), дало сумму более 1060 п.н., что указывало на гетерогенность ВТС гена у популяций *H. schachtii*. *Heterodera glycines*, другой вид из группы *Schachtii*, отличался от других видов, за исключением *H. cajani*, *AvaI* профилем (Рисунок 6.1В). *Heterodera cajani* может быть легко диагностирован среди других видов несколькими ферментами: *AluI* (Рисунок 6.1А), *BshI236I* (Рисунок 6.1С), *BsiZI* (Рисунок 6.1D), *BsuRI* (Рисунок 6.1F), *CfoI* (Рисунок 6.1G), *DdeI* (Рисунок 6.1H), *Hinfl*, *HpaII* (Рисунок 6.2В), *ScrFI* (Рисунок 6.2F), *TaqI* (Рисунок 6.2H) и *Tru9I*. Рестрикционная картина, полученная с помощью *CfoI* (Рисунок 6.1G), отличает *H. ciceri* от других видов. Гетерогенность области ВТС наблюдалась для *H. ciceri* при рестрикции *AluI* (Рисунок 6.1А), *CfoI* (Рисунок 6.1G), *RsaI* (Рисунок 6.2Е). Комбинации по крайней мере двух ферментов рестрикции отличали виды друг от друга внутри группы *Schachtii*. Например, рестриктаза *RsaI* (Рисунок 6.2Е) дифференцировала *H. trifolii* и *H. ciceri* от других видов, тогда как рестриктаза *CfoI* (Рисунок 6.1G) разделяла эти два вида. *H. medicaginis* отличался от других видов комбинацией трех ферментов: *HpaII* (Рисунок 6.2В), *MvaI* (Рисунок 6.2С) и *AvaI* (Рисунок 6.1В). Вид *H. salixophila* отличался от всех изученных видов ферментами *BshI236I* (Рисунок 6.1С), *BsiZI* (Рисунок 6.1D), *BsuRI* (Рисунок 6.1F), *CfoI* (Рисунок 6.1С), *DdeI* (Рисунок 6.1H), *Hinfl*, *TaqI* (Рисунок 6.2H) и *Tru9I*.

Heterodera humuli, *H. ripae* и *H. fici* дифференцировались от других видов и друг от друга с помощью рестриктазы *AluI* (Рисунок 6.1А). Три других фермента: *CfoI* (Рисунок 6.1G), *PstI* (Рисунок 6.2D) и *Tru9I* – диагностировали *H. humuli* от родственного вида *H. ripae*. *Heterodera litoralis* отличался от других видов с помощью рестриктаз *BshI236I* (Рисунок 6.1С), *BsiZI* (Рисунок 6.1D), *BsuRI* (Рисунок 6.1F), *CfoI* (Рисунок 6.1G), *DdeI* (Рисунок 6.1H), *MvaI* (Рисунок 6.2С), *RsaI* (Рисунок 6.2Е) и *ScrFI* (Рисунок 6.2F). Диагностика трех видов: *Heterodera humuli*, *H. ripae* и *H. vallicola* – с использованием 12 рестриктаз приводится в нашей работе (Eroshenko *et al.*, 2001).

Виды группы *Goettingiana* диагностировались несколькими ферментами. Рестриктаза *BshI236I* (Рисунок 6.1С) дифференцировала все виды, кроме *H. carotae* и *H. cruciferae*. Ни один из ферментов не позволил отделить эти два вида друг от друга. *Heterodera goettingiana* отличалась от других видов профилями ферментов *AluI* (Рисунок 6.1А), *BshI236I* (Рисунок 6.1С), *CfoI* (Рисунок 6.1G), *DdeI* (Рисунок 6.1H), *RsaI* (Рисунок 6.2Е), *TaqI* (Рисунок 6.2H) и *Tru9I* (Рисунок 6.4). *Heterodera urticae*, паразит крапивы во многих странах Западной Европы,

отличался от *H. carotae* и *H. cruciferae* профилями, продуцируемыми тремя рестриктазами: *Bsh1236I* (Рисунок 6.1С), *HpaII* (Рисунок 6.2В) и *Tru9I*. Рестриктаза *HpaII* четко дифференцировала *H. urticae* от этих двух видов, но не расщепляла ПЦР продукт *H. carotae* и *H. cruciferae*.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Рисунок 6.2. ПЦР-ВТС-ПДРФ. А: *EcoRI*; В: *HpaII*; С: *MvaI*; D: *PstI*; Е: *RsaI*; F: *ScrFI*; G: *SfuI*; H: *TaqI*. Дорожки: 1 и 30 – 100 п.н. ДНК маркер, 2 – нерасщеплённый продукт, 3 – *H. avenae* (тип А), 4 – *H. avenae* (тип В), 5 – *H. arenaria*, 6 – *H. filipjevi*, 7 – *H. aucklandica*, 8 – *H. ustinovi*, 9 – *H. latipons*, 10 – *H. hordecalis*, 11 – *H. schachtii*, 12 – *H. trifolii*, 13 – *H. medicaginis*, 14 – *H. ciceri*, 15 – *H. salixophila*, 16 – *H. oryzoicola*, 17 – *H. glycines*, 18 – *H. cajani*, 19 – *H. humuli*, 20 – *H. ripae*, 21 – *H. fici*, 22 – *H. litoralis*, 23 – *H. carotae*, 24 – *H. cruciferae*, 25 – *Heterodera* sp., 26 – *H. cyperi*, 27 – *H. goettingiana*, 28 – *H. urticae*, 29 – *Meloidodera sikhotealiniensis*.

Ампликоны, полученные от *H. oryzoicola* и *H. cyperi*, отличались от других видов по размеру. Расщепление различными ферментами обычно дает уникальные профили ПДРФ для этих двух видов (Рисунок 6.1).

Вариации в картинах рестрикции были обнаружены между популяциями некоторых видов. Рестриктазы *AhlI* (Рисунок 6.1А) и *RsaI* (Рисунок 6.2Е) дифференцировали европейские популяции *H. avenae* (тип А) от азиатских популяций (тип В). Эти ферменты частично расщепляли ВТС области трех французских популяций, что указывает на гетерогенность их рДНК (Subbotin *et al.*, 1997). Две популяции *H. salixophila*, одна из Бельгии и другая из Украины, различались по их рестрикционным профайлам. Две популяции *Meloidodera sikhotealiniensis* различались по профилю рестрикции рестриктазы *MvaI*.

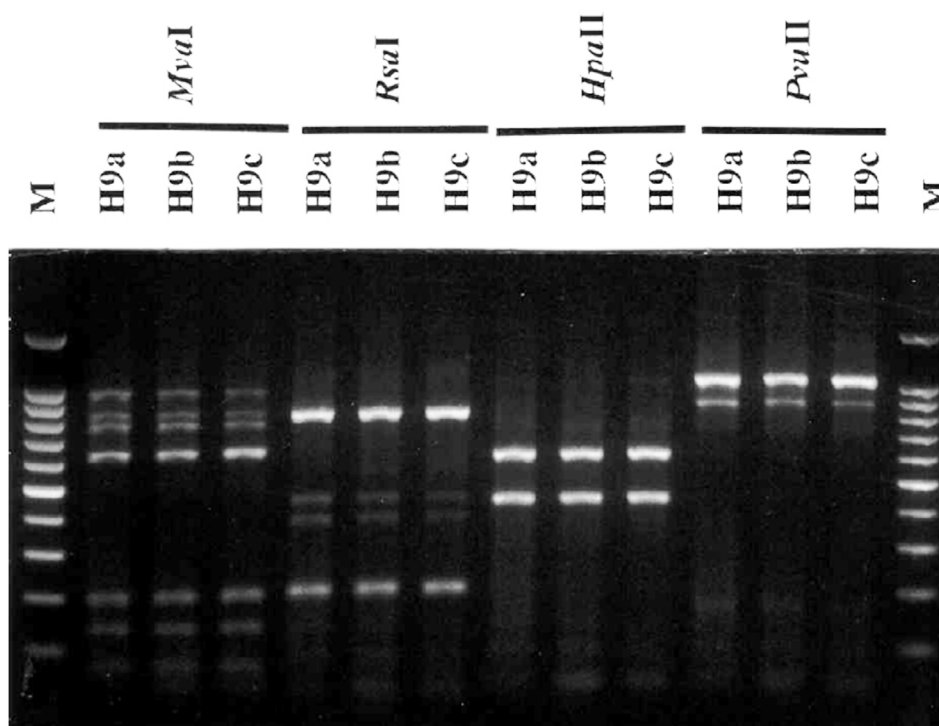


Рисунок 6.3. ПЦР-ВТС-ПДРФ для свекловичной цистообразующей нематоды.

6.1.2. Диагностика видов родов *Globodera* и *Cactodera*

В результате амплификации области гена ВТС рРНК праймерами TW81 и AB28 были получены отдельные ампликоны размером от 976 до 1013 п.н. в зависимости от вида. Диагностические профили ПЦР-ВТС-ПДРФ для видов *Globodera* и *Cactodera* приведены на Рисунках 6.4 и 6.5 соответственно. Приблизительные размеры рестрикционных фрагментов для видов из этих родов представлены в таблицах в нашей монографии по цистообразующим нематодам (Subbotin *et al.*, 2010).

Расщепление продуктов ПЦР-ВТС-рРНК одним из четырех рестриктаз (*BshI236I*, *HinfI*, *PstI* или *RsaI*) позволило различить несколько известных видов рода *Globodera* от еще не описанных. Например, рестриктаза *RsaI* может отличать группу популяций *G. pallida*

(подклада 1, см. Subbotin *et al.*, 2011), в настоящее время распространенных в Европе, Азии, Северной Америке и Океании, от южноамериканских групп *G. pallida* (подклады 3, 5, 6). Тем не менее ни один из этих используемых ферментов не может достоверно дифференцировать популяции *G. pallida* от *G. mexicana*. Виртуальное расщепление показывает, что фермент *SfaNI* может различать их, генерируя две полосы (690 п.н. и 290 п.н.) для *G. mexicana*, тогда как ампликон для популяций *G. pallida* (подклада 1) должен оставаться нерасщепленным.

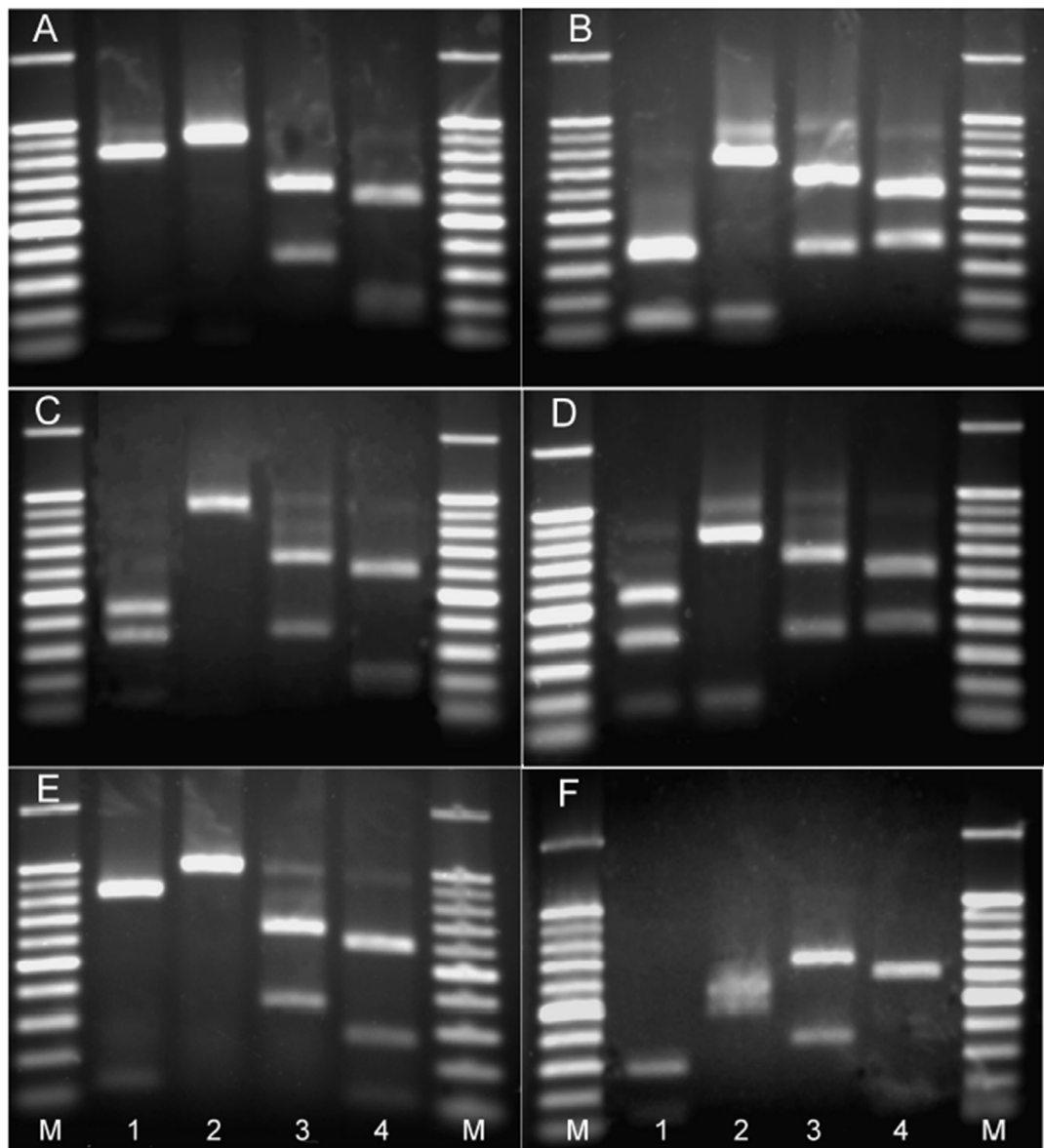


Рисунок 6.4. ПЦР-ВТС-ПДРФ для некоторых видов *Globodera*. А: *G. rostochiensis*; В: *G. pallida* (подклада 1); С: *G. tabacum*; D: *G. mexicana*; E: *G. artemisiae*; F: *G. zelandica*. Дорожки: М = 100 н. п. ДНК маркер; 1 = *Bsh1236I*; 2 = *HinfI*; 3 = *PstI*; 4 = *RsaI*.

Четыре рестриктазы (*Bsh1236I*, *HinfI*, *HpaII* и *PstI*) дифференцировали несколько видов *Cactodera* друг от друга, однако виды *C. rosae*, *C. salina* и *C. weissii* не отличались ни по одному из используемых ферментов (Рисунок 6.5). Из-за отсутствия достаточного количества

ПЦР продукта мы не смогли сделать расщепление для некоторых образцов. В таких случаях их диагностические профили были рассчитаны на *in silico* анализа. Такие результаты следует рассматривать как предварительные, и их необходимо проверить с помощью метода ПЦР-ПДРФ-ВТС рРНК.

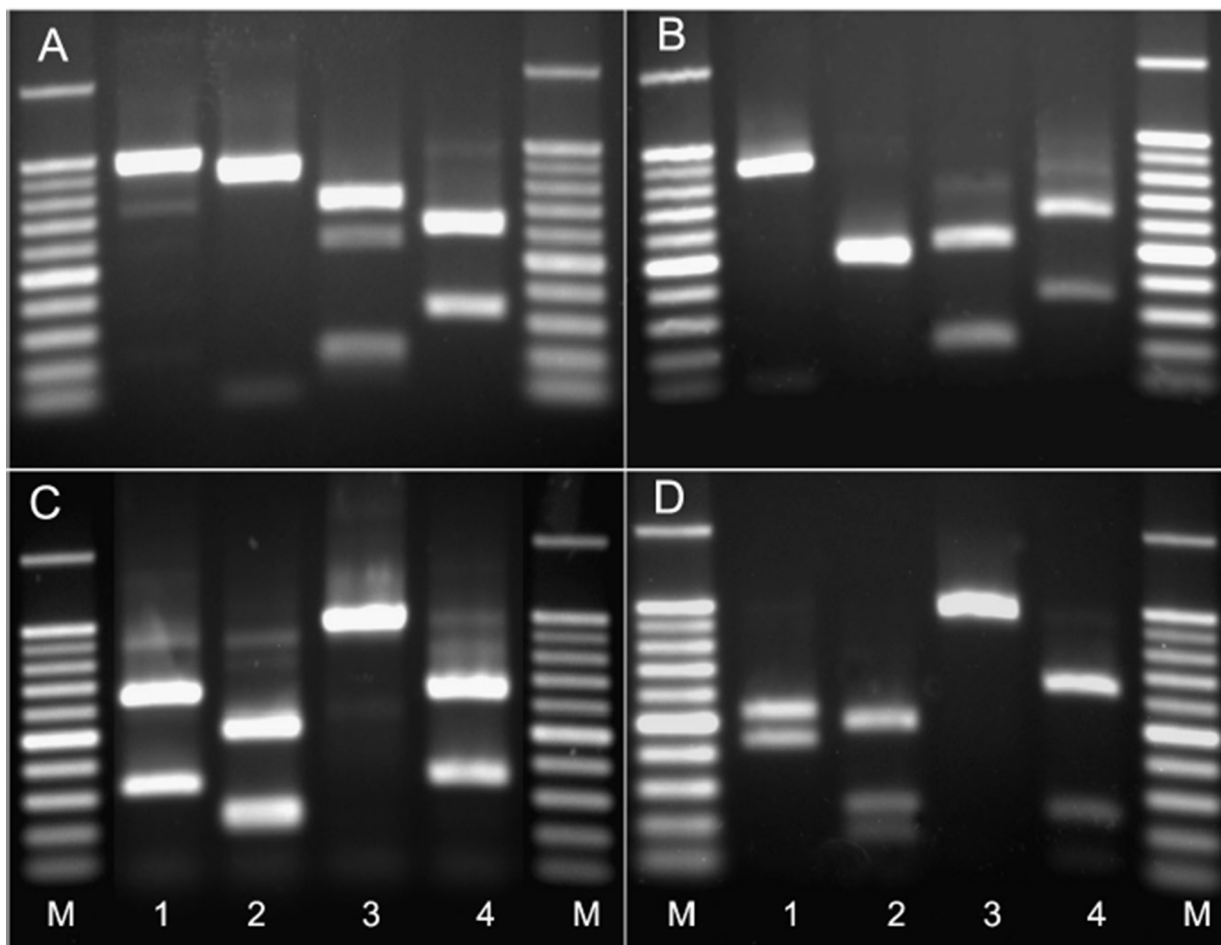


Рисунок 6.5. ПЦР-ВТС-ПДРФ для некоторых видов *Cactodera*. A: *C. galinsogae*; B: *C. rosae*; C: *C. cacti*; D: *Cactodera* sp. 1., Дорожки: M = 100 н. п. ДНК маркер; 1 = *Bsh1236I*; 2 = *HinfI*; 3 = *HpaI*; 4 = *PstI*.

6.2. Традиционная ПЦР с видоспецифическими праймерами

ПЦР со специфическими праймерами – это другой надежный метод диагностики, основанный на амплификации участка гена только у определенного вида нематод. В результате наших исследований мы разработали такую диагностику для свекловичной и соевой цистообразующих нематод. Эти результаты опубликованы в наших статьях: Subbotin *et al.* (2001), Amiri *et al.* (2002), Madani *et al.* (2005).

6.2.1. Диагностика свекловичной цистообразующей нематоды

Несколько опубликованных нами ДНК-последовательностей видов группы *H. schachtii* использованы при анализе и отборе предполагаемых видоспецифичных праймеров

(Рисунок 6.6). Несколько предполагаемых специфических праймеров для *H. schachtii* были сконструированы вручную на основании различий последовательностей.

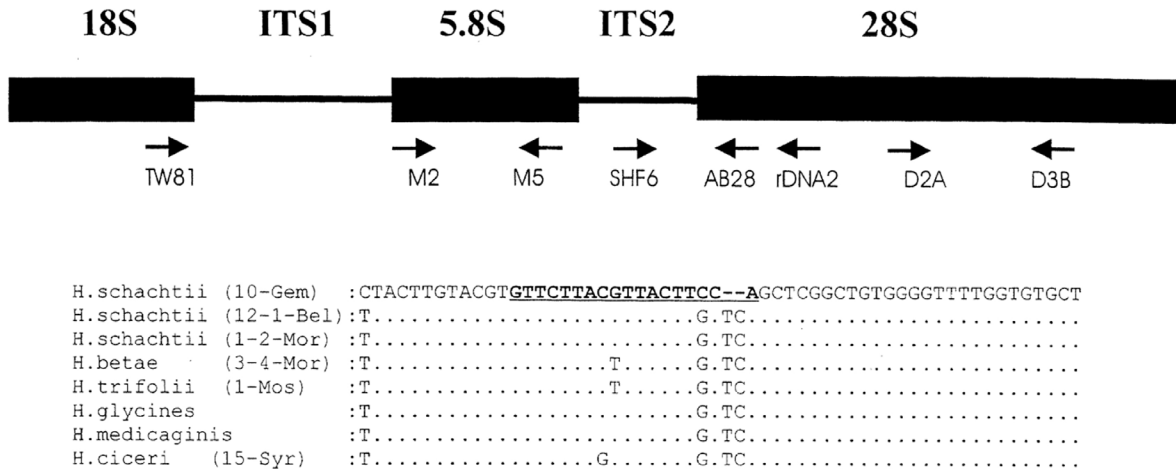


Рисунок 6.6. Положение праймеров, используемых в ПЦР, и выравнивание фрагмента последовательностей рРНК *Heterodera schachtii* и близкородственных видов. Выделенный и подчеркнутый участок указывает на последовательность видоспецифического праймера SHF6.

ДНК выделяли из одиночных цист. Концентрацию ДНК измеряли с помощью Pharmacia GeneQuant и затем разводили в стерильной воде. Два микролитра суспензии ДНК (36, 18, 9, 4,5, 2,3, 1,2 или 0,6 нг) добавляли в пробирку, содержащую 20 мкл смеси ПЦР с комбинацией праймеров. Концентрации видоспецифичных продуктов ПЦР оценивали на агарозном геле с маркером Lambda DNA / *HindIII* (Промега) с использованием системы визуализации Kodak Digital Science 1D. Каждую комбинацию разбавление/праймер исследовали в трех различных ПЦР.

Для разработки ПЦР диагностики *H. schachtii* мы использовали два набора праймеров. Первый набор включал видоспецифический праймер и универсальный праймер. На основе анализа различий ДНК-последовательностей между *H. schachtii*, *H. betae*, *H. trifolii*, *H. ciceri*, *H. glycines* и *H. medicaginis* (Рисунок 6.6) (Zheng *et al.*, 2000; Subbotin *et al.*, 2001b), где было обнаружено 14 уникальных нуклеотидных мутаций, мы вручную сконструировали несколько предполагаемых видоспецифичных праймеров. Тесты с двенадцатью выбранными предполагаемыми праймерами (данные не показаны) дали надежные результаты только с одним видоспецифическим праймером SHF6 (Таблица 1, Приложение). Этот праймер амплифицировал один гаплотип *H. schachtii*, который отсутствует в последовательностях родственных видов. Этот праймер был использован в дальнейших тестах в сочетании с праймерами AB28 или rDNA2 (Рисунок 6.6). Второй набор праймеров содержал универсальные праймеры D2A и D3B. Эти праймеры амплифицировали D2–D3 фрагмент 28S рРНК гена, и эта амплификация указывала на присутствие ДНК нематоды в образце. Результаты дуплексной ПЦР с этими двумя наборами праймеров представлены на

Рисунке 6.7. Комбинация праймеров SHF6 и AB28 или праймера rDNA2 амплифицировала фрагмент около 200 п.н. или около 255 п.н. соответственно. Фрагмент, амплифицированный универсальными праймерами D2A и D3B, имел длину около 800 п.н.

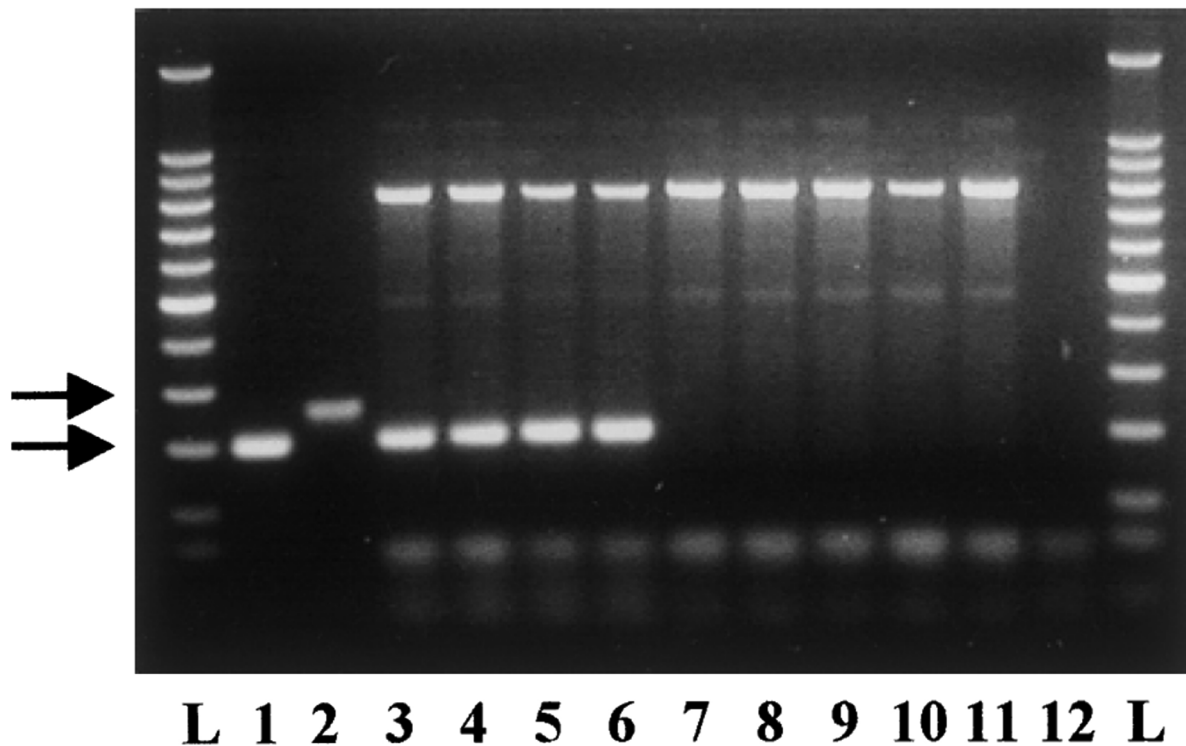
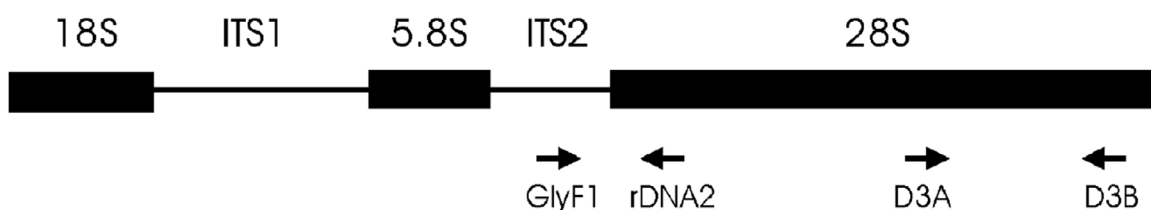


Рисунок 6.7. ПЦР продукты, полученные из отдельных цист с видоспецифическим праймером SHF6: L: ДНК 100 п.н. маркер (Промега), 1: комбинация праймеров SHF6-TW81 и 2: комбинация праймеров SHF6- rDNA2 с тем же количеством ДНК. 3–11: дуплексная ПЦР. 3–6: *Heterodera schachtii*; 7: *H. betae*; 8: *H. trifolii*; 9: *H. glycines*; 10: *H. ciceri*; 11: *H. humuli*; 12: отрицательный контроль без ДНК. Стрелки указывают на специфические полосы.

Эти два набора праймеров были дополнительно протестированы в ПЦР с ДНК из одиночных личинок второй стадии, одиночных или нескольких цист из 36 популяций *H. schachtii*. Все образцы, содержащие *H. schachtii*, всегда давали два разных фрагмента, тогда как образцы без *H. schachtii* показали только один фрагмент 800 п.н. (Рисунок 6.7). Дополнительных продуктов амплификации не наблюдалось.

6.2.2. Диагностика соевой цистообразующей нематоды

В этом исследовании было использовано 53 популяции вида *H. glycines* и нескольких других видов цистообразующих нематод. Все популяции были идентифицированы как по морфологии, так и по методике ПЦР-ВТС-ПДРФ, как описано в работе Subbotin *et al.* (2000).



```

H. glycines (Hgl6) 5' ..TTCGCGTTTTACGGACCGTAACTCAA**GCGCACCAATGCTTT..3'
H. glycines (Hgl5) .....GG.....*
H. glycines (Arkansas) .....GG.....
H. medicaginis .....GG.....C..
Heterodera sp.1 .....GG.....C..
H. schachtii .....GG.....G.C...C..
H. trifolii .....GG.....G.C...C..
H. ciceri .....GG.....G.C...C..

```

Рисунок 6.8. Схематическое изображение, показывающее положения четырех праймеров в генах рРНК, используемых в дуплексной ПЦР для идентификации *H. glycines* и выравнивания фрагментов ВТС2, используемых для разработки видоспецифического праймера. Фрагменты последовательности ВТС2 двух клонов (Hgl) соответствуют двум ВТС-гаплотипам *H. glycines* согласно Zheng *et al.* (2000). Положение праймера GlyF1 указано выделенным шрифтом, сайт рестрикции, распознаваемый ферментом *Ava*I (C/YCGRG), подчеркнут, а звездочки показывают положения нуклеотидов, отличающие *H. glycines* от других видов группы Schachtii.

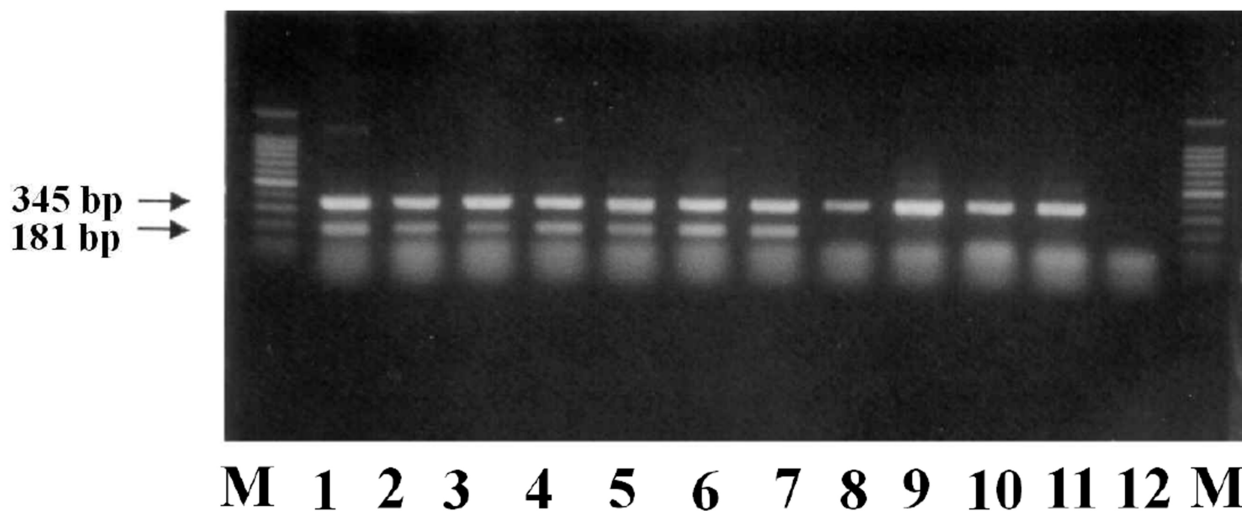


Рисунок 6.9. Дуплексная ПЦР с GlyF1 праймером, видоспецифичным для *H. glycines*. Амплифицированные продукты, полученные из одной цисты. Дорожки М: ДНК-маркер 100 п.н. (Промега, США); 1-7: *H. glycines* (1: Амурская область, Россия; 2: Арканзас, США; 3: Северная Каролина, США; 4: округ Анда, провинция Хэйлунцзян, Китай, раса 6; 5: Шеньян, провинция Ляонин, Китай; 6: ферма ИРР, Пекин, Китай; 7: Чжанцзякоу, провинция Хэбэй, Китай; 8: *H. schachtii* (Шладен, Германия); 9: *H. ciceri*; 10: *H. medicaginis*; Дорожка 11: *H. cajani*; 12: образец без нематодной ДНК.

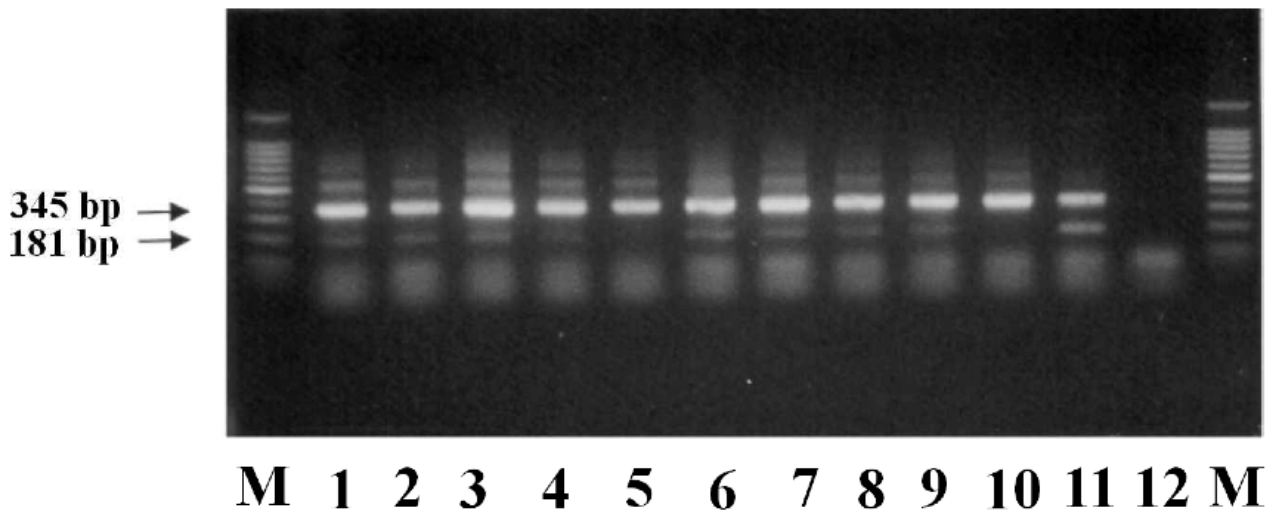


Рисунок 6.10. Дуплексная ПЦР с GlyF1 праймером, специфичным для вида. Амплифицированные продукты получают из образцов, содержащих одну личинку второй стадии *H. glycines* отдельно или в смеси с другими почвенными нематодами. Дорожки - М: ДНК-маркер 100 п.н. (Промега, США); 1-4: одна личинка в смеси с 18, 36, 54, 72 экземплярами почвенных нематод, соответственно; 5: 72 почвенные нематоды, без личинок *H. glycines*; 6-9: одна личинка второй стадии, смешанная с 75, 150, 225, 300 экземплярами видов *Pratylenchus*, соответственно; 10: 300 особей *Pratylenchus* без личинок *H. glycines*; 11: одна личинка второй стадии; 12: образец без нематодной ДНК.

Для разработки дуплексной ПЦР были выбраны два набора праймеров; первый – для проверки успешности ПЦР, а второй – для специфического определения *H. glycines*. Первый набор включал два универсальных праймера для амплификации D3 фрагмента 28S рРНК гена, что указывает на присутствие ДНК нематоды в образце и на качество амплификации. Вторым набором праймеров содержал видоспецифичный и универсальный праймер. Для разработки конкретного праймера использовались ДНК-последовательности ВТС рРНК гена нескольких популяций *H. glycines*, *H. ciceri*, *H. medicaginis*, *H. trifolii*, *H. schachtii*, *H. cajani*, неопределенного вида *Heterodera* sp.1, заражающий *Atriplex litoralis* L. и других видов нематод. Последовательность популяции *H. glycines* из Арканзаса (AF274390) и последовательности двух разных ВТС гаплотипов китайской популяции, опубликованные Zheng *et al.* (2000), были использованы для этого выравнивания. Zheng *et al.* (2000) показали наличие двух гаплотипов ВТС рРНК гена в геноме *H. glycines*, которые можно было различить по профилям рестриктазы *AvaI*. Мы смогли обнаружить только четыре нуклеотидные позиции, отличающие *H. glycines* от других видов. Две точечные нуклеотидные мутации, которые были общими для всех ВТС-гаплотипов, находились в ВТС1 и ВТС2 участках соответственно. Два нуклеотидных различия были уникальны только для одного ВТС-гаплотипа и находились на сайте рестрикции фермента *AvaI* на ВТС2 участке (Рисунок 6.8). Основываясь на этой информации, несколько предполагаемых специфических ПЦР-праймеров были сконструированы вручную. Видоспецифичный праймер GlyF1 и универсальный праймер rDNA2 (Рисунок 6.8) амплифицировали фрагмент (181 п.н.) гена ВТС2-28S одного гаплотипа

и показали многообещающие результаты. Положение специфического праймера GlyF1 соответствует положению 935-952 по выравниванию последовательностей популяций *H. glycines* и *H. avenae*, как это было представлено в нашей работе Zheng *et al.* (2000). Эта комбинация праймеров была выбрана для дальнейшего тестирования.

Дуплексная ПЦР с этими двумя наборами праймеров была проверена на образцах с одной и несколькими цистами, полученных из 53 популяций *H. glycines*, а также нескольких других видов нематод. Все популяции *H. glycines* дали два отдельных фрагмента (181 и 345 п.н.), тогда как все другие виды дали только один (345 п.н.) (Рисунок 6.9). Никаких отчетливых дополнительных неспецифических продуктов амплификации не наблюдалось.

Чтобы проверить чувствительность этого метода, мы использовали одну личинку второй стадии *H. glycines* (популяций из Байчэна, Цзилиня, Китай и Северной Каролины, США) либо отдельно, либо в смеси с различными пропорциями почвообитающих нематод или видов *Pratylenchus*. ПЦР со всеми образцами, содержащими одну личинку второй стадии, показала две различные полосы ДНК. Образцы, не содержащие *H. glycines*, давали только один фрагмент (Рисунок 6.10). Мы наблюдали уменьшение интенсивности видовой полосы вида в образцах, в которых *H. glycines* смешивали с другими нематодами. Эта интенсивность, однако, не сильно зависела от числа других нематод.

ПЦР с видоспецифическими праймерами должны быть разработаны и протестированы на большом количестве материала, чтобы избежать возможных ложноположительных или отрицательных результатов. Наш видоспецифический праймер диагностирует только фрагмент одного из гаплотипов. Наши праймеры идентифицировали все популяции *H. glycines*, протестированные и происходящие из Азии, США и Бразилии. Тем не менее необходимо провести дальнейшее тестирование других популяций, чтобы проверить надежность нашего метода для идентификации *H. glycines*.

6.3. ПЦР в реальном времени с видоспецифическими праймерами

Молекулярные методы анализа ДНК также предоставляют несколько подходов для количественного определения нематод в образцах. ПЦР в реальном времени требует специализированного оборудования, которое включает термоциклер, оптику для индуцирования флуоресценции и сбора эмиссии, а также компьютерное программное обеспечение для сбора и анализа данных. ПЦР в реальном времени – это непрерывный сбор флуоресцентных сигналов от одной или нескольких полимеразных цепных реакций в течение ряда циклов. Методика в реальном времени позволяет контролировать образец во время ПЦР с использованием гибридизирующих проб (TaqMan, Molecular Beacons и Scorpions) или

красителей ДНК, таких как SYBR Green, дающих сигналы флуоресценции. Амплификация любого фрагмента ДНК определяется четырьмя фазами: (1) исходный уровень; (2) экспоненциальный; (3) линейный и (4) плато. Количественная ПЦР требует, чтобы измерение проводилось до фазы плато, поэтому соотношение между количеством циклов и амплифицированных молекул выглядит относительно линейно. Количественная ПЦР в реальном времени – это преобразование флуоресцентных сигналов каждой реакции в числовое значение для каждого образца. Приборы для ПЦР в реальном времени используют для вычислений порог цикла (Ct) или точку, когда уровень флуоресценции превышает некоторый произвольный порог. График числа циклов в сравнении с логарифмической шкалой концентрации ДНК показывает линейную зависимость во время экспоненциальной фазы амплификации ПЦР. По сравнению с традиционным методом ПЦР, ПЦР в реальном времени имеет несколько преимуществ. Она позволяет быстро и одновременно обнаруживать и количественно определять целевую ДНК. Автоматизированная система позволяет избежать трудоемкого процесса оценки количества продукта ПЦР с использованием геле-электрофореза, а результаты можно увидеть в режиме реального времени. ПЦР тесты также можно легко адаптировать для анализа множества проб одновременно в форматах 96 или 384 образцов. Анализ методов ПЦР в реальном времени для обнаружения и количественной оценки различных фитонематод были опубликованы и рассмотрены во многих статьях, включая Braun-Kiewnick и Kiewnick (2018), а также в наших статьях (Madani *et al.*, 2005; Roubtsova & Subbotin, 2021) и недавно опубликованой главе (Subbotin, 2021).

6.3.1. Диагностика цистообразующей нематоды *Heterodera cajani*

Цистообразующая нематода *Heterodera cajani* Koshy, 1967 – это важный нематодный вредитель голубинового гороха (*Cajanus cajan* [L.] Millsp), который обнаружен во всех основных регионах выращивания этой культуры в Индии. Эта нематода также поражает кунжут. О вредоносности, вызванной этой нематодой, также сообщалось из Пакистана, Египта и Мьянмы (Subbotin *et al.*, 2010). *Heterodera cajani* внесена в список потенциально вредных организмов в нескольких странах и включена в список организмов для обследования в 2020 году в США. Разработка надежных и чувствительных методов молекулярной диагностики важна для раннего обнаружения этого вредителя и предотвращения его распространения. *Heterodera cajani* впервые была охарактеризована на молекулярном уровне с помощью ПЦР-ВТС-ПДРФ (Subbotin *et al.*, 2000). Последовательности генов ВТС рНК (Subbotin *et al.*, 2001), β -тубулина (Sabo & Ferris, 2004), 28S рНК (Subbotin *et al.*, 2006) и СОП (Riepsamen *et al.*, 2011) были опубликованы для индийских популяций *H. cajani*. Анализ ПЦР

в реальном времени с использованием видоспецифичных праймеров гена ВТС рРНК для этого вида был также разработан Katsuta *et al.* (2016). В этой главе описывается новый анализ ПЦР в реальном времени, разработанный для обнаружения *H. cajani* с использованием видоспецифического праймера и пробы на основе последовательности COI гена.

```

                *           20           *           40           *           60           *           80           *
Het-coxiF
Heterodera cajani : TAGTTGATCGTAATTTTAATGGTAATTTTTTTTGATTCTACCGGTGGAGGTAATCCTTTAGTGTTTTCAGCATCTTTTTGGTCTTTGGAC : 90
H. glycines (MK093146) : .....A.....AGA..A.....G.....A...T.A...A..T...T... : 90
H. medicaginis (MK093169) : .....AGA..A.....G.....A...C.A..C.A..T...T... : 90
H. schachtii (MK093070) : .....A.....CAGA..A.....T...C..C.....T.A..C.A..T...T... : 90
H. avenae (MK093164) : ..A...A.....GG.....AGA.....T.....A...T.A..C..... : 90
H. cardiolata (HM640929) : ..T.....C..A...T..G..T.....C.....A..T...T... : 90

                100           *           120           *           140           *           160           *           180
Probe_H_caj1
Heterodera cajani : ATCCAGAGGTTTATGTTCTTATTTGCCTGCCTTTGGTTTAGTTAGTCTTTCTATTCAGTTTTTAACGGGAAAAAATCTCTTTGGTT : 180
H. glycines (MK093146) : .....T.A...A.....T.....AT.AA...C..A..C.AT..A..T.....T...T... : 180
H. medicaginis (MK093169) : .....T.A...A.....T..C.....AT.AA.....A...AT..A..T.....T...T... : 180
H. schachtii (MK093070) : ..C..C.....T.A...A.....T.....T.AA.....A...AT..A..T.....T...T... : 180
H. avenae (MK093164) : ..C..T..A.....AT.GG...A.....G...A...CT.A.....G...TT...A.....GGG.A..... : 180
H. cardiolata (HM640929) : ...T.....T.AG...A.....T.....A...T...ATG...A..A...G...A.....A.T.A..... : 180

```

Рисунок 6.11. Фрагмент выравнивания последовательности гена COI для цистообразующих нематод с указанием положений праймеров и пробы.

В наших исследованиях мы использовали видоспецифические праймеры, разработанные и успешно испытанные для традиционной ПЦР. Проба TaqMan для *H. cajani* была разработана с использованием выравнивания последовательностей COI гена и была помечена флуоресцентным красителем FAM, тогда как проба TaqMan для универсального набора праймеров нематод была разработана с использованием выравнивания последовательности D3 фрагмента 28S рРНК гена и помечена красителем JOE. Универсальный набор праймер-проба для нематод использовался в мультиплексных реакциях для подтверждения того, что ДНК нематод успешно экстрагирована из образца. Реакционная смесь для ПЦР содержала 10 мкл 2 × SensiFast Probe Lo-ROX master mix (Thermo Fisher Scientific), по 1 мкл прямого праймера и обратного праймера и 0,4 мкл пробы, 5,6 мкл воды и 2 мкл ДНК. Были проведены тесты с одноплексным (мишень – ген COI *H. cajani*) и мультиплексным (мишени – ген COI *H. cajani* и D3 рРНК) ПЦР в реальном времени. Термальная программа для ПЦР была следующей: денатурация при 95°C в течение 5 минут, затем 40 циклов – денатурация при 95°C в течение 10 секунд, отжиг и амплификация при 60°C в течение 60 секунд в Quant Studio 7 Flex. Кривые амплификации визуализировали и анализировали путем построения графика флуоресценции (ΔR_n : нормализация флуоресценции репортерного красителя) в зависимости от номера цикла. Стандартные кривые были построены с помощью ПЦР в реальном времени и выполнены с растворами 5-кратного разведения ДНК, первоначально приготовленного из 100 яиц и J2 (концентрация ДНК = 45,5 нг/мкл). Несколько образцов нематод были использованы для определения специфичности анализов. Все реакции проводили не менее трех раз, и в каждом эксперименте использовали отрицательный контроль (воду).

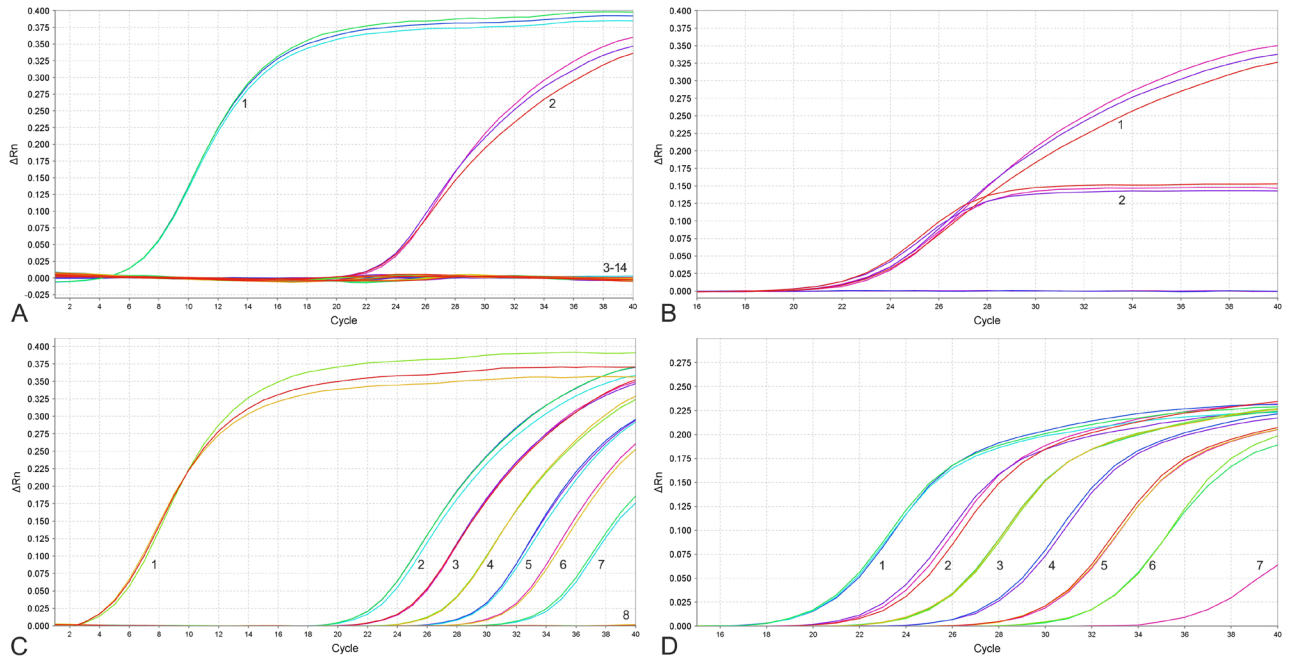


Рисунок 6.12. А. Результаты ПЦР в реальном времени с графиками амплификации. А. Обнаружение *Heterodera cajani* с помощью видоспецифичного праймера и пробы. Дорожки: 1 – разбавленный продукт ПЦР COI *H. cajani* (в качестве положительного контроля); 2 – образец ДНК, выделенный из яиц и J2 *H. cajani*; 3–13 – образцы ДНК, выделенные из нематод, не являющихся мишенями, и отрицательный контроль без ДНК (14); В: Обнаружение *H. cajani* в мультиплексной реакции ПЦР в реальном времени с набором видоспецифичных праймеров и проб, нацеленных на ген COI (1), и с универсальным набором праймеров и зондов для нематод, нацеленных на D3 гена 28S рРНК (2); С: Обнаружение *H. cajani* в серийных разведениях ДНК с набором видоспецифичных праймеров и проб, нацеленных на ген COI. Дорожки: 1 – разбавленный продукт ПЦР COI *H. cajani* (положительный контроль); 2 – ~ 8 яиц и J2; 3 – ~ 1,6 яйца и J2; 4 – ~ 0,32 яйца и J2; 5 – ~ 0,06 яиц и J2; 6 – ~ 0,01 яйца и J2; 7 – ~ 0,003 яйца и J2 на пробирку; 8 – отрицательный контроль; D: Обнаружение *H. cajani* в серийных разведениях ДНК с помощью универсального набора праймер-зонд, нацеленного на D3 гена 28S рРНК. Дорожки: 1 – ~ 8 яиц и J2; 2 – ~ 1,6 яйца и J2; 3 – ~ 0,32 яйца и J2; 4 – ~ 0,06 яиц и J2; 5 – ~ 0,01 яйца и J2; 6 – ~ 0,003 яйца и J2 на пробирку; 7 – отрицательный контроль.

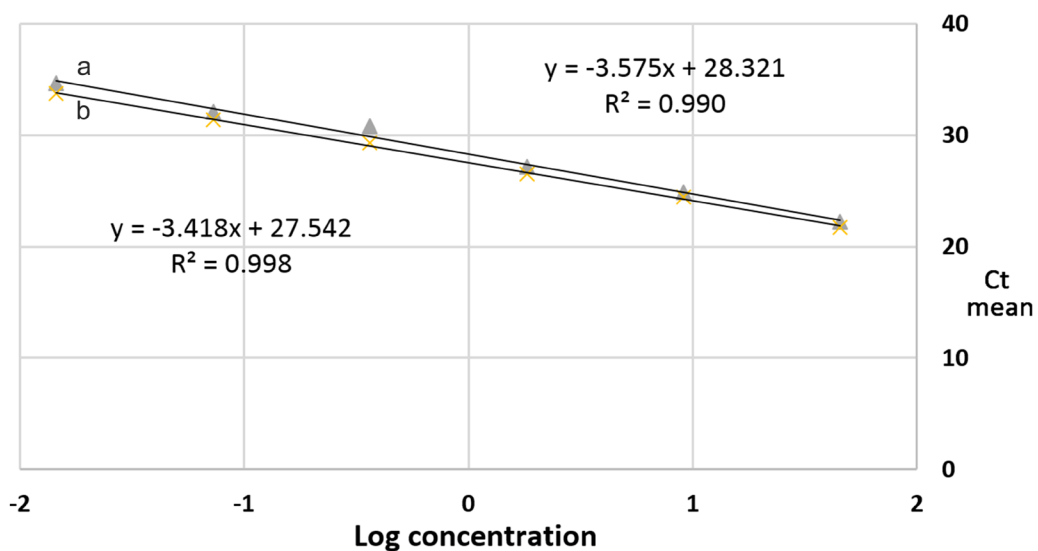


Рисунок 6.13. Стандартные кривые, с логарифмом количества ДНК (или количество нематод) и пороговыми циклами при 5-кратном серийном разведении ДНК вида *H. cajani* с набором видоспецифичных праймеров-проб, нацеленных на ген COI (а), и универсальным набором праймеров-проб для нематод, нацеленных на D3 28S рРНК ген (b).

Для *H. sajanii* были разработаны видоспецифичные праймеры на основе различий в последовательностях гена COI. Было протестировано несколько наборов праймеров, и набор видоспецифичных праймеров, который дал хорошую амплификацию, был выбран для тестирования. Комбинация универсального праймера Net-soxiF для цистообразующих нематод с видоспецифичным праймером HsaJR1 для *H. sajanii* дала один ампликон длиной 157 п.н. из образцов, содержащих ДНК этого вида (Рисунок 16.11).

Видоспецифичность набора праймер-проба была проверена в одноплексных и мультиплексных реакциях для *H. sajanii* и других нематод. Набор видоспецифичных праймер-проб определял только *H. sajanii* (Рисунок 16.12А). В эксперименте с мультиплексной ПЦР с видоспецифичным и универсальным наборами праймер-проба (пробы с красителями FAM и JOE соответственно) сигналы одновременно наблюдались для обоих генов-мишеней (Рисунок 16.12В). Графики амплификации для обоих генов-мишеней с серийными 5-кратными разведениями ДНК показаны рисунках 16.12С и D. В реакционном объеме образцы, содержащие приблизительно 8, 1,6, 0,32, 0,06, 0,01 и 0,003 яиц и личинок, показали значения C_t , пропорциональные логарифмически преобразованному количеству нематод. Стандартные кривые в результате наших экспериментов с ПЦР в реальном времени и выполненные с 5-кратными серийными разведениями, приведены на Рисунке 6.13. Линейные корреляции ($R^2 = 0,99$) между значениями C_t и концентрацией ДНК нематод были хорошо выражены. Результаты показали, что ПЦР в реальном времени с видоспецифичным праймером и пробой может обнаружить ДНК *H. sajanii*, выделенную из 0,003 яйца или личинки и помещенную в реакционную пробирку (разведение исходного образца 1: 3,125). Таким образом, в этом исследовании мы разработали эффективный метод обнаружения и количественного определения яиц и личинок *H. sajanii*. Анализы ПЦР в реальном времени были достаточно чувствительны, чтобы обнаружить ДНК, выделенную из одного образца в смеси с другими видами. Тем не менее мы считаем, что необходимо провести дальнейшие испытания, чтобы проверить этот метод на широком диапазоне полевых образцов.

ГЛАВА 7. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ У ЦИСТООБРАЗУЮЩИХ НЕМАТОД, ВЫЯВЛЕННЫЕ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ВТС ОБЛАСТЕЙ РИБСОМАЛЬНОЙ ДНК

В задачи наших исследований входило изучение филогенетических взаимоотношений между видами цистообразующих нематод и влияния выбора филогенетического метода и моделей ДНК эволюции, в частности применение сложной модели вторичной структуры рРНК молекулы и оценка ее влияния на результаты анализа. Филогенетические взаимоотношения между видами цистообразующих нематод подробно проанализированы и опубликованы в нескольких наших статьях: Subbotin *et al.* (1997, 2001, 2004, 2017); Eroshenko *et al.* (2001); Tanha Maafi *et al.* (2003, 2006, 2007); Madani *et al.* (2004, 2007); Subbotin & Sturhan (2004); Ma *et al.* (2008); Mundo-Ocampo *et al.* (2008); Zheng *et al.* (2008); Vovlas *et al.* (2015); Ryss *et al.* (2018); Subbotin & Skantar (2018); Escobar-Avila *et al.* (2018, 2019, 2020). Общая филогения цистообразующих нематод, включающая большинство известных видов и реконструированная на основе БВ анализа, приведена на Рисунке 7.1.

7.1. Влияние методов построения деревьев и процедур выравнивания на результат филогенетического анализа

В этом исследовании мы представляем филогенетический анализ 40 видов и подвидов семейства Heteroderidae, которые охватывают большую часть известного таксономического и морфологического разнообразия этой группы (Рисунок 7.2). Наш анализ был основан на 36 новых последовательностях, полных областей ВТС1-5.8S-ВТС2 рРНК гена, которые мы проанализировали с помощью нескольких филогенетических методов. Задачами данного исследования были: i) выявление филогенетических отношений между видами, группами видов и родами цистообразующих нематод, ii) рассмотрение соответствия молекулярных филогенетических деревьев морфологическому группированию, iii) оценка уровня влияния методов построения деревьев и процедур выравнивания на результат филогенетического анализа для цистообразующих нематод.

Нуклеотидные вставки или делеции обычно обнаруживаются в ВТС рРНК генах цистообразующих нематод, и в настоящее время среди исследователей не существует согласия, как анализировать такие выравнивания. Чтобы решить эту проблему, мы сгенерировали несколько выравниваний: i) группа компьютерных выравниваний с различной длиной разрыва и штрафами за открытие разрыва, ii) комбинированное выравнивание,

состоящее из объединения последовательностей нескольких выравниваний, iii) консервативное выравнивание, из которого были исключены плохо выровненные участки. Мы сравнивали топологию деревьев, полученных из этих выравниваний, с использованием различных методов. При анализе топологии деревьев нас интересовал порядок ветвления клад и их статистическая поддержка в каждом анализе.

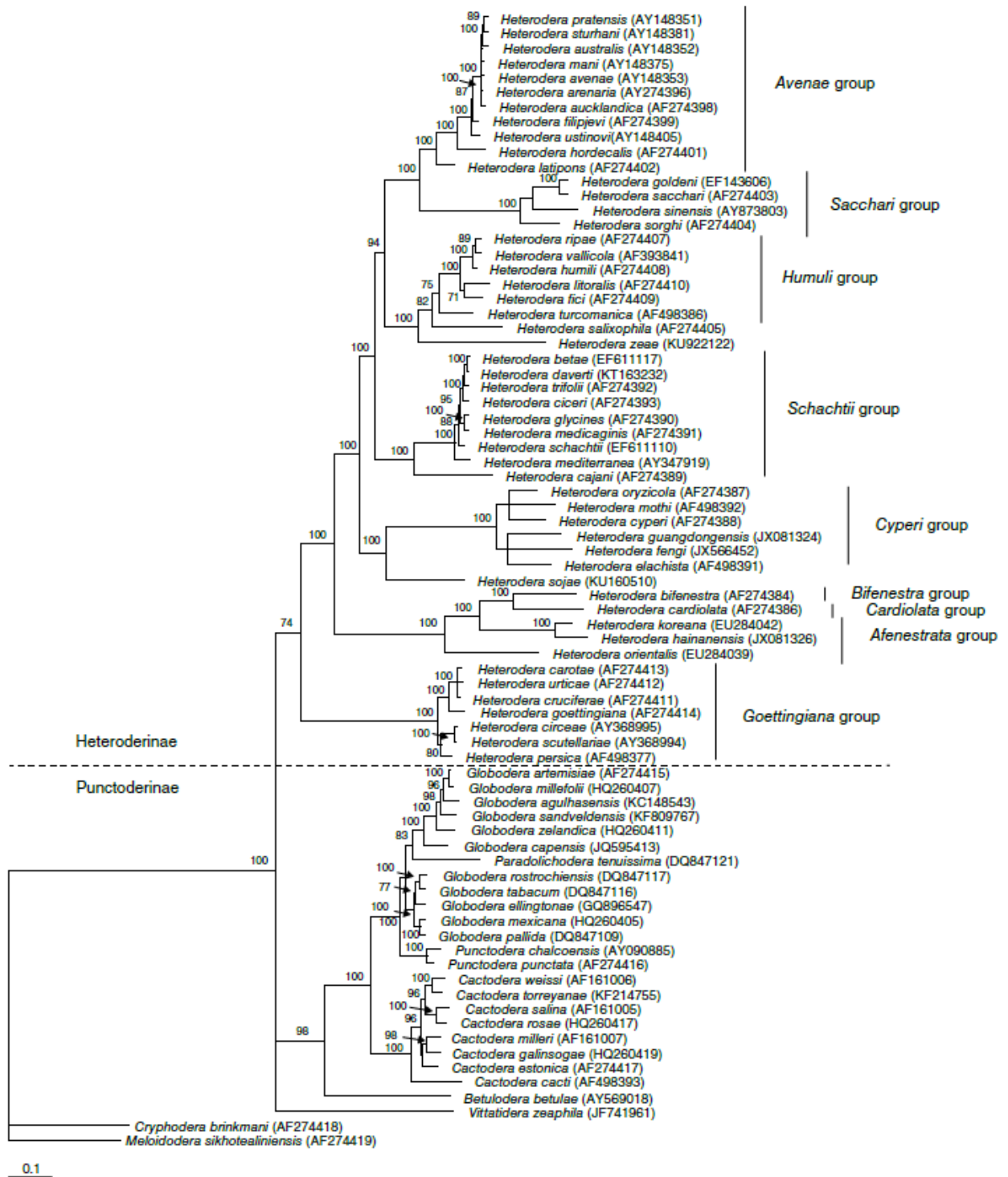


Рисунок 7.1. Филогенетические взаимоотношения между видами цистообразующих нематод. Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа ВТС рРНК гена по модели GTR + G + I. Апостериорные вероятности более 70% приведены для соответствующих клад.

Подробно эта работа изложена в статье Subbotin *et al.* (2001). В ходе этого исследования были определены 36 новых нуклеотидных последовательностей ВТС областей различных видов нематод и популяций семейства Heteroderidae. Семь ранее определенных последовательностей видов были включены в наши филогенетические анализы. Всего в этом исследовании было использовано 28 валидных видов *Heterodera*, 4 вида *Globodera* и по одному виду из каждого родов *Punctodera* и *Cactodera* (см. Таблицу 1 в работе Subbotin *et al.* 2001). Все виды нематод были идентифицированы по их морфологии и морфометрии. Две популяции видов *H. avenae* и *H. salixophila*, которые показали полиморфизм во время анализа областей ВТС в предыдущих исследованиях (Subbotin *et al.*, 1999, 2000a), и две популяции *H. bifenestra*, которые были использованы Ferris (1998) в качестве внешней группы для филогенетического анализа цистообразующих нематод, также были включены в настоящую работу. Ранее полученные нами последовательности *G. rostochiensis*, *G. pallida*, *G. tabacum solanacearum*, *G. t. virginiae* и *G. t. tabacum* (Subbotin *et al.*, 2000b) были включены в анализ. Седентарные цистоидные виды нематод *M. sikhotealiniensis* (= *M. alni*) и *Cryphodera brinkmani* были секвенированы и использовались как внешние группы (Subbotin *et al.*, 2001).

7.1.1. Анализ последовательности ДНК

Длина ВТС последовательности была короче у видов представителей Punctoderinae, чем у представителей Heteroderinae, и варьировала от 898 п.н. (*C. estonica*, *G. rostochiensis*) до 910 п.н. (*G. artemisiae*) и от 931 п.н. (*H. oryzicola*) до 1021 п.н. (*H. cyperi*). Длина девяти выравниваний варьировалась от 1124 до 1298 п.н., а комбинированное выравнивание составило 10734 п.н. (Таблица 7.1). Расхождение последовательностей для выравнивания внутри группы варьировалось от 0,0 до 31,4% и от 0,3 до 14,7% в пределах Heteroderinae и Punctoderinae соответственно и было рассчитано посредством парных сравнений выравнивания всех последовательностей с поправкой на отсутствующие данные.

Широкий диапазон содержания G:C наблюдался во всех последовательностях различных видов Heteroderidae. Относительно более высокое значение содержания G:C было обнаружено в области ВТС1, чем в гене 5.8S или области ВТС2. Хотя ВТС2 был короче ВТС1, различия в последовательностей между родами и внутри гетеродер и глободер было выше в этом регионе, чем у ВТС1. Длина гена 5.8S была постоянной и составляла около 158 п.н. для всех видов цистообразующих нематод и *A. crassicrustata*, отличаясь одной вставкой/делецией от таксонов внешней группы. Вариация последовательности в 5.8S рРНК гене для рода *Heterodera* была самой высокой между *H. cardiolata* и *H. cajani* (6,9%). В пределах рода *Globodera* она достигла только 1,3%, а между гетеродерами и *Globodera* – 5,7%.

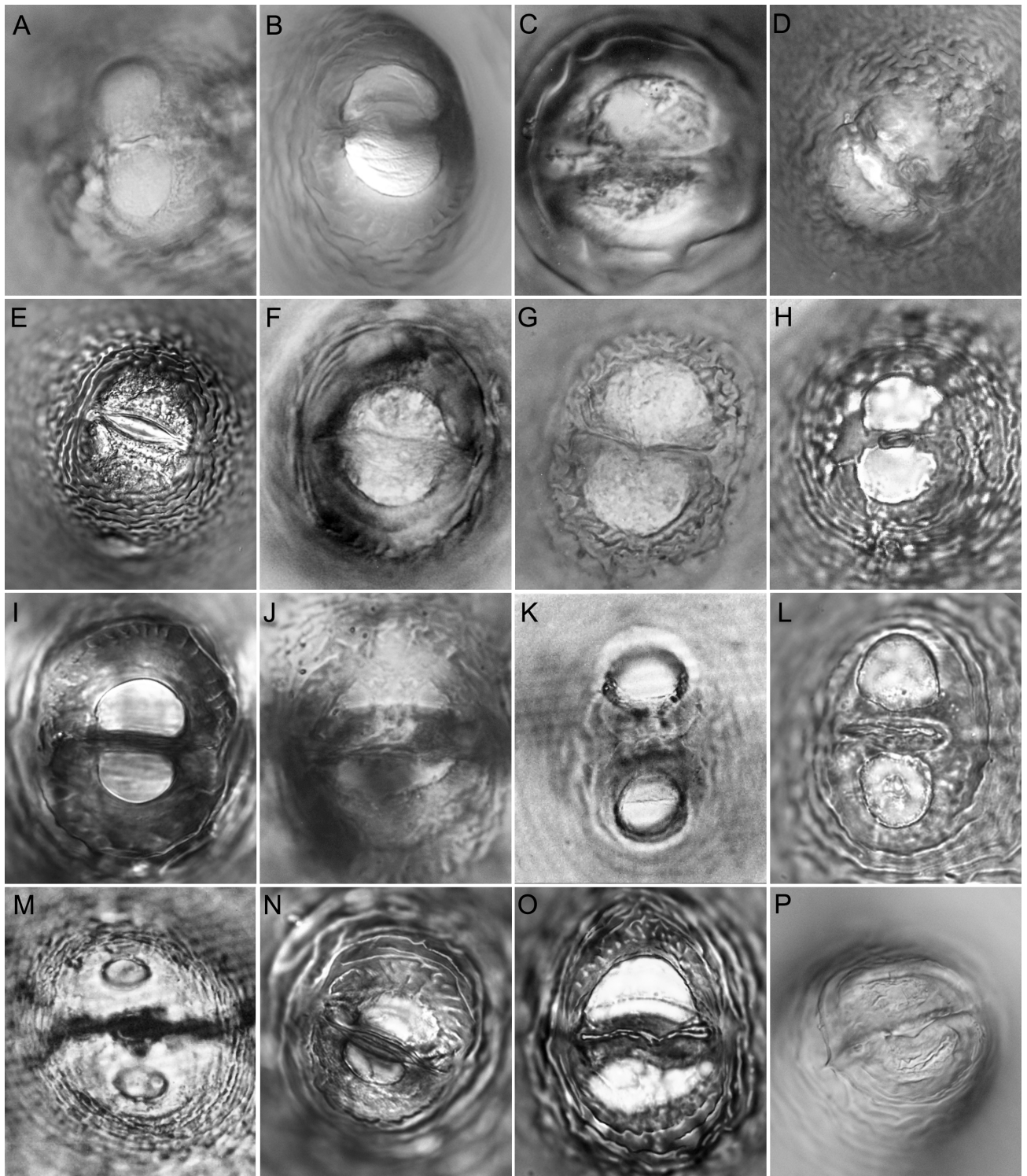


Рисунок 7.2. Вульварные пластинки. (A) *Heterodera avenae*; (B) *H. betae*; (C) *H. cajani*; (D) *H. carotae*; (E) *H. cruciferae*; (F) *H. elachista*; (G) *H. fici*; (H) *H. filipjevi*; (I) *H. glycines*; (J) *H. goettingiana*; (K) *H. hordecalis*; (L) *H. humuli*; (M) *H. latipons*; (N) *H. schachtii*; (O) *H. trifolii*; (P) *H. zae*. B, C, D, P – Subbotin *et al.* (2010); K – Andersson (1975); M – Franklin (1969); E, H, I, L, N, O – фото предоставлено В.Н. Чижовым.

7.1.2. Филогенетический анализ

Комбинированное выравнивание. МП анализ позволил получить шесть деревьев с одинаковой длиной в 27050 шагов (CI = 0,4854, RI = 0,7409). Строгий консенсус этих шести деревьев представлен на Рисунке 7.3. Шесть основных клад были обнаружены для всех цистообразующих нематод. Хорошо поддерживаемая клада I включала виды *Cactodera*, *Punctodera* и *Globodera* из подсемейства Punctoderinae. У Heteroderinae 29 видов *Heterodera* составляли еще пять клад: II – группа Goettingiana; III – группа Humuli + *H. salixophila*; IV – группы Avenaе + Sacchari; V – группа Schachtii; VI – группа Cyperi + *H. orientalis* (= *Afenestrata orientalis*) + *H. cardiolata* + *H. bifenestra*. Дополнительная клада (VII) состояла исключительно из *A. crassicrustata*. Монофилия цистообразующих нематод поддерживалась умеренно (БС = 84%), тогда как монофилия *Globodera* поддерживалась слабо (БС = 69%).

На основе результатов оценок ModelTest LRT и AIC был проведен МЛ анализ набора данных для модели GTR + G + I со следующими значениями: R (a) = 0,9749, R (b) = 2,6468, R (c) = 1,5320, R (d) = 0,6423, R (e) = 2,5317, R (f) = 1,0000, доля неизменных сайтов (p-inv) = 0,2041 и параметр формы гамма = 1,5658. В результате этого анализа было получено дерево (Ln = 127667.7399), отличающееся от МП деревьев положением *A. crassicrustata* и клады I (Рисунок 7.4). Клада с *A. crassicrustata* + Punctoderinae и клады III и IV были хорошо поддержаны на МЭ дереве. КХ тест с МЭ и МР деревьями выявил существенные различия между их топологиями (Таблица 7.2).

Консервативное выравнивание. Метод максимальной экономии позволил получить два дерева с наименьшими изменениями и дерево их строгого консенсуса (Рисунок 7.5). Отношения между основными кладами Heteroderidae были плохо разрешены, хотя поддержка бутстрепа для каждой основной клады варьировалась от умеренной до высокой, за исключением клады VI. Анализ МЛ проводился с использованием модели GTR + G + I, со следующими значениями, полученными из ModelTest: R (a) = 0,9181, R (b) = 3,7942, R (c) = 1,8081, R (d) = 0,6139, R (e) = 3,4156, p-inv = 0,2534 и параметр формы гамма = 1,4533. МЛ дерево (Ln = 9848.51292) выявило парафилию Heteroderinae, тогда как МЭ анализ дал неразрешенную политомию среди представителей Punctoderinae, группы Goettingiana и других клад Heteroderinae. Однако топологии всех этих деревьев существенно не различались (Таблица 7.2).

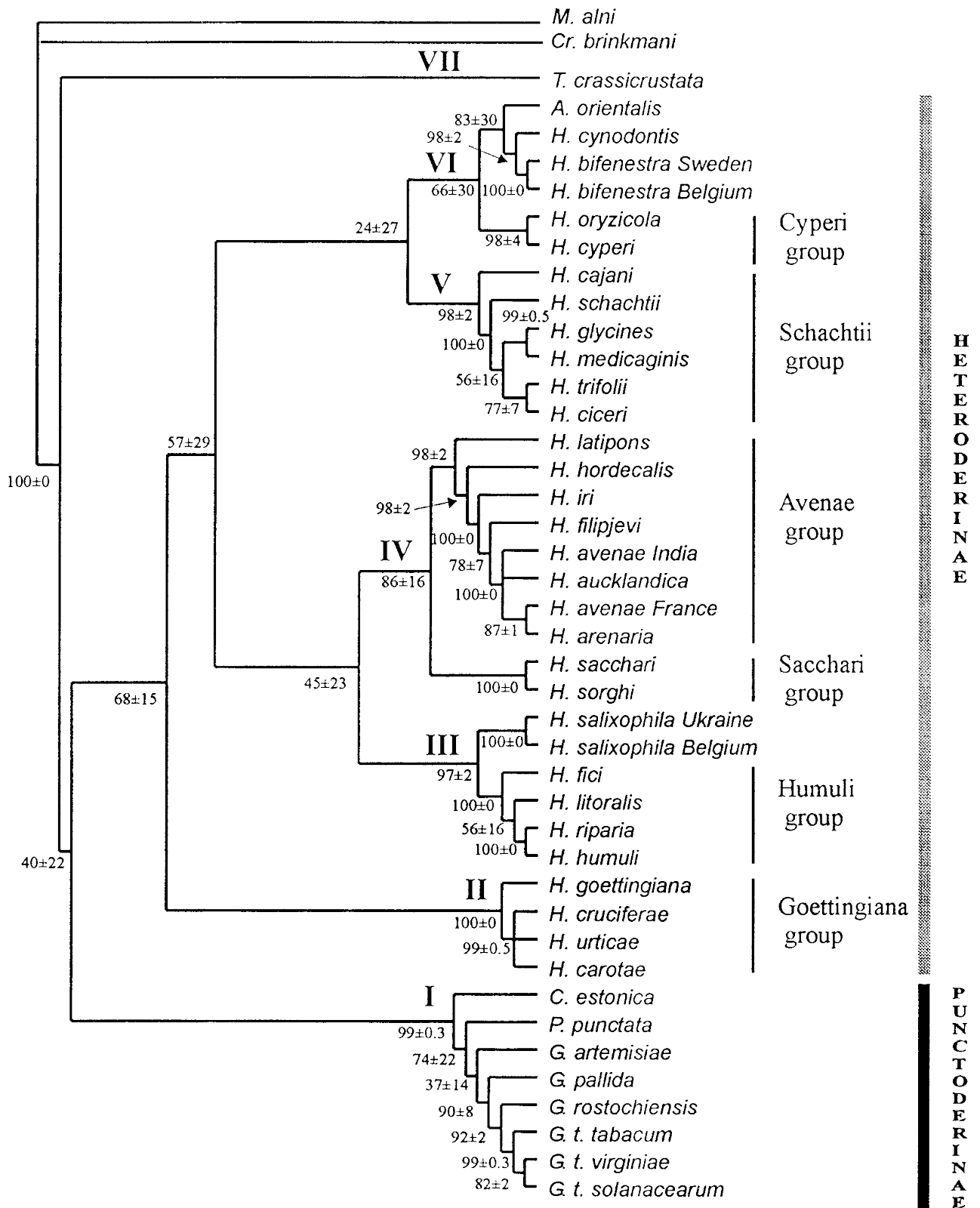


Рисунок 7.3. Комбинированное выравнивание ДНК-последовательности ВТС рРНК гена из 40 видов и подвидов семейства Heteroderidae. Строгий консенсус шести одинаковых по параметрам МП деревьев, полученных из девяти выравниваний. Среднее и стандартное отклонение от значений бутстрепа по девяти выравниваниям дается для соответствующих клад.

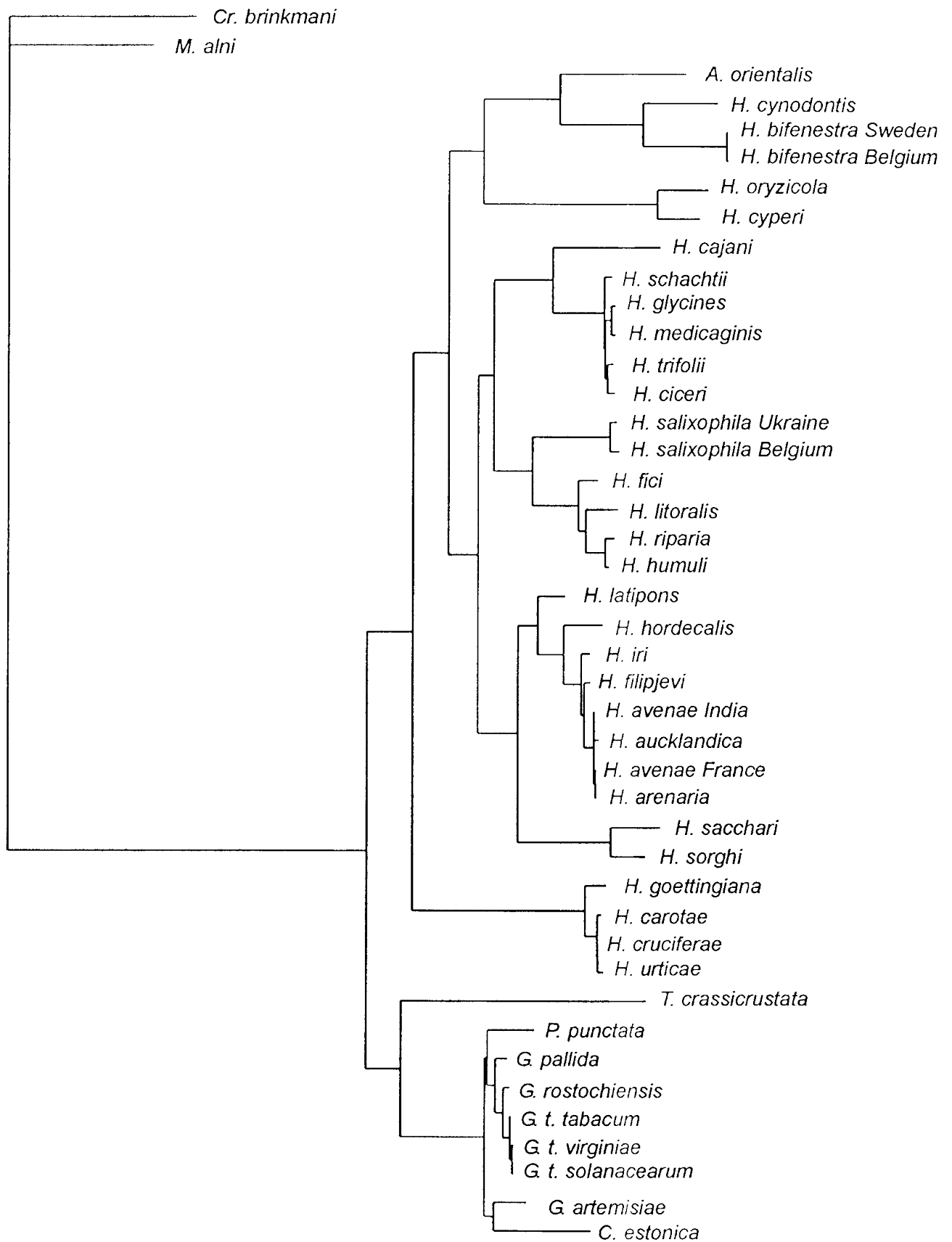


Рисунок 7.4. Дерево, реконструированное методом максимального правдоподобия из комбинированного выравнивания ($L_n = 127667.7399$).

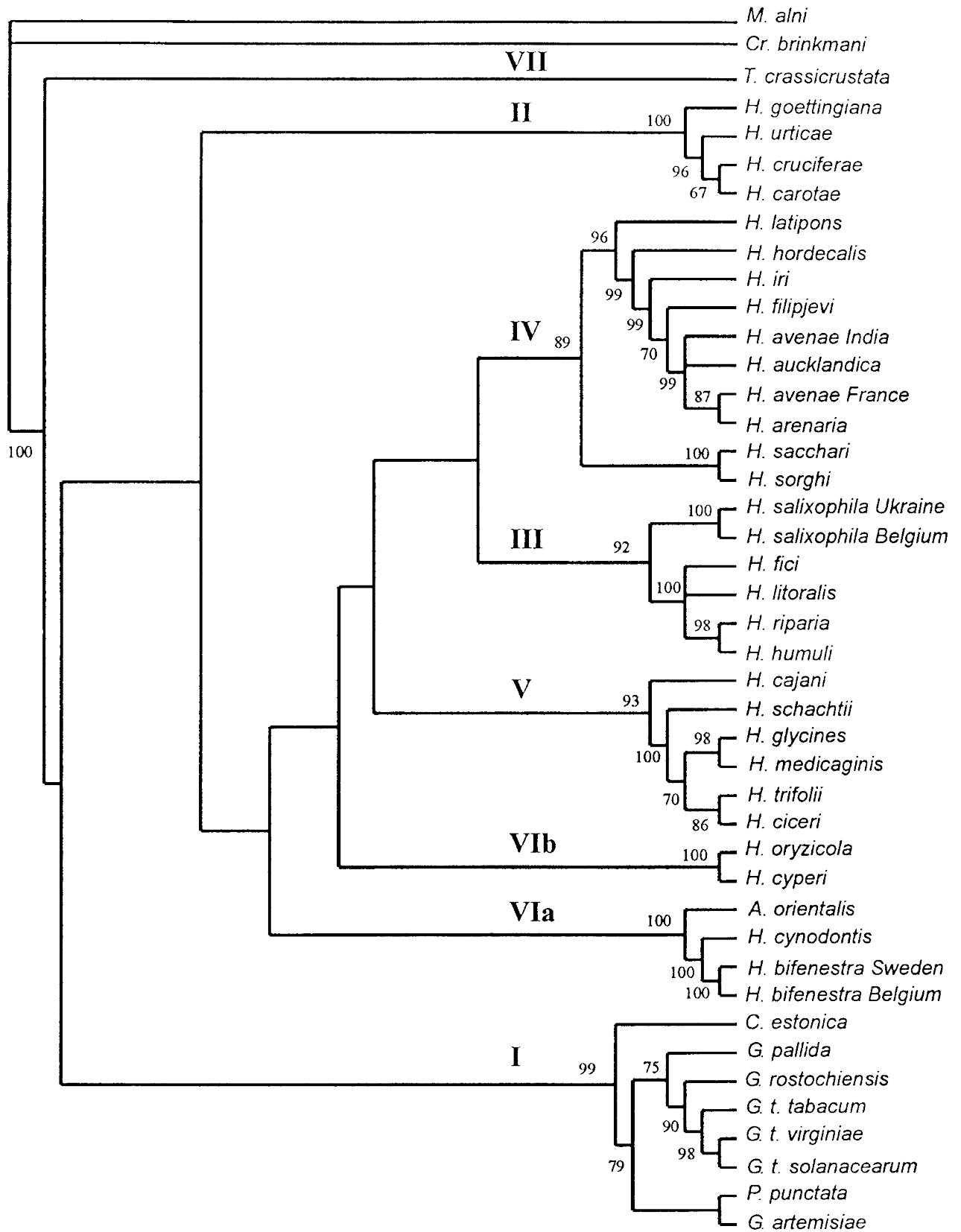


Рисунок 7.5. Строгий консенсус двух деревьев, полученных методом максимальной экономии из консервативного выравнивания. Бутстреп дается только более 70%.

Таблица 7.1 – Параметры выравниваний и статистика для деревьев, полученных в исследовании

Н	ГО	ГЛ	Д	КИ	КП	ТЛ	ТН	СИ	НИ	РИ	РС	gl
Комбинированное выравнивание			10734	6130	3239	27050	6	0.4854	0.5146	0.7409	0.3845	-0.5955
Консервативное выравнивание			853	464	300	2003	2	0.4616	0.5384	0.7307	0.3597	-0.5841
1	5	3	1298	623	460	2425	12	0.5185	0.4815	0.7644	0.4366	-0.5624
2	5	6.66	1228	653	397	2638	6	0.5068	0.4932	0.7553	0.4134	-0.6257
3	5	10	1192	652	384	2773	12	0.4807	0.5193	0.7438	0.3860	-0.5310
4	15	3	1215	665	378	2875	6	0.4895	0.5105	0.7482	0.3953	-0.6220
5	15	6.66	1192	687	356	2967	6	0.4906	0.4906	0.7425	0.3892	-0.6013
6	15	10	1159	692	337	3183	6	0.4728	0.5272	0.7315	0.3663	-0.6182
7	30	3	1170	713	312	3279	6	0.4856	0.5144	0.7435	0.3841	-0.6765
8	30	6.66	1156	719	312	3317	12	0.4795	0.5205	0.7193	0.3641	-0.6778
9	30	10	1124	726	305	3498	12	0.4751	0.5249	0.7443	0.3681	-0.5629

Примечание. Н – номер выравнивания, ГО – штраф для открытия разрыва, ГЛ – штраф для длины разрыва, Д – длина выравнивания, КИ – количество информативных признаков, КП – постоянные признаки, ТЛ – длина дерева, ТН – количество деревьев; СИ – индекс согласованности; НИ – индекс гомоплазии; РИ – индекс удержания.

Таблица 7.2 – Результаты тестов альтернативных топологий для филогении цистообразующих нематод

	Комбинированное выравнивание				Консервативное выравнивание			
	лучшие log likelihood	$\Delta \ln L$	SD	P	лучшие log likelihood	$\Delta \ln L$	SD	P
МЛ дерево	-127667.73996	—	—	—	-9848.51292	—	—	—
МП дерево	-127785.94668	118.20673	32.83653	0.0003*	-9851.98596	3.47305	10.28823	0.7358
МЭ дерево	-127723.33141	55.59145	26.57420	0.0365*	-9860.21930	11.70638	10.93626	0.2847
<i>Afenestrata</i> + <i>Heterodera</i> ^a	-128102.42909	434.68914	44.85737	<0.0001*	-9901.37887	52.86596	15.88487	0.0009*
Avenae группа + другие гетеродеры ^b	-127926.61973	258.87978	43.90586	<0.0001*	-9871.95430	23.44139	14.06753	0.0960
Avenae группа + <i>H. bifenestra</i> ^c	-129909.14946	2241.40950	89.34631	<0.0001*	-10029.07902	180.56610	23.99201	<0.0001*
Sacchari группа + Cyperi группа + <i>H. orientalis</i> + <i>H. cynodontis</i> + <i>H. bifenestra</i> ^d	-128042.37297	374.63301	38.81976	<0.0001*	-9877.82666	29.31374	14.04401	0.0372*

Примечание. а – обоснованность рода *Afenestrata*; b – обоснованность рода *Bidera*; c – группирование видов, имеющих бифенестральные цисты и паразитирующих на злаках; d – виды, имеющие три инцизуры у личинок второй стадии; * – значительные различия при $P < 0.05$; SD – стандартное отклонение.

Компьютерные выравнивания. Тенденции, обнаруженные в филогенетических анализах девяти компьютерных выравниваний, были в согласии с вышеупомянутыми результатами (Таблица 5, Приложение). Поддержка монофилии группы цистообразующих нематод была выше на деревьях, построенных с помощью МП, чем в результате реконструкции МЛ и МЭ методами. Виды подсемейства Punctoderinae во всех анализах образовали монофилетическую группу с высокой поддержкой. Базальная позиция *Cactodera* и его родственные отношения с *Punctodera* были поддержаны большинством деревьев. *Globodera pallida*, *G. rostochiensis* и *G. tabacum* образовали хорошо поддерживаемую кладу. Монофилия *Globodera* была поддержана в большинстве МЭ деревьев, тогда как МЛ деревья демонстрируют предположительную парафилию этого рода.

Большая или умеренная поддержка монофилии Heteroderinae была обнаружена в большинстве топологий деревьев. Наибольшая поддержка монофилии наблюдалась на деревьях, полученных по результатам МЭ анализа. Все анализы помещали представителя бывшего рода *Afenestrata*, *H. orientalis* в Heteroderinae, как правило, группировали этот вид с

H. cynodontis и *H. bifenestra*. За исключением клады VI, пять основных клад внутри Heteroderinae были обнаружены почти во всех анализах. Несоответствие между топологиями обычно соответствовало самым слабым узлам в МП и МЭ анализах. Сравнение МЛ дерева, полученного из консервативного выравнивания, со всеми деревьями МП анализа, полученными из компьютерных выравниваний, с помощью теста Кишино-Хасегавы, позволило получить статистически значимые различия для топологий на основе компьютерных выравниваний 5, 6 и 9. Полученное дерево МП из компьютерного выравнивания 7 было в основном идентично МП деревьям, полученным из комбинированного выравнивания.

Базальная позиция группы Goettingiana в Heteroderinae была умеренно подтверждена во всех деревьях, за исключением анализов, основанных на выравниваниях 9 (МП, МЭ и МЛ) и 7 (МЭ). Взаимоотношения между другими основными кладами Heteroderinae не всегда были хорошо выявлены. В рамках клады IV статус сестринских таксонов групп Avenae и Sacchari был сильно или умеренно поддержан во всех деревьях, кроме МП деревьев, полученных из выравнивания 8.

Heterodera cajani всегда занимала базальную позицию в кладе V с высокой поддержкой. *Heterodera glycines* и *H. medicaginis* всегда поддерживались как сестринские виды. *Heterodera ciceri* и *H. trifolii* были сгруппированы вместе с умеренной поддержкой; позиция *H. schachtii* не была хорошо выявлена.

Клада VI была высоко или умеренно поддержана в выравниваниях 1, 2 и 8. В других деревьях взаимоотношения видов в пределах этой клады были плохо выявлены, или группа Cyperi сформировала отдельную кладу в пределах Heteroderinae. Клада VI обычно отходила после группы Goettingiana или занимала базальное положение на МЭ и МП деревьях, полученных из выравнивания 9. Родственные отношения между видами *H. cyperi* и *H. oryzicola* были высоко поддержаны во всех деревьях.

Проверка гипотез. Несколько гипотез, полученных на основании МЛ анализа консервативного и комбинированного выравниваний, были оценены с помощью теста Кишино-Хасегавы (Таблица 7.2). Топологии, ограничивающие *H. orientalis* (для проверки обоснованности рода *Afenestrata*), группировка видов с бифенестральными цистами (*H. bifenestra* с группой Avenae, заражающей травы) и группировка видов с тремя инцизурами в боковом поле личинок второй стадии были отклонены. Размещение группы Avenae вне других Heteroderinae (для проверки обоснованности рода *Bidera*) было приемлемым только при консервативном выравнивании.

7.1.3. Чувствительность филогении к процедурам выравнивания и построения деревьев

Ранее уже подчеркивалось, что выбранные методы выравнивания, как и методы построения деревьев, существенно влияют на результаты филогенетических исследований (Morrison & Ellis, 1997). Наше исследование с использованием ВТС данных о цистообразующих нематодах ясно показывает, что возникновение и положение клад может варьироваться в зависимости от применяемых филогенетических процедур. Например, хорошо поддерживаемая позиция группы *Сурегі* в кладе, включающей виды с тремя инцизурами у личинок второй стадии, была получена из выравниваний с наименьшими штрафами за открытие разрыва и длину разрыва, а *H. orientalis* была более чувствительна к параметрам выравнивания, чем к филогенетическим процедурам. Увеличение штрафов за длину разрыва уменьшило значение бутстрепа или нарушило положение этого вида, который затем сгруппировался с группой *Goettingiana* или появился как сестринский таксон группы *Сурегі*. Напротив, монофилия *Globodera* оказалась чувствительной к методу построения деревьев. Монофилия *Globodera* была обнаружена в большинстве МЭ деревьев, хотя МЛ деревья показали родственные отношения *G. artemisiae* с другими видами, относящимися к родам *Punctodera* или *Cactodera*.

В любом филогенетическом исследовании трудности возникают во время выравнивания областей с большим расхождением последовательностей и большой изменчивостью длин последовательностей. Включение участков, дающих неоднозначные результаты при выравнивании, увеличивает уровень шума и может поддерживать ошибочные топологии, тогда как удаление таких областей снижает уровни филогенетического сигнала и, следовательно, может уменьшать разрешение между кладами (Gatesy *et al.*, 1993; Wheeler *et al.*, 1995). Как и ожидалось, наше консервативное выравнивание, после исключения самых неоднозначных участков в последовательностях, имело тенденцию снижать филогенетическое разрешение внутри групп. Рассмотрев эти проблемы, Wheeler *et al.* (1995) выступали за менее экстремальный подход и предложили комбинированное выравнивание, согласно которому объединение альтернативных выравниваний в одно расширенное выравнивание уменьшает влияние ошибочно выровненных участков. В нашем исследовании комбинированный подход обычно приводил к более высоким значениям бутстрепа. Тем не менее различные методы построения деревьев по-прежнему генерировали альтернативные топологии для некоторых основных клад *Heteroderidae*, отражая основные отклонения, которых нельзя избежать без более объективных критериев для выбора одного «наилучшего» выравнивания.

7.2. Влияния выбора моделей эволюции ДНК на результат филогенетического анализа

В качестве объективного критерия для выравнивания часто используют информацию о вторичной структуре исследованной молекулы. В задачи наших исследований также входила реконструкция филогенетических взаимоотношений на основе информации о вторичной структуре ВТС2 рРНК молекулы.

Внутренний транскрибированный спейсер 2 (ВТС2) гена рибосомальной РНК является широко используемым стандартным маркером для филогенетического изучения многих организмов на низких таксономических уровнях. Хотя биологическая роль спейсеров не совсем понятна, использование моделей дрожжей определенно показало их важность для производства зрелой рРНК. Для многих организмов вторичная структура предшественника ВТС2 рРНК организована вокруг центрального ядра, из которого выходят четыре спирали или домена (Coleman, 2003).

Филогенетические исследования с использованием рРНК генов часто игнорируют то, что эта молекула транскрибируется с генов и образует сложные вторичные и третичные структуры с опосредованным спариванием между нуклеотидами, иногда отдаленными и находящимися в различных частях молекулы. Рибосомальная РНК образует спиральные структуры, в которых две области последовательностей являются комплементарными. Спаривание в спирали включает канонические пары оснований, то есть пары оснований Уотсона-Крика и колеблющиеся пары G-U (Wuyts *et al.*, 2001). Знание вторичной структуры рРНК становится все более важным для филогенетического анализа. Во-первых, вторичная структура используется для идентификации гомологичных положений для наборов нуклеотидов и областей последовательностей, которые в противном случае сложно определить с помощью алгоритмов множественного выравнивания (Kjer, 1995). Во-вторых, вторичная структура может быть использована в качестве дополнительного источника данных, включающих как структурные, так и морфометрические параметры молекул рРНК (Aleshin *et al.*, 1998; Billoud *et al.*, 2000; He *et al.*, 2005). В-третьих, вторичная структура используется для выбора более подходящих моделей эволюции. Во многих исследованиях было показано, что способ эволюции в спиральных областях рРНК осуществляется с помощью компенсаторных или полукompенсаторных мутаций, и, таким образом, эволюция оснований в структурно связанных нуклеотидах оказывается сильно зависимой.

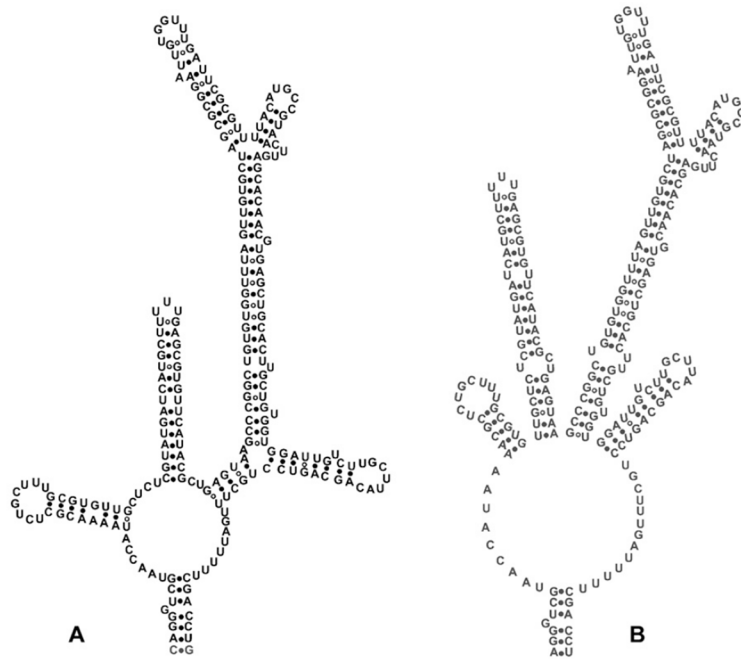


Рисунок 7.7. Два альтернативных варианта свертывания VTC2 молекулы для *Heterodera cajani*, реконструированные с помощью термодинамических критериев и ковариационного анализа.

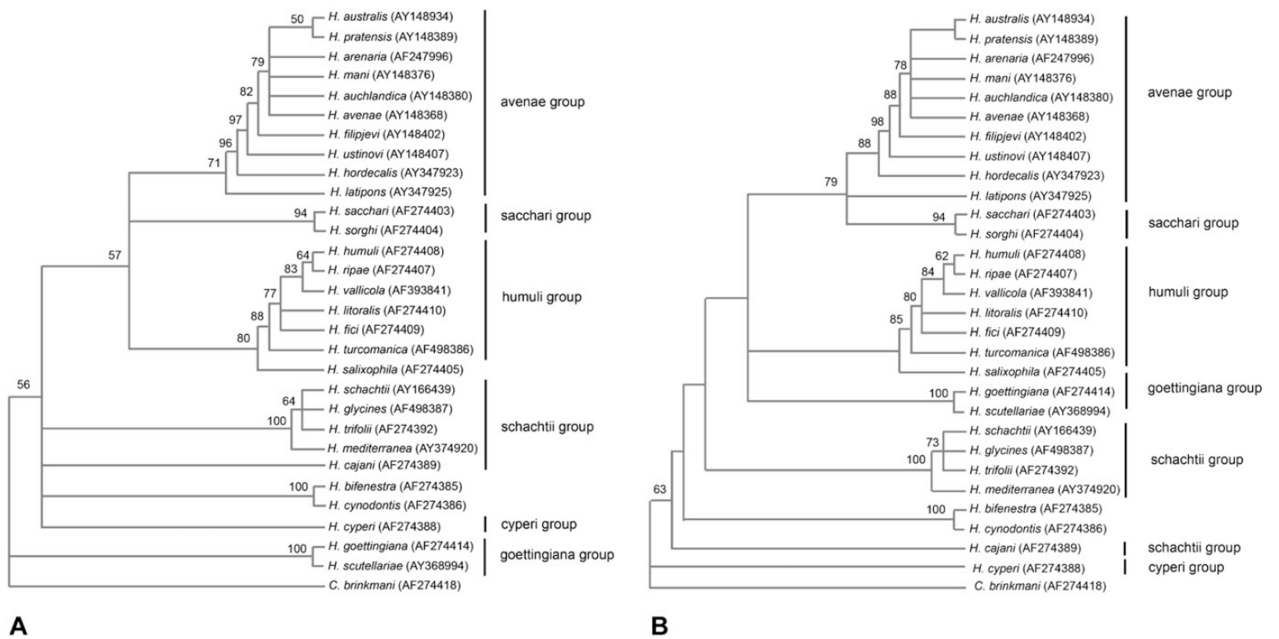


Рисунок 7.8. Консенсусные МП деревья, полученные из исходных (А) и преобразованных (В) выравниваний. Статистика для дерева А: количество деревьев = 20; длина дерева = 596; CI (исключая неинформативные признаки) = 0,5405; HI (исключая неинформативные признаки) = 0,4595; RI = 0,7123; RC = 0,4207; количество признаков = 309; количество информационных признаков = 150. Статистика для дерева В: количество деревьев = 14; длина дерева = 560; CI (исключая неинформативные признаки) = 0,6323; HI (исключая неинформативные признаки) = 0,3677; RI = 0,7390; RC = 0,4496; количество признаков = 224; количество информационных признаков = 116. Значения бутстрепа, превышающие 50%, приведены для соответствующих клад.

Тем не менее большинство традиционных моделей замещения, используемых в филогенетических исследованиях, рассматривают изменения вдоль нуклеотидных последовательностей как независимые. Байесовский вероятностный метод анализа филогении (Hudelot *et al.*, 2003) может учитывать эмпирические коэффициенты замещения матриц непарных и парных оснований (Smith *et al.*, 2004), и такие подходы недавно были применены для моделирования последовательности и структуры молекул рРНК. Некоторые исследования уже показали превосходство рассмотрения корреляции пар оснований в нуклеотидах РНК по сравнению с методами, предполагающими независимую эволюцию нуклеотидов (Muse, 1995; Savill *et al.*, 2001; Telford *et al.*, 2005). Этот подход был применен к филогенетическому анализу 18S рРНК у насекомых (Kjer, 2004) и Bilateria (Telford *et al.*, 2005). Таким образом, знание вторичной структуры позволяет применять более сложную модель и, следовательно, генерировать картину отношений, которую можно считать более реалистичной. С ростом понимания важности вторичной структуры для точного выравнивания последовательностей и филогенетического анализа потребность во вторичных структурных моделях рРНК для различных таксономических групп становится все более насущной. Такие модели лучше всего могут быть разработаны и протестированы в монофилетической группе, для которой существуют вероятные гипотезы отношений и внешних групп, в том числе основанные на классических морфологических исследованиях.

7.2.1. Вторичная структура ВТС2 и ее значение для филогении

В этой работе мы реконструировали и исследовали вторичную структуру сегментов расширения ВТС2 рРНК для улучшения автоматического выравнивания с использованием компьютерной программы MARNA. Также мы использовали вторичную структурную информацию для выбора сложной модели эволюции в построении филогенетических деревьев цистообразующих нематод. Мы предложили новый метод кодирования для непарных и парных оснований вторичной структуры, аналогичный тому, который был предложен Smith *et al.* (2004), но преобразовали выравнивание последовательности в код из 28 символов. Исходные и преобразованные данные последовательности анализировались с помощью МП и БВ с учетом сложной модели эволюции и затем сравнивались с традиционными подходами в анализе последовательностей. Подробно этот метод исследований изложен в нашей работе Subbotin *et al.* (2007).

Используя подходы минимизации энергии и сравнительный структурный анализ последовательностей, мы реконструировали вторичную структуру ВТС2 для 29 видов цистообразующих нематод и одного вида внешней группы (*Cryphodera brinkmani*).

Консенсусные вторичные структуры BTC2 были реконструированы для *Avenae* группы (Рисунок 7.6А) и *Humuli* группы (Рисунок 7.6В). Модели были организованы в четыре основные спирали, выходящие из центрального ядра. Третья спираль всегда была самой длинной и имела две ветви в виде Y-образной структуры около вершины. У большинства видов спирали III и IV сливались, образуя сегмент (S) центрального ядра. Сегмент варьировал от 2 до 8 нуклеотидных пар у большинства видов, однако он отсутствовал у *H. turcomanica*. Для *H. cajani* были возможны два альтернативных складывания: один с сегментом, а другой без сегмента (Рисунок 7.7). Консенсусные вторичные структуры для цистообразующих нематод и видов *Cryphodera*, использованных в этом исследовании, представлены на Рисунке 7.6D. Нами были найдены два консервативных мотива, GAUCR и UURC, в спиралях II и III соответственно. Мотив GAUCR спирали II в наших моделях демонстрирует такое же несоответствие U – U, что и структуры спирали II, полученные из базы данных BTC2 (Wolf *et al.* 2005).

Реконструированные в нашем исследовании вторичные структуры для цистообразующих нематод (Рисунок 7.6) отличались от реконструированных и депонированных в базе данных BTC2 (Schultz *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 2005). Наши консенсусные структуры для групп *Humuli* и *Avenae* включали на 16 и 19% соответственно больше спаренных нуклеотидов в спиралях, чем соответствующие структуры, предложенные Wolf *et al.* (2005). Только около 50% этих нуклеотидных пар были идентичны в обеих структурах. Значительные различия наблюдались в спирали III. Эта спираль, генерируемая гомологическим моделированием (Wolf *et al.*, 2005), не содержит Y-образную структуру. В нашем исследовании такая структура отмечалась, если применялся подход реконструкции с использованием минимизации энергии.

7.2.2. Филогенетические отношения, полученные из анализа максимальной экономии и Байесовского анализа, используя вторичную структуру

Строгий консенсус МП деревьев, полученных из исходных данных с последовательностями и из преобразованных данных, представлен на Рисунке 7.8. Отношения между основными группами цистообразующих нематод не были хорошо выявлены. МП анализ конвертированных последовательностей показал, что количество информативных нуклеотидов было в 1,3 раза ниже, и это привело к изменению значений бутстрепа для некоторых взаимоотношений: более высокая поддержка кластеризации групп *Avenae* и *Sacchari* (53% против 79%) и более низкая поддержка кластеризации группы *Humuli* с

Heterodera salixophila (80% против 49%). Были также выявлены измененные позиции для *H. cyperi* и *H. cajani*, однако их отношения с другими нематодами остались невыясненными.

Влияние сложной модели эволюции РНК было также очевидно при рассмотрении парных нуклеотидов в стеблях и неспаренных нуклеотидов в петлях для топологии БВ дерева. БВ анализ в рамках сложной модели со структурной информацией давал консенсусное дерево с неразрешенной политомией для нескольких групп (Рисунок 7.9В), в отличие от дерева, полученного в рамках обычной модели GTR (Рисунок 7.9А). На обоих БВ деревьях группы *Avenae* и *Humuli* были родственными таксонами. Тип применяемой модели оказал минимальное влияние на взаимоотношения внутри нематодных групп.

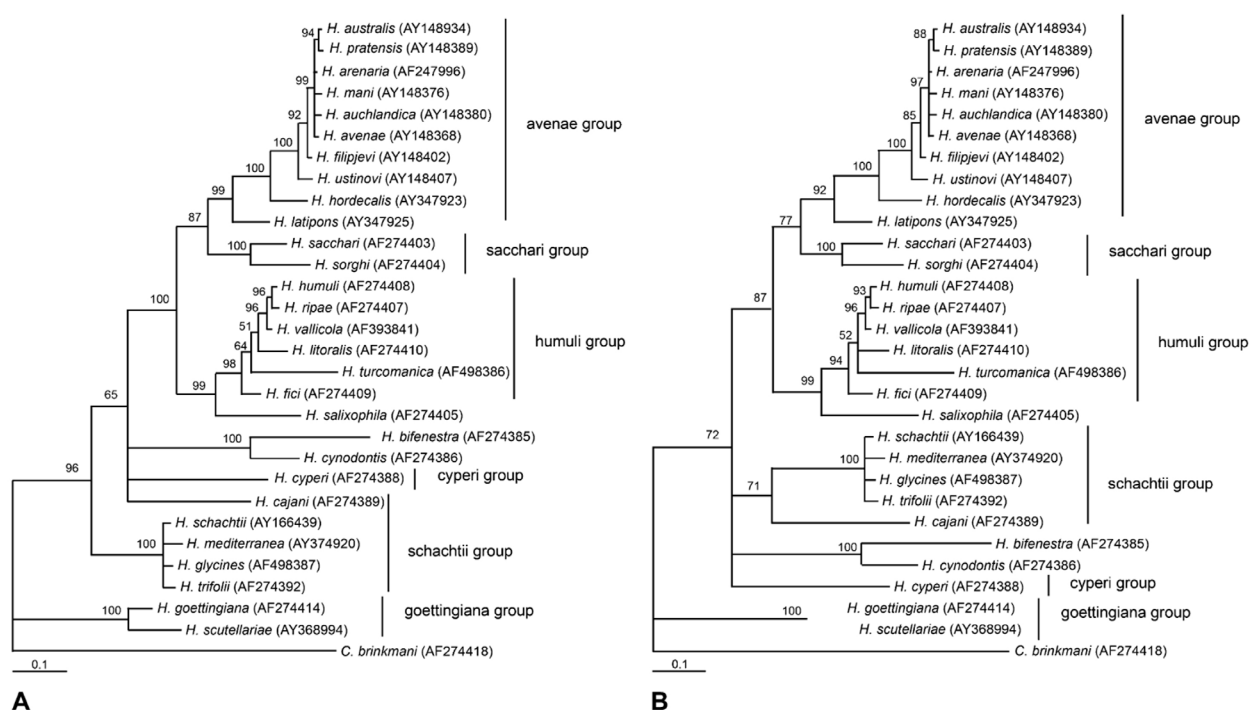


Рисунок 7.9. Байесовские деревья (50%-ный консенсус), полученные с помощью (А) модели GTR + I + G и (В) комплексной модели: модель 4 x 4 для петель и модель 16-дублетов для стеблей вторичной структуры. Апостериорные вероятности, превышающие 50%, приведены для соответствующих клад.

Хотя выбор правильной модели является сложной задачей и невозможен без экспериментального подтверждения, сравнительный анализ таких характеристик, как энергетическая устойчивость структур молекул, количество и распределение компенсирующих оснований, является важным. Согласованность структурных вариаций вдоль последовательности или выравнивания может дать подсказки для предпочтений или обоснований структурной корректности одной модели над другой. В настоящем исследовании мы предлагаем улучшенные модели ВТС2 для цистообразующих нематод рода *Heterodera*, используя комбинации нескольких подходов и процедур оптимизации. В некоторых случаях, таких как нематоды из группы *Cyperi* с сильно расходящимися последовательностями, мы не

смогли реконструировать их ВТС2 и включить в настоящее исследование. Проблема выбора правильной модели для ВТС2 становится более сложной, чем с 18S и 26 / 28S рРНК, если принять во внимание динамическую конформационную модель, предложенную Cote *et al.* (2002). Эти авторы различают «модель кольца» и «модель шпильки» – две альтернативные вторичные структуры для *Saccharomyces cerevisiae*. Первоначальное формирование кольцевой структуры может иметь важное значение для ранних событий процессинга и затем может сопровождаться переходом к шпилечной структуре (Cote *et al.*, 2002). Альтернативное свертывание спиралей вокруг центрального ядра структуры у ВТС2 наблюдалось также для микоризных грибов рода *Senococcum* (Shinohara *et al.*, 1999). Наши данные для некоторых цистообразующих нематод также предполагают, что ВТС2 может быть динамической структурой, сгибающейся между двумя альтернативными вариантами складывания. Мы полагаем, что несоответствие между нашими и представленными в базе моделями можно объяснить тем, что ВТС2 модели, предложенные Wolf *et al.* (2005), могут содержать структурные элементы другого альтернативного складывания.

В наших предыдущих исследованиях нескольких групп нематод различия в топологиях деревьев, полученных с использованием традиционных методов, и моделей, учитывающих вторичную структуру, были достаточно убедительными (Subbotin *et al.* 2005, 2007). В настоящей работе, однако, филогенетические деревья, полученные по разным моделям, принципиально не различались, и они находятся в хорошем соответствии с ранее опубликованными результатами для гетеродерид (Sabo *et al.*, 2001; Subbotin *et al.*, 2001; Tanha Maafi *et al.*, 2003; Madani *et al.*, 2004). Влияние комплексной модели показало, что взаимоотношения между видами в группах Humuli, Avenae и Schachtii существенно не различались в разных моделях. На БВ деревьях, полученных из обеих моделей, цистообразующие нематоды распределены по нескольким отдельным кластерам: группы Avenae, Sacchari, Humuli, Schachtii и Goettingiana. В обоих БВ деревьях были очевидны сестринские отношения между группами Avenae и Sacchari, а также между группой Humuli и *H. salixophila*.

БВ анализ в рамках сложной модели показывает, что отношения между несколькими основными группами, такими как Schachtii или Cyperi, и кладой Avenae + Sacchari + Humuli остаются все же неразрешенными. Известно, что применение модели вторичной структуры рРНК для филогенетического анализа приводит к деревьям с менее выявленными отношениями между кладами и, вероятно, устраняет некоторую искусственную поддержку для некоторых клад. Высоко разрешенная топология в некоторых частях дерева в наших исследованиях указывает на то, что филогенетический сигнал все же был сохранен в последовательностях ВТС2 для некоторых групп видов.

Хотя включение информации о вторичной структуре позволяет улучшить оценки филогении, отношения между несколькими основными гетеродеридными кладами остаются плохо выявленными. Это говорит о том, что маркер ВТС2 не содержит достаточного филогенетического сигнала для разрешения отношений на более высоких таксономических уровнях. Таким образом, основные выводы нашего исследования: (i) термодинамические критерии и ковариационный анализ обеспечивают более точный метод определения вторичной структуры ВТС2 у цистообразующих нематод, чем метод гомологического моделирования, предложенный Wolf *et al.* (2005); (ii) консенсусные модели вторичной структуры ВТС2, разработанные нами для Heteroderidae, служат полезным руководством для реконструкции оптимальных выравниваний и источником дополнительных данных и структурных вариаций для изучения филогении; (iii) применение информации о вторичной структуре обеспечивает применение сложной модели замещения нуклеотидов и дает в конечном счете более реалистичную картину взаимоотношений у гетеродерид.

7.3. Сходство молекулярных и немолекулярных филогенетических гипотез

Punctoderinae. Наши анализы убедительно подтверждают монофилию этого подсемейства, содержащего роды *Cactodera*, *Punctodera* и *Globodera*. В соответствии с филогенетическими гипотезами, предложенными Wouts (1985), эти три рода считаются очень тесно связанными, разделяющими схожую структуру фенестрации вокруг вульвы (циркумфенестральный тип вульварной пластики) и принадлежащую к исключительной эволюционной линии.

Тесные связи между *Cactodera* (*C. milleri* и *C. weissii*) и видами *Globodera*, паразитирующими на Solanaceae, были продемонстрированы Ferris (1998) на основе данных последовательности ВТС рРНК гена. Согласно нашим данным в большинстве анализов, род *Cactodera* можно считать базальным таксоном в Punctoderinae, что подтверждает гипотезу, выдвинутую Ferris (1979) и основанную на кладистическом морфологическом подходе. Stone (1975) и Э.Л. Кралль и Х.А. Кралль (1978) считали *Punctodera* примитивным родом, происходящим независимо от *Globodera* или *Cactodera*. Wouts (1985) поместил *Punctodera* на вершину Punctoderinae и считал род более продвинутым. Однако относительно высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей этих трех родов позволяет предположить, что они могли только относительно недавно дивергировать друг от друга.

Признание монофилетического рода *Globodera* не подтверждается некоторыми анализами. Конвергентная эволюция видов *Globodera*, паразитирующих на растениях из неродственных семейств Solanaceae, Rosaceae и Asteraceae, была выдвинута в качестве

гипотезы еще Кралль и Кралль (1978), однако без каких-либо морфологических доказательств. Мы полагаем, что наблюдаемую парафилию рода *Globodera* в некоторых результатах можно объяснить просто общей тенденцией филогенетических алгоритмов создавать несбалансированные деревья при анализе данных, содержащих значительные различия в нуклеотидных последовательностях, а не истинным ходом эволюции этой группы. Генетическая дивергенция внутри этого рода отражает видовые группировки, основанные на географическом происхождении и растениях-хозяевах: (i) *G. artemisiae*, заражающие полынь в Европе и Азии, (ii) *G. pallida* и *G. rostockiensis*, происходящие из Андских регионов Южной Америки и паразитирующие на картофеле и других близкородственных видах Solanaceae, (iii) виды комплекса *G. tabacum*, обнаруживаемые главным образом в Соединенных Штатах и паразитирующие на других видах семейства Solanaceae, особенно на табаке (Evans & Rowe, 1998). Подробно исследования филогении Punctoderinae приводятся в нашей работе Subbotin *et al.* (2011).

Heteroderinae. В течение долгого времени таксономисты разделили цистообразующих нематод из рода *Heterodera* на три группы, основанные на структурах вульварных конусов: группы Schachtii, Goettingiana и Avenae (Mulvey & Golden, 1983; Baldwin & Mundo-Ocampo, 1991). Также были предложены три дополнительные частично перекрывающиеся группы: группа Humuli (Mathews, 1971; Subbotin *et al.*, 1997), группа Fici-humuli (Ferris, 1979) и группа Latipons (Wouts & Sturhan, 1995). Комбинация наших молекулярных данных с морфологией вульварных структур и количеством инцизур в боковом поле личинок второй стадии поддерживает выделение групп Schachtii, Goettingiana, Avenae и Humuli, хотя и с измененным видовым составом, и выделение двух новых групп: Cyperi и Sacchari. В настоящее время мы выделяем следующие группы внутри рода *Heterodera*: Afenestrata, Avenae, Bifenestra, Cardiolata, Cyperi, Goettingiana, Humuli, Sacchari и Schachtii (Handoo & Subbotin, 2018) (Таблица 7.3).

Исследователями было предложено несколько гипотез о самых ранних группах, возникших в пределах рода *Heterodera*: амфимиктические виды *H. schachtii*, *H. glycines* и, возможно, *H. salixophila* (Krall & Krall, 1978), форма, похожая на *H. cruciferae*, паразитирующая на двудольных (Stone, 1979); или цистообразующий вид, помещенный нами в синонимизированный род *Afenestrata* (Ferris, 1979; Wouts, 1985). Наш филогенетический анализ вносит ясность в понимание базальных взаимоотношений у гетеродер, обычно помещая группу Goettingiana ближе всего к истокам рода. Очевидно, наши молекулярные данные подтверждают гипотезу Stone (1979).

Молекулярная филогения гетеродерид позволяет нам оценить гипотезу коэволюции гетеродерид с их хозяевами, предложенную Краллем и Кралль (1978) и Stone (1979). Наши

данные подтверждают идею о том, что разные гетеродеридные группы ассоциированы с хозяевами, принадлежащими одному или нескольким близким семействам растений (Рисунок 7.10), с которыми они, вероятно, эволюционировали. Тем не менее некоторые виды были в состоянии вторично колонизировать экологически сходные виды растений из неродственных семейств. Наши данные также свидетельствуют о ранней дивергенции между видами цистообразующих нематод, обитающих в тропических регионах и регионах с умеренным климатом.

Таблица 7.3 – Морфологические характеристики групп рода *Heterodera*

Стадия Характеристики Группа	Циста					Личинка	Хозяин
	Форма	Фенестрация	Буллы	Нижний мост	Вульварная щель	Линий в боковом поле	
<i>Afenestrata</i>	Лимоновидная или округлая	Отсутствует	Отсутствуют	Отсутствует или тонкий	Длинная	3 или 4	Однодольные
<i>Avenae</i>	Лимоновидная	Бифенестральная	Хорошо развиты	Отсутствует или имеется	Короткая	4	Однодольные
<i>Bifenestra</i>	Лимоновидная	Бифенестральная	Отсутствуют	Отсутствует	Короткая	3	Однодольные
<i>Cardiolata</i>	Лимоновидная	Амбифенестральная	Отсутствуют	Имеется	Длинная	3	Однодольные
<i>Syperii</i>	Лимоновидная или округлая	Амбифенестральная	Отсутствуют или имеются	Отсутствует или имеется	Длинная	3 или 4	Однодольные
<i>Goettingiana</i>	Лимоновидная	Амбифенестральная	Отсутствуют или имеются	Тонкий	Длинная	4	Двудольные
<i>Humuli</i>	Лимоновидная	Бифенестральная, Амбифенестральная у <i>H. fici</i>	Отсутствуют или имеются	Тонкий	Длинная	4	Двудольные
<i>Sacchari</i>	Лимоновидная или округлая	Амбифенестральная	Пальце-подобные	Толстый	Длинная	3	Однодольные
<i>Schachtii</i>	Лимоновидная	Амбифенестральная	Хорошо развиты	Толстый	Длинная	4	Двудольные

Группа *Goettingiana* включает *H. goettingiana*, *H. carotae*, *H. urticae* и *H. cruciferae*. Другие виды (*H. syperi* и *H. cardiolata*), которые ранее считались членами этой группы (Baldwin & Mundo-Ocampo, 1991), должны, по нашим данным, считаться представителями других групп. Неожиданная кластеризация *H. carotae* (штат Мичиган, США) с группой *Schachtii* в филогенетической кладограмме, основанной на последовательностях ВТС, полученных Ferris (1998), была вызвана неверной видовой идентификацией.

Группа *Syperii* включает *H. syperi* и *H. oryzicola*. Эти виды паразитируют на растениях семейства *Cyperaceae* и *Poaceae*, *Oryzoideae*, у их личинок имеется три инцизуры в боковом поле, буллы слабо развиты или вообще отсутствуют, и они встречаются в субтропических и тропических регионах мира. Эти два вида находятся в базальном положении на большинстве наших филогенетических деревьев. *Heterodera* (= *Afenestrata*) *orientalis* образуют кладу с высокой поддержкой с *H. cynodontis* и *H. bifenestra* на большинстве филогенетических деревьев. Цисты видов бывшего рода *Afenestrata* не имеют ни буллы, ни нижнего моста и фенестрации. Последние признаки, которые не являются общими с другими цистообразующими родами, по мнению некоторых авторов, требуют выделения для этих видов отдельного рода, считающегося предком рода *Heterodera* (Baldwin & Bell, 1985; Wouts,

1985). Однако наши результаты молекулярных анализов не поддерживают эту гипотезу. Вместо этого они предполагают синонимизировать род *Afenestrata* на основании его тесной родственной связи с *H. bifenestra* и *H. cynodontis*. Подробные исследования и синонимизация рода *Afenestrata* с родом *Heterodera* изложены в нашей работе Mundo-Ocampo *et al.* (2008).

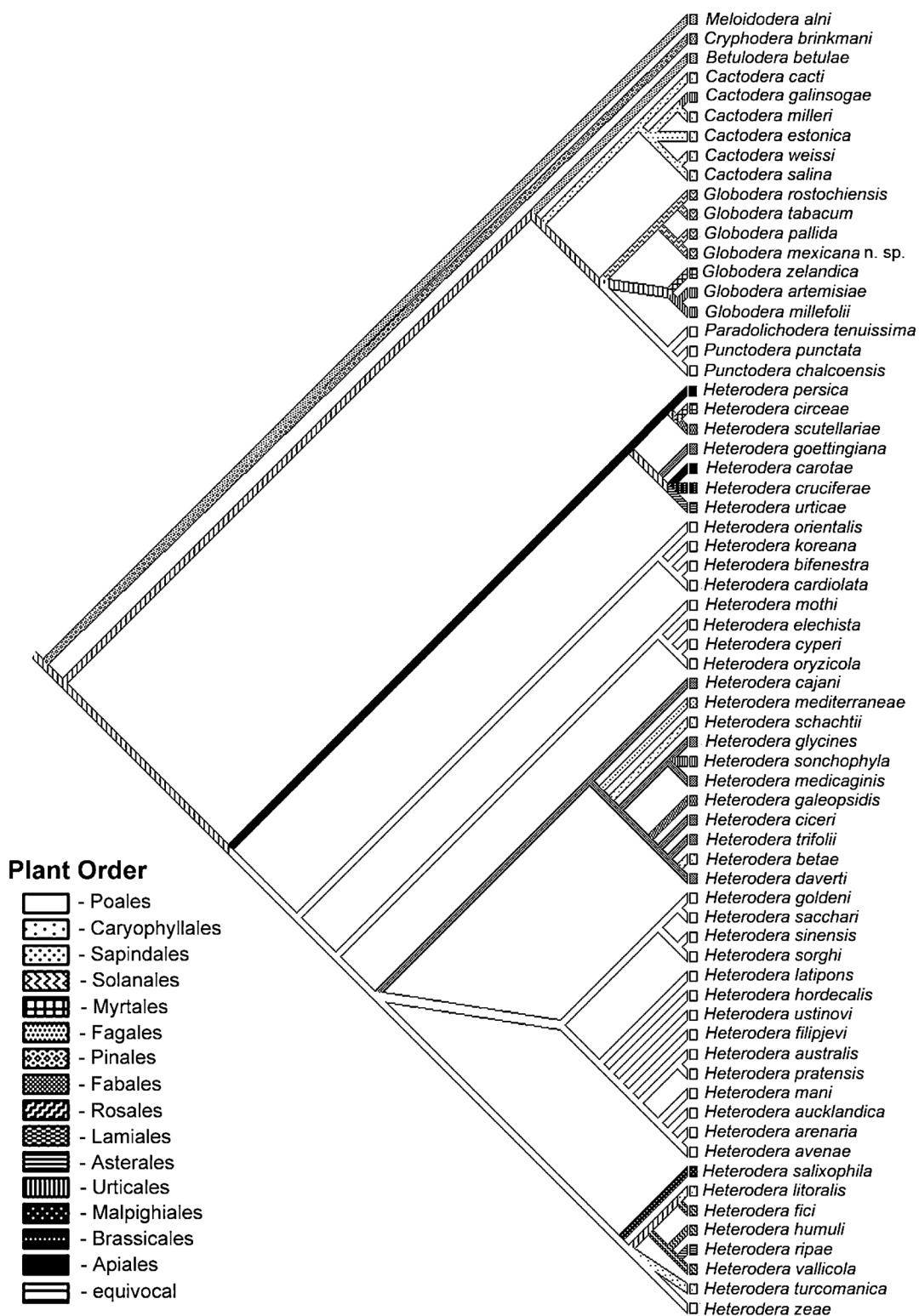


Рисунок 7.10. Филогенетические отношения между некоторыми представителями подсемейства Heteroderinae, реконструированные с использованием Байесовского анализа и с картированием растений-хозяев.

Наши результаты также подтверждают мнение Wouts и Sturhan (1995) о том, что *H. bifenestra* не относится к группе Avenae из-за наличия только трех инцизур в боковом поле у личинок второй стадии и близка к *H. cyperi*, *H. graminis* и *H. mothi*. На наших деревьях *H. bifenestra* сгруппирована с *H. cardiolata* (= *H. cynodontis*), который относится к видовому комплексу *H. cardiolata*. Согласно Ferris (1998), ВТС последовательность *H. bifenestra* сильно отличается от таковой у всех других таксонов в ее филогенетическом анализе, и этот вид был выбран ею в качестве внешней группы для цистообразующих нематод. Тем не менее в нашем исследовании этот вид неизменно помещался в род *Heterodera* с высокой статистической поддержкой, когда в качестве внешней группы использовались цистойдные нематоды.

В то время как позиции предыдущих клад были хорошо разрешены, по крайней мере в некоторых деревьях, порядок ветвления среди других основных гетеродеридных клад оставался гораздо более неопределенным. Неразрешенная политомия позволяет предположить, что эти гетеродеридные группы могли относительно быстро эволюционировать, или их ВТС области быстро дивергировали. Две из этих групп (группа Schachtii, группа Numuli и *H. salixophila*), по-видимому, коэволюционировали с двудольными, в то время как другие группы (Sacchari и Avenae) коэволюционировали с однодольными.

Группа Numuli характеризуется бифенестральным строением вульварной пластинки у большинства видов (за исключением амбифенестрального у *H. fici*), небольшим количеством или отсутствием буллы, очень слабым нижним мостом и длинной влагалищной щелью, расположенной между утолщенными губами (Subbotin *et al.* 1997). За исключением вида *H. litoralis*, эта группа явно развивалась вместе с растениями из порядка Urticales. *Heterodera fici*, широко распространенный субтропический и тропический вид, очевидно, отличается от всех умеренных видов. Филогенетический анализ подтверждает, что бифенестральное строение цисты последнего вида является апоморфным состоянием. Интересно, что вид *H. salixophila*, ранее рассматриваемый Baldwin и Mundo-Ocampo (1991) как представитель группы Schachtii, имеет общего предка с группой Numuli. Эти взаимоотношения ранее не рассматривались.

Другая основная клада включала две морфологически разные группы, которые паразитируют на однодольных: Sacchari (амбифенестральные цисты, личинки второй стадии с тремя инцизурами) и Avenae (бифенестральные цисты, личинки второй стадии с четырьмя инцизурами). Тесные взаимоотношения между этими двумя группами впервые были выявлены в результате нашего исследования. Наш молекулярный анализ также подтверждает неправомочность выделения рода *Bidera*, выделенного для видов группы Avenae рода *Heterodera*. Синонимизация этих родов была предложена несколькими авторами (Mulvey &

Golden, 1983; Wouts & Sturhan, 1995). Удивительно, но мы не обнаружили каких-либо нуклеотидных различий ВТС между европейскими популяциями *H. avenae* и видом *H. arenaria*, что подтверждает гипотезу о том, что *H. arenaria* является близкородственным видом с *H. avenae*.

Некоторые несоответствия между нашей молекулярной филогенией и ранее предложенными филогенетическими гипотезами могут быть объяснены с позиции гомопластической эволюции. Например, по нашим данным, бифенестральный конус возник независимо, по крайней мере, три раза в течение эволюции цистообразующих нематод. Аналогичным образом наличие трех инцизур в боковом поле у личинок нематод второй стадии, по-видимому, возникло дважды, независимо. Наконец, короткая влагалищная щель появилась независимо в пределах подсемейства Heteroderinae у группы Avenae и у вида *H. bifenestra*.

7.4. Козволюция цистообразующих нематод с растениями-хозяевами

С учетом современной классификации растений, виды цистообразующих нематод описаны по типовым растениям-хозяевам, принадлежащим к следующим порядкам: род *Heterodera* (80 видов) – Poales (42); Fabales (10), Caryophyllales (5), Rosales (5), Lamiales (4), Malpighiales (3), Apiales (2), Brassicales (2), Urticales (2), Saxifragales (1), Myrtales (1), Fagales (1), Sapindales (1), Asterales (1); род *Globodera* (10 видов) – Solanales (6), Asterales (2), Rosales (1), Myrtales (1); род *Cactodera* (14 видов) – Caryophyllales (10), Solanales (1), Asterales (1), Poales (1); род *Punctodera* (4 вида) – Poales (4); род *Dolichodera* (1 вид) – Poales (1); род *Paradolichodera* (1 вид) – Poales (1); род *Betulodera* (1 вид) – Fagales (1). Таким образом, почти половина известных видов цистообразующих нематод описаны из растений порядка Poales, одного из крупнейших порядков цветковых растений.

Кралль и Кралль (1970, 1973, 1978) и Кралль (1990) подчеркивали важность сравнительного экологического подхода в изучении эволюции цистообразующих нематод. Они предложили гипотезу коэволюции гетеродерид, используя концепции Гроссгейма (1945), который предполагал, что эволюция цветковых или покрытосеменных растений может быть представлена в форме трех этапов филогенеза. На этом основании Кралль и Кралль (1978) предположили, что гетеродериды, чьи виды паразитируют на покрытосеменных и которые характеризуются более широким диапазоном хозяев (более низкая степень трофической специализации) меньше эволюционно продвинуты, по сравнению с видами, у которых более ограниченный круг хозяев. Они отметили, что не было обнаружено никаких видов цистообразующих нематод, паразитирующих на голосеменных и на таксонах покрытосеменных растений, отнесенных Гроссгеймом к первой стадии филогенетического

развития; это Protanthophyta, в том числе Magnoliales, Ranunculales и другие. Гроссгейм отнес ко второй стадии филогенеза покрытосеменных Mesanthophyta, включающие крупные порядки цветковых растений, в том числе семейства, филогенетически далекие друг от друга. Гроссгейм полагал, что третьей специализированной и высшей стадией филогенеза цветковых растений являются Nypsanthophyta, в том числе травы, осоки и многие другие растения. Эти растения, согласно Кралль и Кралль (1978), заражаются видами цистообразующих нематод, у которых относительно ограниченное количество хозяев и которые часто ограничены одним родом или семейством растений (Kral, 1990). Дополнительные аспекты гипотез коэволюции цистообразующих нематод и их растений-хозяев были проанализированы Stone (1979, 1985) и Sturhan (2000). Через реконструкцию молекулярной филогении гетеродерид мы дополнительно протестировали гипотезы коэволюции гетеродерид с их хозяевами (Subbotin *et al.* 2001a). Наши молекулярные данные подтвердили заключение, что каждая гетеродеридная клада связана с растениями из одного семейства или с группой близкородственных семейств растений. Тем не менее наши данные свидетельствуют о том, что некоторые виды вторично колонизировали растения-хозяева, не связанные родством с первичных хозяином.

Филогенетическое дерево для гетеродерид с порядками растений-хозяев приводится на Рисунке 7.10. Внешние группы для этого анализа взяты роды *Meloidodera* и *Cryphodera*. Они были ранее предложены в качестве предков для цистообразующих нематод (Кралль и Кралль, 1978; Wouts, 1985, Subbotin *et al.*, 2006). Виды этих родов паразитируют на довольно широком спектре растений, в том числе голосеменных и покрытосеменных. Действительно, способность некоторых видов *Meloidodera* и *Cryphodera* паразитировать на видах *Pinus*, и таких, как *Rhizonemella sequoia*, паразитировать на *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl., согласуется с аргументацией Кралля и Кралль (1978), которые утверждали, что эти виды имеют древнее происхождение. Результаты молекулярно-филогенетического анализа показывают, что подсемейство Punctoderinae имеет несколько линий: i) наиболее базальная линия, *Betulodera*, имеющая хозяев из Fagales; ii) *Cactodera*, ассоциированная с Caryophyllales (Amaranthaceae, Caryophyllaceae, Portulacaceae) и, возможно, сравнительно недавно с Asterales и Poales; iii) *Punctodera* и *Paradolichodera*, паразитирующие на Poales; iv) *Globodera* с хозяевами из Asterales и Myrtales; v) *Globodera*, паразитирующая на Solanales.

У рода *Heterodera* прослежены шесть линий, три из которых с однодольными и три с двудольными растениями. Группа Goettingiana включает виды, паразитирующие на растениях, принадлежащих к различным таксономическим группам. На основе анализа последовательностей генов ВТС рРНК для некоторых видов паразитов Brassicales и Apiales, Myrtales и Lamiales правдоподобно предположить, что некоторые из этих видов связаны с

изменениями в специализации хозяина относительно недавно и совершили эти быстрые переходы к филогенетически не связанным, но экологически сходным растениям-хозяевам. Несколько линий связаны с Poales. На некоторых деревьях (Subbotin *et al.*, 2001a; Tanha Maafi *et al.*, 2003) группа Cyperi образуют кладу с группой Afenestrata, *H. cardiolata* и *H. bifenestra*. Все эти виды, кроме *H. bifenestra*, были найдены паразитирующими на растениях из семейств Cyperales и Poaceae (подсемейства Panicoideae, Chloridoideae, Bambusoideae). Другая линия, связанная с Poales, включает в себя виды из группы Avenae, которые паразитируют на Poaceae из подсемейства Pooideae и из группы Sacchari, паразитирующие на растениях из подсемейств Panicoideae и Arundinoideae.

Тропический вид *H. cajani* распространен в Индии, Пакистане и Египет и паразитирует на сельскохозяйственных культурах из семейства Fabaceae, разделяет общего предка с видами из группы *H. schachtii sensu stricto*. Поэтому мы предполагаем, что группа Schachtii, в первую очередь, совместно развивалась с растениями отряда Fabales и вторично колонизовала Lamiales, Caryophyllales и Asterales (рис. 7.10).

Другая линия включает в себя виды группы Humuli, связанной с хозяевами из Caryophyllales, Urticales и Rosales, а также *H. salixophila* и *H. zae*, паразитирующие на растениях из Malpighiales и Poales соответственно. Положение *H. zae* в пределах рода нуждается в более тщательном тестировании с несколькими наборами данных генов. Нужно подчеркнуть, что более четкое понимание закономерностей коэволюции Heteroderinae зависит от нашего более полного разрешения вопросов филогении нематод, а также филогении видов растений, с которыми они коэволюционировали.

7.5. Важность данных о последовательностях ВТС рРНК гена для филогенетических исследований гетеродерид

Анализ данных о последовательности ВТС, представленных в нашем исследовании, дает новое понимание эволюционных отношений цистообразующих видов нематод. Полученные филограммы в целом согласуются с некоторыми современными морфологическими группировками цистообразующих видов нематод и с предыдущими гипотезами их филогенетических связей и коэволюции с растениями-хозяевами. Хотя МП, МЛ и МЭ анализы выявили несколько альтернативных филогенезов, некоторые филогенетические картины для ряда групп видов тем не менее хорошо просматриваются. Анализ филогений также позволил сделать ряд выводов о полярности различных морфологических признаков и о спектре растений-хозяев.

Галловые нематоды рода *Meloidogyne* являются экологически и морфологически сходными с цистообразующими нематодами. У некоторых видов рода *Meloidogyne* была обнаружена значительная вариация в последовательностях ВТС рНК гена (Hugall *et al.*, 1999). В отличие от Hugall *et al.* (1999), мы не намеревались тщательно исследовать полиморфизм ВТС и использовали главным образом прямое секвенирование ПЦР продуктов. Хотя прямое секвенирование менее чувствительно к выявлению полиморфизма, этот метод также позволил обнаружить гетерогенность у ВТС, которую мы наблюдали у некоторых ПЦР продуктов, полученных с этого генного участка. Однако в этих немногих случаях варианты ДНК-последовательностей, полученные после клонирования и использованные для филогенетического анализа, не привели к их различному размещению на филогенетических деревьях. Эти последовательности образовывали единые кластеры. Мы предполагаем, что микрогетерогенность внутри видов цистообразующих нематод менее распространена, чем у некоторых видов мелойдогин. Однако представляется, что основное ограничение в использовании данных для ВТС последовательности у гетеродерид заключается в их ограниченной информативности и относительно низкой разрешающей способности для построений филогений. Представляется, что более надежная филогения в этом семействе может быть получена как при включении более обширной выборки таксонов, так и комбинированного анализа данных ВТС с другими наборами генов. Применение такого подхода может помочь улучшить наше понимание филогенеза у цистообразующих нематод.

ГЛАВА 8. ДНК-БАРКОДИРОВАНИЕ, ФИЛОГЕНИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ НЕМАТОД ВИДОВ РОДА *HETERODERA* ГРУППЫ *AVENAE*

Перед нашим исследованием стояли следующие задачи: i) проанализировать филогенетические отношения внутри видов группы *Avenae* с использованием последовательности ВТС рРНК гена и частично секвенированного COI гена; ii) провести молекулярную характеристику видов и популяции группы *Avenae* с использованием последовательностей COI гена; iii) предложить и проверить гипотезы происхождения и распространения видов группы *Avenae*.

В этом исследовании было проанализировано более чем 150 популяций нематод, собранных в 26 странах (Таблица 6, Приложение). В результате проведенных исследований было получено 220 новых последовательностей COI гена и 80 новых последовательностей ВТС рРНК генов для видов группы *Avenae* (Рисунок 8.1). Результаты нашей работы подробно изложены в нескольких публикациях: Subbotin *et al.* (1996, 1999, 2002, 2003, 2015, 2018); Ferris *et al.* (1999); Gäbler *et al.* (2000); Smiley *et al.* (2017). Основные результаты по филогеографии, филогении и ДНК-баркодированию этой группы нематод приводятся ниже.

8.1. Филогенетический анализ ВТС рРНК гена

Два подхода были использованы для анализа последовательностей ВТС рРНК гена видов группы *Avenae*. Первый подход включал в себя БВ, МЛ и МП анализы ВТС рРНК гена, содержащие только референтные последовательности для каждого вида группы *Avenae*, а второй подход включал анализ с использованием статистической парсимонии (СП) нескольких выравненных последовательностей ВТС рРНК гена для видового комплекса *H. avenae* и видов *H. hordecalis*, *H. latipons* и *Heterodera* sp.

8.1.1. Группа *Avenae*

Филогенетические взаимосвязи в пределах 11 валидных и одного предполагаемого нового вида группы *Avenae*, как это было выявлено БВ, МЛ и МП анализами последовательностей ВТС рРНК гена, приведены на Рисунке 8.2. Комплекс видов *H. avenae* образовывал умеренную или сильно поддерживаемую кладу, тогда как *Heterodera latipons* и *Heterodera* sp. формировали базальную кладу на дереве.

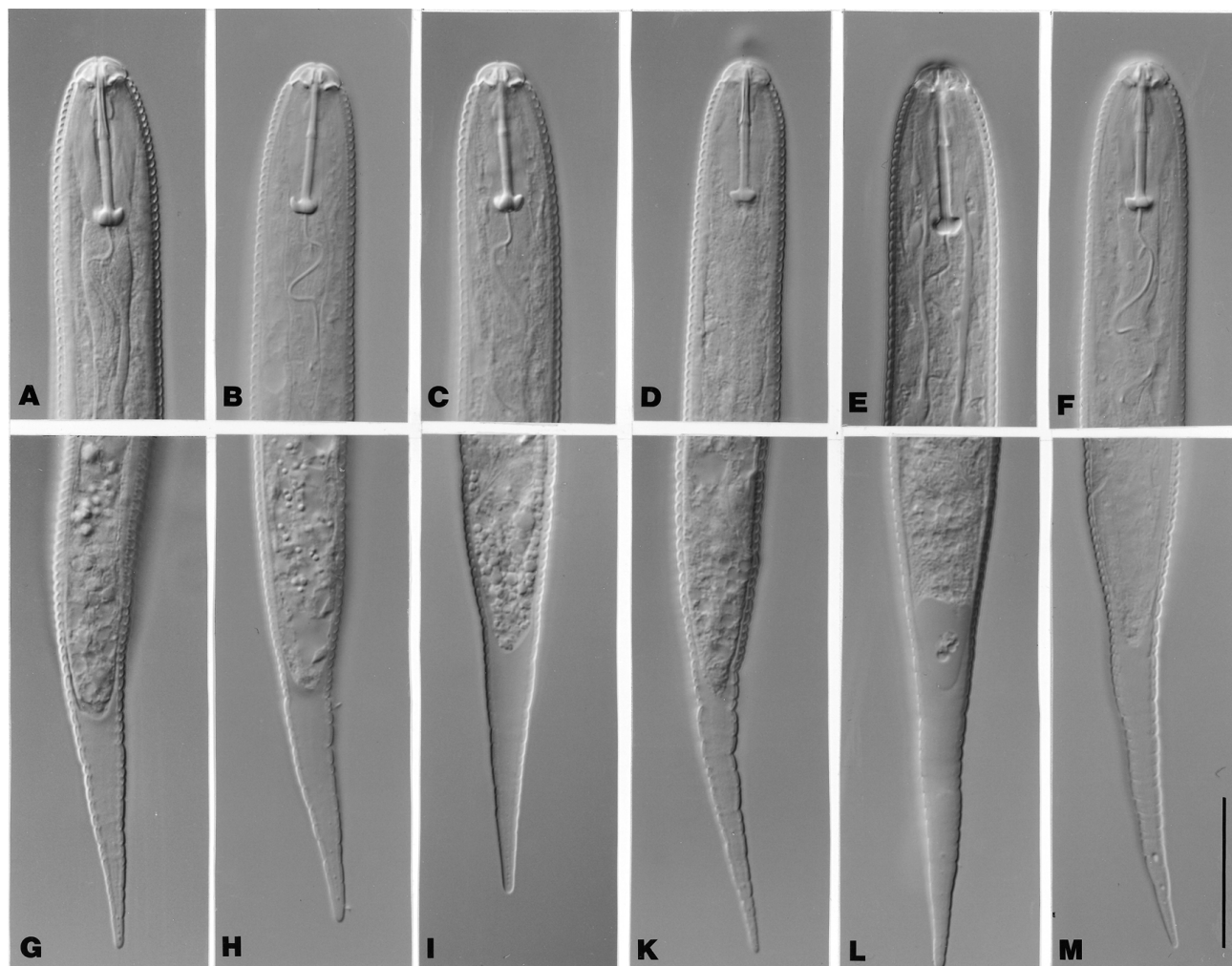


Рисунок 8.1. Головные концы и хвосты личинок второй стадии. А, G: *H. avenae* (Кнокке, Бельгия); В, H: *H. avenae* (Израиль); С, I: *H. australis* (Австралия); D, K: *H. aucklandica* (Великобритания); E, L: *H. arenaria* (Голландия); F, M: *H. ustynovi* (Германия). Масштаб – 30 мкм.

8.1.2. Видовой комплекс *Heterodera avenae*

Из Генного банка было загружено 638 нуклеотидных последовательностей. Но только 610 последовательностей были сохранены в анализе, потому что эти последовательности содержали BTC1 и BTC2 участки, а также эти последовательности оценивались как не содержащие или содержащие минимальное число ошибок чтения. Нуклеотиды, разительно отличающиеся от гомологичных в консервативных 5' и 3' концах последовательности, считались ошибками чтения и удалялись из анализа. После добавления новых последовательностей окончательное выравнивание BTC1-5.8S-BTC2 содержало 613 последовательностей. Выравнивание составляло 758 п.н. в длину и включало 114 последовательностей для *H. avenae*, две – для *H. arenaria*, три – для *H. aucklandica*, шесть – для *H. mani*, четыре – для *H. ustynovi*, 126 – для *H. filipjevi*, 329 – для *H. sturhani*, 11 –

для *H. pratensis* и 18 последовательностей, идентифицированных как *H. australis*. Последовательности *H. avenae* и *H. arenaria* были представлены гаплотипом Hav1 (93 последовательности), *H. filipjevi* гаплотипом Hf1 (77 последовательностей), а *H. sturhani* тремя основными гаплотипами: Hst1 (148 последовательностей), Hst2 (31 последовательность) и Hst3 (31 последовательность) (см. Таблицу 2 в работе Subbotin *et al.* 2018).

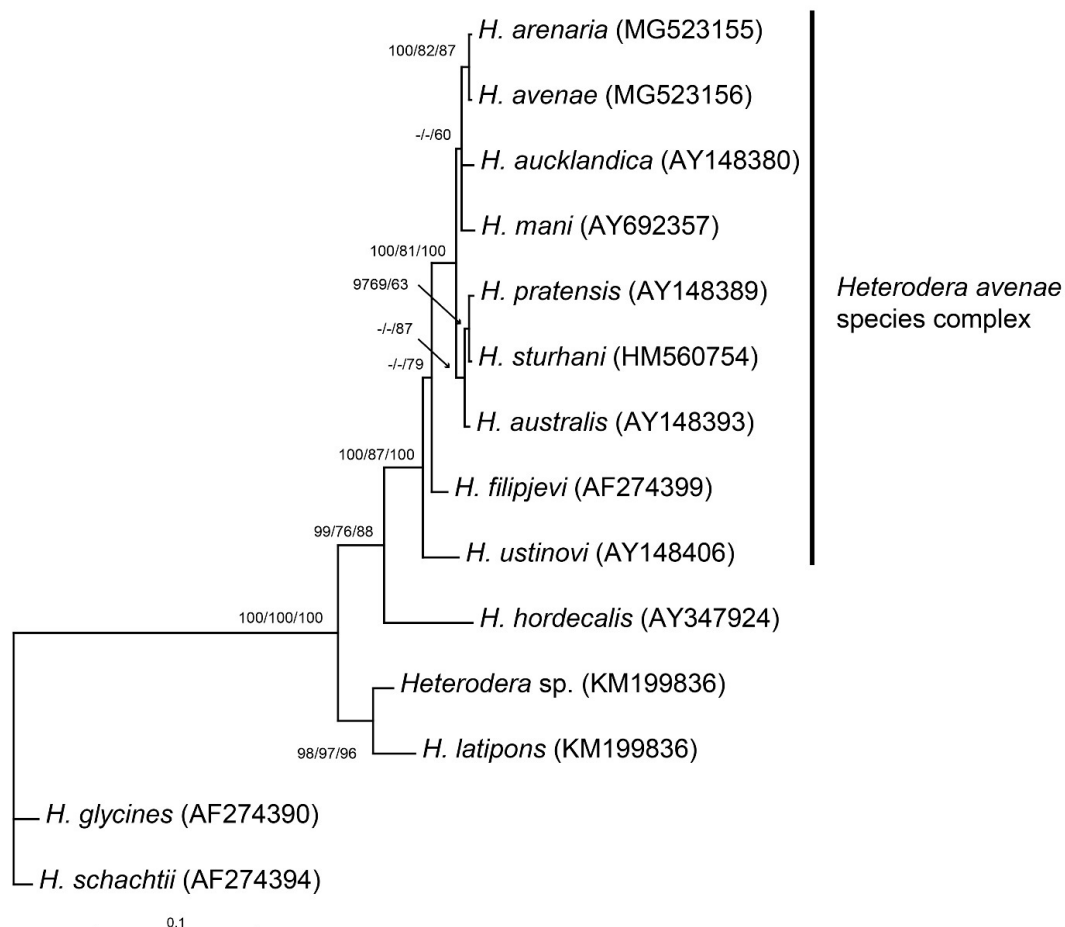


Рисунок 8.2. Филогенетические отношения между видами из группы Avenae, реконструированные с использованием Байесовского анализа последовательностей ВТС рРНК гена. Апостериорная вероятность и значения бутстрепа для БВ, МЛ и МП анализов даны для соответствующих клад. Значения менее 50% не указаны.

Филогенетическая сеть для последовательностей ВТС рРНК гена, реконструированная с использованием СП метода и программным обеспечением POPART, приведена на Рисунке 8.3. Этот метод позволил отличить *H. avenae* + *H. arenaria*, *H. mani*, *H. australis*, *H. ustinovi*, *H. filipjevi* и *H. sturhani* + *H. pratensis* друг от друга. *Heterodera sturhani* + *H. pratensis* отличался от *H. avenae* + *H. arenaria* не менее чем четырьмя нуклеотидными изменениями, и от последовательностей, обозначенных как *H. australis*, по крайней мере одним изменением. Видовая пара *H. avenae* и *H. arenaria* не была различима на основе ВТС рРНК гена. Эти виды отличались от *H. mani* двумя изменениями, а от *H. aucklandica* – четырьмя изменениями. Хотя все 11 последовательностей *H. pratensis* были связаны с *H. sturhani*, девять последовательно-

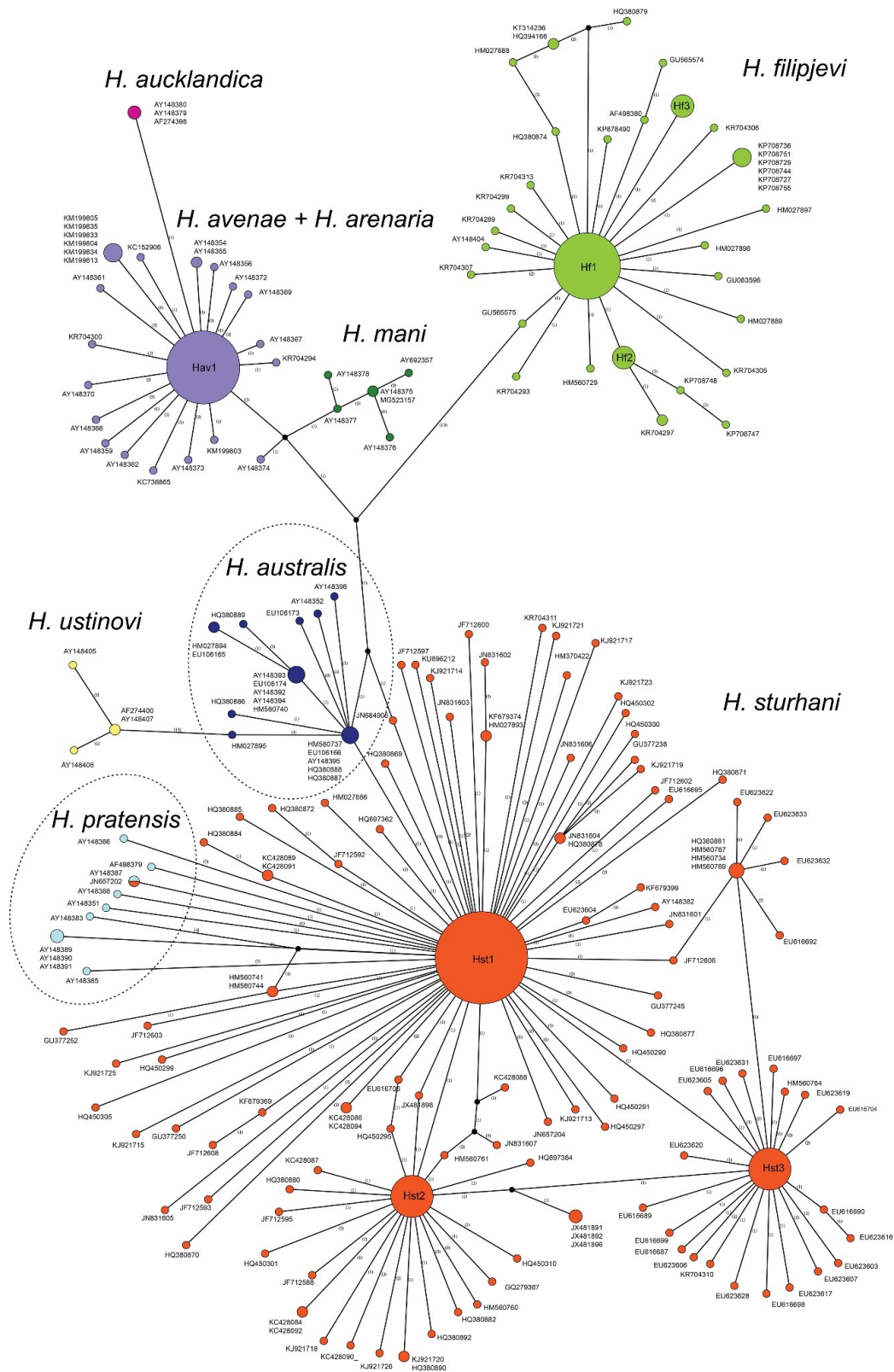


Рисунок 8.3. Статистическая сеть, построенная по принципу парсимонии, показывающая филогенетические отношения между ВТС рРНК гаплотипами видов из комплекса *Heterodera avenae*. Последовательности каждого вида отмечены разными цветами. Круги представляют собой последовательности каждого вида с одинаковым гаплотипом, а их размер пропорционален количеству этих последовательностей в образцах. Число различий нуклеотидов между последовательностями указаны на линиях, соединяющих круги. Маленькие черные кружки обозначают невыявленные гаплотипы.

стей *H. pratensis* представляли собой уникальные гаплотипы, и только две последовательности были идентичны с таковым у *H. sturhani*. Максимальная дивергенция ДНК-последовательностей для видов комплекса *H. avenae* составляла 4,1%.

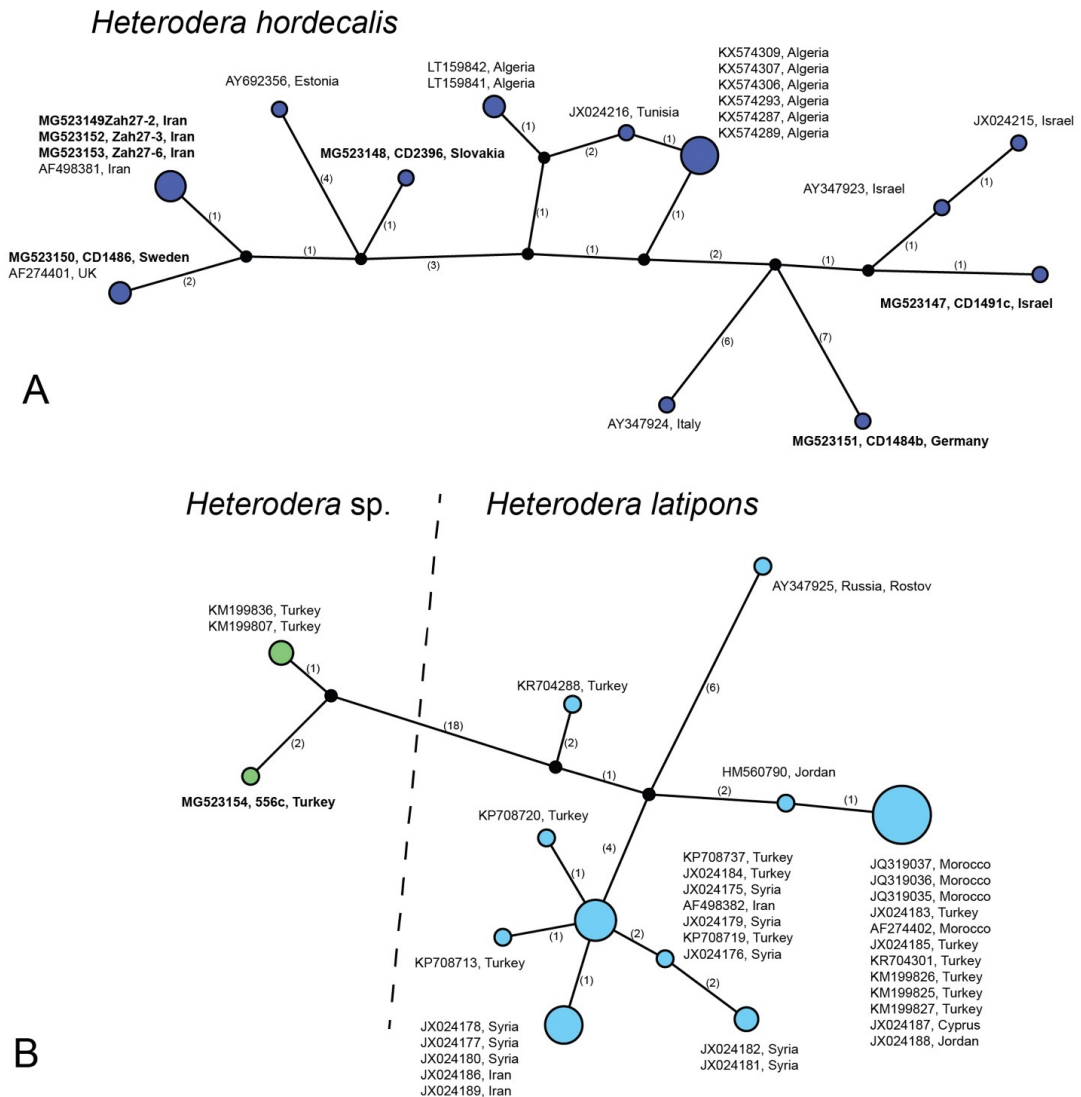


Рисунок 8.4. Статистическая сеть, построенная по принципу парсимонии, показывающая филогенетические отношения между гаплотипами ВТС рРНК гена. А: *Heterodera hordecalis*; В: *H. latipons* и *Heterodera sp.* Последовательности каждого вида отмечены разными цветами. Круги представляют собой последовательности с одинаковым гаплотипом, а их размер пропорционален количеству этих последовательностей в образцах. Различия в числе нуклеотидов между последовательностями указаны на линиях, соединяющих круги. Маленькие черные кружки представляют отсутствующие гаплотипы. Новые последовательности обозначены жирным шрифтом.

8.1.3. *Heterodera hordecalis*

Выравнивание рРНК ВТС гена составляло 839 п.н. в длину и включало 22 последовательности, в том числе семь новых. Филогенетическая сеть для последовательностей ВТС рРНК гена, воссозданная с использованием метода статистической парсимонии, приведена на Рисунке 8.4А. Последовательности итальянской и немецкой популяций были

связаны с последовательностями израильских, тунисских и алжирских образцов. Последовательность иранской популяции отличалась от последовательностей из Швеции, Великобритании, Словакии и Эстонии на 3-6 изменений, а также на 7 или более изменений от израильских, тунисских и алжирских образцов. Максимальная внутривидовая вариация последовательностей для *H. hordecalis* составляла 2,0%.

8.1.4. *Heterodera latipons* и *Heterodera* sp.

Выравнивание ВТС рРНК гена составляло в длину 813 п.н. и включало 31 последовательность *H. latipons* и три последовательности неизвестного, предположительно нового вида *Heterodera*, ранее идентифицированного как *H. latipons*. Две из последних трех последовательностей были уже опубликованы Imgen *et al.*, (2015) для двух образцов, собранных в двух местах в Турции, и одна наша новая последовательность также была получена из цисты, собранной в этой стране. Филогенетическая сеть для последовательностей ВТС гена, полученная с использованием СП, приведена на Рисунке 8.4В. Десять гаплотипов были отмечены для *H. latipons*, пять из которых пришли из Турции, и три гаплотипа были собраны в Сирии. *Heterodera latipons* из Ростова, Россия отличались 8-10 изменениями от других гаплотипов. Предполагаемый новый вид *Heterodera* отличается 21 или более заменами от гаплотипов *H. latipons*. Максимальная внутривидовая изменчивость для последовательностей *H. latipons* составляла 2,8%.

8.2. Филогенетический анализ COI гена

Для анализа последовательностей COI генов видов *Avena* были применены два подхода. Первый подход включал анализы БВ и МЛ гена COI, содержащий только эталонные гаплотипные последовательности видов *Avena*, тогда как второй подход включал СП анализ выравниваний последовательностей COI для каждого вида или групп родственных видов.

8.2.1. Группа *Avena*

Было получено в общей сложности 220 новых последовательностей генов COI в этом исследовании. Выравнивание COI гена составило 415 п.н. в длину. Большинство популяций нематод содержало только один гаплотип гена COI, тогда как два гаплотипа были обнаружены у 21 популяции и три гаплотипа – у двух популяций. Филогенетические взаимоотношения в пределах группы *Avena*, содержащие 79 референтных последовательностей известных гаплотипов и две последовательности видов внешней

группы, приведены на Рисунке 8.5. Несколько клад представляли собой различные виды группы *Avena*. Два вида были сгруппированы в одни и те же клады: *Heterodera avenae* типа А была сгруппирована вместе с *H. arenaria*, а вид *H. pratensis* был сгруппирован с *H. sturhani*.

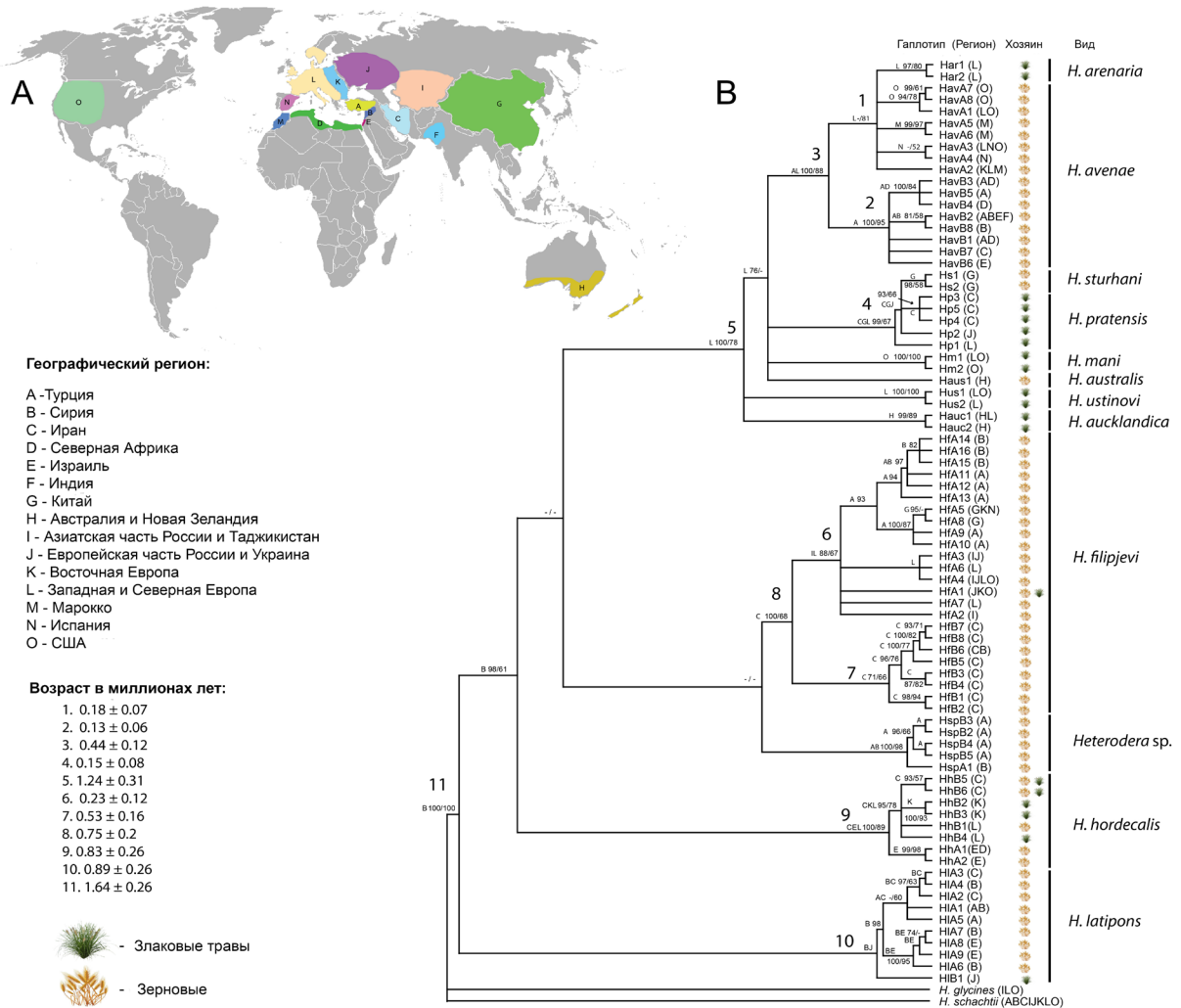


Рисунок 8.5. Филогенетические отношения между гаплотипами COI гена у видов группы *Avena*, полученные с использованием Байесовского анализа с картированием регионов и растений-хозяев и указанием возраста для узлов на дереве. А: Карта мира с кодами регионов; Б: Филогенетическое дерево. Коды с наиболее вероятными анцестральными областями, апостериорные значения вероятности для анализа БВ и значения бутстрепа для МЛ анализа даны для соответствующих клад.

8.2.2. *Heterodera avenae sensu stricto* и *H. arenaria*

В анализ были включены 82 последовательности *H. avenae* и шесть последовательностей *H. arenaria*. Филогенетическая сеть гаплотипов представлена на Рисунке 8.6. Гаплотипы *H. avenae* были разделены на две группы. Тип А включал восемь гаплотипов (NavA1-NavA8) из Европы, Северной Америки и Северной Африки (Марокко). Тип В также

включал восемь гаплотипов (NavB1-NavB8), но из Азии и Северной Африки (Тунис, Египет). NavA1-NavA3 были наиболее распространенными гаплотипами в Европе и США, тогда как NavA5 и NavA6 были обнаружены только в Марокко, NavA7 и NavA8 – только в США, а NavA4 обнаружили только в Испании. NavB2 был самым распространенным гаплотипом в Азии и Северной Африке. В Турции были обнаружены четыре гаплотипа: NavB1, NavB2, NavB3 и NavB5, три гаплотипа: NavB1, NavB3, NavB4 – в Тунисе и NavB2 и NavB8 – в Сирии. Гаплотип NavB7 был зарегистрирован только в Иране и Саудовской Аравии (Рисунок 8.6А). Два гаплотипа (Har1 и Har2) *H. arenaria* отличались двумя изменениями друг от друга и от гаплотипа *H. avenae* NavA1 (Рисунок 8.6В). Максимальная внутривидовая вариация последовательностей для *H. avenae* составляла 8,2%, а для *H. arenaria* – 0,4%. Максимальное различие между последовательностями для *H. avenae* типа А составляло 2,6%, а для *H. avenae* типа В – 1,7%.

8.2.3. *Heterodera filipjevi*

Нами было проанализировано 75 последовательностей *H. filipjevi*. Гаплотипная сеть представлена на Рисунке 8.7. Все гаплотипы были разделены на две группы: тип А, содержащий 16 гаплотипов (HfA1-HfA16) из Европы, Азии и Северной Америки, и тип В, содержащий восемь гаплотипов (HfB1-HfB8) из Ирана и Сирии (Toumi *et al.*, 2013b). Гаплотипы типа В были связаны с гаплотипом HfA2, найденным в Таджикистане и Башкортостане, Россия. HfA1 и HfA4 были наиболее распространенными гаплотипами в Центральной, Северной и Восточной Европе, европейской части России и Северной Америке. HfA3 был найден в Таджикистане, на Украине и в Башкортостане. HfA6 и HfA7 были обнаружены только в Великобритании, а HfA8 – только в Китае. HfA9, HfA10, HfA11 HfA12 и HfA13 были зарегистрированы в Турции, а HfA14, Hf15, HfA16 были найдены только в Сирии. Максимальное внутривидовое разнообразие последовательности составляло 10,6%. Максимальное различие между последовательностями для *H. filipjevi* типа А составляло 3,4%, а *H. filipjevi* типа В – 8,1%.

8.2.4. *Heterodera pratensis* и *H. sturhani*

В исследование было включено в общей сложности 17 последовательностей *H. pratensis* и 7 последовательностей для *H. sturhani*. Гаплотипная сеть представлена на Рисунке 8.8. Нами было обнаружено два гаплотипа (Hs1, Hs2) для *H. sturhani* и пять гаплотипов (Hp1-Hp5) для *H. pratensis*. Гаплотипы Hs1 и Hs2 *H. sturhani* были обнаружены в

Китае, единственной стране, где этот вид присутствует (Рисунок 8.8A). Гаплотипы H_p1 и H_p2 обнаружили в европейских образцах, H_p3, H_p4 и H_p5 были найдены только в Иране. Гаплотипы *H. pratensis* отличались двумя или более изменениями от *H. sturhani* (Рисунок 8.8B). Максимальная вариация между последовательностями для *H. pratensis* составляла 2,1%, а для *H. sturhani* – 0,7%.

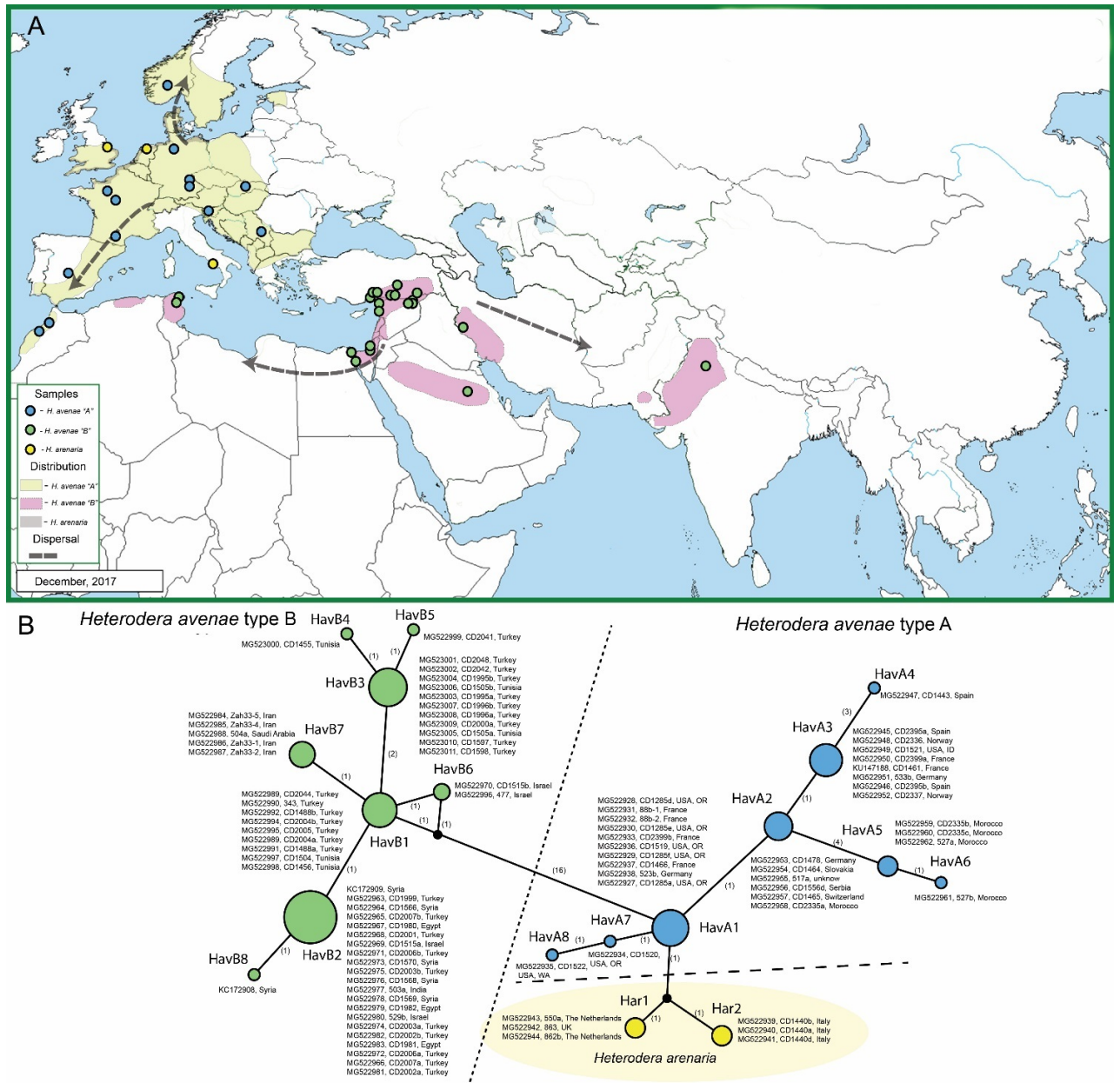


Рисунок 8.6. А: Карта распространения *Heterodera avenae* и *H. arenaria* с указанием изученных образцов и предполагаемых путей распространения; В: Сеть статистической парсимонии, показывающая филогенетические связи между гаплотипами COI *H. avenae* и *H. arenaria*. Маленькие черные круги представляют собой отсутствующие гаплотипы. Размеры кругов пропорциональны количеству образцов с определенным гаплотипом.

8.2.5. *Heterodera auklandica*

Нами было проанализировано пять новых последовательностей *H. auklandica*. Были выявлены два гаплотипа: Haus1 из Новой Зеландии и Великобритания и Haus2 из Новой Зеландии, отличающиеся только одним нуклеотидным изменением, с вариацией последовательностей, равной 0,2%.

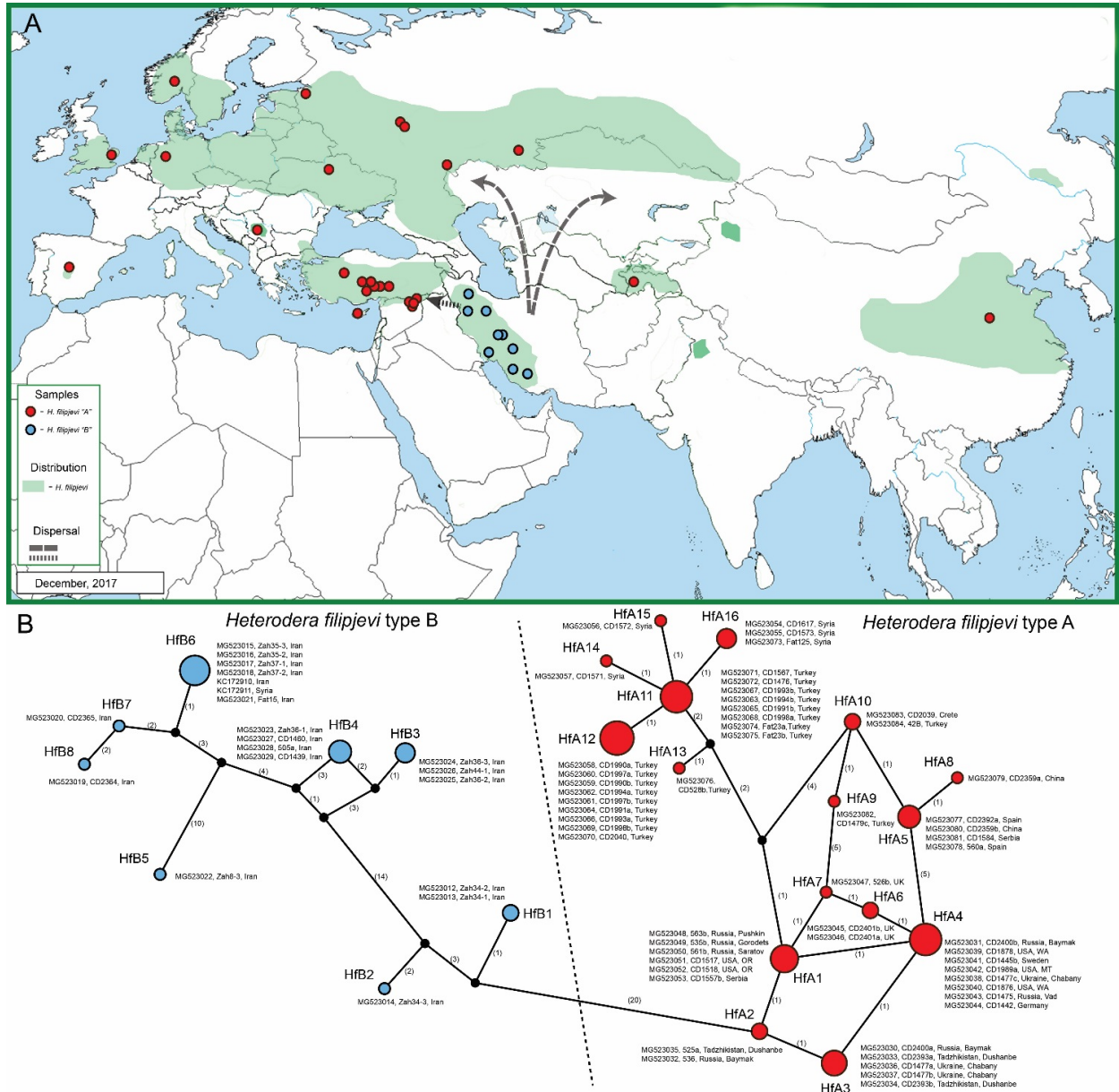


Рисунок 8.7. А: Карта распространения *Heterodera filipjevi* с указанием изученных образцов и предполагаемых путей распространения; В: Статистическая сеть парсимонии, показывающая филогенетические отношения между гаплотипами COI гена для *H. filipjevi*. Маленькие черные круги представляют отсутствующие гаплотипы. Размеры кругов пропорциональны количеству образцов с определенным гаплотипом.

8.2.6. *Heterodera australis*

Пять последовательностей *H. australis* было проанализировано и выявлен только один гаплотип (Haus1).

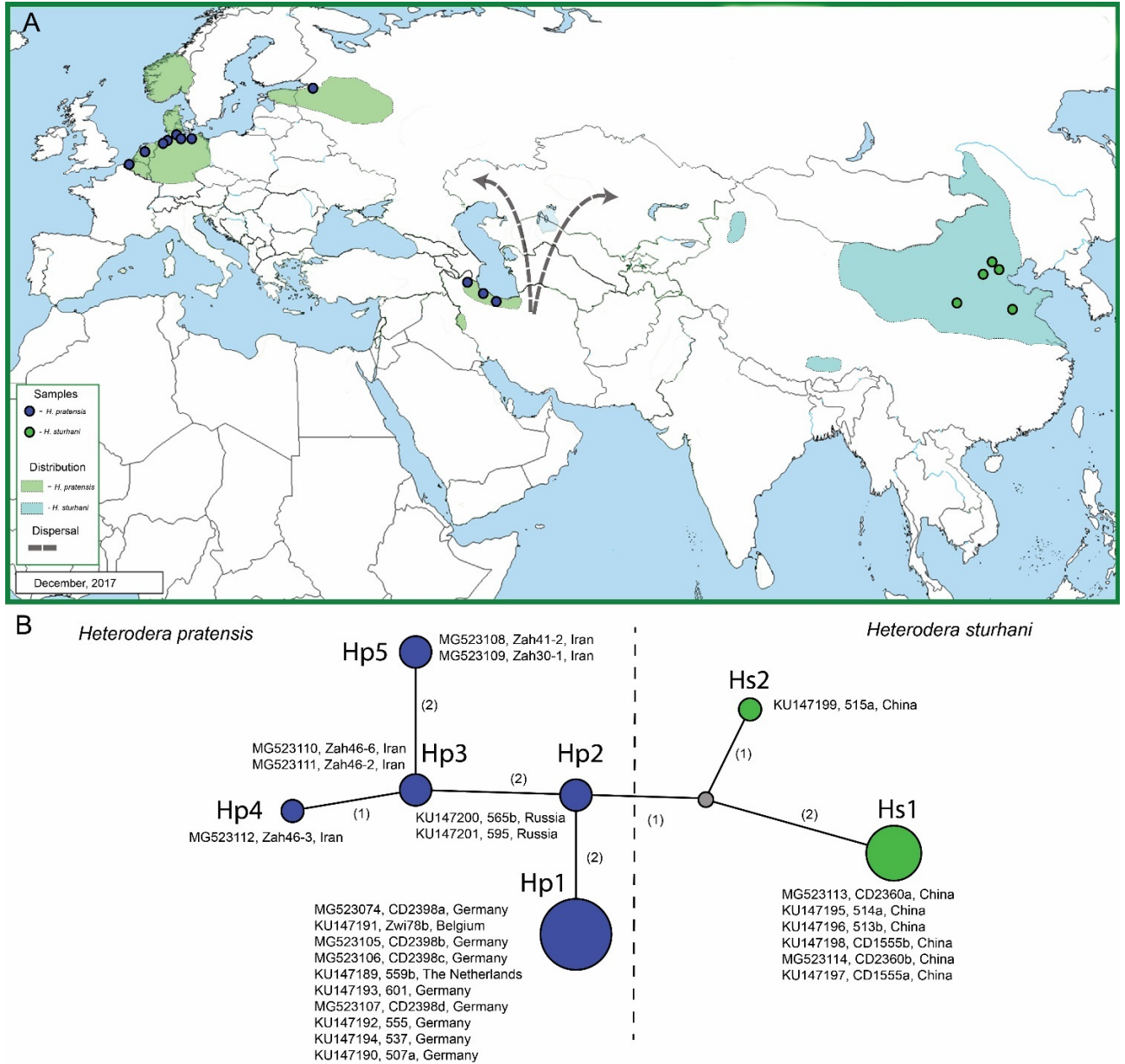


Рисунок 8.8. А: Карта распространения *Heterodera pratensis* и *H. sturhani* с указанием изученных образцов и предполагаемых путей распространения; В: Сеть статистической парсимонии, показывающая филогенетические отношения между гаплотипами COI *H. pratensis* и *H. sturhani*. Маленькие черные круги представляют отсутствующие гаплотипы. Размеры кругов пропорциональны количеству образцов с определенным гаплотипом.

8.2.7. *Heterodera mani*

Нами было проанализировано в общей сложности шесть последовательностей *H. mani*. Выявлены два гаплотипа (Hm1 и Hm2): Hm1 из Германии и США и Hm2 из США, отличающиеся одной заменой. Различие между последовательностями составляло 0,2%.

8.2.8. *Heterodera ustinovi*

Нами было проанализировано пять новых последовательностей *H. ustinovi*, были обнаружены два гаплотипа: Hus1 из Бельгии и США и Hus2 из Бельгии, отличающиеся одной заменой, с различием последовательностей, равной 0,2%.

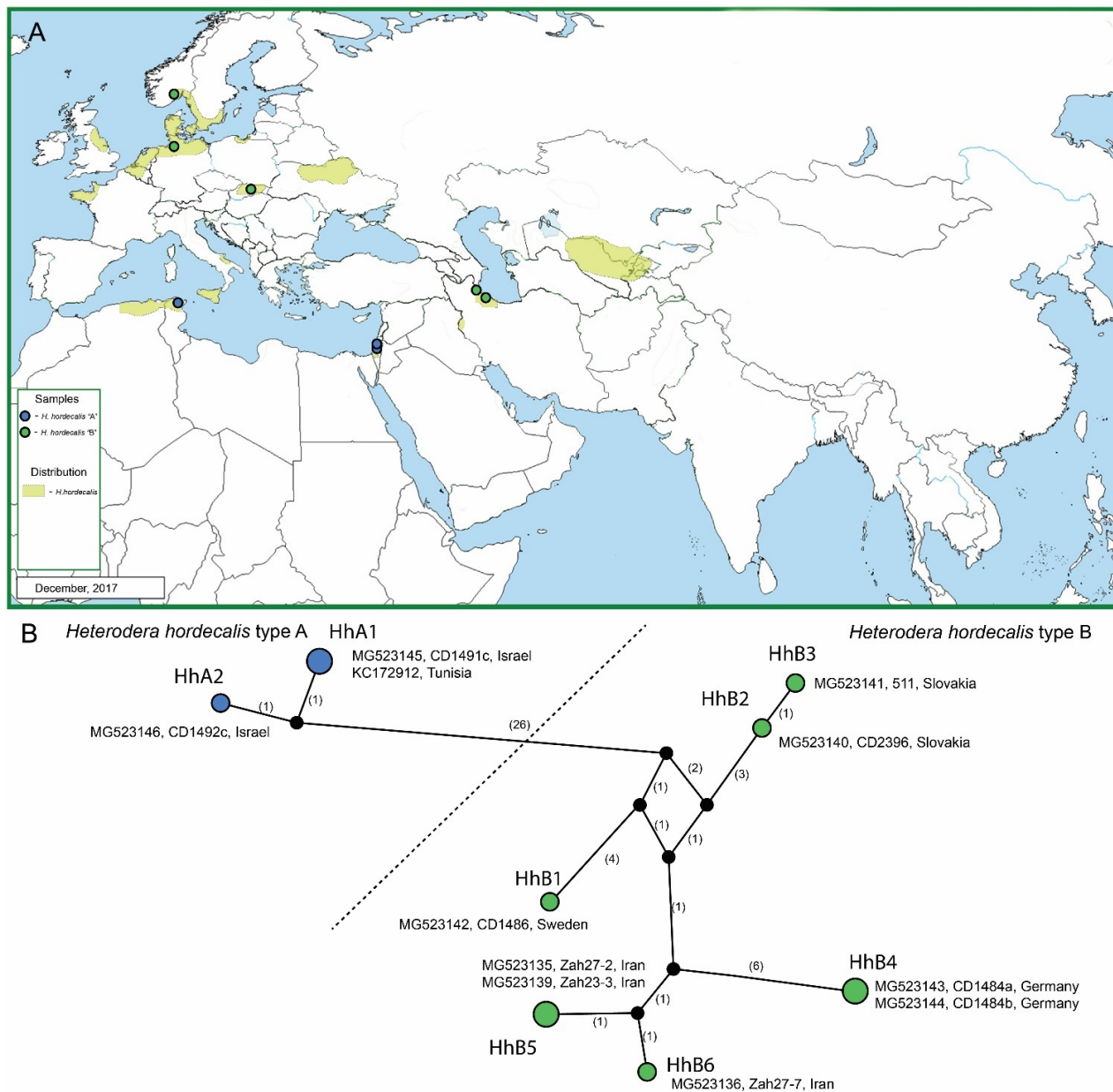


Рисунок 8.9. А: Карта распространения *Heterodera hordecalis* с указанием изученных образцов; В: Статистическая сеть парсимонии, показывающая филогенетические связи между COI гаплотипами у *H. hordecalis*. Маленькие черные круги представляют отсутствующие гаплотипы. Размер кругов пропорционален количеству образцов с определенным гаплотипом.

8.2.9. *Heterodera hordecalis*

Одиннадцать последовательностей *H. hordecalis* было проанализировано в нашем исследовании. Сеть гаплотипов приведена на Рисунке 8.9. Все гаплотипы были разделены на

две группы: тип А, содержащий два гаплотипа (HhA1, HhA2) из Израиля и Туниса, и тип В, содержащий шесть гаплотипов (HhB1-HhB6) из Европы и Иран (Рисунок 8.9А). Эти две группы отличались друг от друга 32 изменениями. Гаплотипы из типа В были обнаружены только в некоторых регионах: HhB1 и Швеции, HhB2, HhB3 в Словакии, HhB4 в Германии и HhB5, HhB6 в Ирана (Рисунок 8.9). Максимальное внутривидовое различие последовательностей составляло 11,4%. Максимальное различие между последовательностями для *H. hordecalis* типа А составляло 1,2%, а *H. hordecalis* типа В – 4,1%.

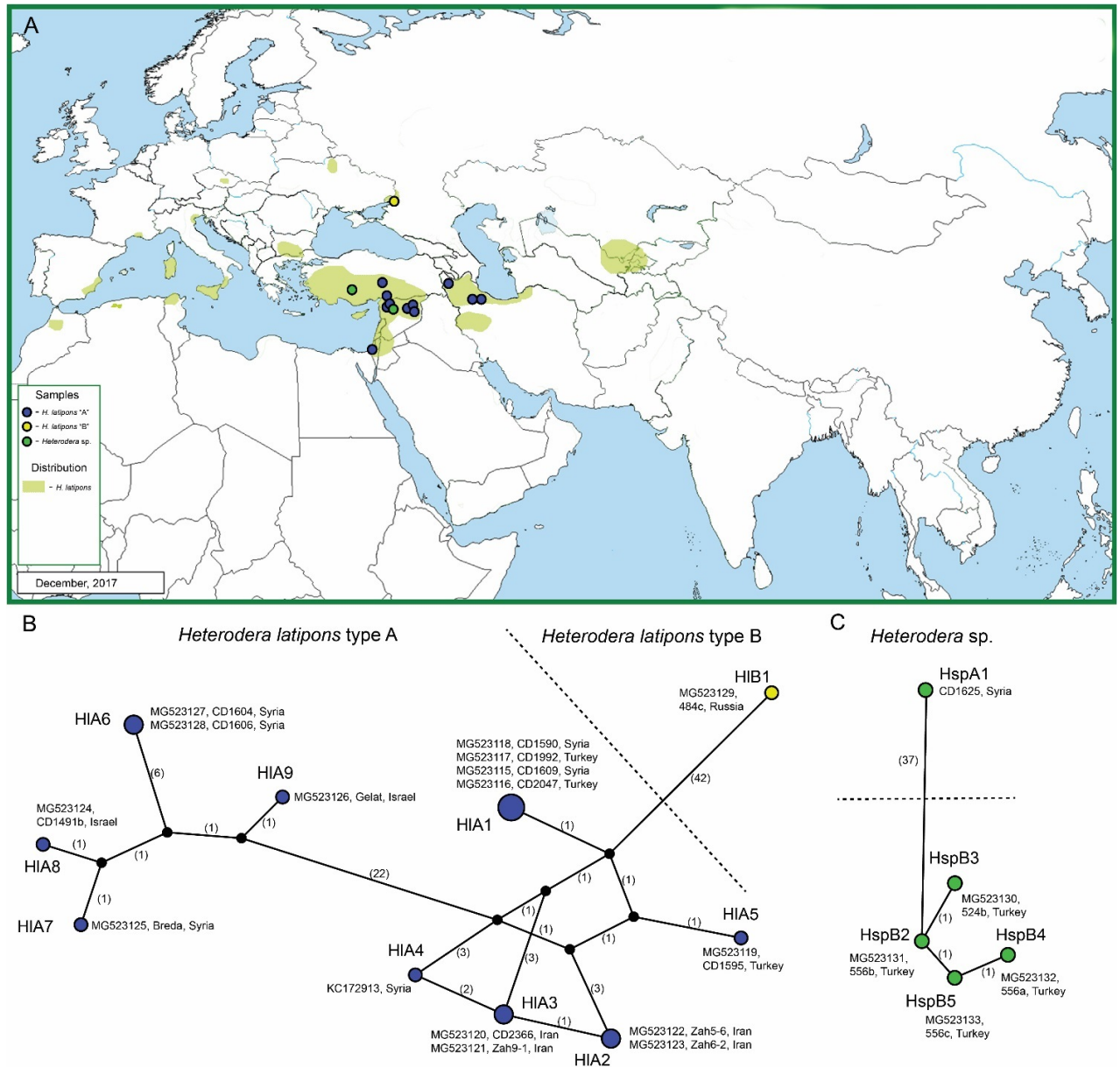


Рисунок 8.10. А: Карта распространения *Heterodera latipons* и *Heterodera* sp. с указанием исследуемых образцов; В: Сеть статистической парсимонии, показывающая филогенетические отношения между гаплотипами COI для *Heterodera latipons*; С: Сеть статистической парсимонии, показывающая филогенетические взаимоотношения между гаплотипами COI для *Heterodera* sp. Маленькие черные круги представляют отсутствующие гаплотипы. Размеры кругов пропорциональны количеству образцов с определенным гаплотипом.

8.2.10. *Heterodera latipons* и неизвестный вид *Heterodera* sp.

Нами было проанализировано в общей сложности 16 последовательностей *H. latipons* и 5 последовательностей неизвестного вида *Heterodera* sp. Сеть гаплотипов приведена на Рисунке 8.10. Гаплотипы были разделены на две группы: А и В (Рисунок 8.10А). Тип А содержал девять гаплотипов: H1A1 из Сирии и Турции, H1A2, H1A3 из Ирана, H1A4, H1A6, H1A7 из Сирии, H1A5 из Турции и H1A8, H1A9 из Израиля. Группа гаплотипов типа В была обнаружена только в России и значительно отличалась от всех остальных. *Heterodera* sp. был представлен двумя различными группами гаплотипов (А и В) – HspA1 из Сирии и HspB2-HspB5 из Турции (Рисунок 8.10В). Максимальное внутривидовое различие для *H. latipons* составляло 12,0%, а для *Heterodera* sp. – 9,4%. Максимальное различие между последовательностями для *H. latipons* типа А составляло 7,7%.

8.3. Филогеографический анализ и молекулярные часы

Анцестральные области для каждого узла в дереве были рассчитаны с учетом филогенетической неопределенности с использованием программы DIVA. Наиболее вероятные одна или несколько анцестральных областей для клад были отмечены на БВ дереве (Рисунок 8.5). Анцестральными областями для клад с *H. latipons*, *H. hordecalis*, *Heterodera* sp. и *H. filipjevi* были Турция, Сирия и Иран. Этот регион следует также считать наиболее вероятным местом происхождения для *H. filipjevi*, *H. avenae* типа В и *H. pratensis*.

МЛ тест отклонил гипотезу глобальных молекулярных часов при $P < 0,001$. Топология дерева, полученная с использованием программы BEAST, противоречила дереву, полученному в результате БВ анализа в отношении положения видов *H. hordecalis* и *H. latipons*. Оценочные возрасты узлов для некоторых основных клад приведены на Рисунке 8.5. Самое раннее расхождение в группе Avenae оценивалось в $1,64 \pm 0,26$ млн лет назад (миллион лет назад, далее – млн). Расхождение ветвей дерева далее разделялось на клады с *H. avenae* А и В – $0,44 \pm 0,12$ млн; *H. filipjevi* – $0,75 \pm 0,2$ млн; *H. hordecalis* – $0,83 \pm 0,26$ млн и *H. latipons* – $0,89 \pm 0,26$ млн.

8.4. Определение границ видов и ДНК-баркодирование

Результаты настоящего исследования показывают, что основные группы последовательностей на деревьях и сети в целом согласуются с признанными в настоящее время видами. Маркер ВТС позволил дифференцировать большинство видов в группе Avenae,

но не смог разделить две пары видов: i) *H. avenae* от *H. arenaria*; ii) *H. pratensis* от *H. sturhani*. Однако анализ последовательностей генов COI был способен дифференцировать все изученные виды группы.

8.4.1. *Heterodera avenae* и *H. arenaria*, *H. pratensis* и *H. sturhani*

Наше исследование показало, что *H. arenaria*, паразитирующая на злаках, растущих исключительно в прибрежных районах, тесно филогенетически связана с *H. avenae* и представляет собой вид, недавно дивергировавший от *H. avenae* типа А в Европе. Молекулярный анализ также показал, что *H. pratensis* и *H. sturhani* филогенетически тесно связаны между собой. Мы предполагаем, что *H. sturhani* представляет собой вид, недавно дивергировавший от *H. pratensis* в регионе Восточной Азии и недавно получивший способность паразитировать на зерновых. Филогенетический анализ COI гена показал, что *H. arenaria* входит в группу последовательностей *H. avenae* типа А и что *H. sturhani* входит в группу последовательностей *H. pratensis*, а различия в последовательностях генов COI внутри каждой пары находятся в пределах внутривидовых изменений для большинства других видов группы *Avenae*. Однако и *H. arenaria*, и *H. sturhani* представляют собой отдельные эволюционные линии, и мы считаем, что их следует рассматривать как валидные виды. Морфологические, биохимические и молекулярные дифференциации *H. arenaria* от *H. avenae* и *H. sturhani* от *H. pratensis* и других видов подробно изложены и обсуждаются в нескольких публикациях (Robinson *et al.*, 1996; Subbotin *et al.*, 2001, 2003, 2010; Subbotin, 2015), и здесь мы можем только подчеркнуть, что их таксономическая дифференциация необходима из соображений фитосанитарных предписаний. Фактически *H. sturhani* и *H. avenae* являются экономически важными паразитами зерновых и злаков и должны находиться под постоянным фитосанитарным контролем, тогда как *H. pratensis* и *H. arenaria* имеют меньшую экономическую значимость, поскольку они паразитируют только на злаковых травах.

8.4.2. *Heterodera australis* из Китая

Мы считаем, что австралийскую злаковую нематоду нужно считать эндемичным видом для Австралии (Subbotin *et al.*, 2010). Нами было показано (Subbotin *et al.*, 2003, 2015), и это подтверждено в настоящем исследовании, что *H. australis* может быть дифференцирован от других видов с помощью последовательностей ВТС и COI генов, причем последний ген дает наилучшую дискриминацию видов. Несколько ВТС последовательностей, обнаруженных в образцах, собранных в провинциях Хэнань и Хэбэй в Китае и описанных Оу с соавторами

(2008) и Fu и соавторами (2011) как *H. avenae*, были определены в нашем анализе как представители вида *H. australis*. Fu и соавторы (2011) уже сообщили об обнаружении типа «Australis» в Китае, и эти авторы заметили, что злаковая нематода в этой стране более генетически разнообразна, чем было ранее известно. В другом исследовании Yuan и соавторы (2010) предложили даже новый патотип Ha43 для популяции злаковых нематод из Хэнань, недалеко от Чжэнчжоу, что сделало его отличным от всех других патотипов *H. avenae* и сходным с патотипом вида *H. australis*. Несмотря на то что филогенетический анализ последовательностей ВТС гена ясно показал присутствие *H. australis* в Китае, эти данные все же должны подтвердиться изучением COI гена и морфометрическим анализом нематод у этих образцов. Если наша идентификация будет поддержана, гипотеза о проникновении *H. australis* из Азии в Австралию окажется более правдоподобной, чем альтернативное объяснение, предложенное ранее Meagher (1977) и разделяемое несколькими современными исследователями, заявившими о европейском происхождении злаковой нематоды в Австралии.

8.4.3. Неизвестный вид *Heterodera* из Турции и Сирии

Анализ двух последовательностей ВТС рРНК генов, опубликованных Imren *et al.* (2015) из Турции, и новые последовательности ВТС и COI генов, полученные из образцов из Турции и Сирии, позволили молекулярно выявить неизвестный вид цистообразующей нематоды. Этот вид, генетически сходный с *H. latipons*, можно считать новым для науки. Mog и Sturhan (2000) сообщали, что повторное морфологическое исследование постоянных микроскопических препаратов с видом *H. latipons* показало, что эти образцы состояли из двух морфологических типов, которые были различимы по характеристикам цист. Характеристики первого типа были сходны с теми характеристиками, которые фигурируют в первоначальном описании *H. latipons*, а второй тип был более схож с родственным видом *H. hordecalis*. Указанные авторы рассматривали эти различия как свидетельство наличия неизвестного вида в комплексе видов *H. latipons* (Subbotin *et al.*, 2010). Rivoal *et al.* (2003) также упоминают о морфологических расхождениях сирийских популяций *H. latipons* от других популяций этого вида. Abidou *et al.* (2005) сообщили о морфологических вариациях, включавших более длинную вульварную щель и стилет у личинок второй стадии для турецких популяций, определенных как *H. latipons*, что может также свидетельствовать о том, что эти популяции относятся к новому и еще не описанному виду.

8.5. Вариации ВТС рРНК гена

Наш анализ показал относительно высокое внутривидовое разнообразие последовательности ВТС гена для видов *H. latipons* и *H. hordecalis*, которые являются первыми описанными видами в группе *Avenae*, тогда как для комплекса видов *H. avenae* внутривидовая вариация была относительно низкой. Относительно большое количество гаплотипов с одиночными мутациями у *H. sturhani*, по сравнению с таковыми у *H. avenae* и *H. filipjevi*, на самом деле может не отражать более высокую скорость мутации для ВТС рРНК гена для этого вида, а может быть объяснено большим количеством ошибок при чтении последовательностей, допущенных в зарубежных лабораториях для некоторых китайских образцов.

8.6. ДНК-баркодирование

Штрих-код ДНК является мощным инструментом для идентификации многих групп нематод. В этом исследовании мы получили большое количество последовательностей COI видов группы *Avenae* из разных регионов мира. Исследование показало, что каждый вид имеет уникальный набор последовательности COI. Информация о последовательности ДНК этого гена может служить важной основой для разработки специальных средств диагностики, включая ПЦР-ПДРФ, обычную ПЦР и ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами и другими технологиями.

8.7. Филогенетические взаимоотношения

Филогенетические взаимоотношения, реконструированные с использованием последовательностей ВТС рРНК и COI генов для видов группы *Avenae* в этом исследовании, во многих чертах были сходными и аналогичными тем, которые были уже опубликованы в наших предыдущих работах (Subbotin *et al.*, 2001, 2003, 2015; Tanha Maafi *et al.*, 2003). Различия в положении некоторых видов между филогенетическими деревьями, полученными различными методами, были в основном обнаружены в слабо поддерживаемых кладах. Согласно нашим филогенетическим анализам, группа *Avenae* представляет собой хорошо поддерживаемую монофилетическую группу и содержит несколько различных эволюционных линий.

Впервые в этом исследовании мы применили филогенетический сетевой подход для анализа большого массива последовательностей группы *Avenae*. Этот подход дает более четкую картину дискриминации между последовательностями, чем традиционная

реконструкция эволюционных отношений с использованием филогенетического дерева, которое используется многими исследователями. Хотя в этом исследовании мы описали только результаты анализа, полученные методом статистической парсимонии, другие алгоритмы для построения сетей, используя тот же набор данных, также реконструировали сети с аналогичным группированием.

8.8. Биогеография

Важным результатом нашего исследования группы *Avena* было описание глобальной структуры распределения видов и понимание того, как это распределение видов было достигнуто. Две различные гипотезы, а именно межконтинентальный дисперсионный и континентальный дрейфы, традиционно были предложены для объяснения широкого распространения многих организмов, в том числе видов нематод. Несколько статистических методов, выявляющих филогенетическую информацию, показывающих распределение образцов и рассчитывающих молекулярные датировки, были использованы для разрешения разногласий между этими гипотезами.

В нашем исследовании результаты были получены на основании изучения двух генетических маркеров – рибосомального и митохондриального генов. Хотя ВТС рРНК ген может использоваться для разграничения видов, он предоставляет очень ограниченную информацию для филогеографических исследований. Хотя мы считаем наши результаты филогеографических исследований с митохондриальным маркером достаточно убедительными, но все же следует учитывать тот факт, что один маркер может неточно отражать эволюцию видов. Мы не можем полностью исключить возможность асимметричной интрогрессии митохондриальной ДНК между некоторыми популяциями – явление, которое может наблюдаться у некоторых видов нематод (Subbotin *et al.*, 2015).

В нашем исследовании мы применили гипотезу молекулярных часов для оценки времени дивергенции между видами и популяциями в группе *Avena*. Наш анализ отверг гипотезу глобальных молекулярных часов для митохондриального маркера, и метод расслабленных молекулярных часов был применен для анализа. Из-за отсутствия окаменелостей для этой группы нематод и возможностей датировки таких остатков мы использовали скорость геномного замещения нуклеотидов в митохондриальной ДНК для калибровки молекулярных часов. В нашем исследовании мы использовали коэффициент нуклеотидных замещений в митохондриальной ДНК, равный $7,2 \times 10^{-8}$ на сайт за поколение, рассчитанный Howe *et al.* (2010) для *Caenorhabditis briggsae*. Эта скорость считается средней для нескольких видов нематод: *Pristionchus pacificus* – $4,5 \times 10^{-8}$ ($\pm 1,7 \times 10^{-8}$) сайт / генерация

(Molnar *et al.*, 2011), *C. elegans* – $9,7 \times 10^{-8}$ сайт / генерация (Denver *et al.*, 2000) и близка к скорости мутации, рассчитанной для *Drosophila melanogaster* – 6.2×10^{-8} сайта / поколения (Haag-Liautard *et al.*, 2008). Поскольку существуют разногласия среди специалистов о допущениях для гипотезы молекулярных часов и методах их вычисления, включая такие, как датирование расхождений, мы считаем, что наши результаты в оценке дат следует рассматривать с осторожностью.

8.9. Происхождение и распространение видов группы Avenae

Несколько авторов выдвинули различные гипотезы о возможных центрах происхождения для видов группы Avenae. Кралль и Кралль (1978) предложили довольно обширную географическую область происхождения для представителей всего рода *Heterodera*, включая группу Avenae, а именно Средиземноморскую, Кавказскую и некоторые среднеазиатские регионы. Bekal с соавторами (1997) предположили, что наиболее вероятный участок происхождения *H. avenae* находится в зоне происхождения зерновых культур на Ближнем Востоке и что эта нематода могла быть затем завезена в Австралию из Западной Азии. Результаты S-DIVA анализа и распределения гаплотипов в нашем исследовании показали, что Ирано-Анатолийская зона биоразнообразия (Рисунок 8.11), вероятно, является основным центром происхождения и диверсификации группы Avenae. Эта зона охватывает почти 900 000 км², в том числе крупные части Центральной и Восточной Турции, небольшую часть Южной Грузии, Нахичеванскую автономную республику Азербайджана, Армению, северо-восток Ирака, север и запад Ирана и Северный Копетдаг в Туркменистане. Известно, что Ирано-Анатолийская зона содержит много центров местного эндемизма (Myers *et al.*, 2000). Наша оценка различий гаплотипов также указывает на то, что виды группы Avenae происходят из разных областей этой горячей точки, и зона биоразнообразия и представители группы Avenae возникли во времена плейстоцена (2,58–0,117 млн лет назад).

Нами было высказано предположение (Subbotin *et al.* 2016), что горные районы являются возможными регионами для диверсификации видов цистообразующих нематод рода *Globodera*. Эта гипотеза также может быть применима к цистообразующим нематодам рода *Heterodera*. Иранско-Анатолийская зона биоразнообразия состоит из горных и межгорных регионов, и последние могли иметь решающее значение для долгосрочного выживания и накопления генетического разнообразия для видов группы Avenae. Колебания климата в течение этого периода позволили увеличить генетическое разнообразие этих видов. Популяции, происходящие из этой области, характеризуются высоким уровнем генетического

разнообразия, тогда как популяции, собранные в других регионах, демонстрируют относительно низкую изменчивость.



Рисунок 8.11. Иранско-Анатолийский регион биоразнообразия (по Kiani *et al.*, 2017, с изменениями).

Два основных региона в Ирано-Анатолийской зоне биоразнообразия предлагаются нами как субцентры происхождения и диверсификации, что соответствует двум гипотезам о дисперсии для этой группы, а именно: «из Анатолии» и «из Персии (Иран)». Анатолийская часть Ирано-Анатолийской зоны биоразнообразия, вероятно, является центром происхождения *H. latipons*, так как наибольшее количество гаплотипов ВТС и COI гена в настоящее время регистрируется в Турции и Сирии. Этот вид занимает базальное положение в филогенезе группы *Avena* и может считаться самым древним таксоном в этой группе. Из Анатолии *H. latipons*, вероятно, распространилась по разным направлениям в Европу, Сирию, Иорданию, Израиль и Северную Африку (Марокко) и Иран.

Анатолия также является возможным субцентром происхождения *H. avenae*, из которого этот вид (тип В) расселялся по Западной Азии и Северной Африке и Южной Азии (Пакистан, Индия). Глобальное распределение гаплотипов было достигнуто за счет расселения из уже внутренне структурированного анатолийского многообразия. Другая эволюционная линия, *H. avenae* типа А, была диверсифицирована и распространена по всей Европе, добравшись до Марокко через Пиренейский полуостров, и колонизировала Северную Африку в период голоцена. Интересно отметить, что не существует перекрытия в распределении групп А и В. Правдоподобным объяснением разделения этих двух групп

является то, что две горные системы, одна в Азии (Анатолийские горы) и другая в Африке (Атласские горы), возможно, служили экологическими барьерами для предотвращения обмена генами между этими группами.

Иранские горы (горы Альборз и Загрос), возможно, являются еще одним субцентром происхождения видов *Avena*, а именно *H. filipjevi*. Действительно, самое высокое генетическое разнообразие *H. filipjevi* наблюдается в Иране. Наличие пространственно ограниченных гаплотипов *H. filipjevi* в Иране, разделенных большими различиями в мутациях, можно объяснить следствием наличия географических барьеров, препятствующих генетическому обмену в этом регионе в течение длительного времени. Гаплотипы иранских популяций связаны с гаплотипами из восточных, центральных и среднеазиатских стран, а не с турецкими гаплотипами, что может указывать на наличие значительных экологических барьеров для распространения из Ирана в Турцию. Было высказано предположение, что так называемая Анатолийская диагональ (Ekim & Güner, 1989) может служить значительным экологическим или геофизическим барьером для распределения многих видов и действует как эффективный барьер для разграничения потока генов между западным и восточным регионами Анатолии. Мы полагаем, что Анатолийская диагональ также служит барьером для *H. avenae* типа В, предотвращая его распространение в западные регионы Анатолии.

Луговая цистообразующая нематода *H. pratensis*, вероятно, также возникла в Иране и только сравнительно недавно распространилась вдоль Голарктического региона. *Heterodera sturhani* возникла в одной из восточноазиатских групп изолятов *H. pratensis* и, благодаря своей способности паразитировать на зерновых, стала наиболее широко распространенным видом группы *Avena* на сельскохозяйственных полях в Китае. Дальнейшее изучение видов, паразитирующих на травах в Восточной Азии, и недавно обнаруженных цист в альпийской луговой степи на *Kobresia* spp. в Ганьсу, Китай (Li *et al.*, 2015) может помочь идентифицировать вторичный центр видообразования для этой группы нематод.

Мы полагаем, что Иран также является местом для возникновения ячменной нематоды, *H. hordecalis*. Этот вид, вероятно, колонизировал Европу по двум разным маршрутам: один из Азии и другой из Северной Африки. К сожалению, ограниченное количество материала по видам *H. australis*, *H. aucklandica*, *H. ustinovi* и *H. mani* не позволило нам предложить центры происхождения для этих видов.

Картины распространения гаплотипов для *H. filipjevi* и *H. avenae* типа А, паразитирующих на зерновых, и *H. mani* и *H. ustinovi*, паразитирующих на травах, очень похожи в Европе и Северной Америке. Это сходство позволяет рассматривать сценарий распространения, связанный с дальними и трансатлантическими расселениями этих видов из Западной и Северной Европы в Северную Америку после последнего оледенения через

Атлантический океан. Распространение этих видов в Северной Америке происходило не в результате колонизации этого континента человеком и недавней сельскохозяйственной деятельности, а из-за более древних и стихийных событий расселения, которые, вероятно, происходили на разных временных отрезках. Отсутствие каких-либо уникальных гаплотипов COI для *H. filipjevi* в Северной Америке и наличие таких гаплотипов для *H. avenae* (Hav7 и Hav8) с более широким ареалом может указывать на то, что *H. avenae* расселилась на этом континенте ранее, чем *H. filipjevi*.

Многими исследованиями было показано, что цисты могут быть разнесены ветром на короткие расстояния (Petherbridge & Jones, 1944; Chitwood, 1951; White, 1953), но не было проведено никаких исследований для оценки переноса цист на большие расстояния. Мы считаем, что возможный сценарий глобального переноса цист с пыльными бурями, которые могут переносить цисты и яйца из Северной Европы через Атлантику в Канаду и США, следует рассмотреть и проверить. Однако в любом случае нельзя исключать того, что условия распространения цист на большие расстояния были более благоприятными в позднем ледниковом и раннем послеледниковом периоде, чем в настоящее время.

Хотя сельскохозяйственная практика и деятельность человека могут способствовать расселению нематод на местном уровне, кажется, что они не сыграли существенной роли в глобальном распределении видов группы *Avenae*. Разные экологические барьеры, центры и время возникновения, а также различная адаптивность видов к климатическим условиям могут объяснить существующую глобальную картину распределения для *H. filipjevi* и *H. avenae* и других видов группы *Avenae*.

8.10. COI гаплотипы и патотипы злаковых нематод

В настоящее время нет устойчивых сортов зерновых культур, которые могут быть применены для контроля всех известных видов злаковых нематод и которые были бы устойчивы ко всем патотипам. Использование устойчивых сортов в качестве защитной меры против злаковых нематод требует точного знания о распределении видов и патотипов в каждом регионе. Распознавание патотипов злаковой нематоды *H. avenae* и родственных с ней видов основано на их способности воспроизводиться на сортах, имеющих разные гены устойчивости. Патотипы нематод различаются на основании их способности поражать международные тестовые сорта и линии ячменя, овса и пшеницы. Тест-ассортимент для выявления патотипов был первоначально предложен Andersen и Andersen (1982), а затем усовершенствован несколькими авторами (Rivoal & Cook, 1993; Cook & Rivoal, 1998; Cook & Noel, 2002; Smiley *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2015). В настоящее время идентифицированы три

группы патотипов: группа 1 содержит девять патотипов (Ha11-Ha91); группа 2 – два патотипа (Ha12, Ha22); группа 3 – четыре патотипа (Ha13-Ha43). Идентификация патотипов занимает много времени и требует проведения многочисленных повторных тестов. После анализа наших данных мы обнаружили, что определенные патотипы злаковых нематод соответствуют определенным видам и группам популяций, имеющим различные гаплотипы COI гена.

Патотипы групп 1 и 2 являются самыми многочисленными и широко распространенными в Европе, Северной Африке, Америке и Азии (Andersen & Andersen, 1982; Mor *et al.*, 1992; Valocká *et al.*, 1994; Al-Hazmi *et al.*, 2001, Mokabli *et al.*, 2002; Smiley *et al.*, 2011; Haddadi *et al.*, 2013; Imren *et al.*, 2013; Singh & Kaur, 2015) и принадлежат к основным группам COI гаплотипов для *H. avenae*. Согласно нашим результатам, несколько популяций с западного побережья США содержат уникальные гаплотипы COI (гаплотипы NavA7 и NavA8) и расположены на периферии в сети COI гена. Уникальный испанский гаплотип, занимающий периферийное положение в сети COI, может также соответствовать патотипу, который не встречается в других регионах. Sanchez и Zancada (1987) описали Ha22, Ha71 и Ha81 патотипы *H. avenae* из разных регионов Испании, а недавно Cui *et al.* (2015) обозначили новый патотип Ha91 для злаковой нематоды от Даксин и Хуангиан (Китай), который, вероятно, является *H. sturhani*.

Группа патотипов 3 включает представителей двух видов: *H. australis* и *H. filipjevi*. Патотип Ha13 из штатов Южной Австралии и Виктории (Subbotin *et al.*, 2010) и недавно обозначенный патотип Ha43 из деревни близ города Чжэнчжоу (Yuan *et al.*, 2010), вероятно, принадлежат *H. australis*, тогда как патотипы Ha23 и Ha33 принадлежат *H. filipjevi* (Subbotin *et al.*, 2010; Toktay *et al.*, 2013). Несколько патотипов, вероятно, принадлежащих *H. sturhani* и отличающихся от уже известных, были обнаружены в Китае (Yuan *et al.*, 2010). В настоящее время мы все же не обладаем всей информацией о патотипах для наших образцов, и соответствие между гаплотипами COI гена и патотипами злаковых нематод должно быть широко изучено и тщательно проанализировано. Мы полагаем, что все будущие генетические исследования и испытания со злаковыми нематодами должны включать информацию о гаплотипах COI исследуемых популяций.

В настоящем исследовании мы предложили несколько гипотез, основанных на некоторых предположениях. Главное из них то, что биогеографические данные, используемые в нашем исследовании для видов группы *Avenae*, отражают фактическое распределение нематод, а не сдвиг в отборе проб только в определенных регионах. К сожалению, большинство опубликованных и исходных результатов были получены в результате исследований, проведенных в сельских районах, а не в естественных местах обитания. Эволюция и распределение видов группы *Avenae* связаны с дикими травами, и

только относительно недавно, после сельскохозяйственной революции (около 10 тыс. лет назад), некоторые виды этой группы стали паразитами зерновых. Особенно важно для будущих исследований получить результаты молекулярного анализа этих нематод из естественных ценозов, где мы можем, вероятно, найти более широкое разнообразие гаплотипов COI гена, включая обнаружение новых анцестральных гаплотипов. Новые данные могли бы дать больше информации о времени происхождения и местонахождения центров и субцентров диверсификации видов. Выводы, сделанные в этом исследовании, основаны на анализе двух генов и предположении, что эволюция этих генов отражает эволюцию видов. В будущих исследованиях мы рекомендуем использовать альтернативные наборы данных и другие методы анализа для подтверждения биогеографических гипотез, выдвинутых в настоящем исследовании.

ГЛАВА 9. ДНК-БАРКОДИРОВАНИЕ, ФИЛОГЕНИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ ВИДОВ ЦИСТООБРАЗУЮЩИХ НЕМАТОД ИЗ РОДА *GLOBODERA* (TYLENCHIDA: HETERODERIDAE)

В круг основных задач нашего исследования входили следующие: i) анализ филогенетических взаимоотношений видов *Globodera* с использованием последовательностей ВТС рРНК, COI и *cytb* генов; ii) изучение генетического разнообразия видов и популяций *Globodera* с использованием последовательностей COI и *cytb* генов; iii) проведение филогеографического исследования видов *Globodera* и анализ распределения их гаплотипов; iv) проверка гипотез происхождения и распространения видов *Globodera*. Результаты этой работы подробно описаны в статье Subbotin *et al.* (2020). Из 13 валидных видов, принадлежащих к роду *Globodera*, нами были изучено 11 видов. Два других валидных вида, *G. mali* и *G. leptonepia*, не были включены в наше исследование из-за отсутствия ДНК материала. В результате настоящего и других наших исследований (Subbotin *et al.*, 2000, 2011; Madani *et al.*, 2010) (Таблица 7, Приложение) было получено новых 205 COI, 116 *cytb* и 56 ВТС рРНК генных последовательностей из более чем 148 популяций, собранных в 23 странах.

9.1. Филогенетический анализ ВТС рРНК гена

Два подхода были применены для анализа последовательностей ВТС рРНК генов для видов *Globodera*. Первый подход включал в себя БВ, МЛ и МП анализ выравнивания ВТС рРНК гена, содержащий только эталонные последовательности каждого вида *Globodera*, а второй подход включал СП анализ последовательностей ВТС рРНК гена для двух основных клад рода *Globodera*.

9.1.1. Филогения глободер

Филогенетический анализ выявил хорошо поддерживаемую топологию, согласно которой виды рода *Globodera* обычно группируются в соответствии с их географической близостью и растениями-хозяевами. Филогенетические взаимоотношения в пределах 11 валидных и трех неописанных и новых видов, полученные в результате БВ, МЛ и МП анализов последовательностей генов ВТС рРНК гена, приведены на Рисунке 9.1. Виды *Globodera* были распределены по двум основным кладам: виды рода *Globodera*, паразитирующие на паслёновых (происхождение из Южной Америки), или клада I, и виды

рода *Globodera*, паразитирующие на непаслёновых (происхождение не из Южной Америки), или клада II.

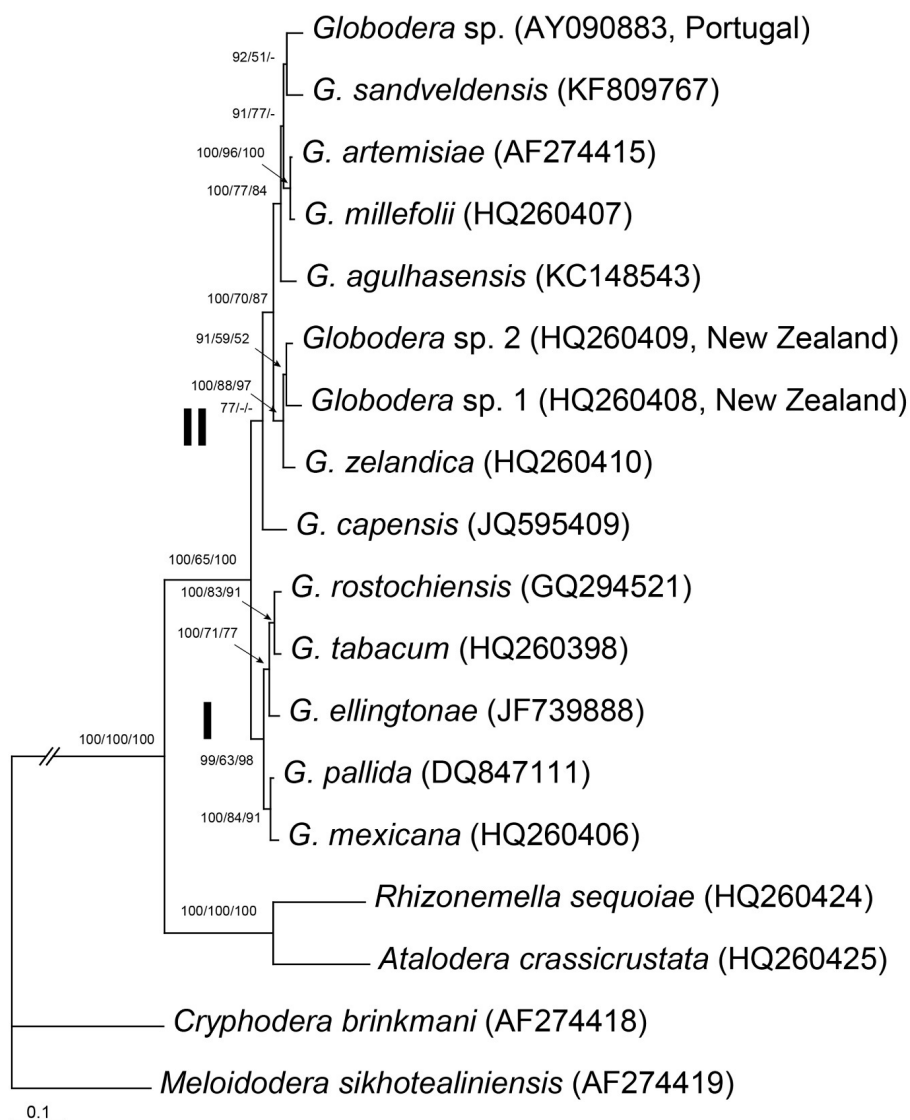


Рисунок 9.1. Филогенетические взаимоотношения между видами *Globodera*, полученные в результате Байесовского вероятностного анализа последовательностей ВТС рРНК гена. Апостериорные значения вероятности и бутстрепы для БВ, МЛ и МП анализов приведены для соответствующих клад. Значения менее 50% не указаны.

9.1.2. Клада видов рода *Globodera*, паразитирующих на пасленовых

Нами было проанализировано 353 последовательности, и они включали 339 последовательностей, загруженных из Генного банка, 4 новые последовательности *G. rostochiensis*, 9 новых последовательностей *G. pallida* и одну новую последовательность *G. mexicana* (= *G. bravoae*). Выравнивание составляло 977 п.н. в длину и включало 128 последовательностей для *G. pallida*, 113 – для *G. rostochiensis*, 73 – для *G. ellingtonae*, 33 – для *G. tabacum* и 6 – для *G. mexicana* (= *G. bravoae*). Последовательности ВТС рРНК гена

были представлены следующим количеством гаплотипов: *G. pallida* – 22 гаплотипа, включая Hpal1 со 101 последовательностью, *G. rostochiensis* – 14 гаплотипов, включая Hros1 со 100 последовательностями, *G. ellingtonae* – 26 гаплотипов, включая Hell1 с 29 последовательностями, *G. tabacum* – 11 гаплотипов и *G. mexicana* – 3 гаплотипа.

Филогенетическая сеть для последовательностей ВТС рРНК гена, реконструированная с использованием СП и программы POPART, приведена на Рисунке 9.2. Этот метод позволил четко различить все изученные виды. Максимальное расхождение последовательностей для видов клады глободер паразитов пасленовых составило 6,2%, с внутривидовой вариацией для *G. pallida* – 3,4%; *G. ellingtonae* – 2,4%, *G. rostochiensis* – 2,2%, *G. tabacum* – 1,2%, *G. mexicana* – 0,5%. Последовательность ВТС рРНК гена из образца, идентифицированного как *G. bravoae*, отличалась в одном нуклеотиде и двух делециях/вставках с таковыми у *G. mexicana* под номером EU006707.

9.1.3. Клада видов рода *Globodera*, паразитирующих на непасленовых

Всего в анализ была включена 31 последовательность, загруженная из Генного банка. Выравнивание составляло 943 п.н. в длину и содержало 8 последовательностей для *G. millefolii*, 7 – для *G. artemisiae*, 6 – для *G. capensis*, 2 – для *G. sandveldensis*, 2 – для *G. zelandica*, 3 – для *Globodera* sp. из Португалии, по одной последовательность для *G. agulhasensis*, *Globodera* sp. 1 и *Globodera* sp. 2 из Новой Зеландии. Филогенетическая сеть для последовательностей ВТС рРНК гена, реконструированная с использованием СП и программы POPART, приведена на Рисунке 9.3. Максимальное расхождение последовательностей для видов непасленовых *Globodera* составило 9,7%.

9.2. Филогенетический анализ последовательностей COI гена

Два подхода были применены для анализа последовательностей COI генов видов *Globodera*. Первый подход включал в себя БВ и МП анализы выравнивания COI генов, содержащего только эталонные последовательности видов, тогда как второй подход включал анализ СП выравниваний последовательностей COI гена для *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *G. mexicana* и *G. tabacum*. Всего в это исследование было включено 219 последовательностей COI гена, 208 из них были новыми. Выравнивание COI гена составляло 443 п.н. в длину.

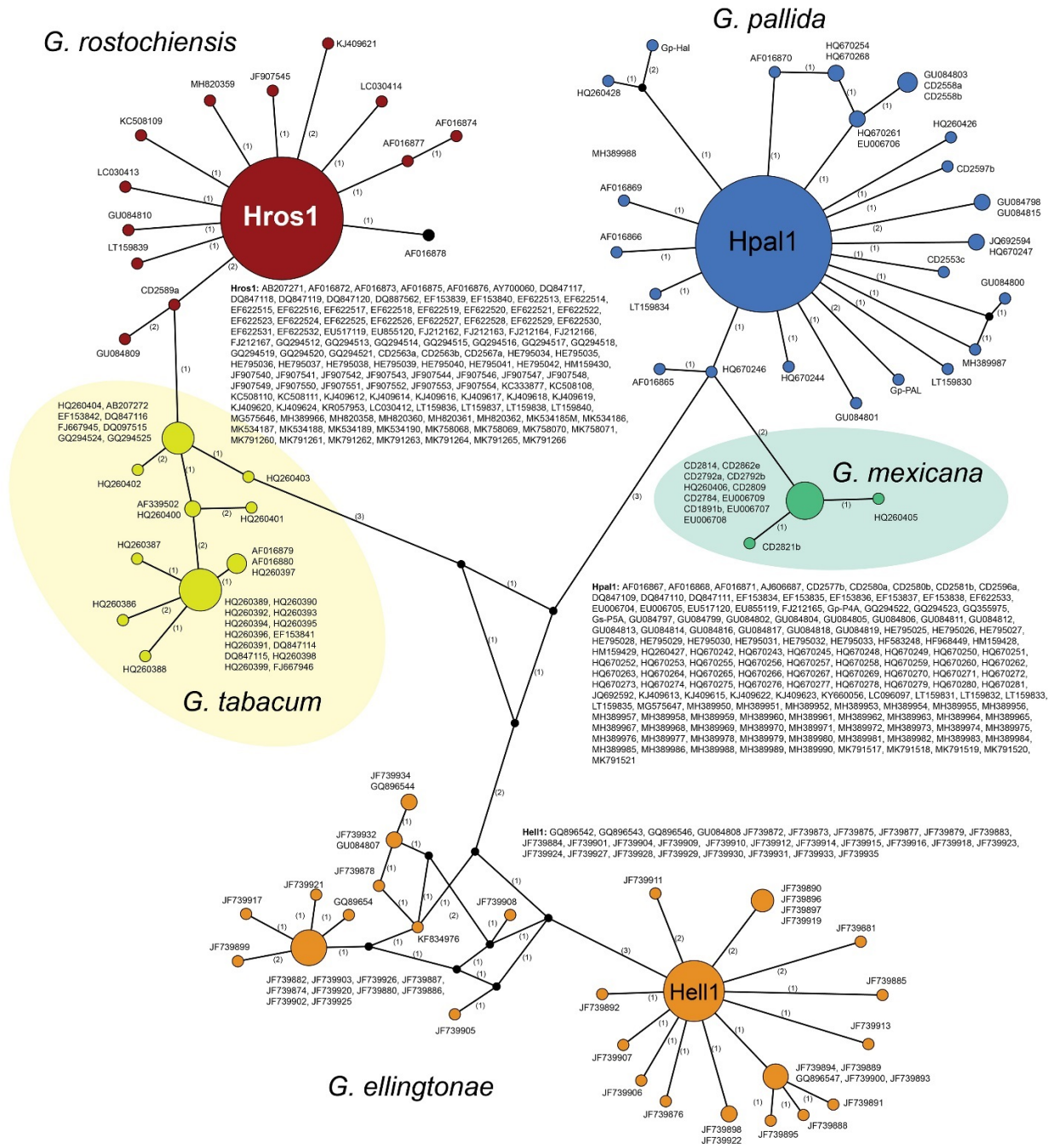


Рисунок 9.2. Статистическая сеть парсимони, показывающая филогенетические отношения между гаплотипами ВТС рРНК гена видов *Globodera*, поражающих пасленовые. ДНК-последовательности каждого вида отмечены разными цветами. Круги представляют собой последовательности каждого вида с одинаковым гаплотипом, их размер пропорционален количеству этих последовательностей в образцах. Число нуклеотидных различий между последовательностями указаны на линиях, соединяющих круги. Маленькие черные кружки представляют отсутствующие гаплотипы. Новые последовательности приведены с кодами.

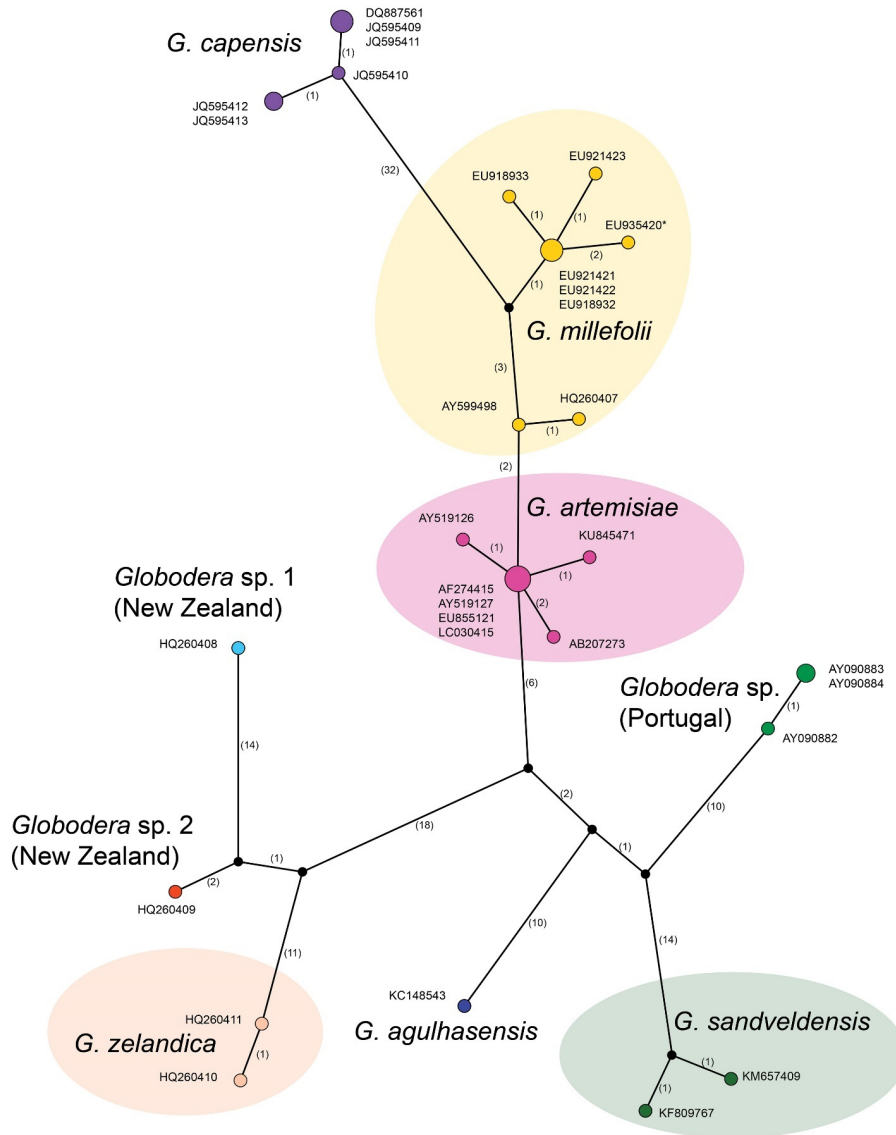


Рисунок 9.3. Статистическая сеть парсимони, показывающая филогенетические взаимоотношения между гаплотипами ВТС рРНК гена видов *Globodera*, поражающих непасленовые растения. Последовательности каждого вида отмечены разными цветами. Круги представляют собой последовательности каждого вида с одинаковым гаплотипом, их размер пропорционален количеству этих последовательностей в образцах. Число нуклеотидных различий между последовательностями указаны на линиях, соединяющих круги. Маленькие черные кружки представляют отсутствующие гаплотипы (* – обозначено как *G. artemisiae* в Генном банке).

9.2.1. Филогения глободер

Филогенетические взаимоотношения в пределах видов рода *Globodera*, содержащие 63 эталонных гаплотипа и три последовательности внешней группы, полученные в результате БВ и МЛ анализа, приведены на Рисунке 9.4. Наш анализ показал, что виды *Globodera* делятся на две основные клады: виды *Globodera*, паразитирующие на паслёновых, или клада I, и клада с видами, паразитирующими на непаслёновых, или клада II. Максимальное расхождение последовательностей COI гена для видов *Globodera* составило 26,6%.

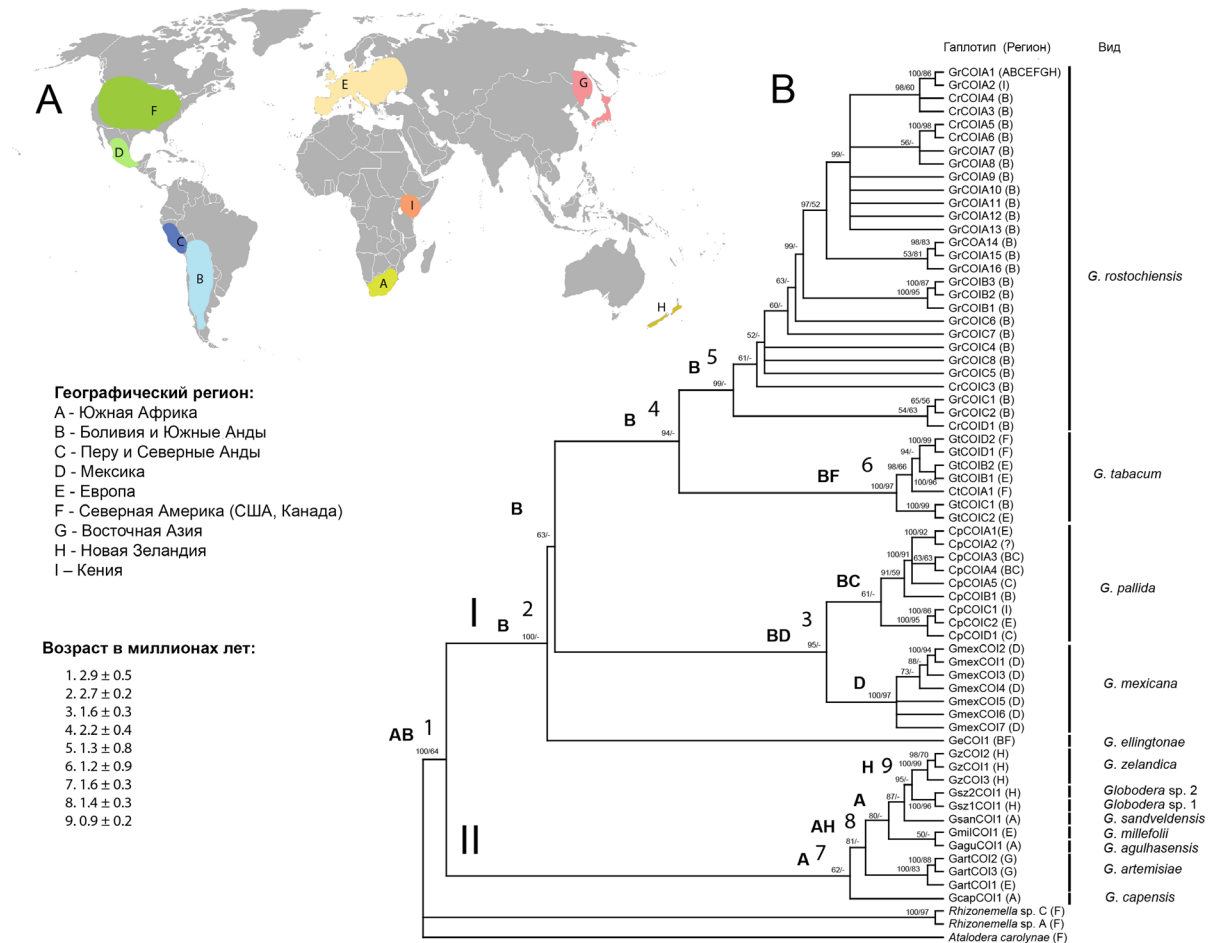


Рисунок 9.4. Филогенетические взаимоотношения между гаплотипами COI гена для видов *Globodera*, полученные в результате БВ анализа, с картированием анцестральных областей и указанием возраста узлов. А: Карта мира с регионами, где виды *Globodera* естественным образом распространены или имеют уникальные гаплотипы; В: Филогенетическое дерево. Коды на дереве представляют наиболее вероятные анцестральные области. АП значения для БВ анализа и значения бутстрепа для МЛ анализа даны для соответствующих клад.

9.2.2. Клада видов рода *Globodera*, паразитирующих на пасленовых

Максимальная дивергенция генной последовательности COI для видов *Globodera* составляла 25,7%.

***Globodera rostochiensis*.** Всего было проанализировано 110 последовательностей этого вида. Сеть гаплотипов приведена на Рисунке 9.5А. В большинстве популяций был обнаружен только один гаплотип, однако в нескольких популяциях содержалось два гаплотипа. Всего было выявлено 29 гаплотипов. Все гаплотипы были разделены на четыре группы: А, В, С и D. Группа А содержала 16 гаплотипов (CrCOIA1-CrCOIA16). Гаплотип CrCOIA1 был в основном распространен по всему миру и отличался от CrCOIA2 из Кении одной мутацией. Только эти два гаплотипа были найдены за пределами Боливии. Все другие группы: группа В с 3 гаплотипами (CrCOIB1-CrCOIB3), группа С с 8 гаплотипами (CrCOIC1-CrCOIC8), группа D

с одним гаплотипом (CrCOID1) – были зарегистрированы в Боливии (Рисунок 9.6). Максимальное разнообразие последовательностей COI гена составило 14,2%.

Globodera pallida. Всего было проанализировано 43 последовательности этого вида. Сеть гаплотипов приведена на Рисунке 9.7А. В большинстве популяций был обнаружен только один гаплотип, однако одна популяция содержала два гаплотипа. Всего было выявлено 9 гаплотипов. Все гаплотипы были разделены на четыре группы: А, В, С и D. Группа А содержала 5 гаплотипов (CrCOIA1-CrCOIA5), тогда как группы В и D состояли из одного гаплотипа, а группа С имела два гаплотипа. Гаплотип CrCOIA1 был зарегистрирован только в нескольких европейских странах и США. Гаплотипы из группы С были зарегистрированы в Великобритании и Кении. Гаплотипы CrCOIA3-CrCOIA5 и гаплотипы из групп В и D были обнаружены в Южной Америке (Рисунок 9.6). Максимальное разнообразие последовательностей COI гена составило 20,7%.

Globodera mexicana. Всего в анализ было включено 16 последовательностей *G. mexicana* (= *G. bravoae*), собранных в 8 местах в Мексике. Филогенетическая сеть гаплотипов приведена на Рисунке 9.8. В большинстве популяций был обнаружен только один гаплотип, однако в нескольких популяциях содержалось два гаплотипа, а в одной популяции – три гаплотипа. Семь гаплотипов (GmCOI1-GmCOI7) были выявлены среди этих последовательностей. Максимальное разнообразие последовательностей составило 4,7%. Последовательность COI гена для образца, идентифицированного как *G. bravoae*, была сходна с последовательностями нескольких образцов *G. mexicana* (Рисунок 9.8).

Globodera tabacum. Всего было проанализировано 33 последовательности этого вида. Сеть гаплотипов приведена на Рисунке 9.9А. В большинстве популяций был обнаружен только один гаплотип, однако одна популяция содержала два гаплотипа. Всего было выявлено 7 гаплотипов. Все гаплотипы были разделены на четыре группы: А, В, С и D. Гаплотипы из группы А обнаружили в Вирджинии, США и Боливии, группа В была из Франции, группа С была из Италии и Аргентины, а группа D – из Вирджинии, США. Максимальное разнообразие последовательностей COI гена составило 14,1%.

Globodera ellingtonae. Одна новая ДНК-последовательность и опубликованная последовательность были включены в исследование, и эти последовательности были идентичны.

9.2.3. Клада видов рода *Globodera*, паразитирующих на непаслёновых

Максимальная дивергенция последовательностей COI гена для непаслёновых видов рода *Globodera* составила 18,9%.

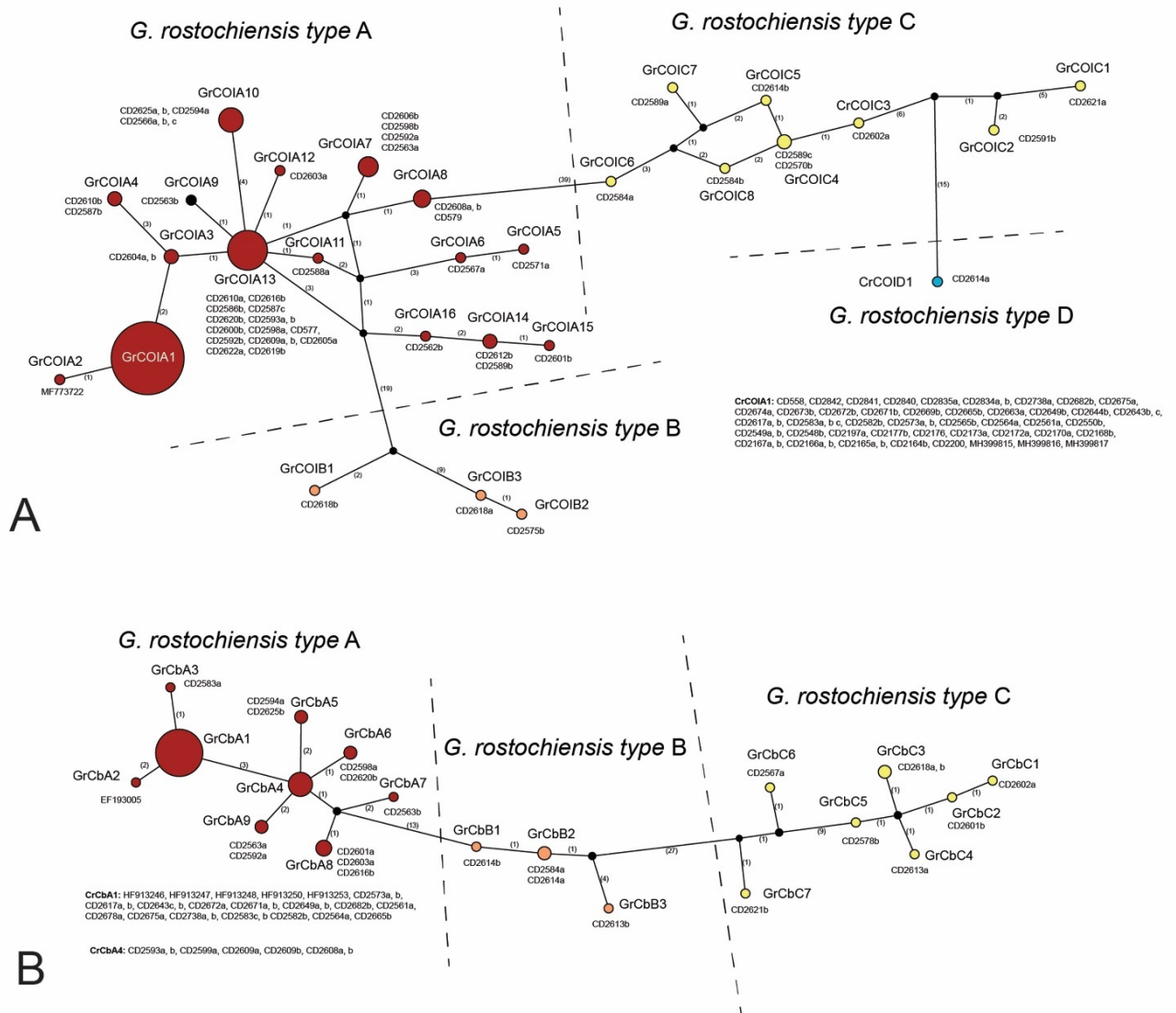


Рисунок 9.5. Статистическая сеть парсимони, показывающая филогенетические отношения между гаплотипами *Globodera rostochiensis*. Маленькие черные кружки представляют отсутствующие гаплотипы. Размеры круга пропорциональны количеству образцов с определенным гаплотипом; А: ген COI; В: ген cytb. Новые последовательности приведены с номерами проб.

***Globodera zelandica*.** Всего было получено 5 новых последовательностей этого вида. Эти последовательности были представлены 3 гаплотипами. Максимальное разнообразие последовательностей составило 2,2%.

***Globodera artemisiae*.** Всего было получено 3 новых последовательности, каждая из которых относится к уникальному гаплотипу этого вида. Максимальное разнообразие последовательностей составило 2,0%.

***Globodera millefolii*.** Две идентичные ДНК-последовательности были получены из образца.

***Globodera agulhasensis*, *G. capensis*, *G. sandveldensis* *Globodera* sp. 1, *Globodera* sp. 2.** Только одна ДНК-последовательность была получена от каждого из этих видов.

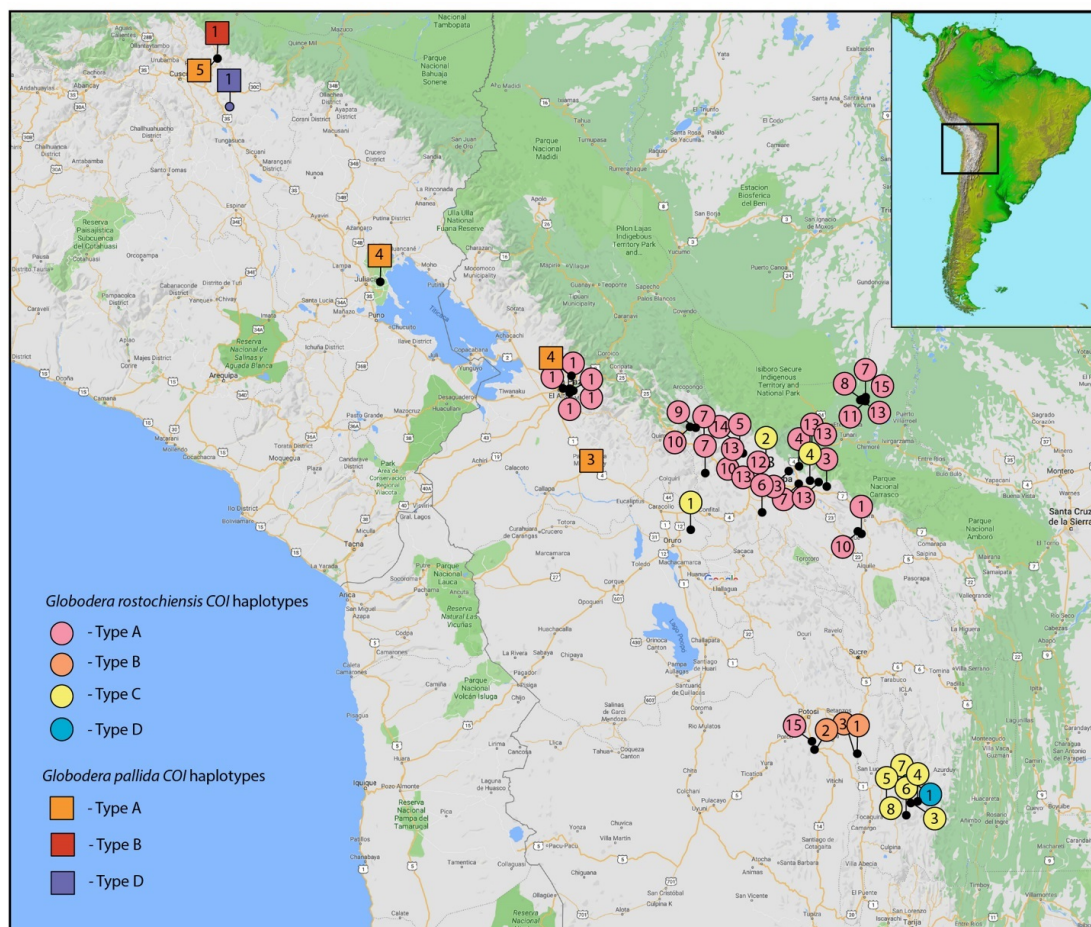


Рисунок 9.6. Карта Анд с распределением COI гаплотипов для *Globodera rostochiensis* и *G. pallida*, полученных из исследованных образцов.

9.3. Филогенетический анализ последовательностей *cytb* гена

Два подхода были также применены для анализа последовательностей *cytb* гена для видов *Globodera*. Первый подход включал в себя БВ и МЛ анализы выравнивания последовательностей *cytb* гена, содержащих только эталонные последовательности видов, тогда как второй подход включал СП анализ выравниваний последовательностей *cytb* гена для *G. rostochiensis*, *G. pallida* и *G. mexicana*.

Анализ хроматограмм выявил двойные пики для амплифицированных продуктов *cytb* гена для *G. rostochiensis* и *G. pallida*. Поскольку существенные различия в уровне гетероплазмии были обнаружены между последовательностями, сгенерированными прямым и обратным праймерами, нами была рассмотрена только 5' > 3' цепь ДНК. Всего в исследование было включено 164 последовательности *cytb* гена, и 98 из них были новыми. Выравнивание *cytb* гена составляло 452 п.н. в длину.

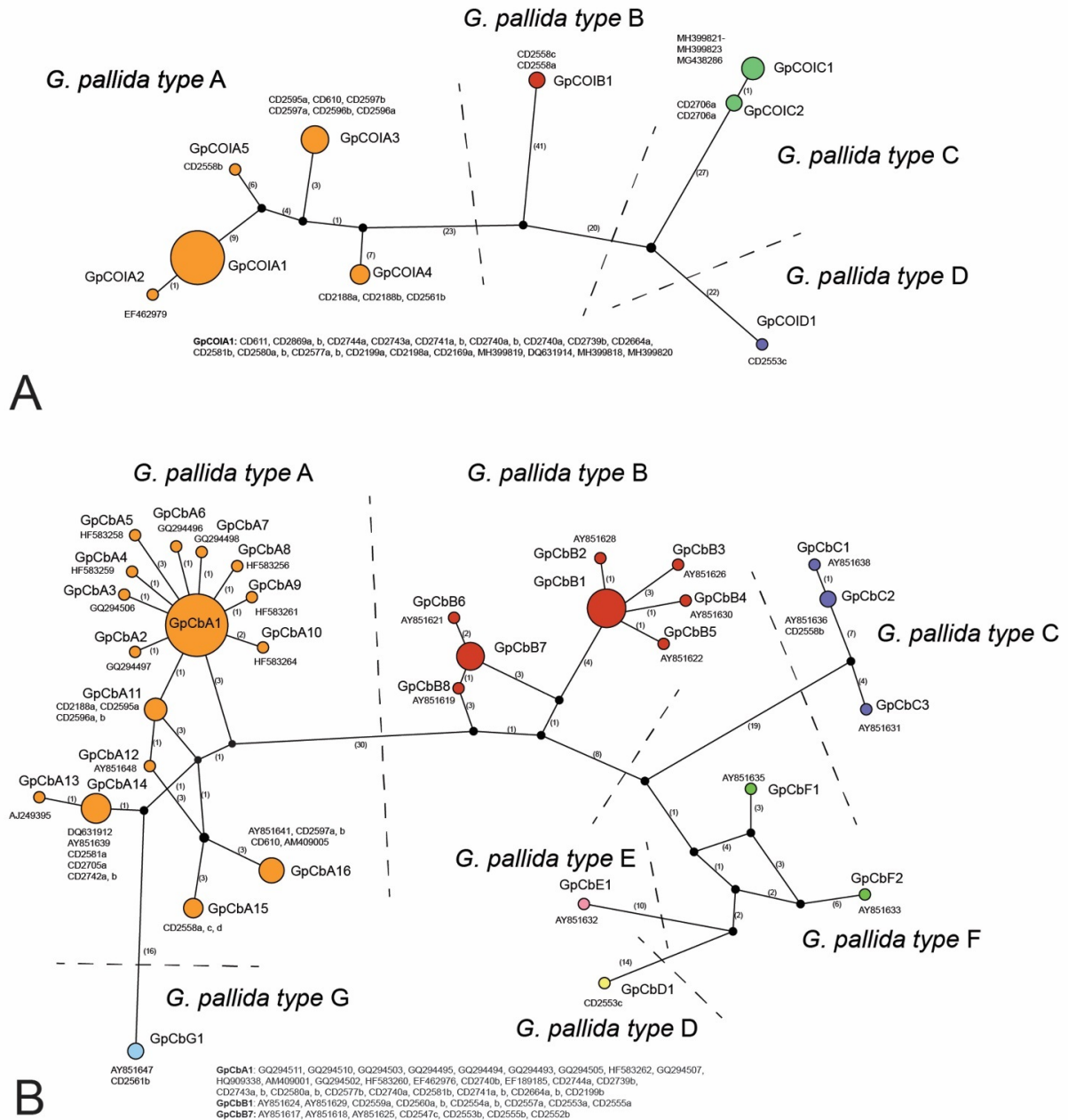


Рисунок 9.7. Статистическая сеть парсимонии, показывающая филогенетические отношения между гаплотипами *Globodera pallida*. Маленькие черные кружки представляют отсутствующие гаплотипы. Размеры круговой диаграммы пропорциональны количеству образцов с определенным гаплотипом. А: ген COI; В: ген cutb. Новые последовательности приведены с номерами проб.

9.3.1. Клада видов рода *Globodera*, паразитирующих на паслёновых

Филогенетические взаимоотношения в пределах вида *Globodera*, содержащие 51 эталонную последовательность видов *Globodera* и одну последовательность *G. capensis*, полученные в результате БВ и МЛ анализов, приведены на Рисунке 9.10. Максимальная дивергенция последовательности cutb гена для видов *Globodera*, паразитирующих на паслёновых, составила 26,3%

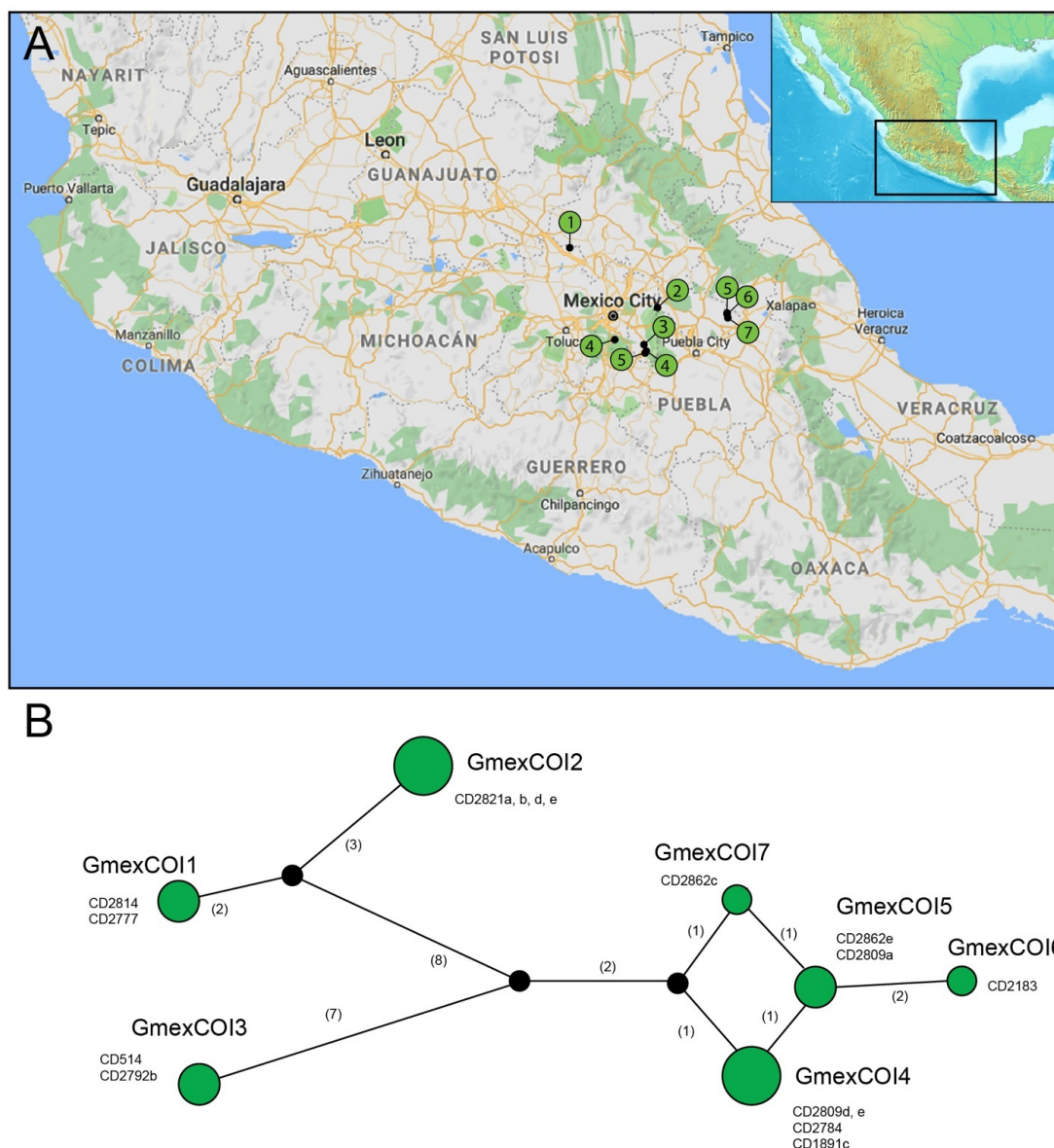


Рисунок 9.8. А: Карта Мексики с распределением COI гаплотипов для *Globodera mexicana*, полученных из оригинальных образцов; В: Сеть статистической парсимонии, показывающая филогенетические связи между гаплотипами COI у *G. mexicana*. Маленькие черные кружки представляют отсутствующие гаплотипы. Размеры круговой диаграммы пропорциональны количеству образцов с определенным гаплотипом. Новые последовательности приведены с номерами проб.

***Globodera rostochiensis*.** Всего было проанализировано 58 последовательностей этого вида. Сеть гаплотипов приведена на Рисунке 9.5В. В большинстве популяций был обнаружен только один гаплотип, однако четыре популяции содержали два гаплотипа. Группа А содержала 9 гаплотипов (CrCbA1-CrCbA9). Гаплотип CrCbA1 был обнаружен в Боливии, Венесуэле, Чили, Канаде, Словении, Сербии, Хорватии и России. Группа В имела 3 гаплотипа (CrCbB1-CrCbB3) с четырьмя последовательностями, а группа С с 7 гаплотипами (CrCbC1-CrCbC7) была обнаружена только в Боливии. Максимальная дивергенция последовательностей *cutb* гена составила 9,5%.

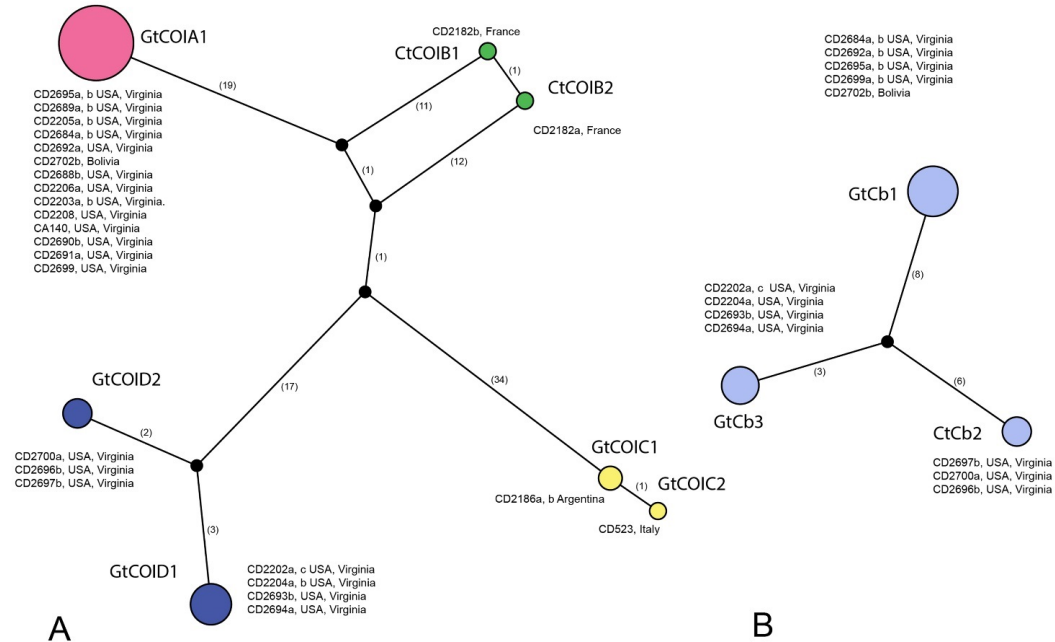


Рисунок 9.9. Статистическая сеть парсимонии, показывающая филогенетические отношения между гаплотипами *Globodera tabacum*. Маленькие черные кружки представляют отсутствующие гаплотипы. Размеры круговой диаграммы пропорциональны количеству образцов с определенным гаплотипом. А: ген COI; В: ген *cytb*. Новые последовательности приведены с номерами проб.

***Globodera pallida*.** Всего было проанализировано 85 последовательностей этого вида. Сеть гаплотипов приведена на Рисунке 9.7В. В большинстве популяций был обнаружен только один гаплотип, однако две популяции содержали два гаплотипа и одна популяция содержала три гаплотипа. Тридцать два гаплотипа были разделены на семь групп: А, В, С, D, Е, F и G. Группа А содержала 16 гаплотипов (СрСbА1-СрСbА16). Гаплотипы СрСbА1-СрСbА10 были обнаружены только в Европе или Канаде. Гаплотип СрСbА14 был зарегистрирован в Испании (Тенерифе), Великобритании, Новой Зеландии и Перу. Гаплотипы из групп В-Г были найдены в Америке. Максимальное разнообразие последовательностей *cytb* гена составило 11,7%.

***Globodera tabacum*.** Всего было проанализировано 17 последовательностей этого вида. Сеть гаплотипов приведена на Рисунке 9.9В. Всего было выявлено 3 гаплотипа. Максимальное разнообразие последовательностей *cytb* гена составило 3,1%.

***Globodera mexicana*.** В анализ были включены две новые и лишь недавно опубликованные последовательности, представляющие три гаплотипа. Максимальное разнообразие последовательностей *cytb* гена составило 0,8%.

***Globodera ellingtonae*.** Последовательность *cytb* гена была получена из Генного банка (KU726971) для этого исследования.

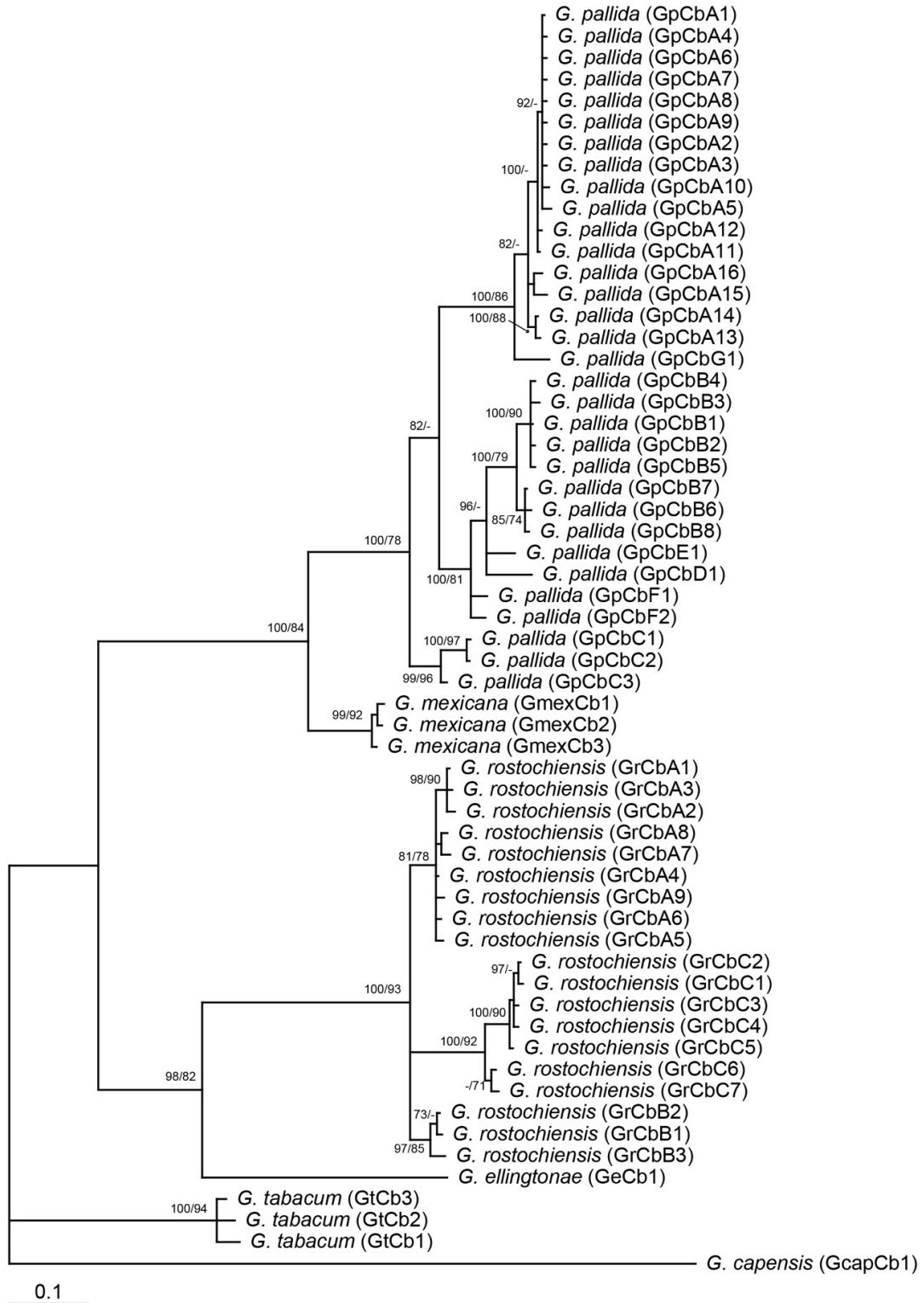


Рисунок 9.10. Филогенетические отношения между гаплотипами видов *Globodera*, поражающих паслёновые, получены из Байесовского анализа. Апостериорные значения вероятности для БВ-анализа и значения бутстрэпа для МЛ анализа приведены в соответствующих кладах.

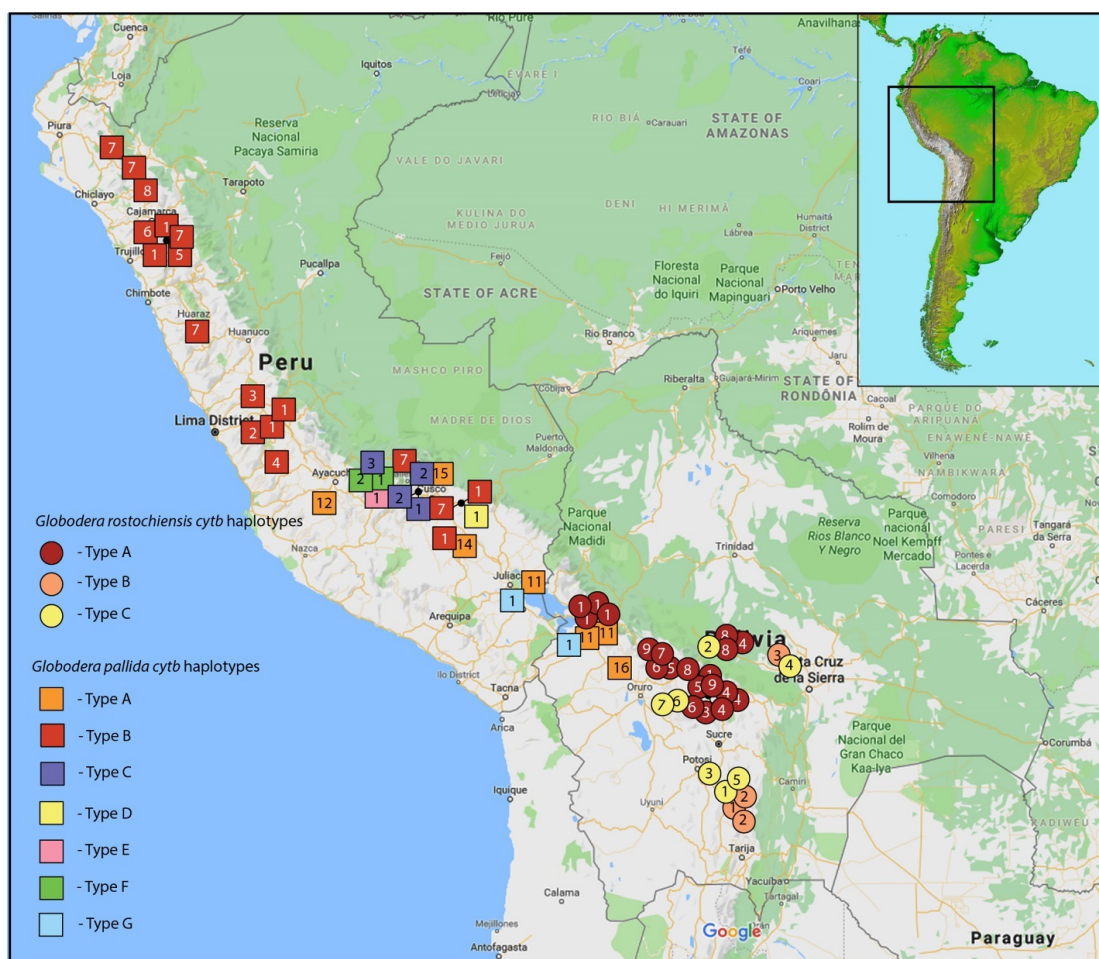


Рисунок 9.11. Карта Анд с распределением гаплотипов *cytb* для *Globodera rostochiensis* и *G. pallida*, полученных из оригинальных образцов и наборов данных, опубликованных Picard *et al.* (2007) и Plantard *et al.* (2008).

9.4. Проблемы использования митохондриальных генов для ДНК-баркодирования и филогеографии глободер

Хотя многие исследования показали, что COI и *cytb* гены являются надежными маркерами для ДНК-баркодирования, идентификации и филогеографических исследований многих групп нематод (Powers *et al.*, 2010; Palomares-Rius *et al.*, 2017; Subbotin *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2019), опубликованные результаты (Armstrong *et al.*, 2000; Gibson *et al.*, 2007a, b; Hoolahan *et al.*, 2011, 2012a) и наше настоящее исследование предоставляют некоторые доказательства о гетероплазмии и возможной интрогрессии и рекомбинации мтДНК у картофельных цистообразующих нематод. Мы полагаем, что результаты, полученные из анализа фрагментов мтДНК генов, следует рассматривать осторожно, особенно если изучаются внутривидовые взаимоотношения нематод. Различия, наблюдаемые в выявленных взаимоотношениях между популяциями *G. rostochiensis* или популяциями *G. pallida* и

реконструированные в результате анализа COI и *cytb* генов, можно объяснить необычной организацией генома митохондрий для этих видов.

Структура митохондриальных геномов нематод, в том числе соевой цистообразующей нематоды *H. glycines*, как правило, высококонсервативна и представлена одной кольцевой молекулой (Gibson *et al.*, 2011). Было показано, что митохондриальный геном *G. pallida* и *G. rostochiensis* состоит из нескольких молекул или субгеномов, включающих по меньшей мере шесть небольших кольцевых молекул мтДНК (scmtDNA I-VI) (Armstrong *et al.*, 2000; Gibson *et al.*, 2007a, b). Установлено, что COI и *cytb* гены с их псевдогенами локализованы в разных молекулах мтДНК. Более того, две функциональные копии *cytb* были также представлены в разных молекулах мтДНК (Gibson *et al.*, 2007a). Геном другой картофельной нематоды, *G. ellingtonae*, состоит из двух кольцевых молекул (мтДНК I и мтДНК II), а COI и *cytb* гены находятся на одной и той же молекуле мтДНК I у этого вида (Phillips *et al.*, 2016). Было также показано, что разные молекулы мтДНК наблюдаются с разной частотой в разных популяциях *G. pallida* (Armstrong *et al.*, 2007). Кроме того, обнаружены доказательства рекомбинации и наличие мозаичной структуры последовательностей мтДНК IV у популяций из Южной Америки (Armstrong *et al.*, 2007). Интересно, что различные субгеномы могут формироваться путем рекомбинации между различными молекулами (Gibson *et al.*, 2007b). Hoolahan *et al.* (2011, 2012a) также сообщили об анцестральных рекомбинационных событиях не только между популяциями из Южной Америки, но и между несколькими популяциями *G. pallida* из Великобритании и популяциями из Южной Америки. Этими авторами было высказано предположение, что эти популяции скрещивались и в результате могло происходить внедрение мтДНК от отцовской линии, и при этом мтДНК этих популяций впоследствии еще и рекомбинировалась. Тем не менее в потомстве от экспериментальных скрещиваний этих популяций *G. pallida* не было обнаружено доказательств рекомбинации между мтДНК материнской и отцовской популяций, что подтверждает аргумент о том, что случаи рекомбинации мтДНК в природных условиях у этих нематод являются относительно редким явлением (Hoolahan *et al.*, 2012a).

9.5. Определение видов глободер

Результаты настоящего исследования показали, что ВТС рРНК, COI и *cytb* гены способны дифференцировать одиннадцать изученных видов *Globodera*: *G. agulhasensis*, *G. artemisiae*, *G. capensis*, *G. ellingtonae*, *G. mexicana*, *G. millefolii*, *G. pallida*, *G. rostochiensis*, *G. sandveldensis*, *G. tabacum*, *G. zelandica* – друг от друга.

Ранее в наших публикациях были высказаны предположения, что бледная цистообразующая нематода картофеля, *G. pallida*, может представлять в действительности видовой комплекс (Subbotin *et al.*, 2011). Проведенный в настоящей статье анализ COI и *cutb* генов не дает доказательств того, что какие-либо неописанные виды присутствуют среди изученных образцов *G. pallida*. Характер кластеризации ВТС рРНК, COI и *cutb* генов для *G. pallida* позволяет предположить, что популяции из Южной Америки и других частей мира следует рассматривать как один вид – *G. pallida*.

Табачная цистообразующая нематода состоит из трех подвидов: *G. tabacum subsp. tabacum*, *G. tabacum subsp. virginiae* и *G. tabacum subsp. solanacearum*, которые имеют сходную морфологию и морфометрию, но различаются по своей способности паразитировать на сортах табака и развиваться на разных видах *Nicotianae* (Subbotin *et al.*, 2010). Хотя последовательности ВТС рРНК гена ранее не смогли идентифицировать различные подвиды и не выявили существенный полиморфизм для этого маркера (Subbotin *et al.*, 2011), СФПД и ПДАФ анализы (Thiéry *et al.*, 1997; Marché *et al.*, 2001) и анализ пяти эффекторов (Alenda *et al.*, 2013), трех генов, кодирующих ферменты, разрушающие клеточную стенку (Pel1, Pel2 и ExpV3), и двух генов, кодирующих пептиды CLE (CLE1 и CLE4), позволили молекулярно дискриминировать подвиды табачной цистообразующей нематоды. Наш настоящий анализ с использованием COI гена хотя и выявил внутривидовую структуру у этой нематоды, но не позволил однозначно дифференцировать подвиды. Возможно, необходимо проанализировать больше популяций этого вида, чтобы сделать вывод о надежности COI маркера для диагностики подвидов.

9.6. Данные по ДНК-последовательностям двух генов как обоснование синонимизации вида *G. bravoae*

В этом исследовании мы предложили свести в синоним *G. bravoae* с *G. mexicana* на основании сходства их молекулярных и морфологических признаков. Вид *Globodera bravoae* был описан из корней *Jaltomata procumbens* (Solanaceae), собранных в Мексике (Franco *et al.*, 2000). Вид считался отличным от всех других видов на основании некоторых различий в длине цисты и расположения протока пищеводных желез у личинок второй стадии. Образец *Globodera*, полученный из типовой местности обитания вида *G. bravoae* и морфологически идентифицированный нами как представитель этого вида, был использован для настоящего молекулярного анализа. Поскольку филогенетический анализ и анализ последовательностей ВТС рРНК и COI генов для *G. bravoae* и *G. mexicana* не выявил каких-либо существенных различий между ними, а диапазон морфометрических признаков этих видов перекрывается,

мы считаем, что *G. bravoae* следует рассматривать как новый и младший синоним вида *G. mexicana*.

9.7. Филогения рода *Globodera*

Филогенетические отношения в пределах рода *Globodera* были подробно изучены и обсуждены с использованием последовательностей ВТС рНК гена несколькими исследователями: Subbotin *et al.* (2000, 2001, 2011), Skantar *et al.* (2011), Knoetze *et al.* (2013, 2017a, b) и Lax *et al.* (2014). Филогения этого рода, реконструированная на основе анализа COI гена в настоящем исследовании, в основном совпадает с филогенией гена ВТС рНК.

Род *Globodera* представлен двумя основными кладами на наших филогенетических деревьях: i) виды *Globodera* из Южной и Северной Америки, паразитирующие на растениях Solanaceae; ii) виды *Globodera* из Африки, Европы, Азии и Новой Зеландии, паразитирующие на растениях Asteraceae и других семейств. Первая основная клада подразделяется на две подклады: первая подклада включает *G. pallida* и *G. mexicana*, вторая подклада включает *G. rostockiensis*, *G. tabacum* и *G. ellingtonae*. Взаимоотношения между этими двумя последними видами не выявлены на основе анализа COI и *cytb* генов. Вторая основная клада состоит из трех подклад: i) единственный вид *G. capensis* из Южной Африки, занимающий базальную позицию, ii) *G. zelandica* и два неописанных вида, собранных с неизвестных растений субальпийской растительности Северного и Южного островов Новой Зеландии, iii) виды *G. artemisiae*, *G. millefolii* из Европы и Азии, *G. agulhasensis* из Южной Африки, все паразитирующие на Asteraceae, а также *G. sandveldensis* из Южной Африки и один неописанный вид из Португалии.

9.8. Происхождение и филогеография рода *Globodera*

На основании проведенного анализа литературы и опубликованных филогенетических деревьев нами были предложены и проверены три основные гипотезы происхождения и распространения рода *Globodera*: i) с территории Западной Гондваны; ii) с территории современной Южной Америки и iii) с территории современной Южной Африки. Stone (1979) предположил, что *Globodera*, возможно, происходит с территории суперконтинента Гондваны, западной ее части, которая стала впоследствии Южной Америкой, в то время как предки европейских видов распространялись на север, с фрагментами Гондваны, которые встретились с Лавразией. Эта гипотеза была частично поддержана Picard *et al.* (2008), которые считали, что возраст дивергенции *Cactodera* (*Punctodera* + *Globodera*) близок к дивергенции

Heteroderinae-Punctoderinae и таксон мог произойти после разделения Лавразии и Гондваны, то есть 173–130 млн лет назад. Также предполагалось, что расхождение южноамериканских и лавразийских видов рода *Globodera* произошло между 80 и 60 млн лет назад уже после расхождения Северной и Южной Америки в палеоцене. Subbotin *et al.* (2011) также высказал гипотезу, что если учитывать предполагаемый возраст растений-хозяев, в настоящее время ассоциированных с цистообразующими и цистоидными нематодами, можно предположить несколько более поздние даты расхождения между линиями этих нематод. Было предложено, что расхождение двух основных линий *Globodera* было связано со временем происхождения Solanaceae, которое произошло 65–51 млн лет назад. Таким образом, разделение двух линий глободер могло произойти после распада Гондваны и раскола Африки и Южной Америки в конце мелового периода. Мы полагали, что распределение Punctoderinae не может быть объяснено исключительно разделением континентов и диффузионным распространением (Subbotin *et al.*, 2011). Анализ молекулярных часов, проведенный в настоящем исследовании, позволил предположить относительно недавнее происхождение рода *Globodera* – 3 млн лет назад или немного позже этого времени. Таким образом, наш анализ не поддерживает гипотезу о происхождении этих нематод из Западной Гондваны и указывает на недавние события распространения нематод на большие расстояния от основного центра происхождения *Globodera*.

Несколько лет назад нами было выдвинуто предположение, что центр происхождения, диверсификации и видообразования в основных кладах и подкладах *Globodera* находился в горных районах (Subbotin *et al.*, 2011, 2016). Известно, что основной центр диверсификации *Globodera*, паразитирующих на паслёновых растениях, находится в горном массиве Анд, который известен как один из самых разнообразных в биологическом отношении регионов на Земле, откуда также произошли многие паслёновые растения (Luebert & Weigend, 2014; Hazzì *et al.*, 2018). Этот регион является одной из тридцати шести горячих точек биоразнообразия (Тропические Анды), где произрастает около одной шестой всех растений в мире, включая более 30000 видов сосудистых растений. Наш анализ четко показывает, что *Globodera*, паразитирующие на паслёновых, первоначально происходят из Южной Америки и только затем представители этой клады колонизировали Мексику и Северную Америку.

Наш анализ также выявил сильную поддержку южноафриканского происхождения для *Globodera*, паразитирующих на непаслёновых, и надежную реконструкцию событий расселения нескольких представителей этой группы в Новую Зеландию и Европу-Азию во время плейстоцена. Мы полагаем, что виды *Globodera*, принадлежащие второй главной кладе, имеют по крайней мере два центра диверсификации: горы Западного Кейпа в Южной Африке (Капский флористический регион) и горы Северного и Южного островов в Новой Зеландии.

Андский регион, Кейп и Австралийский регион с Новой Зеландией относятся к так называемому Австралийскому царству (Morrone, 2018). Результаты филогеографических исследований показали, что Новая Зеландия, очевидно, является вторичным центром видообразования, и только Южная Америка или Южная Африка могут рассматриваться в качестве кандидатов на места, откуда происходит *Globodera*. В результате анализа распространения видов, используя программу S-DIVA, нам не удалось определить с высокими статистическими значениями наиболее вероятную область происхождения рода *Globodera*. Гипотезы о происхождении «из Южной Америки» или «из Южной Африки» были почти в равной степени вероятны, исходя из анализа существующих в данный момент данных. Очевидно, что в будущий анализ необходимо включить больше таксонов из *Globodera* и родственных родов, чтобы определить основной регион происхождения для рода *Globodera*.

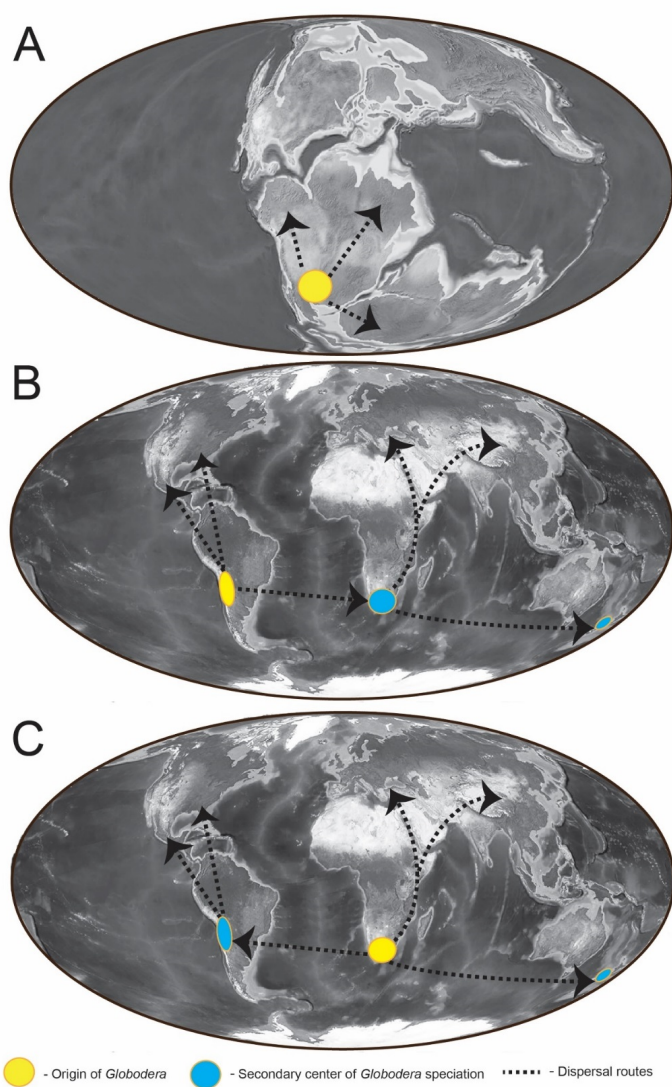


Рисунок 9.12. Происхождение и распространение рода *Globodera* в мире. А: Гипотеза происхождения из Западной Гондваны; В: Гипотеза происхождения из Южной Америки (Анды); С: Гипотеза происхождения из Южной Африки.

МЛ тест отверг гипотезу теста глобальных молекулярных часов при $p < 0,001$. Топология дерева, полученная с помощью программы BEAST, противоречила дереву, полученному с помощью MrBayes, в позиции *G. ellingtonae* и *G. mexicana*. На BEAST дереве *G. ellingtonae* сгруппировались с *G. pallida* и *G. mexicana*, которые были расположены в кладе с *G. pallida*. Расчетное время расхождения между основными кладами показано на Рисунке 9.4. Метод анализа с использованием молекулярных часов показал, что расхождение между паслёновыми и непаслёновыми линиями *Globodera* произошло примерно $2,9 \pm 0,5$ млн лет (миллионов лет назад). Даты дивергенции у паслёновых линий *Globodera* начинались с $2,7 \pm 0,2$ млн лет, а у непаслёновых линии *Globodera* – $1,6 \pm 0,3$ млн лет. Распространение глободеры в Европу и Новую Зеландию произошло $1,4 \pm 0,3$ и $0,9 \pm 0,2$ млн лет назад соответственно.

9.9. Происхождение и популяционная структура картофельных нематод в Андах

Многие исследования показали, что горные массивы Анд сыграли важную историческую роль в происхождении и создании глубоко выраженной внутривидовой структуры различных организмов. Подъем Анд в позднем миоцене и плиоцене в сочетании с климатическими колебаниями плейстоцена оказал сильное влияние на диверсификацию биоты Анд (Luebert & Weigend, 2014). Перуанские и Боливийские Анды были признаны многими нематологами как центр происхождения картофельных цистообразующих нематод (Spears, 1968; Evans *et al.*, 1975; Canto-Saenz & De Scurrah, 1977; Sosa-Moss, 1987). Было показано, что к северу от $15,6^\circ$ ю.ш. был обнаружен только вид *G. pallida*, но к югу от этой широты большинство исследованных популяций были *G. rostochiensis* или смесью двух видов в районе озера Титикака (Evans *et al.*, 1975; Franco, 1977). Наше настоящее исследование с использованием молекулярного анализа подтвердило эту картину распределения двух видов картофельных нематод. Grenier *et al.* (2010) уже заметили, что Spooner *et al.* (2005) идентифицировали ту же область в качестве места главного кладистического разделения для дикого картофеля из видового комплекса *Solanum brevicaulis*. Это место также соответствует географическому барьеру через Анды, так называемому барьеру «Юнгасские межандийские долины», играющему роль в изоляции и диверсификации некоторых эндемичных организмов в тропических Андах в период между последним миоценом и плейстоценом (Hazzi *et al.*, 2018).

Анализ распределения гаплотипов митохондриальных генов предполагает два центра происхождения для КЦН: один для *G. pallida* и другой для *G. rostochiensis*. Центр

происхождения *G. pallida*, вероятно, находится на юге Перу между Куско и озером Титикака. Franco (1977) и Stone (1979) ранее предположили, что настоящее распределение КЦН указывает на то, что их видообразование могло произойти к северу и югу от озера Титикака, где само озеро и возвышенности к северу образовали эффективный барьер во время плейстоцена. Picard *et al.* (2007) обнаружили, что южные популяции *G. pallida* генетически более разнообразны и формируют базальные линии на филогенетических деревьях. На основе анализа *cyt b* гена и микросателлитов также четко прослеживается характер уменьшения генетической изменчивости с юга на север. Наши результаты подтвердили эти выводы и дали более полную характеристику распределения гаплотипов для *G. pallida*. Мы также предположили, что центром происхождения *G. rostockiensis* может быть местонахождение на юге Боливии или северо-западе Аргентины. Brücher (1959) предположил, что КЦН могут происходить с северо-запада Аргентины. Franco (1977) согласился с предположением, что виды КЦН эволюционировали в этом регионе, изолированном во время плейстоценового оледенения, а затем мигрировали на север (Stone, 1979). Наш филогенетический анализ имеющихся в настоящее время данных позволяет предположить, что Южные Анды, включая северо-запад Аргентины, действительно могут считаться другим, более древним центром происхождения для *G. rostockiensis*, *G. ellingtonae* и *G. tabacum*. Гаплотипы COI гена для *G. rostockiensis*, обнаруженные в основном на юге Боливии, занимали базальные линии на нашем филогенетическом дереве. У этого вида наблюдалась также тенденция к снижению генетической изменчивости у популяций с юга на север. Несколькими исследованиями было показано, что многие растения имели недавнее происхождение в северных Андах, по сравнению с растениями из центральных Анд, также как и растения, произрастающие в центральных Андах, по сравнению с южными Андами. Все это согласуется с предположением о том, что подъем горных массивов Анд начинался с юга на север (Luebert & Weigend, 2014). Мы полагаем, что северо-запад Аргентины также может быть центром происхождения и диверсификации *G. ellingtonae*. Этот вид был описан в США: в штатах Орегон (Пауэл Бьютт) и Айдахо (Тетон) (Handoo *et al.*, 2012). Он также был обнаружен в Аргентине, провинция Сальта (Lax *et al.*, 2005), и Чили, Антофагастский регион (Grenier *et al.*, 2010; Skantar *et al.*, 2011; Subbotin *et al.*, 2011). Сравнение биологических признаков *G. ellingtonae* показало, что этот вид больше похож на *G. rostockiensis*, чем на *G. pallida* (Dandurand *et al.*, 2019). На филогенетическом дереве, построенном на основе COI гена, *G. tabacum* из Аргентины также занимал базальную позицию, что указывает на его древнее происхождение в том же регионе.

9.10. Происхождение и распространение европейских и североамериканских популяций картофельных нематод

Появление КЦН в других странах было результатом распространения местных популяций из Анд вместе с семенным картофелем. Молекулярные исследования с использованием различных маркеров выявили сложную эволюционную историю для КЦН. Plantard *et al.* (2008), основываясь на анализе маркеров гена *cutb* и микросателлитов, пришли к выводу, что источник европейской популяции *G. pallida* был из единственной ограниченной зоны на юге Перу, расположенной между северным берегом озера Титикака и Куско. Grenier *et al.* (2001, 2010) предоставили дополнительные доказательства того, что только часть генетической изменчивости, обнаруженной в Южной Америке, была завезена в Европу. Наш повторный анализ последовательностей *cutb* гена для *G. pallida* с включением дополнительных данных подтвердил эти выводы. Наши результаты показали, что только четыре гаплотипа COI гена из двух групп (А и С) были обнаружены за пределами Южной Америки, причем GrCOIA1 был наиболее распространенным и был зарегистрирован в нескольких европейских странах и США. Два других гаплотипа, GrCOIC1 и GrCOIC2, были обнаружены только в Великобритании и Кении соответственно. Однако уникальность кенийских гаплотипов COI гена должна быть тщательно проверена, чтобы определить, является ли она недавним событием эволюции, ошибкой чтения последовательности или результатом геной гетероплазии. В Европе обнаружено несколько гаплотипов *cutb* гена у *G. pallida*, различающихся по одному или двум нуклеотидам. Однако такое различие в последовательностях *cutb* гена можно объяснить проблемами его естественной гетерогенности. Тем не менее ни один из европейских гаплотипов COI из гаплотипов А и гаплотипов *cutb* *G. pallida* точно не соответствует ни одному из известных в настоящее время перуанских гаплотипов. Единственным исключением является гаплотип SpCbA16, обнаруженный в Великобритании, Хулиаке на юге Перу и в департаменте Ла-Пас в Боливии.

В настоящем исследовании мы представили доказательства высокого уровня разнообразия гаплотипов и структурированной филогеографической картины у *G. rostochiensis* в Боливии. *Globodera rostochiensis* из Европы, Северной Америки и другие широко распространенные в мире популяции этого вида относятся к одному гаплоидному типу COI или *cutb* генов. Эти гаплотипы идентичны тем, которые встречаются в основном в боливийском департаменте Ла-Пас, расположенном на западной границе, проходящей по озеру Титикака между Боливией и Перу. Таким образом, мы можем предположить, что *G. rostochiensis* был завезен из этого места в другие регионы мира совместно с картофелем. Наша гипотеза отличается от гипотезы Boucher *et al.* (2013), предполагающей, что

европейские популяции этого вида происходят из Перу или Чили. Очевидно, что для проверки этих гипотез следует проанализировать больше образцов нематод из Южной Америки.

9.11. Происхождение и структура популяции *Globodera mexicana* из Мексики

Анализ последовательностей *cytb* и *COI* генов показал, что *Globodera pallida* и *G. mexicana* являются родственными видами с датой расхождения 1,6 млн назад. *Globodera mexicana*, паразитирующая на диких паслёновых растениях-хозяевах, вероятно, возникла и диверсифицировалась в Мексике после того, как ее предковая форма распространилась из Анд. Наши результаты с ограниченной выборкой для этого вида показывают, что наблюдаемое генетическое разнообразие популяций *G. mexicana* также может быть связано с зонами локальной топографической сложности. Мексику пересекают крупные горные системы (Восточная Сьерра-Мадре, Западная Сьерра-Мадре, Сьерра-Мадре-дель-Сур, Сьерра-де-Чьяпас и Трансмексиканский вулканический пояс), относящиеся к различным геологическим провинциям и сильно различающиеся по возрасту. Эти горы являются важными точками биоразнообразия и эндемизма, сформировавшимися в результате локального и регионального вымирания и колонизации организмов (Sosa *et al.*, 2018). Наша работа показывает необходимость проведения более обширных исследований на разных высотах в этих горных массивах, чтобы понять факторы диверсификации *Globodera mexicana*.

9.12. Происхождение и специализация глободер в Южной Африке

До недавнего времени не было ничего известно о видах *Globodera* в Африке, пока Knoetze *et al.* (2006) не обнаружили несколько видов в регионе Сандвельд на западном побережье Южной Африки. Это открытие позволило выдвинуть новые гипотезы о происхождении этой группы нематод (Knoetze & Swart, 2014). Сандвельд расположен в Капской флористической области (КФО), которая была идентифицирована как точка биоразнообразия, занимающая площадь более 87 тыс. км² и демонстрирующая исключительно высокое разнообразие и эндемизм сосудистых растений и беспозвоночных (Cowling & Heijnis, 2001). Богатое разнообразие КФО обусловлено обширным и сложным набором типов мест обитания, полученных из топографического и климатического разнообразия в горах региона, плодородных низинах и полузасушливых прибрежных дюнах (Cowling *et al.*, 2009). Наши результаты показали, что *Globodera* возникла и диверсифицировалась в Южной Африке 1,6 млн лет назад, а затем распространилась в

Евразию (1,4 млн лет назад) и Новую Зеландию (0,9 млн лет назад) в результате нескольких событий расселения.

Представленные здесь результаты основаны на анализе только трех генетических маркеров. Мы полагаем, что быстрый прогресс в технологиях анализа генома и доступность быстрого секвенирования нуклеотидов позволят провести более подробный анализ эволюционных связей между видами *Globodera* и дать более точное и подробное представление о происхождении и распределении видов и даже предсказать потенциальную будущую картину распространения.

ГЛАВА 10. ФИЛОГЕНИЯ ГАЛЛОВЫХ КОРНЕВЫХ НЕМАТОД И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *MELOIDOGYNE NATALIEI* GOLDEN, ROSE & BIRD, 1981 (NEMATODA: TYLENCHIDA)

В число основных задач настоящего исследования входило: i) проведение молекулярного анализа Мичиганской виноградной галловой нематоды *M. nataliei*; ii) выяснение эволюционной связи *M. nataliei* с другими нематодами, iii) построение филогении галловых нематод, используя мультигенный набор данных, содержащий видовые референтные (эталонные) последовательности 18S рРНК, D2-D3 28S рРНК, ВТС рРНК, мтДНК COI генов и межгенного фрагмента между COII и 16S генами. В результате нашей работы были также отсекужены некоторые другие виды галловых нематод, включая *M. christie*, *M. baetica*, *M. floridensis* (Рисунок 10.1). Результаты работы подробно изложены в наших публикациях: Alvarez-Ortega *et al.* (2019), Castillo *et al.* (2003), McClure *et al.* (2012), Brito *et al.* (2015), Westphal *et al.* (2019) и нескольких других статьях.

10.1. Молекулярный анализ

Для филогенетического анализа были использованы эталонные последовательности пятидесяти пяти валидных видов *Meloidogyne*, доступные в базе данных Генного банка, и полученные нами последовательности *M. nataliei* (Рисунок 10.2). Филогенетические деревья, полученные для пяти генов, представлены на дополнительных рисунках в нашей статье Alvarez-Ortega *et al.* (2019) и не приводятся в настоящей главе.

Амплификация части гена 18S рРНК дала один ампликон длиной 834 п.н. для *M. nataliei*. Поиск BLASTn последовательности этого гена выявил самые высокие совпадения – 93,1-93,3% (покрытие = 99%) – с последовательностями видов *Zygotylenchus*, *Hirschmanniella*, *Trophurus*, *Bitylenchus* spp. и *Tylenchorhynchus* spp. Филогенетическое дерево, реконструированное в результате анализа последовательностей 18S рРНК генов (44 вида *Meloidogyne*, длина выравнивания = 1709 п.н.), показало высокую поддержку суперклады (АП и БС = 100%) с четырьмя кладами (*M. javanica* – *M. enterolobii*, *M. hapla* – *M. silvestris*; *M. chitwoodi* – *M. exigua*; *M. christiei*). Другие нематоды были распределены среди шести клад (*M. mali*; *M. baetica* – *M. oleae*; *M. camelliae* – *M. aberrans*; *M. coffeicola*; *M. africana*; *M. nataliei*). Вид *Meloidogyne nataliei* занимал базальную позицию в пределах рода.

Амплификация D2-D3 фрагмента гена 28S рРНК дала один ампликон длиной 716 п.н. для *M. nataliei*. Поиск BLASTn 28S рРНК гена выявил наибольшее совпадение с последовательностью *Meloidogyne indica* (MF680038) – 86% (покрытие = 99%).

Филогенетическое дерево (Рисунок S3, см. Alvarez-Ortega *et al.* 2019), полученное в результате анализа последовательности 28S рРНК генов (42 вида *Meloidogyne*, длина выравнивания = 791 п.н.), показало высокую поддержку суперклады (АП и БС = 100%), которая включала четыре основных клады (*M. arabicida* – *M. inornata*; *M. spartelensis* – *M. hapla*; *M. trifoliophila* – *M. minor*; *M. graminis* с *M. marylandi*) и кладу с *M. christiei*. Другие нематоды были распределены среди шести клад (*M. mali*; *M. artiellia* – *M. oleae*; *M. camelliae*; *M. daklakensis* – *M. aberrans*; *M. africana*; *M. indica* с *M. nataliei*). *Meloidogyne nataliei* показала близкие родственные отношения с *M. indica* и занимала базальную позицию в пределах рода.

Амплификация гена ВТС рРНК дала один ампликон длиной 696 п.н. для *M. nataliei*. Поиск BLASTn последовательности ВТС рРНК гена выявил наибольшее совпадение с последовательностью ВТС рРНК гена видов *Hirschmanniella*, *Pratylenchus* spp. и *Tylenchorhynchus clarus*. Сходство последовательностей гена ВТС рРНК *M. nataliei* с этими последовательностями составляла 82-84%, при покрытии = 51-55%. Из-за большой неоднозначности в выравнивании области ВТС2, только фрагмент выравнивания, содержащий ген ВТС1 и частичный 5.8S рРНК ген, был использован в филогенетическом анализе. Дерево, полученное из полного выравнивания ВТС1, содержало 40 видов *Meloidogyne* и было длиной 522 п.н. (показано на Рисунке S4, см. Alvarez-Ortega *et al.*, 2019). Выравнивание ВТС1 также показало некоторые неоднозначные области. Gblocks использовался, чтобы удалить расходящиеся участки и создать выравнивание ВТС1, которое составляло 325 п.н. в длину (Рисунок S5, см. Alvarez-Ortega *et al.*, 2019). Вид *Meloidogyne nataliei* сформировал кладу с *M. indica* и занял базальную позицию в пределах рода на этом дереве.

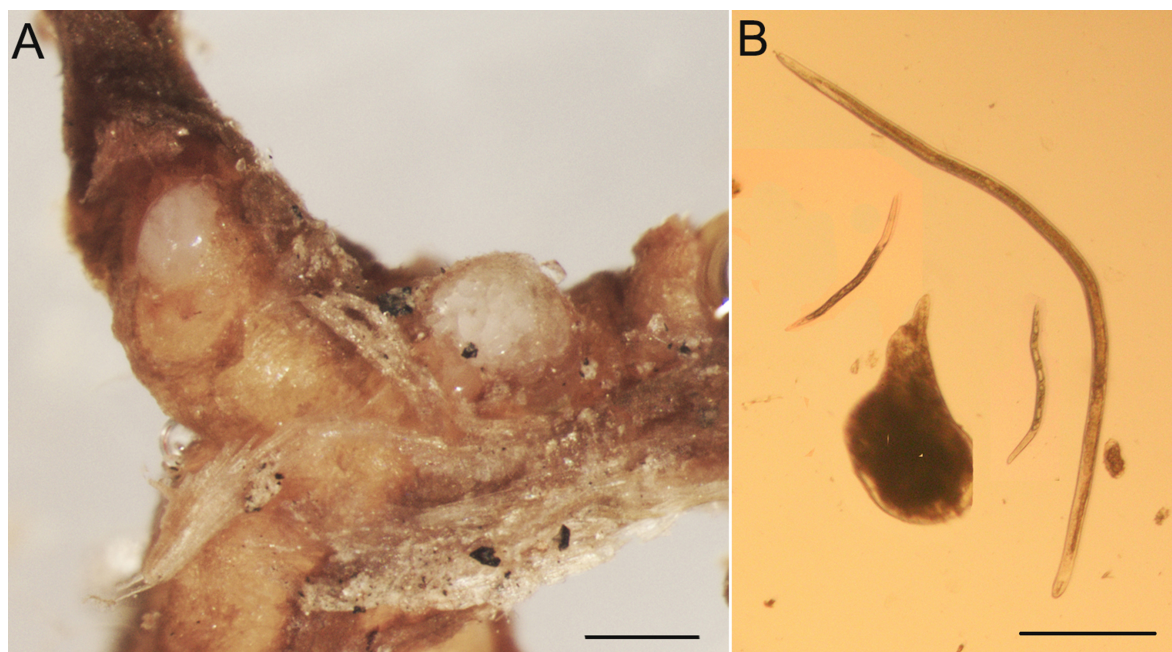


Рисунок 10.1. А: Галловая нематода *Meloidogyne floridensis* на корнях персика. В: Самка, личинки и самец *Meloidogyne floridensis* (из статьи Reighard *et al.*, 2019)

Для анализа видов корневых галловых нематод, принадлежащих к тропической группе, было создано выравнивание, содержащее 258 ДНК-последовательностей ВТС 13 валидных и неопределенных видов. Выравнивание составляло 454 п.н. в длину. Филогенетическая сеть с последовательностями ВТС рРНК, реконструированная с использованием статистической парсимонии с помощью программы POPART, представлена на Рисунке 10.3. Этот метод выявил две группы видов: Incognita и Ethiopica и отдельно вид *M. enterolobii*. Максимальные вариации последовательности для клады 1 составили 15,5%, для группы Incognita – 11%, для группы Ethiopica – 3,5% и для *M. enterolobii* – 10,1%. ВТС последовательности *M. enterolobii* были распределены между двух групп. У *Meloidogyne paranaensis* и некоторых видов из группы Ethiopica некоторые ВТС последовательности были также объединены с группой Incognita.

Амплификация частичного гена COI дала один ампликон длиной 439 п.н. для *M. nataliei*. Поиск BLASTn последовательности COI *M. nataliei* выявил наибольшее сходство (83,1% покрытие = 100%) с последовательностью COI для *M. camelliae* (KM887147). Филогенетическое дерево, полученное в результате анализа COI гена (31 *Meloidogyne* spp., 433 п.н.), представлено на Рисунке S7 (см. Alvarez-Ortega *et al.*, 2019). Филогенетические отношения между большинством клад и видов были плохо выявлены. *Meloidogyne nataliei* формировал базальную кладу внутри рода.

Выравнивание межгенного фрагмента COII-16S рРНК длиной 567 п.н. включало 31 последовательность нематод. Филогенетическое дерево, выведенное из этого фрагмента, представлено на Рисунке S8 (см. Alvarez-Ortega *et al.*, 2019).

Комбинированное выравнивание было составлено из пяти генов 56 видов *Meloidogyne* и имело 4022 п.н. в длину. Филогенетическое дерево содержало одиннадцать клад (Рисунок 10.2). *M. nataliei* и *M. indica* сформировали базальную кладу всех других видов *Meloidogyne*. Картирование биологических признаков и биогеографических данных: i) ареал хозяина; ii) способ размножения; iii) количество хромосом – также приведено на Рисунке 10.2.

10.2. Филогенетические отношения в пределах рода *Meloidogyne*

В этом исследовании мы оценили мультигенное дерево из набора данных, содержащих эталонные последовательности пяти генов у 56 видов *Meloidogyne*, которые представляют более половины известных валидных видов галловых нематод. Наш филогенетический анализ и несколько опубликованных филогений *Meloidogyne* показали, что не все виды могут быть отнесены к трем основнымкладам. В нашем исследовании мы предложили новую нумерацию клад как попытку классифицировать все изученные виды. Изученные в нашей работе виды

галловых нематод распределены по одиннадцати кладам с высокой или умеренной поддержкой, семь из которых составляют суперкладу, содержащую 75% изученных видов. Суперклада содержит кладу I и кладу III по нумерации Tandingan De Ley *et al.* (2002). Виды из бывшей клады II распределены в новых кладах II, IV, VI и VII. Тенденции эволюции галловых нематод, составляющих суперкладу, были уже охарактеризованы Tandingan De Ley *et al.* (2002), Tigano *et al.* (2005) и Holterman *et al.* (2009). В настоящей работе, благодаря включению дополнительных таксонов, мы смогли более четко охарактеризовать эти закономерности.

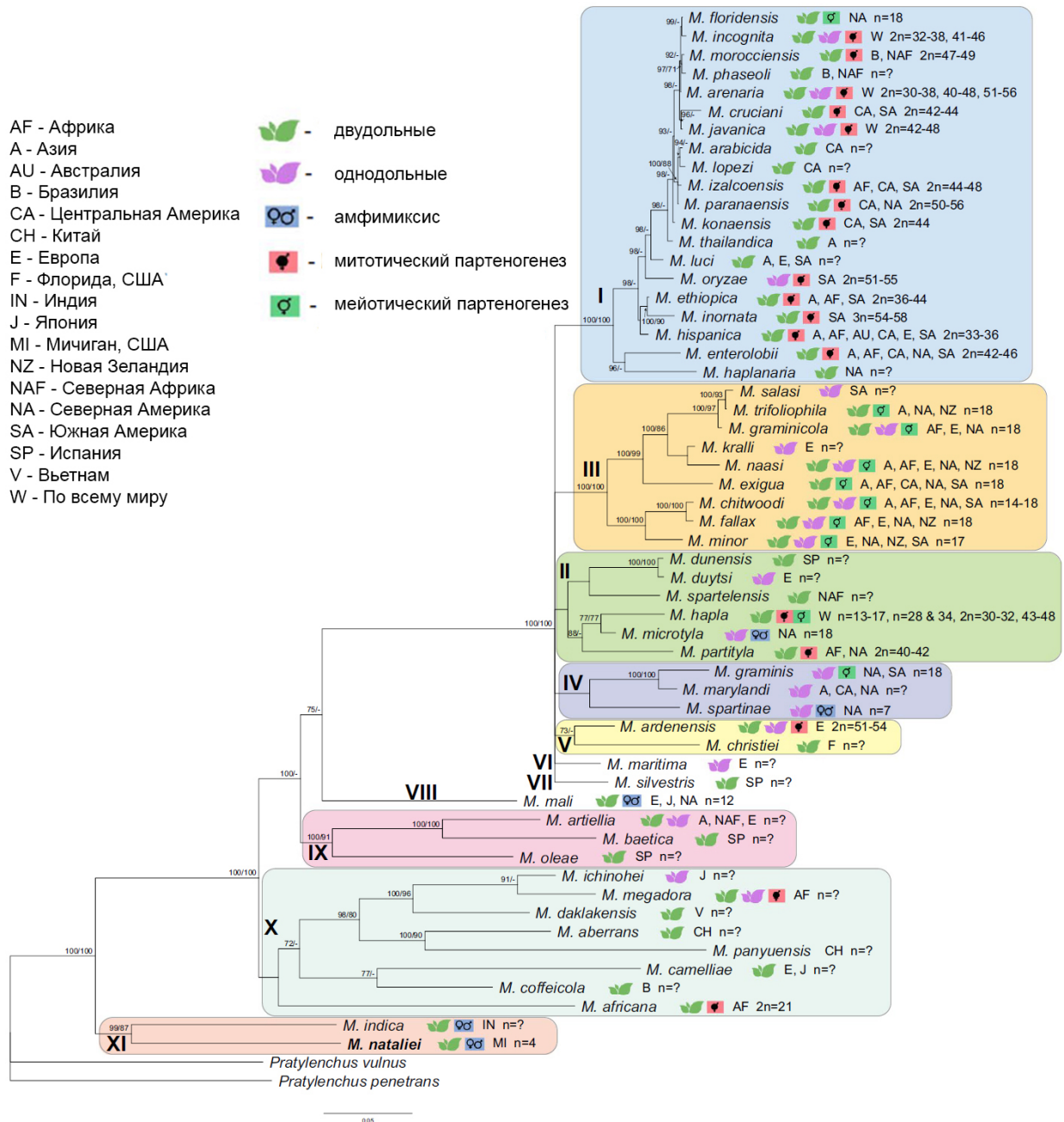


Рисунок 10.2. Филогенетические взаимоотношения между видами рода *Meloidogyne*, полученные в результате БВ анализа комбинированного выравнивания 18S рРНК, ВТС1 рРНК, D2-D3 28S рРНК, COI и COII-16S рРНК генов. АП значения для БВ анализа и значения бутстрепа для МЛ анализа даны для соответствующих клад.

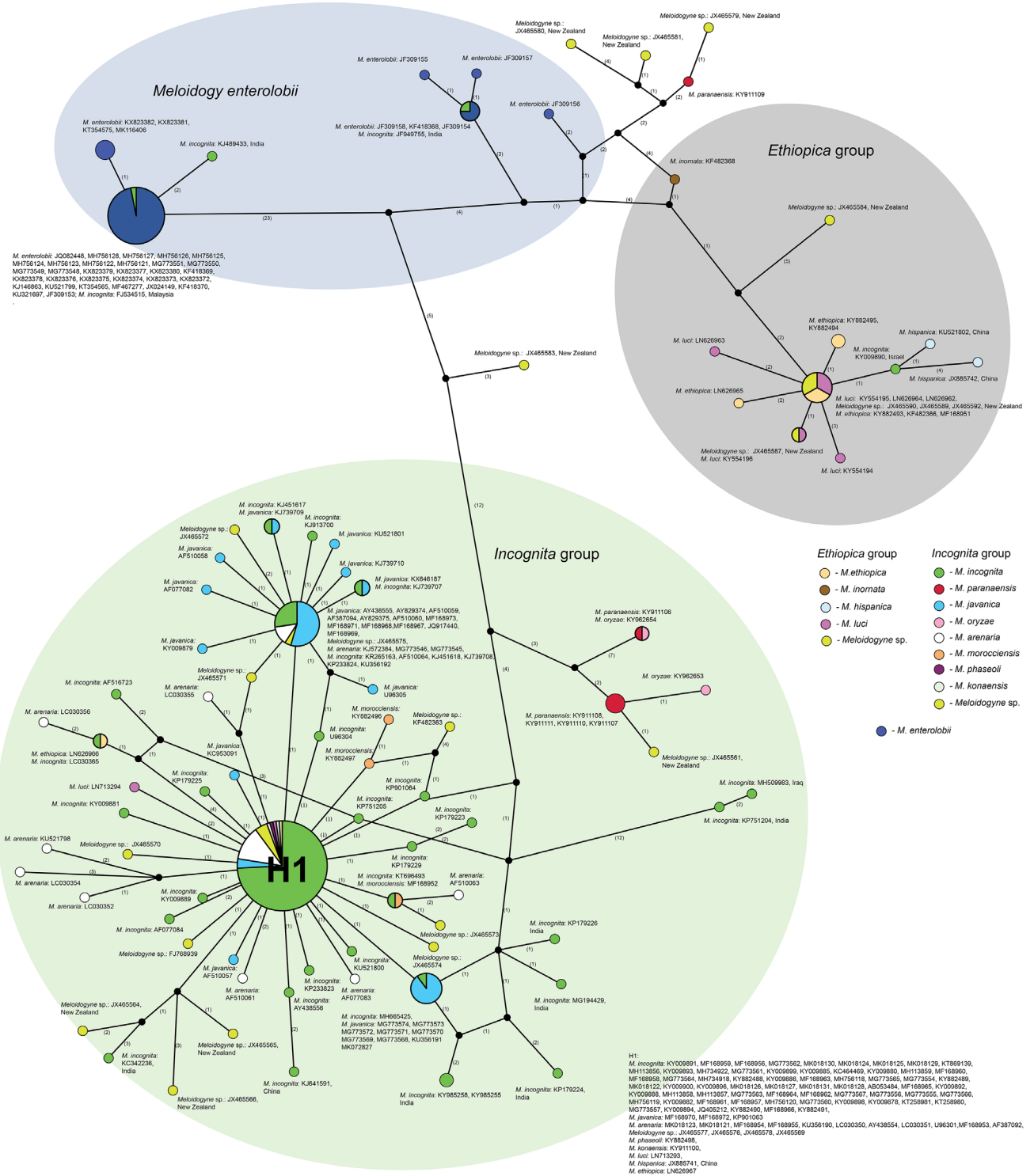


Рисунок 10.3. Статистическая сеть парсимони, показывающая филогенетические отношения между ВТС гаплотипами у мелойдогин из тропической группы.

К кладе I относятся виды *Meloidogyne*, распространенные в теплом климате, а именно *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* и еще 17 видов, рассматриваемых как комплекс тропических видов. Три вида этого комплекса: *M. arenaria*, *M. incognita* и *M. javanica* – распространены по всему миру и являются основными вредителями многих сельскохозяйственных культур. *Meloidogyne phaseoli* и *M. morocciensis* обнаружены в

Бразилии и Северной Африке, тогда как *M. floridensis* найдена только во Флориде, Калифорнии и Южной Каролине. *Meloidogyne arabicida*, *M. izalcoensis*, *M. lopezi*, *M. paranensis* и *M. konaensis* паразитируют на кофейных деревьях в Северной, Центральной и Южной Америке. Вид *Meloidogyne thailandica*, представитель группы *Ethiopica* (*M. luci*, *M. ethiopica*, *M. inornata* и *M. hispanica*), по Stare *et al.* (2019), паразитирует на различных двудольных и обнаружен в Азии, Африке, Южной Америке и Европе.

Вид *Meloidogyne oryzae*, размножающийся митотическим партеногенезом, был отнесен несколькими авторами к кладе III (Tigano *et al.*, 2005; Holterman *et al.*, 2009). Однако результаты, полученные Negretti *et al.* (2017) и da Silva Mattos *et al.* (2018), показали, что рРНК ген, который анализировался, на самом деле принадлежит другому виду – *M. graminicola*. Наш анализ этого гена показывает, что последовательность, депонированная Silva Mattos *et al.* (2018) как *Meloidogyne oryzae*, принадлежит кладе I. Принимая во внимание то, что депонированная Silva Mattos *et al.* (2018) последовательность ВТС рРНК гена (KY962653-изолят Mo1, KY962654-изолят Mo2) относится к *Meloidogyne oryzae*, мы рассматриваем другие депонированные ДНК-последовательности: 18S рРНК (AY942631) (Tigano *et al.* 2005), COI (MH128473, MH128474) (Powers *et al.*, 2018) и D2-D3 28S рРНК (KY962662-изолят Mo2) (da Silva Mattos *et al.*, не опубликовано) – как принадлежащие к *M. graminicola* или, возможно, к другим неизвестным видам.

С помощью секвенирования было показано, что *M. incognita*, *M. javanica* и *M. arenaria* содержат дивергентные копии рРНК генов. Различная эволюционная история этих копий, вероятно, возникшая в результате гибридизации и/или дупликаций генома, усложняет как филогенетический анализ, так и идентификацию видов (Hugall *et al.*, 1999; Lunt 2008; Szitenberg *et al.*, 2017). Диагностика большинства видов *Meloidogyne* является трудной задачей и основана главным образом на генах мтДНК, а именно на *nad5* и межгенной области между COII и 16S генов, или на изозимах. Все виды этой клады являются полиплоидами и включают исключительно митотические партеногенетические виды, за исключением мейотического партеногенетического вида *M. floridensis*.

Клада II содержит шесть видов, которые паразитируют на однодольных и двудольных. Она включает в себя вид *M. microtyla* из Северной Америки и вид *M. hapla*, который является основным вредителем многих сельскохозяйственных культур во всем мире. Вид *M. hapla* способен размножаться двумя способами: мейотическим и митотическим партеногенезом, в зависимости от расы. *Meloidogyne partityla* из Африки и Северной Америки размножается митотическим партеногенезом. Способы размножения для *M. spartelensis*, *M. duytsi* и *M. dunensis* неизвестны; эти нематоды встречаются в Европе или Северной Африке.

Клада III содержит девять видов, паразитирующих на однодольных и двудольных растениях, которые распространены на нескольких континентах, за исключением *M. salasi*, найденного только в Южной Америке, и *M. kralli* – только в Европе. Виды этой клады являются исключительно мейотическими партеногенетическими организмами.

Клада IV содержит *M. spartinae*, *M. marylandi* и *M. graminis*, и спектр их хозяев, по-видимому, ограничен только семейством Poaceae. Эти виды, вероятно, имеют североамериканское происхождение. Вид *M. graminis* найден в Европе и Южной Америке, а *M. marylandi* также встречается в Азии. *Meloidogyne spartinae* является амфимиктическим видом, тогда как *M. graminis* является исключительно мейотическим партеногенетическим видом.

Клада V включает вид *M. christiei*, который, как было установлено, паразитирует только на корнях турецкого дуба, и вид *M. ardenensis*. *Meloidogyne christiei* образует небольшие галлы, вовлекающие ткани, непосредственно окружающие нематоду. Хотя способ размножения этого вида неизвестен, присутствие многих самцов в популяциях может указывать на возможное размножение амфимиксисом.

Клады VI и VII содержали только по одному виду. Клада VI включает вид *M. maritima*, который паразитирует на корнях *Ammophila arenaria*, произрастающих на дюнах в Перранпорте, Корнуолл, Великобритания. Клада VII содержит вид *M. silvestris*, который паразитирует на *Ilex aquifolium* в провинции Сория, Испания.

Клада VIII включала в себя только амфимиктический вид *M. mali*, который паразитирует на древесных растениях родов *Ulmus*, *Euonymus*, *Acer* и других родов в Японии. Этот вид, вероятно, был завезен в Северную Америку и Европу из Азии.

Клада IX включала в себя виды *M. artiellia*, *M. baetica* и *M. oleae*. Первый вид, паразитирующий на однодольных и двудольных, был найден в Европе, Азии и Северной Африке, в то время как два других вида зарегистрированы в Испании на оливковых деревьях и других растениях. Способ размножения и количество хромосом у этой группы до сих пор неизвестны.

Клада X содержала восемь видов: *M. aberrans*, *M. panyuensis*, *M. camelliae*, *M. ichinohei*, *M. daklakensis* из Восточной Азии, *M. megadora* и *M. africana* из Африки и *M. coffeicola* из Бразилии, которые паразитируют на кофейных деревьях. Способ размножения, митотический партеногенез, известен только для двух представителей этой клады: *M. megadora* и *M. africana*. *Meloidogyne africana* имеет наименьшее количество хромосом ($2n = 21$) из галловых нематод, которые, как известно, размножаются при митотическом партеногенезе (Janssen et al., 2017).

Наконец, клада XI представляла собой самую древнюю линию галловых нематод и включала два вида: *M. indica* и *M. nataliei* (Рисунок 10.4).

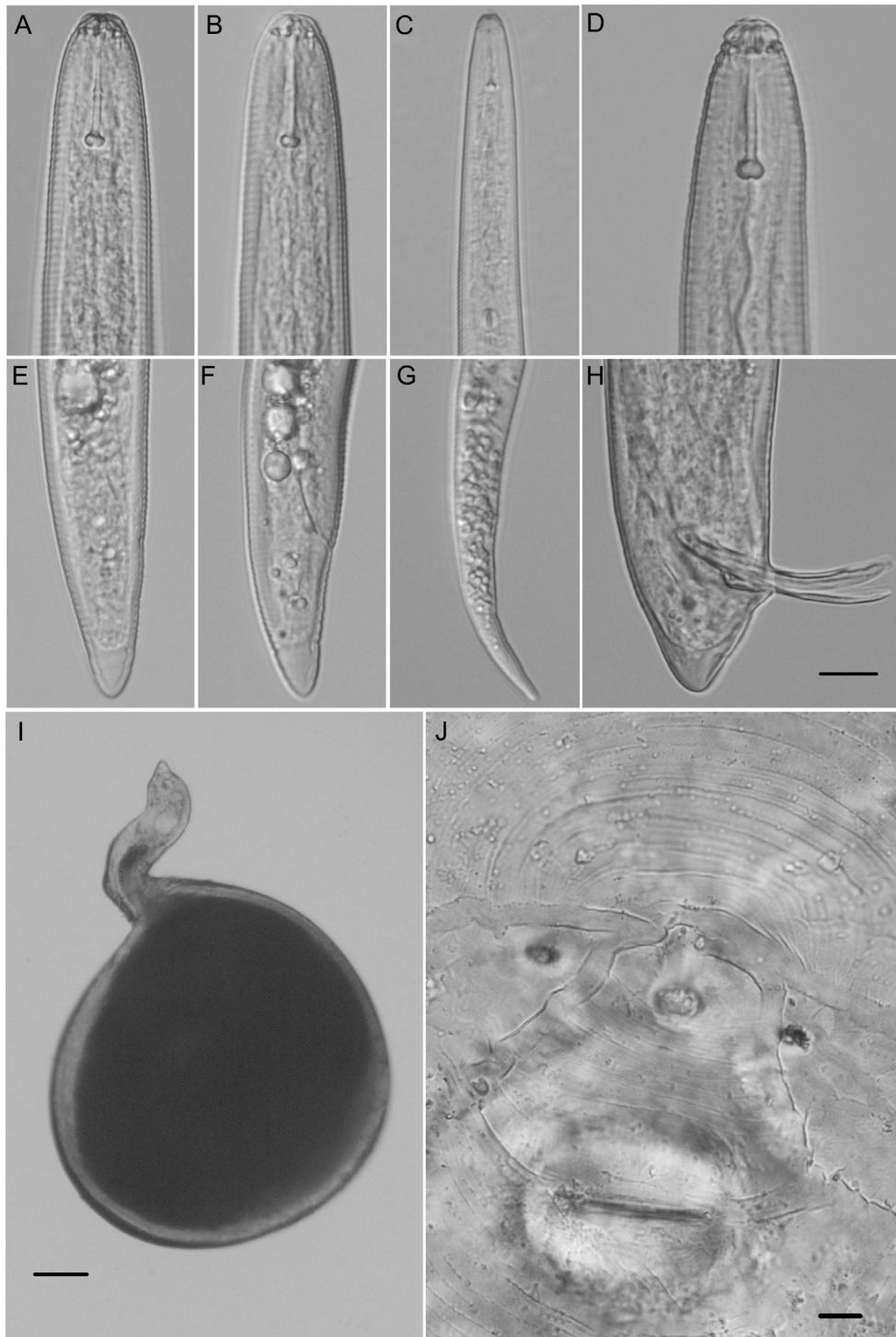


Рисунок 10.4. *Meloidogyne nataliei* (A, B, D-F, H-J) и *M. hapla* (C, G). A-C: Головные концы личинок второй стадии; T-G: Хвост; D: Самец, головной конец; H: Спикулы; I: Самка; J: Вульварная пластинка.

Основываясь на анализе многих морфологических признаков, Jepson (1987) предложила 12 морфологических групп для личинок второй стадии галловых нематод, шесть групп для вульварных областей самок и семь групп для самцов. Jepson (1987) поместила все изученные виды в несколько группировок *Meloidogyne*, названных в соответствии с именами

описанных в них видов, а именно: «graminis», «acroneae», «exigua», «nataliei» и другие. Хотя ни одна из этих группировок не вписывается точно в группы, предложенные в настоящем исследовании, мы заметили некоторые тенденции сходства между морфологическими и молекулярными группировками, которые требуют более тщательного анализа с включением большего количества видов.

10.3. Эволюционные отношения *Meloidogyne nataliei* с другими нематодами

Филогении, разработанные по четырем генам, проанализированным для *M. nataliei*, выявили достаточную дивергенцию этого вида нематод и продемонстрировали его уникальность среди других видов мелойдогин. Филогенетические деревья, полученные из D2-D3 28S и ВТС рНК генов и мультигенного дерева, показали, что мичиганская виноградная корневая нематода формирует группу с *M. indica*, в хорошо поддерживаемой кладе. Оба вида морфологически сходны. Jepson (1987) выделила 12 морфологических групп для личинок рода *Meloidogyne*, поместила *M. nataliei*, *M. indica*, *M. brevicauda* и *M. propora* в одну группу под номером 1. Эта группа характеризуется конусообразным хвостовым окончанием с очень широким и округлым кончиком у личинок второй стадии. Jepson (1987) отметила небольшие различия между видами внутри группы, но их нелегко выявить при определении. *Meloidogyne indica* и *M. brevicauda* были зарегистрированы на Индийском субконтиненте, а *M. propora* была обнаружена на Сейшельских островах. В то время как эти три вышеупомянутых вида распространены в тропиках, *M. nataliei* найдена в Мичигане – штате, который имеет влажный континентальный климат и является одним из самых холодных регионов в Соединенных Штатах. Мы предполагаем, что *M. nataliei* является инвазивным видом для Мичигана, который, вероятно, был интродуцирован вместе с растением-хозяином, *Vitis labrusca*, одним из 17 видов, обитающих в более теплом климате юго-востока США (Wan *et al.*, 2013).

Наши результаты показывают, что *M. nataliei* вместе с *M. indica* представляют собой раннее обособившуюся ветвь галловых нематод, где эти два вида сохранили анцестральные признаки. Наши молекулярные результаты отвергают гипотезу Goldstein и Triantaphyllou (1986), которые предположили, что мичиганская виноградная галловая нематода, возможно, не относится к роду *Meloidogyne*. Phani *et al.* (2018) провели молекулярную характеризацию вида *M. indica* и на основании молекулярных данных отметили, что этот вид нематод следует считать наиболее древним таксоном рода. *Meloidogyne nataliei* – это диплоидный амфимиктический вид, который имеет гаплоидный набор, включающий только четыре хромосомы (Triantaphyllou 1985a). Эти четыре хромосомы *M. nataliei* относительно

велики по размерам по сравнению с хромосомами других видов. Таким образом, наши результаты подтверждают гипотезу Triantaphyllou (1985b, 1987) о том, что амфимиктические виды *Meloidogyne* с небольшим количеством хромосом являются анцестральными, из которых развились митотические партеногенетические виды галловых нематод.

Ryss (1988) рассматривал пратиленхид как наиболее близких к *Meloidogyne* нематод. Общие морфологические характеристики области губ и стилета могут указывать на общее происхождение Meloidogynidae и Pratylenchidae. Тесная родственная связь *Meloidogyne* с Pratylenchidae дополнительно подтверждается нашим филогенетическим анализом D2-D3 фрагмента 28S рРНК гена (Subbotin *et al.*, 2006). Используя ген 18S рРНК для оценки филогенеза тиленхид, Holterman *et al.* (2009) также предположили, что галловые нематоды произошли от *Pratylenchus*-подобного предка. Морфология области губ у личинок и самцов *M. nataliei* сильно склеротизирована и напоминает область губ нематод из рода *Pratylenchus*. Личинки *M. nataliei* имеют также хорошо выраженный стилет и хвост с широко закругленным концом, которые напоминают таковые у некоторых представителей рода *Pratylenchus*. Эти особенности строения вполне могут представлять плезиоморфное состояние признаков рода *Meloidogyne*.

10.4. Эволюционные тенденции внутри галловых нематод

Triantaphyllou (1985b), обобщая результаты цитогенетики галловых нематод, предположил, что облигатные амфимиктические виды с хромосомным набором $n = 18$ или 19 следует рассматривать как анцестральные для *Meloidogyne* spp. Он также полагал, что небольшое число хромосом у большинства видов подтверждает их полиплоидное происхождение. Janssen *et al.* (2017) пришли к выводу, что число гаплоидного набора хромосом для рода *Meloidogyne* может быть равным 7. Филогенетическое положение амфимиктического вида *M. nataliei* с $n = 4$ в базальном положении по отношению ко всем другим видам *Meloidogyne* подтверждает гипотезу о низком количестве хромосом у предков галловых нематод.

Castagnone-Sereno *et al.* (2013) пришли к заключению, что разнообразие в количестве хромосом у галловых нематод отражает их сложную эволюцию, которая включает дупликацию генома, полиплоидизацию, интрогрессию и гибридизацию. Смена размножения от амфимиксиса к партеногенезу совпадает с развитием их широкой полифагии, что привело к быстрой диверсификации суперклады *Meloidogyne*. Возникновение партеногенеза у этой группы было скоррелировано у нематод с их возрастающим значением как паразитов сельскохозяйственных культур.

Несколькими исследователями было высказано предположение, что современные апомиктические виды произошли из диплоидных амфимиктических предков, в то время как облигатные партеногенетические митотические виды произошли от факультативных партеногенетических мейотических видов после подавления мейоза во время созревания ооцитов (Castagnone-Sereno, 2006). Однако наше картирование способов размножения на мультигенное филогенетическое дерево не подтверждает эту гипотезу, и скорее показывает, что переход к митотическому партеногенезу мог произойти раньше, чем появление мейотического партеногенеза в эволюции галловых нематод.

ГЛАВА 11. БЫСТРАЯ ДИАГНОСТИКА ГАЛЛОВЫХ КОРНЕВЫХ НЕМАТОД РОДА *MELOIDOGYNE* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

Относительно недавно было разработано и предложено несколько методов амплификации ДНК, которые не требуют использования специального оборудования и могут происходить при постоянной температуре (Craw & Balachandran, 2012). Один из таких методов – это метод рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА) (Piepenburg *et al.*, 2006; James & Macdonald, 2015; Daher *et al.*, 2016). РПА представляет собой альтернативу полимеразной цепной реакции (ПЦР). РПА использует высокоэффективную вытесняющую полимеразу, которая в состоянии амплифицировать ДНК во множество копий за 20 минут при постоянной температуре (37-42°C). Преимущества РПА заключаются в высокоэффективной и быстрой амплификации и постоянной рабочей температуре. Продукты РПА могут быть выявлены с использованием флуоресцентных проб в режиме реального времени, обнаружены с помощью электрофореза в агарозном геле или с помощью иммунных методов. Несколько диагностических тестов с использованием РПА продемонстрировали высокую чувствительность и специфичность для обнаружения небольших количеств ДНК различных вирусных, бактериальных и грибных возбудителей болезней растений (Miles *et al.*, 2015; Lau *et al.*, 2016; Londoño *et al.*, 2016; Babu *et al.*, 2018). До проведения наших исследований не было публикаций, описывающих какие-либо тесты РПА для обнаружения фитопаразитических нематод.

11.1. Диагностика *Meloidogyne enterolobii*

Нематода *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback, 1983 является сельскохозяйственным вредителем с ограниченным географическим распространением в странах с тропическим и субтропическим климатом. Эта нематода имеет широкий спектр хозяев, включающий культурные растения и сорняки. В настоящее время эта нематода считается одним из наиболее значимых вредителей для сельского хозяйства, поскольку она обладает широкой вирулентностью и может развиваться на генотипах сельскохозяйственных культур, включая томаты, сою, вигну и перец, несущих несколько генов устойчивости к другим галловым нематодам. Этот вид также обладает более высокой патогенностью и бóльшим репродуктивным потенциалом, чем *M. incognita* или *M. arenaria* (Anonymous, 2014, 2016). Вид *M. enterolobii* был добавлен в список А2 карантинных вредителей Европейской и Средиземноморской организации по защите растений, рекомендованных для контроля.

Meloidogyne enterolobii обнаружена в нескольких странах Африки, Азии, Центральной Америки и Карибского бассейна, Северной и Южной Америки. В Европе её находили в нескольких тепличных хозяйствах во Франции и Швейцарии (Yang & Eisenback, 1983; Kiewnick *et al.*, 2009; Anonymous, 2016). В Северной Америке *M. enterolobii* была обнаружена в США во Флориде (Brito *et al.*, 2004), Северной Каролине (Ye *et al.*, 2013) и в Мексике (Ramírez-Suárez *et al.*, 2014).

В настоящее время *M. enterolobii* имеет самый высокий рейтинг «А» в Калифорнии как вредитель, который еще не обнаружен в штате. Эту нематоду никогда не идентифицировали в образцах, собранных в рамках программ контроля и фитосанитарной сертификации нематод Калифорнийского департамента продовольствия и сельского хозяйства и в рамках общегосударственных исследований нематод, выращиваемых на участках сельскохозяйственного производства и питомниках в Калифорнии. Калифорния обладает подходящим климатом и хозяевами для *M. enterolobii*, и если этот вид будет интродуцирован, то, вероятно, станет широко распространенным (Chitambar, 2016).

Использование методов анализа ДНК в настоящее время имеет большое значение для точной идентификации галловых нематод на уровне видов. Для идентификации *M. enterolobii* было разработано несколько молекулярных методов, включая секвенирование МС рНК гена (Blok *et al.*, 1997), митохондриальной области между генами COI и 12S rRNA (Blok *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2004), ВТС рНК гена (Brito *et al.*, 2004), COI, COII, 28S рНК и 18S рНК генов (Kiewnick *et al.*, 2014), а также ПЦР с видоспецифическими праймерами (Long *et al.*, 2006; Tigano *et al.*, 2010), изотермическую амплификацию методом LAMP (Niu *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013) и ПЦР в реальном времени с видоспецифическими праймерами (Kiewnick *et al.*, 2015; Braun-Kiewnick *et al.*, 2016).

В этой главе описаны разработка и тестирование метода РПА для быстрого и специфического выявления *M. enterolobii* (Рисунок 11.1). Исследование включало три этапа: 1) тестирование и отбор комбинаций праймеров, специфичных для РПА; 2) проверка чувствительности и специфичности РПА анализа в реальном времени; 3) практическая оценка РПА тестирования в реальном времени с полевыми образцами.

11.1.1. Образцы нематод

Два изолята *M. enterolobii* были получены от доктора Дж. Брито (Отдел растениеводства, Флорида, Департамент сельского хозяйства и бытового обслуживания (FDACS, Гейнсвилл, Флорида, США) и П. Робертса (Университет Калифорнии в Риверсайде (UCR, Риверсайд, Калифорния, США) для разработки анализа РПА. Личинок второй стадии и

самцов извлекали из образцов корней и почвы методом центрифужной флотации (Coolen, 1979). Гены ВТС и МС рРНК были секвенированы из каждого изолята для подтверждения их видовой идентичности. ДНК нескольких галловых нематод: *M. arabicida* (Коста-Рика), *M. ethiopica* (Бразилия), *M. hispanica* (Бразилия), *M. izalcoensis* (Сальвадор), *M. morocciensis* (Бразилия) и *M. paranaensis* (Brazil), предоставленные доктором Валери Уильямсон (Университет Калифорнии, Дэвис, США); *M. arenaria*, *M. floridensis* и *M. javanica* (все из Флориды, США), предоставленные доктором Дж. Брито (FDACS); и *M. incognita* и *M. hapla* (все из Калифорнии, США) из коллекции КДФА, также использовались в этом эксперименте для исследования специфичности. Эти образцы нематод были ранее идентифицированы морфологическими и молекулярными методами (Pagan *et al.*, 2015).

Восемь образцов ДНК, («полевые образцы»), идентифицированные как положительные по наличию в них *M. enterolobii*, были предоставлены доктором Ве (Агрономический отдел Департамента сельского хозяйства и бытового обслуживания Северной Каролины (NCDA), Северная Каролина, США) и доктором Дж. Брито (FDACS) из Флориды, США. Виды нематод из полевых образцов были идентифицированы путем секвенирования гена *nad5* (Janssen *et al.*, 2016), частичного гена 28S рРНК (Tenente *et al.*, 2004) или анализом изозимов (Brito *et al.*, 2008). Эти образцы были использованы для оценки метода РПА с полевыми пробами.

Свободноживущие и паразитирующие на растениях нематоды были выделены с использованием метода центрифужной флотации из нескольких полевых образцов, собранных в Калифорнии, и их экстракты были использованы в качестве фоновой, нецелевой ДНК в эксперименте с РПА в реальном времени.

11.1.2. Нематодные экстракты

Два метода были использованы для умерщвления и гомогенизации нематод. Первый метод включал разрушение личинок или самцов с использованием зубной иглы из нержавеющей стали в капле дистиллированной воды на предметном стекле под стереомикроскопом. Измельченных нематод в капле воды переносили в пробирку Эппендорфа объемом 0,2 мл. В эксперименте с экстракцией с использованием протеиназы К в каждую пробирку добавляли 3 мкл этого фермента (600 мкг/мл) (Promega) и 2 мкл 10 × ПЦР буфера (Taq PCR Core Kit, Qiagen). Пробирки последовательно инкубировали сначала при 55°C (30 мин) и затем при 95°C (10 мин). Второй метод включал гомогенизацию различных стадий нематод в микропробирке (Sarstedt) с 250 мкл дистиллированной воды и стеклянной бусиной с использованием Mini BeadBeater (Biospec Product) (скорость: 42; время: 1 мин)

(Рисунок 1). Нами было приготовлено несколько различных экстрактов в общем объеме 250 мкл воды: i) пять личинок; ii) 50 личинок; iii) одиночные самки; iv) растительные галлы с одной или несколькими самками и яйцевыми мешками. Различные разведения готовили из экстрактов нематод для изучения чувствительности метода. Экстракт свободноживущих и некоторых корневых нематод был также получен путем гомогенизации нескольких сотен почвенных нематод в 250 мкл воды.

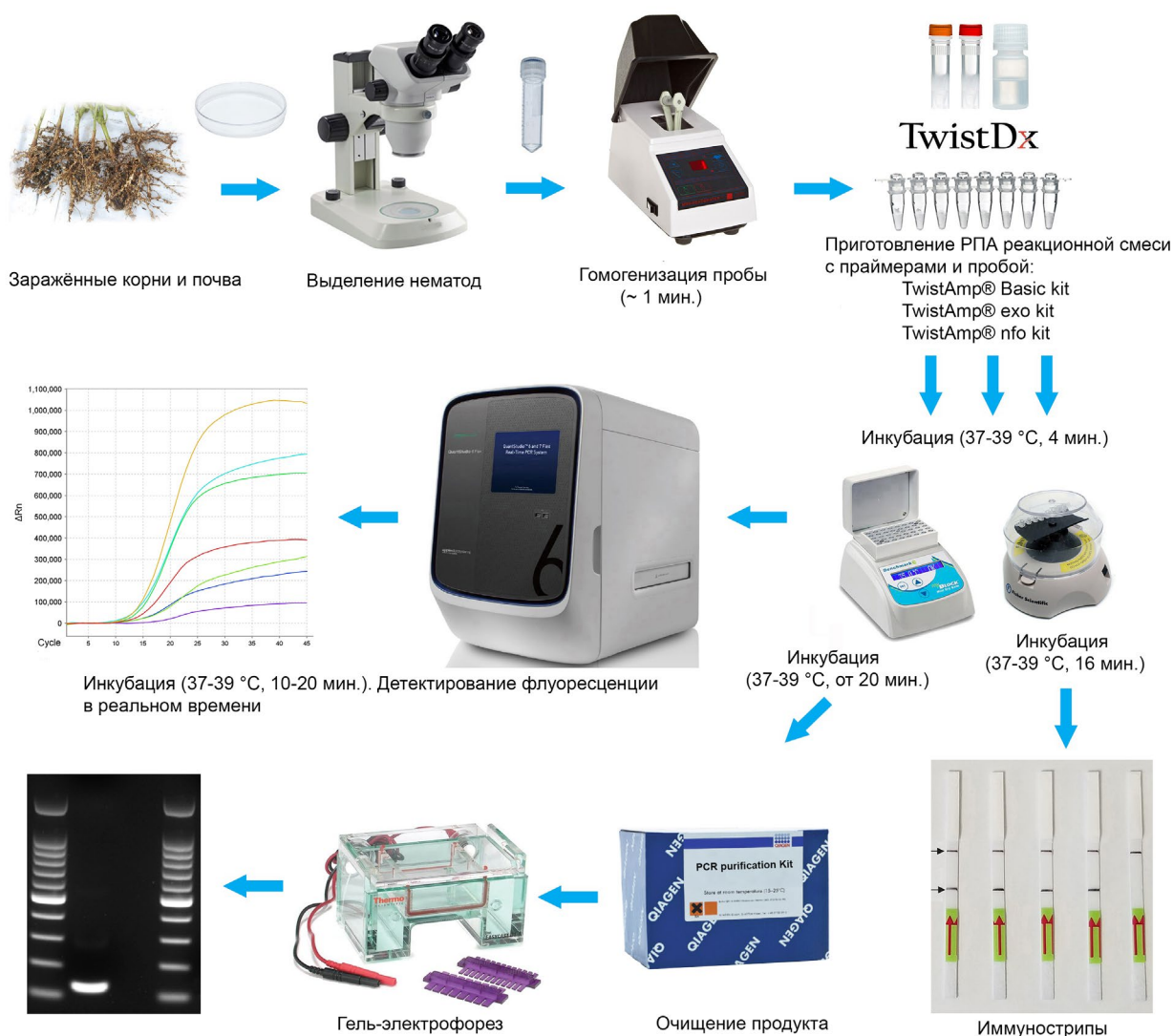


Рисунок 11.1. Процесс диагностики галловых нематод с использованием наборов китов TwistAmp® (TwistDx, Кембридж, Великобритания) в наших исследованиях.

11.1.3. РПА праймеры и тестирование

Всего 15 РПА праймеров, видоспецифичных для *M. enterolobii* и универсальных для галловых нематод, были сконструированы вручную на основе полиморфизмов видовой последовательности МС рРНК гена. Праймеры сначала подвергали тестированию в различных комбинациях с использованием базового набора TwistAmp® (TwistDx). Реакции

были подготовлены в соответствии с инструкциями производителя. Лиофилизированные реакционные осадки разводили в 29,5 мкл буфера, затем было добавлено по 2,4 мкл растворов прямого и обратного праймеров (10 мкМ), 1 мкл ДНК, полученной с использованием первого метода экстракции нематод, и 12,2 мкл дистиллированной воды. В каждый образец добавляли 2,5 мкл 280 мМ ацетата магния, затем содержимое перемешивали. Пробирки инкубировали при 37°C (4 мин) в мини-бане MyBlock (Benchmark Scientific), затем переворачивали 8-10 раз, быстро центрифугировали и возвращали в блок инкубатора (37°C, 56 мин). Продукты амплификации очищали с помощью QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Шесть мкл продукта помещали в 1% TAE забуференный агарозный гель (100 вольт, 40 мин) и затем визуализировали с помощью этидия бромид. Продукты амплификации были отданы на секвенирование в Quintara Biosciences с использованием праймеров для амплификации.

11.1.4. РПА анализ в реальном времени

Три экзопробы TwistAmp® изначально были сконструированы в соответствии с инструкциями производителя. Пробы были синтезированы Biosearch Technologies. Пробы были протестированы в тех же условиях, как описано ниже, и только одна проба была выбрана для анализа (Рисунок 11.2) исходя из лучших результатов амплификации. Для диагностирования РПА в реальном времени использовали TwistAmp® exo kit (TwistDx). Реакционная смесь для анализа РПА содержала 2,1 мкл каждого прямого и обратного праймеров (10 мкМ), 0,6 мкл (10 мкМ) экзопробы, 1 или 5 мкл образца и воду до объема 47,5 мкл. ДНК нематод для этих экспериментов получали с использованием первого и второго метода экстракции нематод. Раствор ацетата магния, поставляемый с набором в объеме 2,5 мкл, добавляли на крышку пробирки, затем крышку осторожно закрывали. Все пробирки быстро центрифугировали для попадания ацетата магния в реакционную смесь и одновременного инициирования реакций. Пробирки инкубировали при 37°C в течение 4 мин в сухой мини-бане MyBlock, затем интенсивно переворачивали 8-10 раз и центрифугировали. После этого пробирки немедленно помещали в систему Applied Biosystems™ QuantStudio™ 6 Flex в режиме реального времени и инкубировали при 39°C в течение 25-30 мин (Рисунок 11.1). Сигнал флуоресценции регистрировали в режиме реального времени, измеряя каждые 20 секунд (цикл) с использованием канала FAM. Положительный контроль с *M. enterolobii* и отрицательный контроль без какой-либо нематодной ДНК были также включены во все эксперименты. Три повторности для каждого варианта были выполнены для экспериментов по чувствительности и специфичности.

11.1.5. РПА анализ полевых образцов в реальном времени

Для оценки и подтверждения возможного полевого применения метода РПА образцы, содержащие ДНК различных видов галловых нематод, полученные из Калифорнии, Флориды и Северной Каролины, коммерческие образцы, отправленные в лабораторию из Флориды и других штатов, и контрольные образцы, содержащие ДНК *M. enterolobii*, были также протестированы. Для этого эксперимента все варианты включали две повторности.

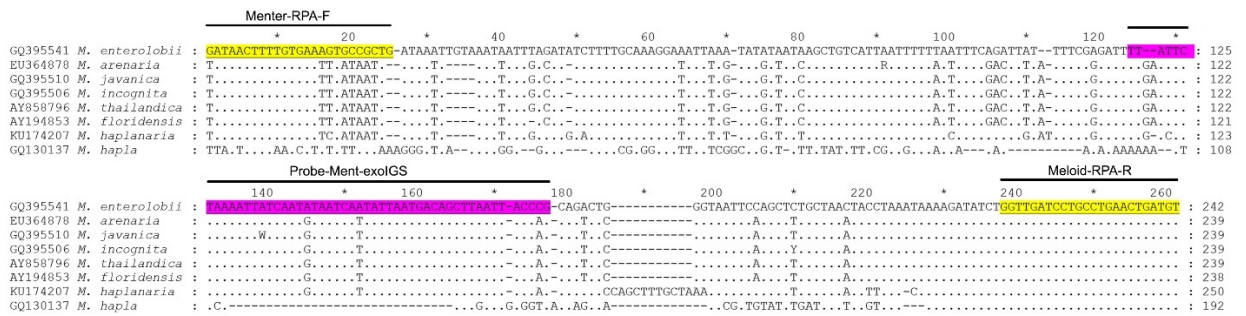


Рисунок 11.2. Фрагмент выравнивания последовательностей гена МС рРНК для нескольких нематод с положениями праймеров и пробы, использованных в настоящем исследовании.

11.1.6. Обнаружение продуктов РПА

Только одна из нескольких тестируемых комбинаций с 15 праймерами, которая включала прямой видоспецифический праймер для *M. enterolobii* в сочетании с обратным универсальным праймером для группы галловых нематод, была выбрана как оптимальная (Рисунок 11.2) и использовалась для последующего анализа. Этот видоспецифический праймер является модифицированной версией праймера, ранее предложенного Long *et al.* (2006) для обычной ПЦР. Набор праймеров надежно и специфически амплифицировал фрагмент МС рРНК гена для *M. enterolobii*. С использованием набора TwistAmp® Basic были получены два продукта на геле: один показал яркую полосу длиной около 240 п.н., а второй – слабую полосу длиной около 500 п.н. (Рисунок 11.3). Ампликон размером приблизительно 240 п.н. имел уникальную последовательность для *M. enterolobii*, что было подтверждено прямым секвенированием этого продукта. Идентичность ДНК-последовательности слабой полосы не выявлена. Неспецифические и слабые полосы также наблюдались для некоторых образцов с другими видами галловых нематод (данные не показаны). Метод РПА позволил обнаружить все стадии развития *M. enterolobii*, что было подтверждено в эксперименте с несколькими образцами из Флориды и образцом неизвестного происхождения, полученным из Калифорнии, с использованием базового набора TwistAmp® (данные не показаны).

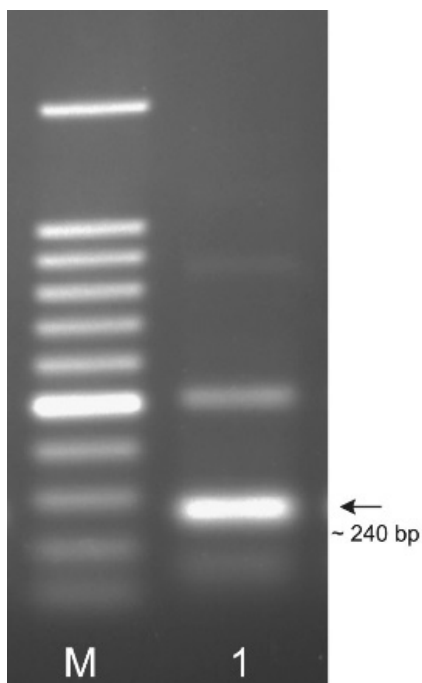


Рисунок 11.3. РПА-ампликон МС рРНК гена на агарозном геле. Дорожки: ДНК-маркер – М – 100 п.н. (Промега); 1 – ампликон РПА, полученный через 1 час при 37°C с использованием праймеров Menter-RPA-F и Menter-RPA-R и набора TwistAmp® Basic.

11.1.7. Обнаружение и чувствительность метода РПА в реальном времени

В результате анализа серии экспериментов, в которую вошли 25 тестов, содержащих положительные контроли с нематодой и отрицательные контроли с водой или нецелевой ДНК, пороговый уровень для надежного обнаружения *M. enterolobii* был установлен равным 30 циклам (или 10 минутам) при базовом уровне флуоресценции до 500 000 (ΔRn) с помощью набора TwistAmp® ехо при использовании инструмента Applied Biosystems™ QuantStudio™ 6 Flex. Образцы, которые показали экспоненциальную кривую выше этих порогов, считались положительными или содержащими *M. enterolobii*, тогда как образцы с низкими значениями считались отрицательными или не содержащими *M. enterolobii*. Обнаружение взрослых и личиночных стадий *M. enterolobii* было также подтверждено с использованием набора TwistAmp® ехо (Рисунок 11.4А).

Чувствительность метода тестировали в вариантах с серийными разведениями (1, 1: 2, 1:10 и 1: 100) экстрактов, полученных из образцов с пятью и 50 личинками на 250 мкл воды. По крайней мере три повторности каждого варианта были включены в эксперимент. Уровень достоверного обнаружения *M. enterolobii* для образцов был оценен как 1/10 личинки в реакционной пробирке РПА (Рисунок 11.4В). Обнаружение было также подтверждено в присутствии неочищенного экстракта других видов нематод (Рисунок 11.4С).

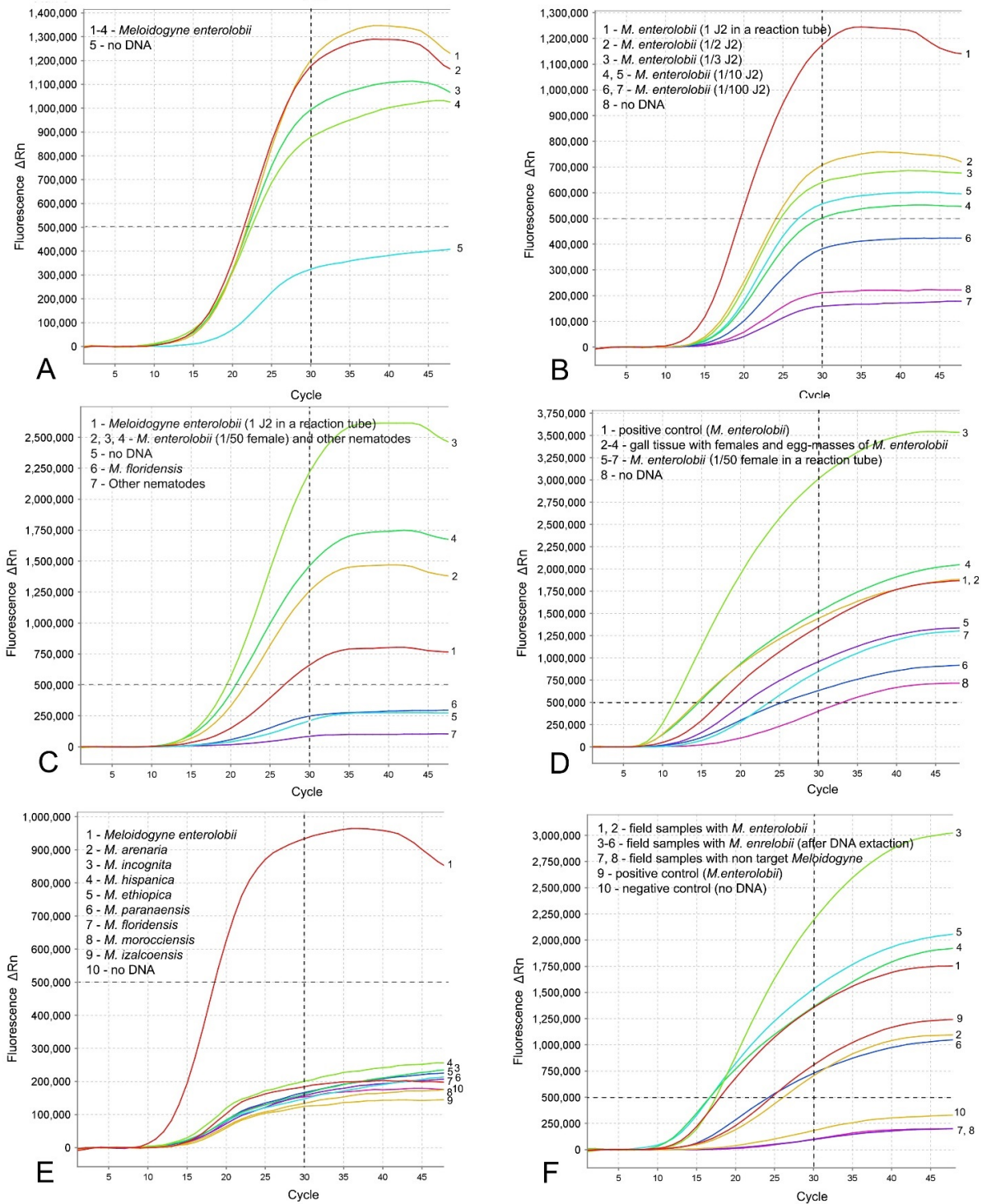


Рисунок 11.4. Анализ РПА с использованием флуоресцентного детектирования в реальном времени. А: График амплификации в реальном времени одного из анализов. Экстракты нематод были получены двумя различными методами из четырех образцов *Meloidogyne enterolobii*; В: график амплификации в реальном времени из анализа чувствительности, проведенного с различными разбавленными и неочищенными экстрактами J2 *M. enterolobii*; С: График амплификации в реальном времени одного из тестов РПА с неочищенным экстрактом *M. enterolobii* и таким же количеством этого экстракта с другими нематодными экстрактами; D: График амплификации в реальном времени из анализа РПА с неочищенными экстрактами самок и галловых тканей; E: График амплификации в реальном времени одного из тестов на специфичность. В этом исследовании были использованы ДНК из нескольких видов *Meloidogyne*; F: График амплификации в реальном времени одного из анализов РПА полевых образцов из Флориды и Северной Каролины. Вертикальная линия на графике – флуоресценция ΔRn . ΔRn рассчитывается для каждого цикла как ΔRn (цикл) = Rn (цикл) – Rn (базовый уровень), где Rn = нормализованный репортер. Горизонтальная линия на графике – циклы, каждый цикл = 20 сек.

Анализ позволил обнаружить неочищенный экстракт одной самки *M. enterolobii* на 250 мкл воды в образце или 1/50 самки в реакционной пробирке РПА (Рисунок 11.4D). Этот метод позволил также обнаружить *M. enterolobii* в экстрактах из растительных галлов, содержащих одну самку с яйцевым мешком на 250 мкл воды (Рисунок 11.4D).

11.1.8. Специфичность РПА

Разработанный метод РПА был проверен на специфичность к ДНК, выделенной из других галловых нематод: *M. arabicida*, *M. arenaria*, *M. ethiopica*, *M. floridensis*, *M. hapla*, *M. hispanica*, *M. incognita*, *M. izalcoensis*, *M. javanica*, *M. morocciensis* и *M. paranaensis*. РПА показал высокую специфичность только к *M. enterolobii*, и мы не наблюдали положительных реакций с другими видами галловых нематод (Рисунок 11.4E).

11.1.9. РПА анализ полевых образцов

Анализ был подтвержден с использованием восьми экстрактов ДНК из полевых образцов из Флориды и Северной Каролины, содержащих только вид *M. enterolobii* или его смеси с другими видами нематод, и 10 экстрактов ДНК из полевых образцов, содержащих личинок других видов галловых нематод. Анализ РПА в нескольких повторностях выявил сильные сигналы, указывающие на присутствие *M. enterolobii* в восьми полевых образцах, действительно содержащих эту нематоду, и сигналы ниже порогового уровня во всех образцах, в которых ДНК этой нематоды отсутствовала (Рисунок 11.4F).

11.1.10. Обсуждение

В нашем исследовании мы разработали и описали доступный, простой, быстрый и чувствительный метод обнаружения *M. enterolobii*. Анализ РПА был разработан с использованием Applied Biosystems QuantStudio™ 6 Flex в реальном времени. Этот метод позволяет также одновременно анализировать образцы, используя 96-луночный планшет. В настоящее время стоимость реакции РПА оценивается в пределах 4,3-5,5 долл. США (Daher *et al.*, 2016; Londoño *et al.*, 2016), и эта стоимость выше, чем для ПЦР. Тем не менее общая стоимость обнаружения галловых нематод в образцах с помощью РПА может быть сопоставима со стоимостью ПЦР, если рассматривать низкие затраты на рабочую силу и короткое время анализа, исключаящую трудоемкую процедуру экстракции ДНК.

Метод РПА в реальном времени требует установления базового и порогового уровней флуоресценции для обнаружения *M. enterolobii*. Из-за наличия флуоресцентного фона было

необходимо установить эти значения экспериментально. Пороговый уровень в нашем исследовании был оценен в 25 независимых экспериментах на основе анализа флуоресцентного фона образцов без нематоды и анализа флуоресцентных сигналов в образцах с нематодой. Были рассмотрены два параметра, коррелирующие с количеством ДНК: время обнаружения и интенсивность флуоресценции. В реальном времени пороговый уровень был оценен в 30 циклов (= 10 минут), а базовое значение уровня флуоресценции было установлено в 500000 (ΔR_n). Эти значения были предложены для нашего прибора и могут различаться у других инструментов.

Метод РПА может быть легко адаптирован к различным системам обнаружения флуоресцентных сигналов. Например, можно использовать портативные флуоресцентные считыватели (ESE-Quant, Qiagen; Genie, OptiGene; T8-ISO, TwistDX и др.), которые проще и дешевле, чем Applied Biosystems QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System, и могут работать от батареи в полевых условиях (James & Macdonald, 2015; Daer *et al.*, 2016).

Метод РПА имеет некоторые важные преимущества по сравнению с методами ПЦР. Во-первых, он использует непосредственно нематодный экстракт без специального выделения ДНК с помощью протеиназы К, которое необходимо для анализов при использовании ПЦР. Второе преимущество состоит в том, что результаты анализа доступны уже через 15-20 минут для РПА по сравнению с 1,5-3,0 часами для ПЦР. Метод РПА также имеет некоторые важные преимущества по сравнению с другими изотермическими методами диагностики, такими как LAMP, поскольку он использует более короткие праймеры и позволяет проводить диагностику за более короткое время, чем метод LAMP. Метод диагностики с РПА в режиме реального времени осуществляется с помощью флуоресцентных проб, происходит в закрытых пробирках и позволяет избежать загрязнения ДНК, что часто является проблематичным для метода LAMP (Daher *et al.*, 2016). При сравнении методов РПА, ПЦР и LAMP, РПА все же является наиболее простым методом в применении.

11.2. Диагностика *Meloidogyne hapla*

Северная галловая нематода *Meloidogyne hapla* – один из четырех наиболее распространенных видов галловых нематод. Эта нематода поражает многочисленные сельскохозяйственные культуры и сорняки. *Meloidogyne hapla* вызывает значительные экономические потери овощных культур, включая морковь и сахарную свеклу. В этой главе описаны разработка и тестирование метода РПА для быстрого и специфического выявления *Meloidogyne hapla*. Подробная методика и результаты по этой теме опубликованы в нашей статье Subbotin, Burbridge (2021).

11.2.1. Праймеры и пробы для РПА

Все доступные последовательности МС рРНК для *M. hapla* и других видов *Meloidogyne* были загружены из Генного банка и выровнены с помощью ClustalX. Было выявлено несколько областей с высокой степенью различий в последовательностях между *M. hapla* и другими *Meloidogyne*, несколько видоспецифичных наборов праймеров и проб для *M. hapla* были вручную сконструированы. Поиск с помощью Blastn этих видоспецифичных последовательностей праймеров-кандидатов и последовательностей проб показал высокое сходство (100%) только с фрагментами МС рРНК *M. hapla*, депонированными в Генном банке.

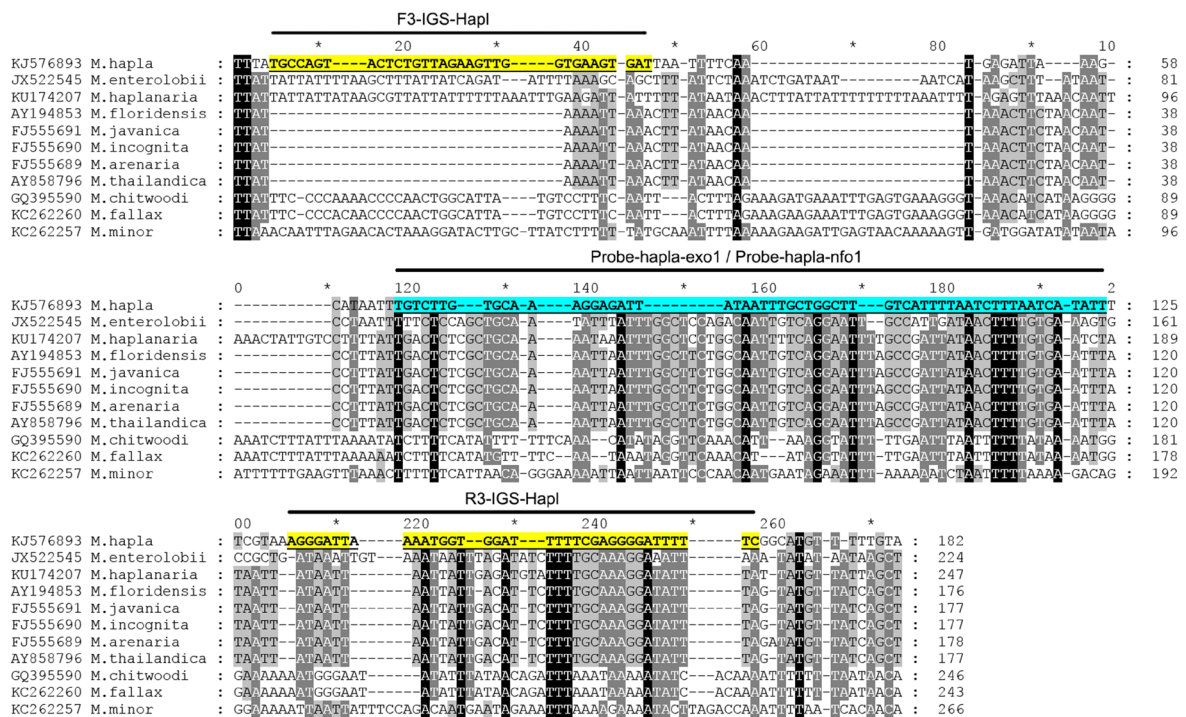


Рисунок 11.5. Фрагмент выравнивания последовательностей гена МС рРНК для нескольких нематод с положениями праймеров и пробы, использованных в настоящем исследовании.

11.2.2. Тестирование праймеров для РПА

Девять наборов праймеров были проверены на эффективность амплификации при одинаковых условиях РПА. Видоспецифичные праймеры F3-IGS-Hapl и R3-IGS-Hapl оказались оптимальными, амплифицировали один ампликон и не показали перекрестных реакций с другими галловыми нематодами. Последовательности праймеров и проб, используемых для анализа, указаны на выравнивании гена МС рРНК на Рисунке 11.5. Этот набор праймеров надежно и специфически амплифицировал фрагмент гена длиной примерно

164 п.н., что также было подтверждено прямым секвенированием продукта. Дополнительные неспецифические слабые дополнительные полосы, имеющие другие размеры, иногда наблюдались в экспериментах с *M. hapla*, а также в образцах с другими (данные не показаны).

11.2.3. РПА в реальном времени

Используя результаты девяти экспериментов, которые включали положительный и отрицательный контроли с водой и нецелевой ДНК, пороговый уровень для надежного обнаружения *M. hapla* был установлен равным 8 циклам (~ 3 мин) с базовым уровнем 250000 (ΔR_n) флуоресценции с использованием набора TwistAmp® ехo для Applied Biosystems QuantStudio7 Flex Real-Time PCR System (Рисунок 11.6). Образцы, показавшие кривую экспоненциальной амплификации выше порогового значения, считались положительными для *M. hapla*, а образцы ниже порогового значения считались отрицательными. Обнаружение *M. hapla* было подтверждено во всех образцах, содержащих ДНК этой нематоды.

РПА реакции были проведены на специфичность с использованием ДНК, выделенной из нескольких зараженных корней и с 10 и 20 нематодами, не относящимися к галловым нематодам (Рисунок 11.6С) и уменьшением вдвое объема реакционной смеси. Метод РПА тестировали с другими галловыми нематодами: *Meloidogyne arenaria*, *M. baetica*, *M. christiei*, *M. enterelobii*, *M. floridensis*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. naasi* и *M. nataliei*. Результаты РПА с использованием флуоресцентного обнаружения в реальном времени показали высокую специфичность только к *M. hapla* и не выявили никаких положительных реакций с другими видами галловых нематод (Рисунок 11.6А).

Анализ чувствительности метода РПА был проведен для оценки уровня нижнего порога обнаружения *M. hapla*. Варианты с серийными разведениями (1, 1/10, 1/100, 1/1000 и 1/10000 на реакционную пробирку) неочищенных экстрактов нематод были получены для личинок или самок без яйцевых мешков. Надежный уровень обнаружения *M. hapla* был оценен как 1/100 личинки на реакционную пробирку (Рисунок 11.6В). Уровень обнаружения самок *M. hapla* варьировал в разных повторах и достигал 1/100, 1/1000 и 1/10000 самок в трех, двух и одной повторностях соответственно (Рисунок 11.7А).

Обнаружение личинок *M. hapla* было подтверждено в условиях добавления других экстрактов, полученных по меньшей мере от 20 экземпляров других нематод. Не наблюдалось снижения флуоресцентных сигналов между вариантом с одной личинкой без других нематод и вариантами с одной личинкой *M. hapla* с 10 и 20 другими нематодами (Рисунок 11.6С). Снижение вдвое объема реакционной смеси показал снижение сигнала флуоресценции и скорости реакции (Рисунок 11.6С). Эти образцы можно считать положительными с

пороговым уровнем 12 циклов (~ 6 мин). Обнаружение *M. hapla* было также подтверждено с использованием экстрактов, полученных из зараженных корней растений томата и перца, содержащих самок с яйцевыми мешками.

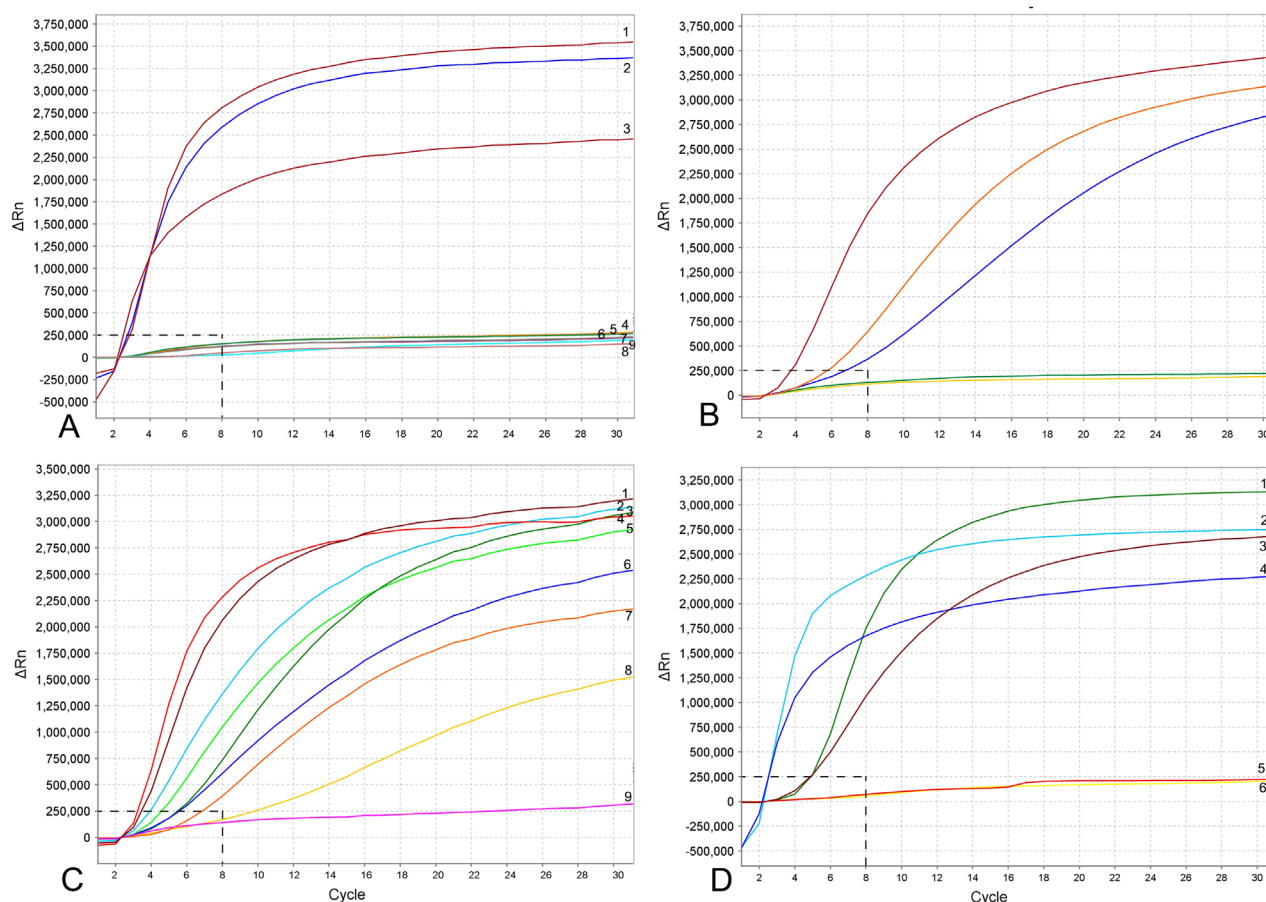
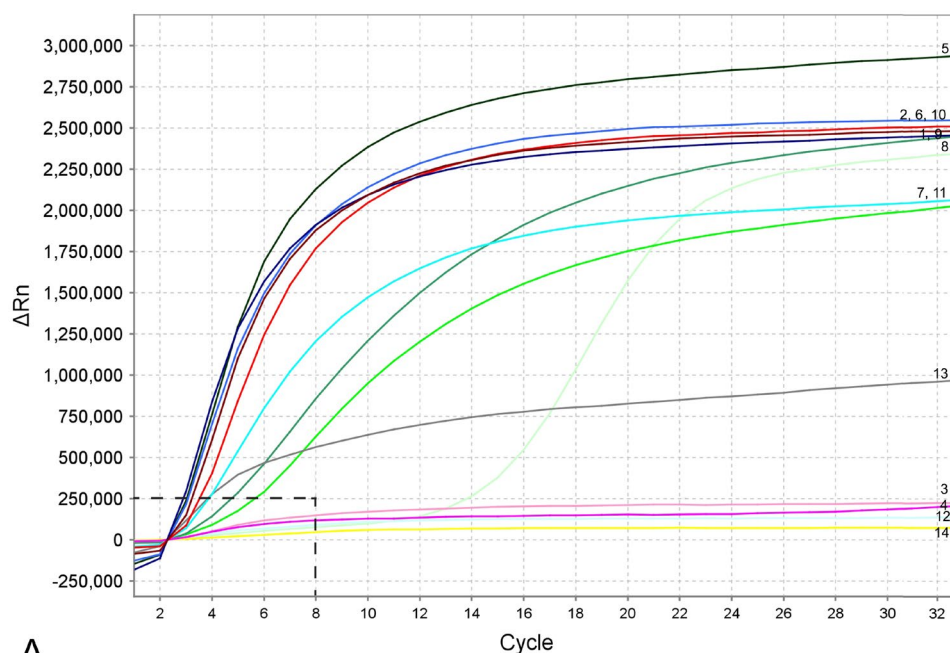


Рисунок 11.6. Анализ РПА с использованием флуоресцентного детектирования в реальном времени. А. Анализ специфичности с ДНК пробами галловых нематод и экстрактом из личинок второго возраста *M. hapla*. 1-3 – *M. hapla*; 4 – *M. incognita*; 5 – *M. arenaria*; 6 – *M. naasi*; 7 – *M. javanica*; 8, 9 – контроль без ДНК; В: Анализ на чувствительности с серией разведений неочищенного экстракта личинок *M. hapla*. 1 – одна личинка на пробирку; 2 – 1/10 личинки на пробирку; 3 – 1/100 личинки на пробирку; 4 – 1/1000 личинки на пробирку; 5 – контроль без ДНК. С: Анализ на чувствительности с экстрактом личинок *M. hapla* и других нематод. 1, 4 – одна личинка на пробирку; 2, 5 – одна личинка и 20 других нематод; 3, 6 – одна личинка и 10 других нематод; 7, 8 – одна личинка и половина реакционной смеси; 9 – контроль без ДНК; D: Экстракты *M. hapla*; 1 – одна личинка на пробирку; 2, 4 – экстракт из зараженных корней, содержащих самок с яйцевыми мешками; 3, 6 – экстракт из зараженных корней, содержащих старых самок без яйцевых мешков; 5 – контроль без ДНК. Вертикальная линия на графике – флуоресценция ΔRn . ΔRn рассчитывается для каждого цикла как $\Delta Rn (\text{цикл}) = Rn (\text{цикл}) - Rn (\text{базовый уровень})$, где Rn = нормализованный репортер. Горизонтальная линия на графике – циклы, каждый цикл = 20 сек.

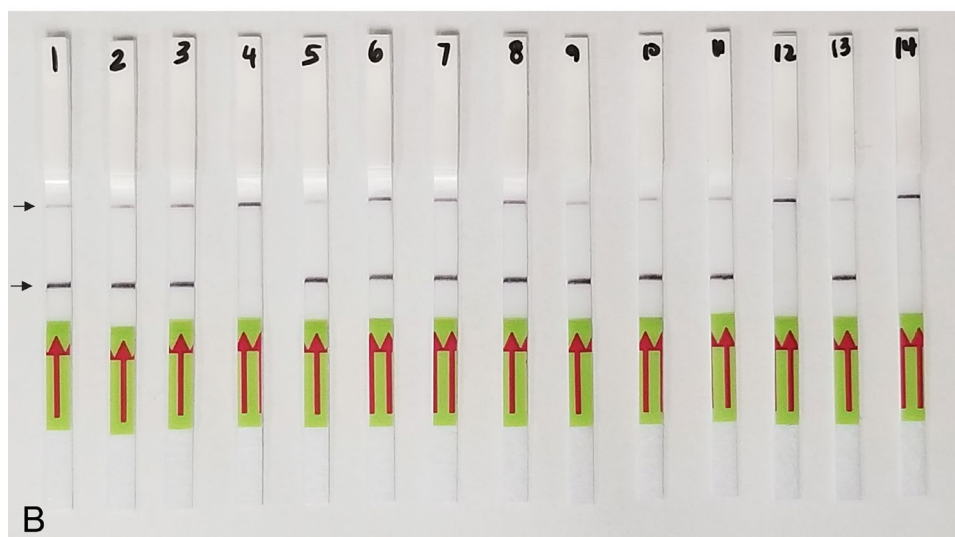
11.2.4. РПА с иммунострипами

Обнаружение продуктов РПА было проверено на специфичность и чувствительность при обнаружении с помощью иммунострипов. Положительные тестовые линии на полосках стрипов наблюдались для всех образцов *M. hapla*, тогда как образцы с другими видами нематод показали только контрольную линию (Рисунки 11.7 и 11.8). Обнаружение личинок *M. hapla* было подтверждено также в присутствии экстрактов от 10 до 20 других нематод.

Meloidogyne hapla была обнаружена в экстрактах корней перца, зараженных этой нематодой (Рисунок 11.8В). Снижение вдвое объема реакционной смеси также давал возможность обнаруживать *M. hapla* (Рисунок 11.8D). Обнаружение было подтверждено в присутствии фонового неочищенного экстракта от 10 до 20 экземпляров других нематод. Результаты анализов РПА показали надежное обнаружение с чувствительностью 1/10 личинки или 1/1000 самки (Рисунки 11.7 и 11.8) в реакционных пробирках.



A



B

Рисунок 11.7. Анализ чувствительности РПА в реальном времени (А) и в сочетании с иммунострипами (В). Серия разведений трех экстрактов *M. hapla*. Линии (полоски): 1, 5, 9 – 1/10 самки на пробирку; 2, 6, 10 – 1/100 самки на пробирку; 3, 7, 11 – 1/1000 самки на пробирку; 4, 8, 12 – 1/10000 самки на пробирку; 13 – положительный контроль (одна личинка); 14 – отрицательный контроль (без ДНК). Контрольная (верхняя) и тестовая (нижняя) линии обозначены стрелками.

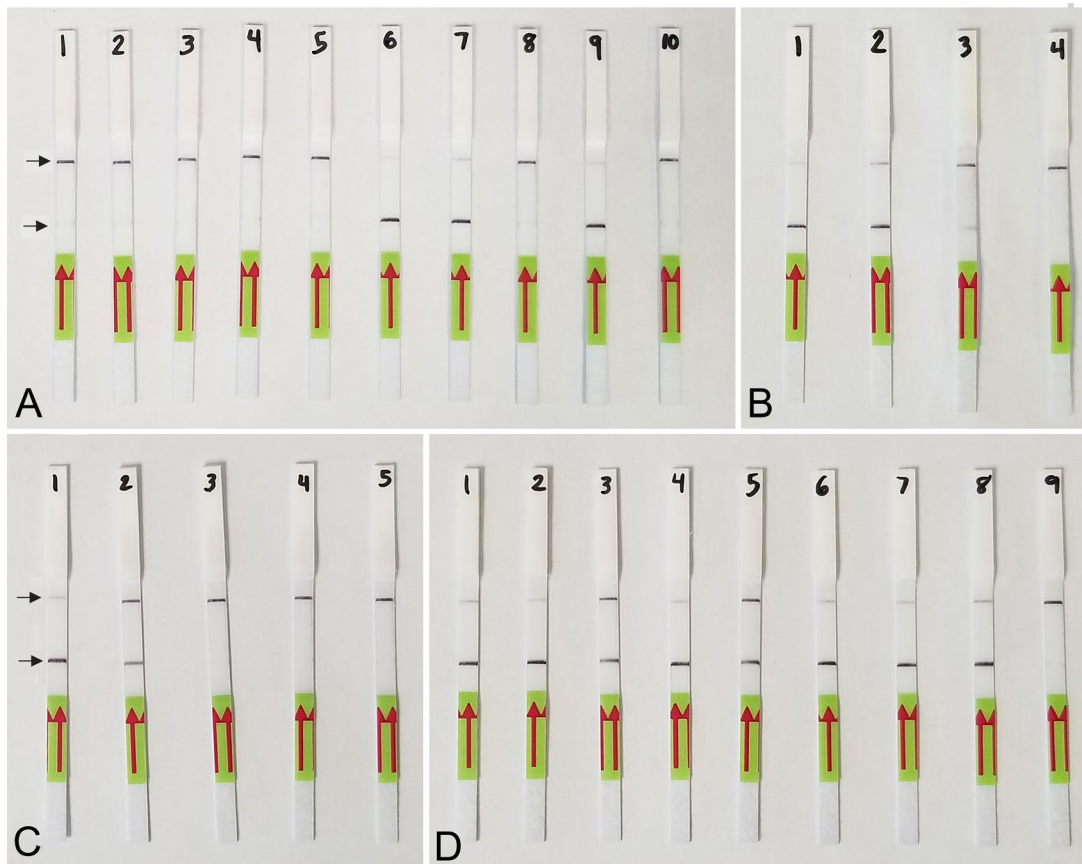


Рисунок 11.8. РПА в сочетании с иммунострипами. Анализ специфичности с образцами ДНК *Meloidogyne* spp. и неочищенным экстрактом личинок *M. hapla*. Полоски: 1, 2 – *Meloidogyne* sp.1; 3 – *M. naasi*; 4 – *M. baetica*; 5 – *Meloidogyne* sp.2; 6, 7, 9 – *M. hapla*; 8 – *M. arenaria*; 10 – контроль без ДНК; В: Экстракт *M. hapla*. Полоски: 1, 2 – экстракт из зараженных корней, содержащих самки с яйцевыми мешками; 3 – одна личинка на пробирку; 4 – контроль без ДНК; С: Анализ на чувствительность РПА. Полоски: 1 – 1 одна личинка на пробирку; 2 – 1/10 одна личинка на пробирку; 3 – 1/100 одна личинка на пробирку; 4 – 1/1000 одна личинка на пробирку; 5 – контроль без ДНК; D: Анализ на чувствительности с экстрактом личинок *M. hapla* и других нематод. Полоски: 1, 2 – одна личинка на пробирку; 3, 4 – одна личинка и 10 других нематод; 5, 6 – одна личинка и 20 других нематод; 7, 8 – одна личинка и половина реакционной смеси; 9 – контроль без ДНК.

11.2.5. Обсуждение

В новейшей работе Song *et al.* (2021) описали диагностический анализ РПА с иммунострипами *M. hapla* с использованием видоспецифичных праймеров и пробы, сконструированного с использованием последовательности эффекторного гена 16D10. Эти авторы заявили, что весь процесс обнаружения может быть завершён в течение 1,5 часов, включая 30–60 минут для экстракции ДНК, 20 минут для реакции РПА и 3-5 минут для визуального обнаружения на полосках. В нашем анализе видоспецифичные праймеры и пробы были сконструированы с использованием последовательности гена МС рРНК. Весь процесс обнаружения для нашего анализа РПА с иммунострипами может быть завершён в течение примерно 30 минут, включая 4 минуты для приготовления неочищенного экстракта нематод, 20 минут (4 + 16) для реакции РПА, 1 минуту для смешивания и центрифугирования

пробирок и 5 минут для визуального обнаружения на иммунных полосках. Весь процесс обнаружения для нашего анализа РПА в реальном времени может быть завершён в течение примерно 13 минут, включая 4 минуты для приготовления неочищенного экстракта нематод, 8 минут (5 + 3) для реакции РПА и 1 минуту для перемешивания и центрифугирования пробирок. Этот расчёт не включает время приготовления реакционной смеси РПА.

В нашем исследовании МС рРНК ген был выбран для анализов РПА из-за его большого числа копий и потому, что уже опубликованные исследования по ПЦР продемонстрировали его полезность для диагностики видов *Meloidogyne*. Zhang *et al.* (2020) заметили, что разные ДНК-мишени, вероятно, будут иметь чрезвычайно разную эффективность амплификации, даже имея ряд общих характеристик, включая содержание GC, температуру плавления праймера и длину продукта РПА. Эти авторы также пришли к выводу, что праймеры являются наиболее важным фактором, определяющим эффективность РПА, включая чувствительность, специфичность и скорость реакции. Хотя ампликоны, полученные из фрагментов эффекторного гена 16D10 и гена МС рРНК, сопоставимы по длине (148 против 164 п.н.), похоже, что эффективность реакции РПА выше для гена МС рРНК, чем для фрагмента эффекторного гена. РПА – диагностический тест, разработанный на основе МС рРНК гена, более чувствителен, чем тест, основанный на фрагменте эффекторного гена.

Song *et al.* (2021) сообщили об 1/1000 самок (после экстракции ДНК протеиназой К) в качестве предела обнаружения в анализе РПА с иммунострипами, тогда как в нашем анализе РПА с иммунострипами предел обнаружения может достигать 1/10000 (без специального выделения ДНК). Наш тест РПА для *M. hapla* также показал более высокую скорость амплификации по сравнению с аналогичным тестом, разработанным нами для *M. enterolobii*, в котором видоспецифичные праймеры были также сконструированы на основе МС рРНК гена. Пороговый уровень для надёжного обнаружения *M. enterolobii* был установлен равным 30 циклам (= 10 мин) и базовому уровню флуоресценции 500000 (ΔR_n) с помощью набора TwistAmp® ехo и системы Applied Biosystems QuantStudio Flex Real-Time PCR System, тогда как в нашем настоящем исследовании для *M. hapla* пороговый уровень был оценён равным 8 циклам (~ 3 мин) и исходному уровню 250000.

Хотя надёжный предел обнаружения нематоды методом РПА сопоставим с таковым для обычной ПЦР и ПЦР в реальном времени (Braun-Kiewnick *et al.*, 2016), остаётся возможность улучшить этот параметр путём уменьшения начального объёма образца с гомогенизированной нематодой и увеличения количества ДНК в реакционной смеси РПА. Тем не менее и другие улучшения могут быть сделаны в этом методе. В описанном исследовании мы протестировали неочищенные экстракты из нематод и растительных галлов. Тестирование экстрактов нематод, непосредственно полученных из образцов почвы, с их

количественной оценкой может быть предложено в качестве будущего плана для развития этого метода. Однако подробный анализ некоторых факторов, влияющих на эффективность РПА, должен быть предварительно тщательно протестирован и проанализирован. Таким образом, наши исследования впервые показывают, что метод РПА имеет большой потенциал для применения в программах тестирования полевых образцов на наличие галловых нематод в диагностических лабораториях, что будет способствовать своевременной и надежной идентификации этих вредных организмов и, таким образом, уменьшит риск их распространения.

ГЛАВА 12. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВИДОВ РОДА *TYLENCHULUS*

Основными задачами настоящего исследования являлись: i) молекулярная характеристика известных видов рода *Tylenchulus* и нового вида *T. musicola*, выделенного из почвы и корней банана в Иране, с использованием ВТС рРНК и D2-D3 фрагмента 28S рРНК генов; ii) изучение филогенетических отношений в пределах рода с использованием последовательностей рРНК генов; iii) разработка ПЦР с родоспецифическим праймером для идентификации представителей рода *Tylenchulus*; iv) тестирование и разработка ПЦР-ВТС-ПДРФ и ПЦР с видоспецифичными праймерами для быстрой и надежной диагностики всех известных видов *Tylenchulus*. Результаты наших исследований опубликованы в работе Tanha Maafi *et al.* (2012).

12.1. Филогения рода *Tylenchulus*

Выравнивание последовательностей ВТС рРНК гена имело в длину 877 п.н. и содержало 61 последовательность видов рода *Tylenchulus*, 21 из которых были новыми, полученными в результате нашего исследования. Внутривидовая вариация ВТС последовательностей для *T. musicola* составляла 1-10 п.н. (0,1-1,0%), а ВТС последовательности этого вида отличались от ДНК-последовательностей других видов *Tylenchulus* на 106-181 п.н. (13-23%). На БВ дереве эти шесть последовательностей *T. musicola* были сгруппированы вместе с высоким значением АП (Рисунок 12.1). Внутривидовая вариация последовательности ВТС для *T. semipenetrans* достигала 22 п.н. (2,8%). Не было обнаружено никаких группировок среди изолятов *T. semipenetrans* относительно их географического местоположения или растения-хозяина. Отношения между *T. semipenetrans* и другими видами не были хорошо определены из набора данных ВТС рРНК гена. Внутривидовая вариация последовательности ВТС для *T. palustris* достигала 24 п.н. (3,1%), а для *T. graminis* составила 1-14 п.н. (0,1-1,9%). *Tylenchulus palustris*, *T. graminis* и *T. furcus* образовали хорошо поддерживаемую кладу (АП = 100).

Выравнивание последовательностей D2-D3 фрагмента 28S рРНК гена имело в длину 669 п.н. и содержало 20 последовательностей изолятов *Tylenchulus*, 12 из которых были новыми. Две последовательности для *T. musicola* были идентичны и отличались от других видов *Tylenchulus* на 51-105 п.н. (8-16%). Вид *Tylenchulus musicola* сформировал высоко поддерживаемую кладу (АП = 100%) с *T. semipenetrans* (Рисунок 12.2). Внутривидовая дивергенция последовательности 28S рРНК гена для большинства образцов *T. semipenetrans*

варьировала от 0 до 6 п.н. (от 0 до 1,5%) и достигала максимума в 14 п.н. (2,3%) между калифорнийским изолятом с оливковых деревьев и другими изолятами. Филогенетический анализ не выявил какой-либо группировки среди изолятов *T. semipenetrans* по сходству их ареалов или растений-хозяев.

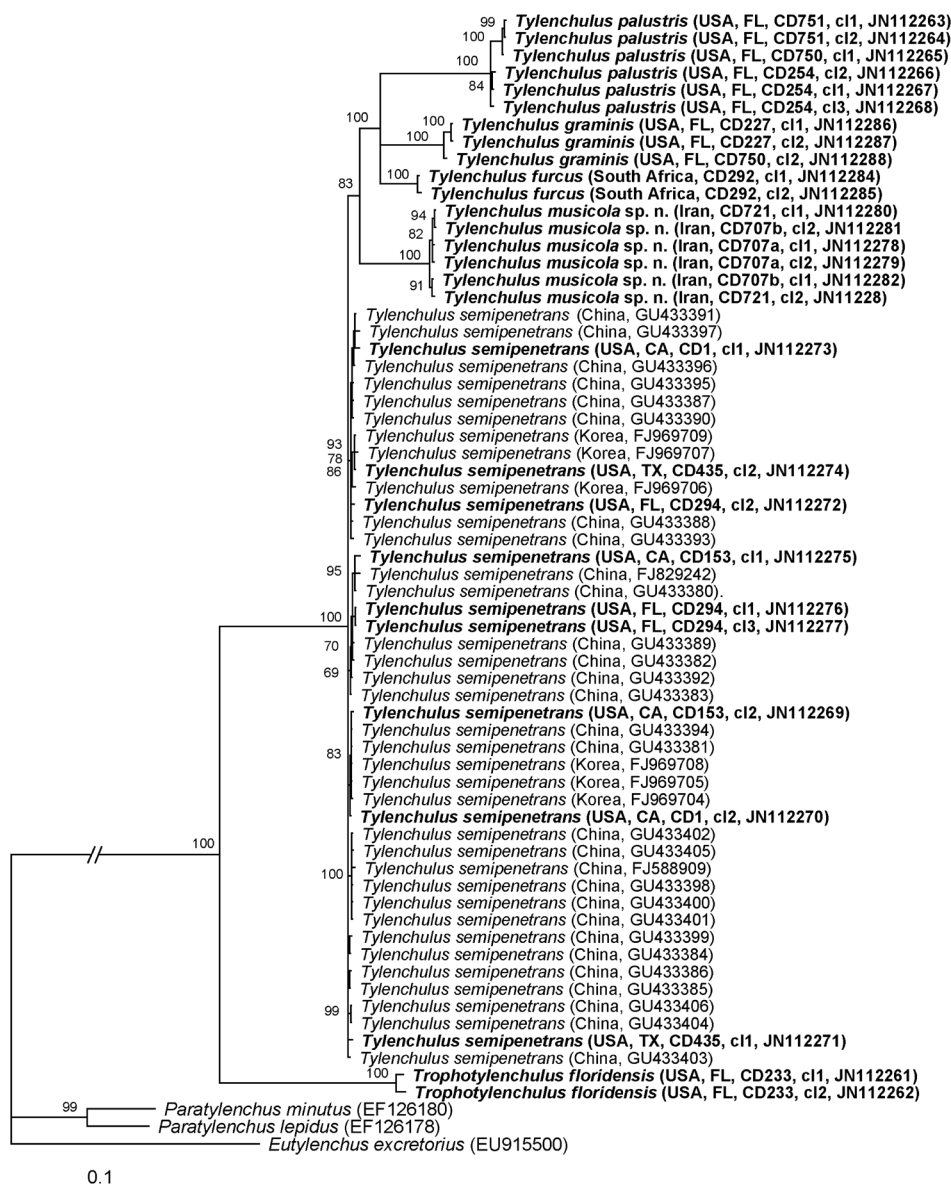
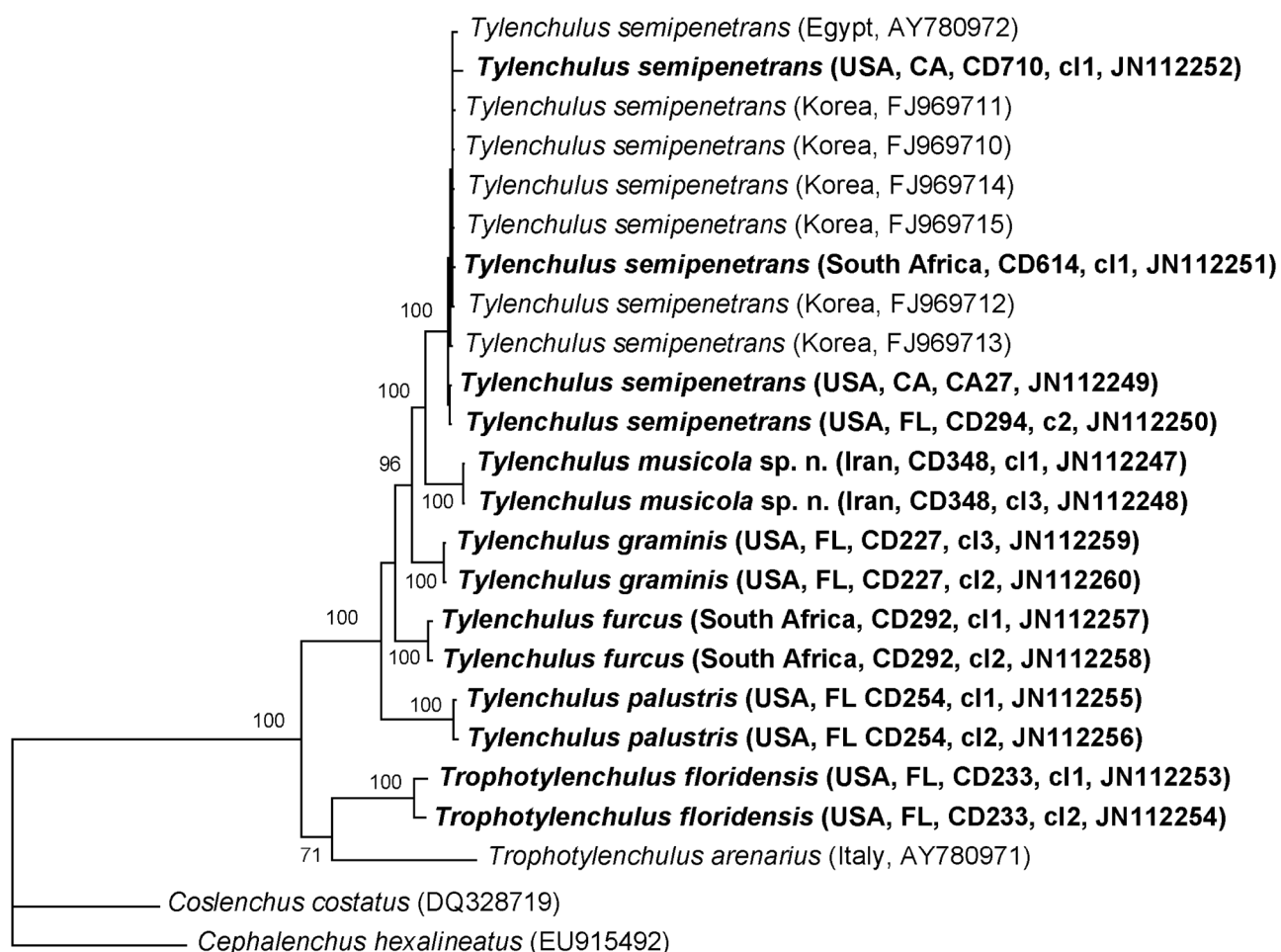


Рисунок 12.1. Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное из набора данных последовательности генов ВТС рРНК для видов *Tylenchulus* с использованием модели GTR + I + G. Апостериорная вероятность более 70% дана для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом.

Cobb (1913) обосновал род *Tylenchulus* с *T. semipenetrans* в качестве типового вида. Raski (1957) предложил род *Trophotylenchulus*, представители которого отличались от *Tylenchulus* более передним положением экскреторной поры. Виды обоих родов имеют большую экскреторно-секреторную клетку, которая продуцирует желатиноподобное вещество. Maggenti (1962) считал *Trophotylenchulus* младшим синонимом *Tylenchulus* на том основании, что они имеют одну и ту же выделительную систему. Эта синонимия была

отвергнута Hashim (1983), но поддержана Raski и Luc (1987). Результаты молекулярного анализа в нашем исследовании подтверждают обоснованность выделения рода *Trophotylenchulus* как отдельного таксона от *Tylenchulus*.



0.1

Рисунок 12.2. Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа последовательностей D2-D3 фрагмента 28S рРНК генов для видов *Tylenchulus* с использованием модели GTR + I + G. Апостериорная вероятность более 70% дана для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом.

Идентификация видов рода *Tylenchulus* – достаточно сложная задача, особенно во Флориде. После описания *T. semipenetrans* нематологи из Флориды обнаружили личинки *Tylenchulus*, которых нельзя было отличить от *T. semipenetrans*. Эти личинки считались «дикими расами» *T. semipenetrans*. Chitwood отметил значительное морфологическое сходство этих диких рас с таковыми у *T. semipenetrans* и считал эти «дикие расы» местными популяциями *T. semipenetrans* (Chitwood & Birchfield, 1957). Только в 1988 году после описания в Южной Африке нового вида *T. furcus* эти «дикие расы» *T. semipenetrans* были описаны как два разных вида – *T. graminis* и *T. palustris* (Inserra *et al.*, 1988a). Описание этих двух новых видов облегчило разделение трех видов флоридских тиленхулусов; их личинок

второй стадии можно идентифицировать до вида по положению прямой кишки, которая видна на живых нематодах, помещенных на водный агар. Результаты молекулярного анализа нашего исследования подтверждают обоснованность выделения этих двух видов, а также предоставляют молекулярные методы идентификации видов *Tylenchulus*.

Молекулярный анализ с использованием генов рРНК не дает четкой картины эволюции и распространения видов *Tylenchulus*. Мы можем только предполагать, что обнаружение *T. musicola* на банане и *T. semipenetrans* на цитрусовых может указывать на то, что эти виды *Tylenchulus*, вероятно, эволюционировали вместе с этими растениями в их естественной среде обитания, в Юго-Восточной Азии. Вероятно, они были занесены с зараженным растительным материалом в другие страны и приспособились к паразитированию на других культурах. Предварительные результаты теста на заражение различных растений показали, что *T. musicola* не заражает сахарный тростник и цитрусовые. Однако эти результаты нельзя считать окончательными, пока они не будут подтверждены дальнейшими тестированиями и полевыми наблюдениями.

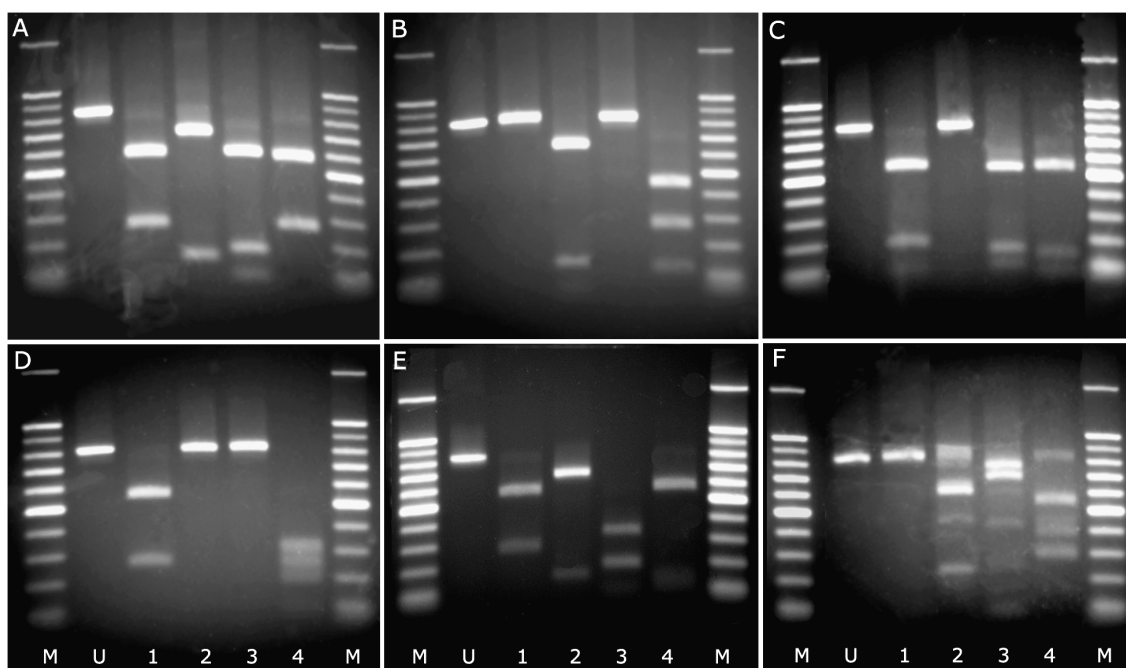


Рисунок 12.3. ПЦР-ПДРФ. А: *Tylenchulus semipenetrans*; В: *T. musicola*; С: *T. graminis*; D: *T. furcus*; E: *T. palustris*; F: *Trophotylenchulus floridensis*. Дорожки: М = 100 п.н. ДНК маркер (Промега); U = нерасщепленный продукт; 1 = *AvaI*; 2 = *BseNI*; 3 = *BsuRI*; 4 = *Hin6I*.

12.2. Молекулярная диагностика видов рода *Tylenchulus*

12.2.1. ПЦР-ВТС-ПДРФ

Профили ПЦР-ВТС-ПДРФ для пяти видов *Tylenchulus* и *Trophotylenchulus floridensis* приведены на Рисунке 12.3 (размеры фрагментов даны в Таблице 5, см. Tanha Maafi *et al.*,

2012). Гетерогенность области ВТС рРНК для *T. floridensis* была выявлена ферментами *BsuRI*, *BseNI* и *Hin6I*.

Wang *et al.* (2004) и Park *et al.* (2009) первыми представили диагностические профили ПЦР-ВТС-ПДРФ для цитрусовой нематоды, *T. semipenetrans*, из Китая и Кореи. Park *et al.* (2009) выявили гетерогенность области ВТС после расщепления *MseI* и *MspI* и наличие двух гаплотипов ВТС у этого вида. В настоящем исследовании мы выбрали четыре рестриктазы, которые генерируют несложные профили и не усложняют процедуру идентификации *T. semipenetrans* и других видов.

12.2.2. ПЦР со специфическими праймерами

Сравнительный анализ последовательностей D2-D3 фрагмента 28S рРНК гена *Tylenchulus* с последовательностями других родов нематод выявил области с короткой уникальной последовательностью для представителей *Tylenchulus* и позволил разработать родоспецифичный праймер. Результаты ПЦР с этим родоспецифичным праймером приведены на Рисунке 12.4.

Родоспецифичный и универсальный праймеры дали ампликон длиной около 360 п.н. для всех протестированных образцов *Tylenchulus*. В образцах *Trophotylenchulus floridensis* и других нематод продуктов ПЦР обнаружено не было (данные не показаны).

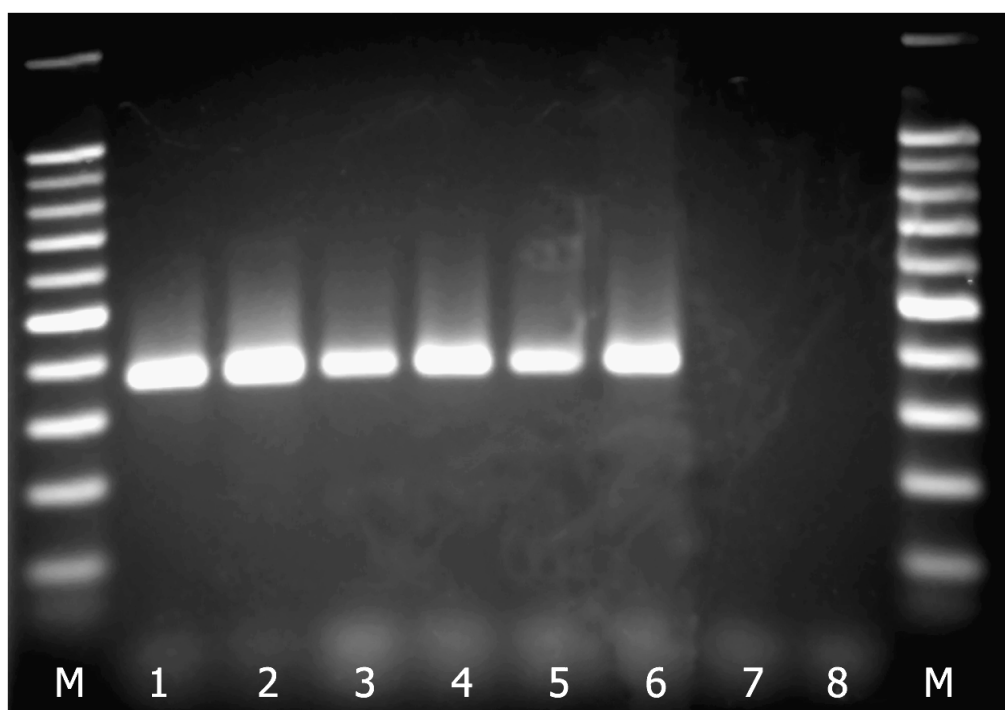


Рисунок 12.4. ПЦР со специфическим для рода *Tylenchulus* праймером. Дорожки: М = 100 п.н. ДНК маркер (Промега); 1 = *Tylenchulus musicola*; 2 = *T. semipenetrans* (Вентура, Калифорния, США); 3 = *T. graminis*; 4 = *T. palustris* (Седар Айланд, Флорида, США); 5 = *T. palustris* (Перри, Флорида, США); 6 = *T. furcus*; 7 = *Trophotylenchulus floridensis*; 8 = контроль без ДНК.

Видоспецифичные праймеры были разработаны для каждого вида *Tylenchulus* на основе различий в последовательностях ВТС рНК гена (Таблица 1, Приложение; Рисунок 12.5). Результаты ПЦР с видоспецифичными праймерами приведены на Рисунке 12.6. Комбинация универсального праймера TW81 с соответствующими видоспецифичными праймерами давали один продукт ПЦР в 113 п.н. для *T. semipenetrans*, 190 п.н. для *T. musicola*, 344 п.н. для *T. palustris*, 690 п.н. для *T. furcus* и 767 п.н. для *T. graminis*. Все эти комбинации праймеров были успешно протестированы в мультиплексной ПЦР.

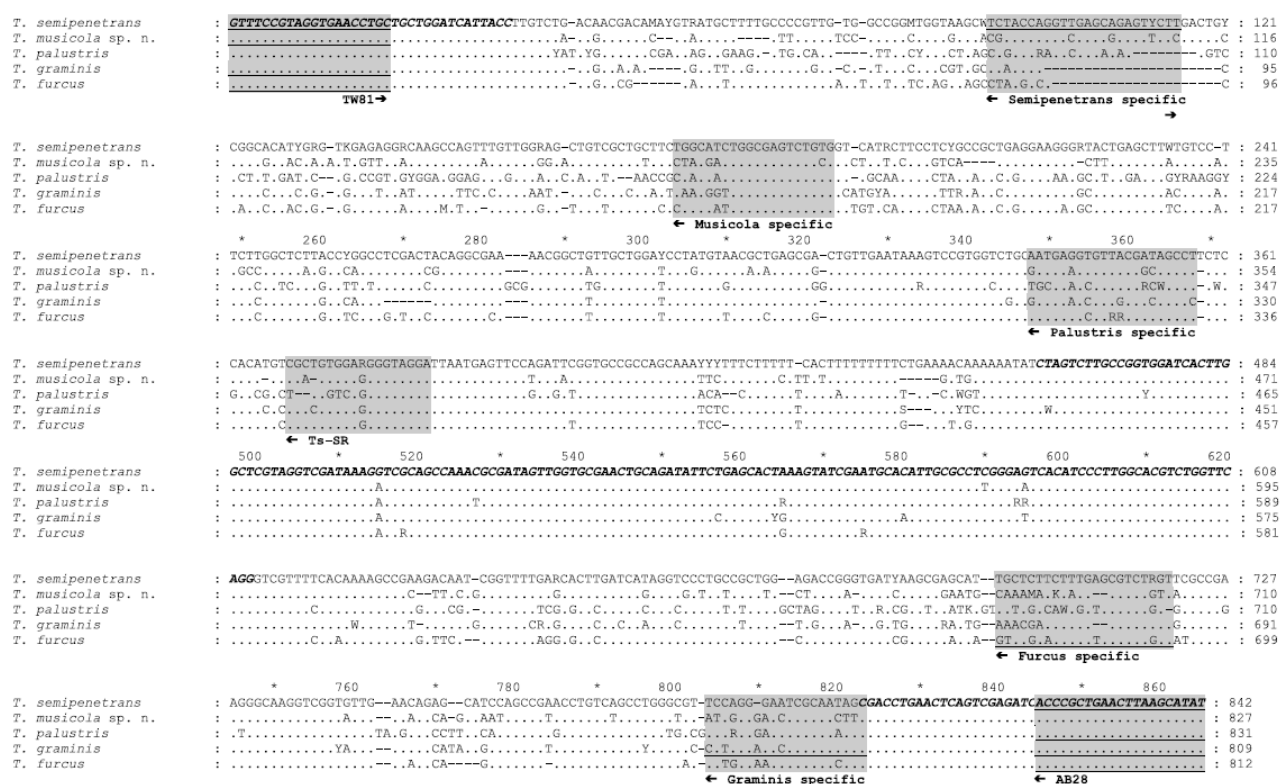


Рисунок 12.5. Выравнивание последовательности рНК гена для видов *Tylenchulus* с указанием положений праймеров. Позиции праймеров для определенных видов подчеркнуты и отмечены серым цветом. Рибосомальные гены 18S, 5.8S и 28S выделены жирным курсивом.

Сравнительное чувствительное тестирование нашего специфического праймера для *T. semipenetrans* и набора праймеров, разработанного Liu *et al.* (2011), показали, что оба метода ПЦР могут успешно обнаружить одну личинку второй стадии в образце. Анализ выравнивания последовательностей (Рисунок 12.7) выявил, что праймер Ts-SF по Liu *et al.* (2011) нацелен только на *T. semipenetrans* и, таким образом, анализ *in silico*, включающий все известные виды *Tylenchulus*, подтверждает специфичность метода обнаружения *T. semipenetrans*, разработанного Liu *et al.* (2011).

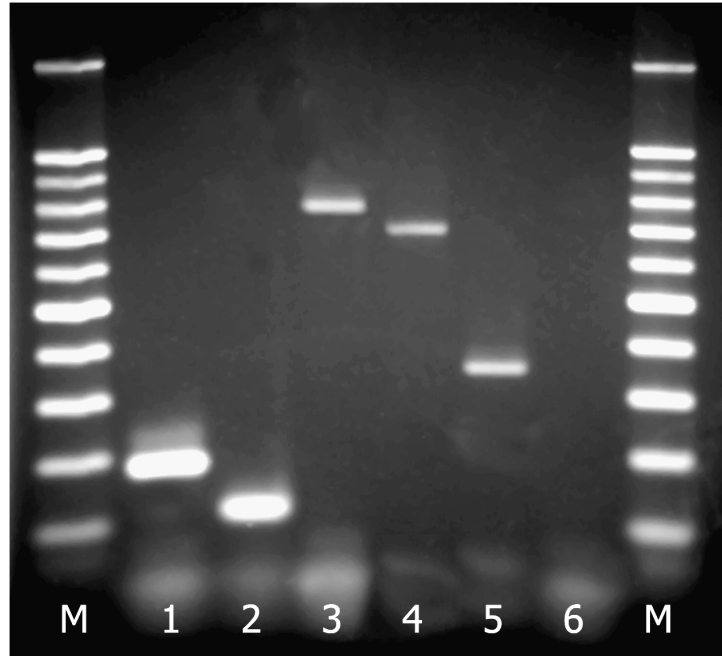


Рисунок 12.6. Результаты ПЦР с несколькими видоспецифическими праймерами для видов *Tylenchulus*. Дорожка: М = 100 п.н. ДНК маркер (Promega); 1 = *Tylenchulus musicola*; 2 = *T. semipenetrans*; 3 = *T. graminis*; 4 = *T. furcus*; 5 = *T. palustris*; 6 = контроль без ДНК.

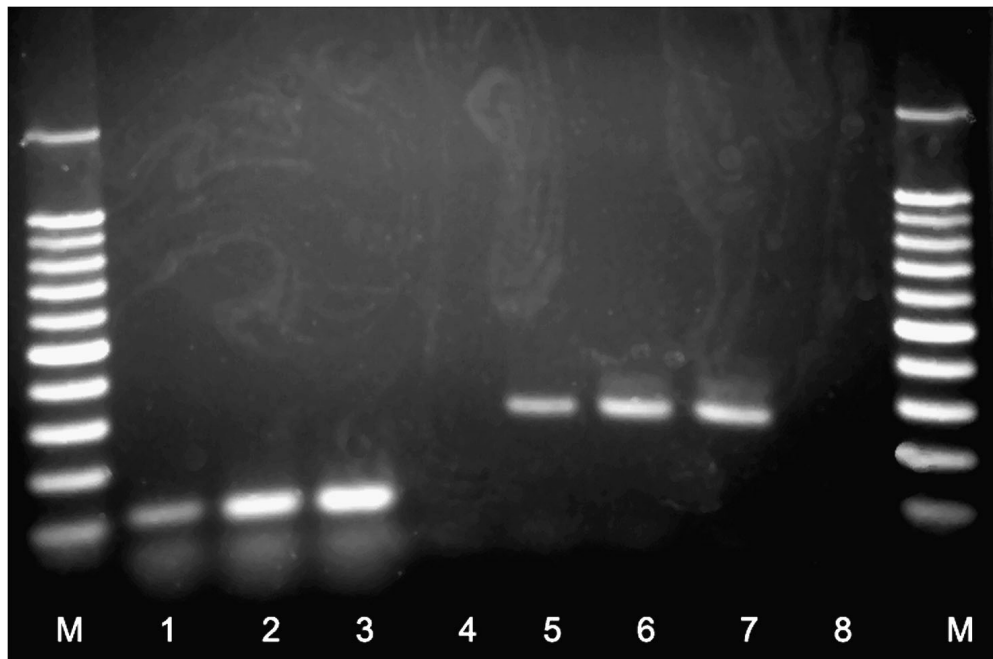


Рисунок 12.7. Результаты ПЦР с видоспецифическим *Tylenchulus semipenetrans* праймером. Дорожки: М = 100 п.н. ДНК маркер (Промега); 1-4 = комбинация праймеров semipenetrans specific + TW28; 5-8 = комбинация праймеров: Ts-SF + Ts-SR; 1-8 = ПЦР ампликон, полученный из различного количества личинок в реакционной смеси: 1, 5 = 0.25 J2; 2, 6 = 0.5 J2; 3, 7 = 1 J2; 4, 8 = негативный контроль без ДНК.

ГЛАВА 13. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПОЗИЦИЯ РОДОВ
MELOIDODERITA И *SPHAERONEMA* (SPHAERONEMATIDAE)

Наши исследования показали, что представители сphaеронематид формируют отдельную и базальную кладу среди представителей подотряда Criconematina. Для подробного анализа и выявления филогенетической позиций этой группы седентарных нематод были молекулярно охарактеризованы несколько видов рода *Meloidoderita*: *M. kirjanovae*, *M. polygoni*, *M. whittoni* и несколько популяций *Sphaeronema alni* (Рисунок 3.1). Результаты этой работы подробно изложены в наших статьях: Vovlas *et al.* (2006), Palomares-Rius *et al.* (2010) и Troccoli *et al.* (2017).

Интересные данные были получены нами после анализа седентарной нематоды *M. whittoni*. Sledge и Christie (1962) описали новую тиленхулоидную нематоду, паразитирующую на корнях сладкой камеди (*Liquidambar styraciflua* L.) вдоль берега ручья Хатчет-Крик, округ Алачуа, Северная Флорида. Сладкая камедь – это эндемичное дерево в лиственных лесах в теплых и умеренных районах Северной Америки. Авторы определили эту нематоду как нового представителя рода *Sphaeronema* Raski & Sher, 1952, *Sphaeronema whittoni*, на основе формы самок, наличия атрофированного пищевода и стилета у самцов, а также массивного стилета у личинок второй стадии. Этот вид хорошо морфологически отличается от родственных видов *S. californicus* Raski & Sher, 1952 и *S. minutissimum* Goodey, 1958. Впоследствии Siddiqi (1986) посчитал морфологические признаки *S. minutissimum* и *S. whittoni* достаточными для выделения двух новых родов, и *S. minutissimum* была представлена в новой комбинации как *Goodeyella minutissima* (Sledge & Christie, 1962) Siddiqi, 1986, а *S. whittoni* была представлена в новой комбинации как *Tumiota whittoni* (Sledge & Christie, 1962) Siddiqi, 1986. Siddiqi также представил отличия этих двух родов от рода *Sphaeronema* в отсутствии конусоподобных и выступающих влагалищных губ, которые имеются у *Sphaeronema*. Было предложено, что род *Tumiota* отличается от рода *Goodeyella* наличием налегания лопасти пищеводных желез на кишечник, тогда как у *Goodeyella* эти железы формируют четкий базальный бульбус, а также эти роды различаются по форме головной части у личинок. Округлость головы считалась свойственной самкам и личинкам рода *Goodeyella*. Однако ни *Goodeyella*, ни *Tumiota* не были признаны валидными другими таксономистами, включая Raski и Luc (1987) и Decraemer и Hunt (2013).

Во время обследования на нематод, проведенного в Северной Флориде в 2015 году, популяция *Tumiota* (= *Sphaeronema*) *whittoni* была обнаружена на дереве сладкой камеди в типовом месте обитания этого вида. Наблюдение за зараженными корнями выявило наличие

сфероидных цист, которые при небольшом увеличении напоминали таковые у видов рода *Globodera*. Эти цисты содержали яйца с личинками. В задачи наших исследований входило следующее: i) морфологическая характеристика некоторых стадий жизненного цикла, которые не были указаны в первоначальном описании; ii) проведение молекулярной характеристики этой нематоды и iii) реконструкция филогенетических отношений между этим видом и другими тиленхулоидными нематодами с помощью анализа последовательностей 18S рРНК, D2-D3 28S рРНК и ВТС рРНК генов.

Результаты нашего молекулярного исследования показали, что *T. whittoni* относится не к роду *Tumiota* или *Sphaeronema*, а к роду *Meloidoderita* Poghossian, 1966. В результате номенклатурного переноса этот вид следует называть *Meloidoderita whittoni* (Sledge & Christie, 1962) (= *Sphaeronema whittoni*; *Tumiota whittoni*).

Морфологические характеристики жизненных стадий этого нового представителя рода *Meloidoderita* согласуются с таковыми у других видов этого рода. Однако *M. whittoni* отличается от четырех видов *Meloidoderita*, а именно *M. kirjanovae* Poghossian, 1966, *M. polygoni*, *M. safrica* Van den Berg & Spaull, 1982, и *M. salina* Ashrafi, Mugniéry, van Heese, van Aelst, Helder & Karssen, 2012, по признакам взрослой стадии, которая представляет собой цисту, содержащую яйца. Самки сравниваемых видов *Meloidoderita* откладывают яйца в маточный мешок, который имеет толстую, склеротизованную и различно окрашенную стенку. Этот склеротизованный маточный мешок превращается в цистоидное тело, которое некоторое время удерживается внутри тела самки, но со смертью последней и разложением ее тела оказывается во внешней среде. Самки *Meloidoderita whittoni* откладывают яйца в маточный мешок так же, как у других видов *Meloidoderita*, этот маточный мешок имеет тонкую стенку и не становится цистоидным телом. Мешок остается внутри тела самки, которое не распадается, а превращается в цисту с толстой, тонированной стенкой, как у цист рода *Globodera*.

Филогенетические взаимоотношения в пределах видов Sphaeronematidae и некоторых других исследованных видов Criconematina, представляющих разные роды, были проанализированы с последовательностями частично секвенированных генов 18S рРНК (данные не показаны), 28S рРНК (Рисунок 13.2) и ВТС рРНК (Рисунок 13.3). На всех этих деревьях виды семейства Sphaeronematidae образовывали высоко или умеренно поддерживаемую кладу, где *Meloidoderita* и *Sphaeronema* имели близкие родственные отношения. Молекулярный анализ также выявил четкие различия в последовательностях генов между *M. whittoni* и другими изученными видами *Meloidoderita*: *M. kirjanovae*, *M. polygoni* и *M. salina*.

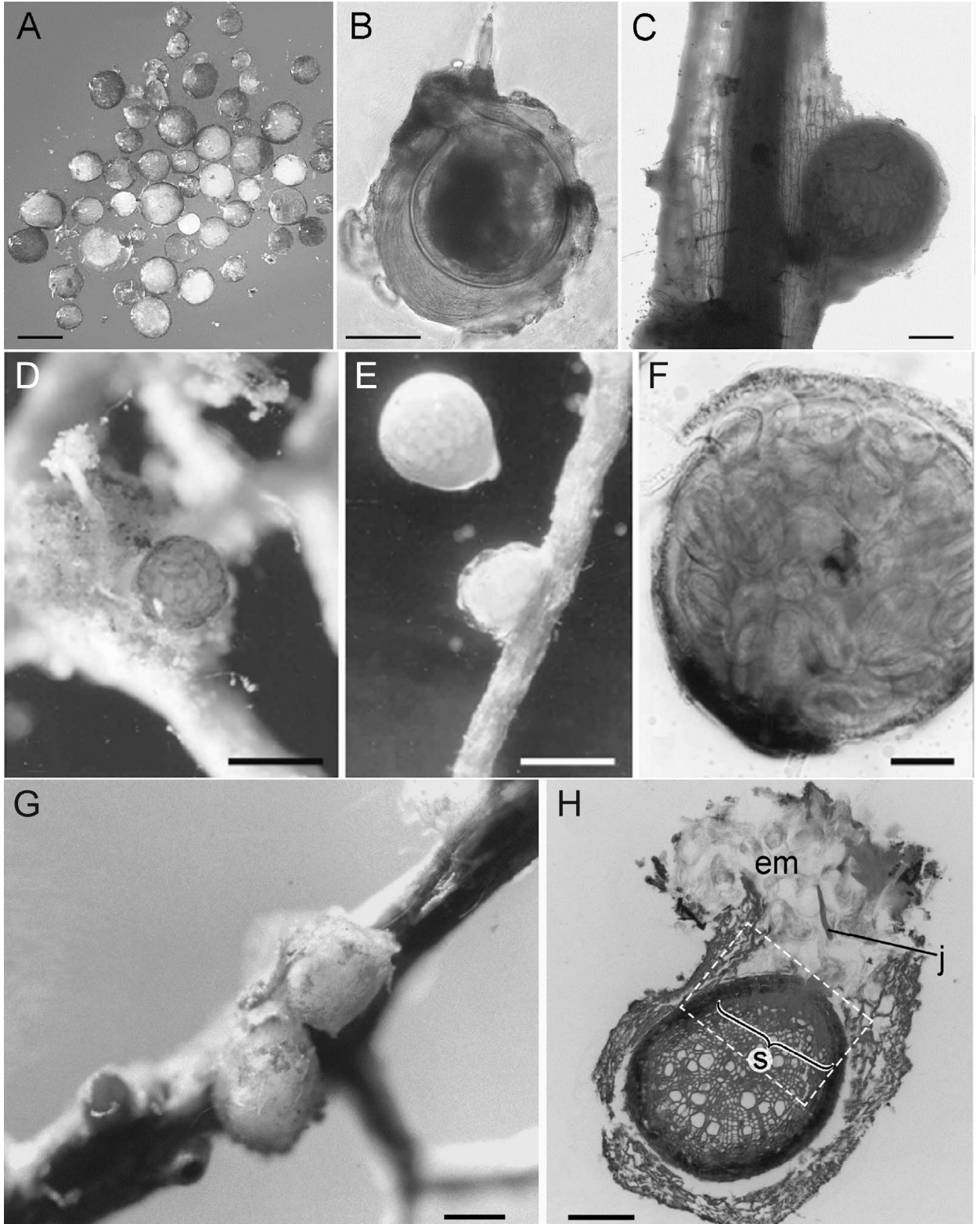


Рисунок 13.1. Взрослые самки. А-С: *Meloidoderita whittoni*; D-F: *Meloidoderita kirjanovae*; G-H: *Sphaeronema alni*.

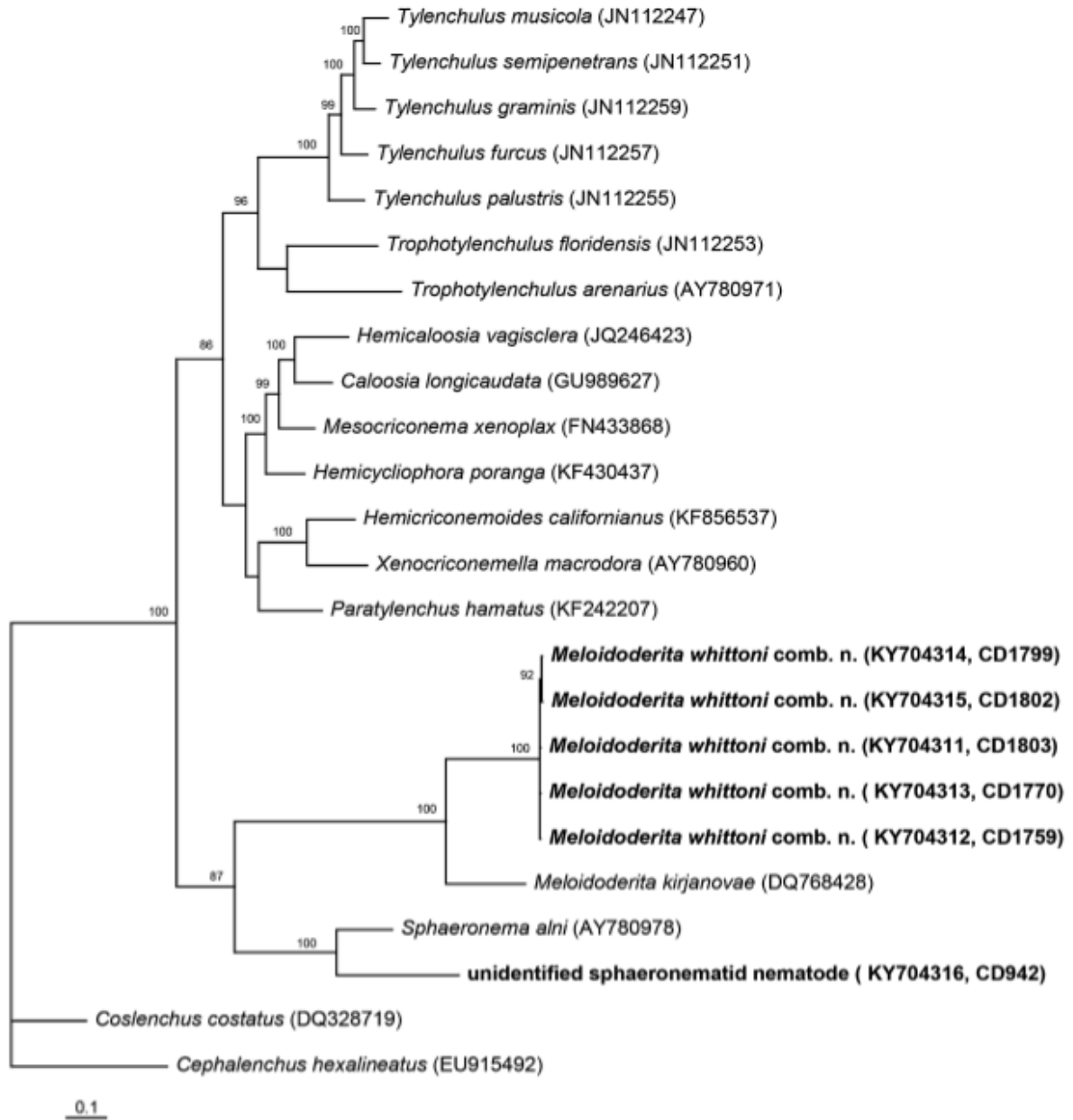


Рис. 13.2. Филогенетические взаимоотношения внутри Sphaeronematidae и других видов Triconematina: Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа выравнивания D2-D3 последовательностей генов 28S рРНК по модели GTR + I + G. Апостериорные вероятности, равные или более 70%, приведены для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом.

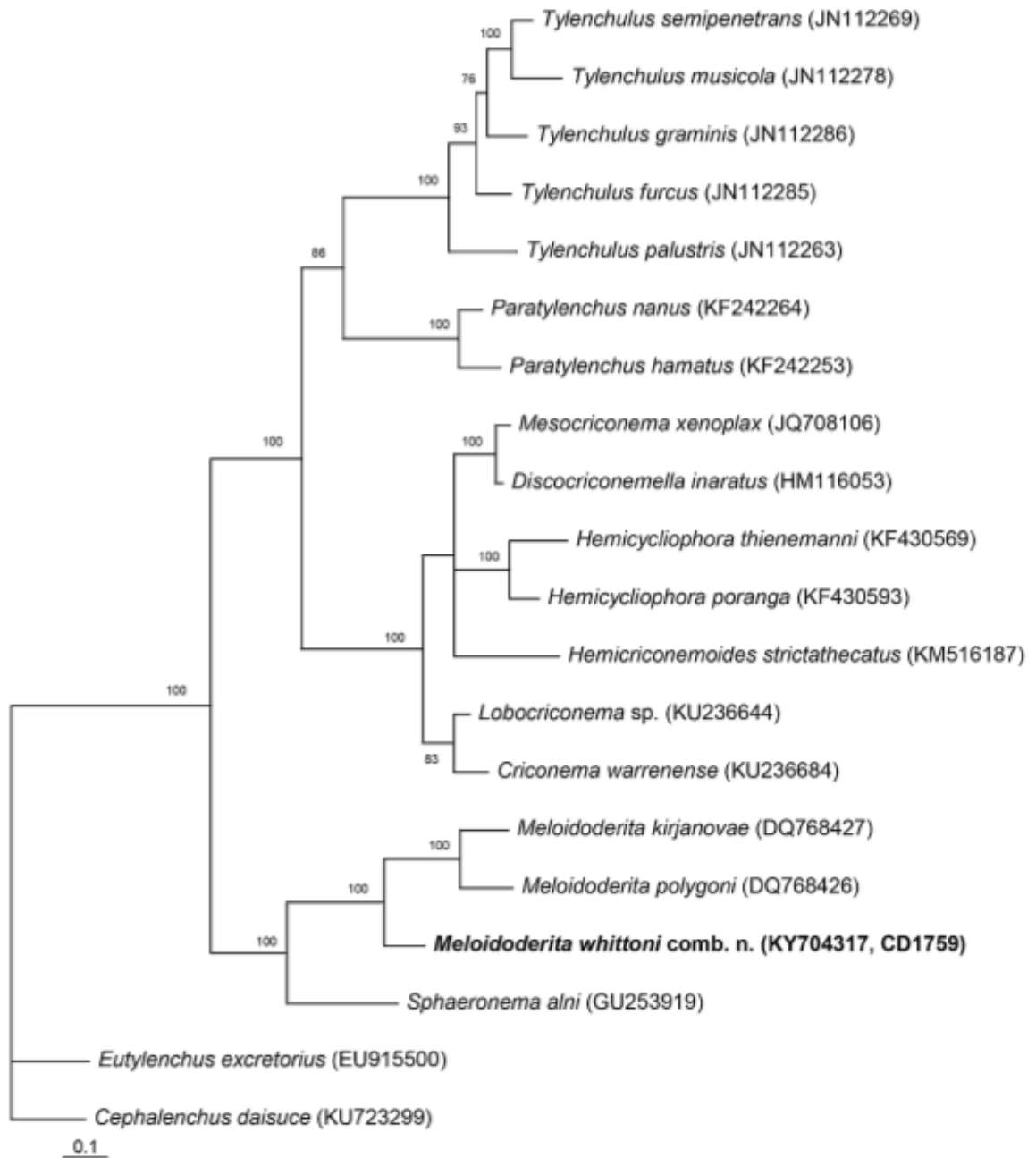


Рис. 13.3. Филогенетические взаимоотношения внутри Sphaeronematidae и других видов Criconematina: Байесовское дерево (50%-ный консенсус), полученное в результате анализа выравнивания ВТС последовательностей генов рРНК по модели GTR + I + G. Апостериорные вероятности, равные или более 70%, приведены для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом.

Выводы

1. Фрагмент D2 и D3 28S рРНК гена является информативным и надежным маркером для реконструирования филогенетических взаимоотношений между видами, родами, семействами, надсемействами и подотрядами тиленхид. ДНК-последовательности ВТС рРНК и COI генов позволяют идентифицировать виды у седентарных нематод семейств Heteroderidae, Meloidogynidae и Sphaeronematidae, могут быть использованы для ДНК-баркодирования и для выявления родственных отношений между видами и родами внутри этих семейств.
2. Параметры выравнивания ДНК-последовательностей и модели ДНК-эволюции могут оказывать влияние на результат филогенетических исследований. Использование моделей вторичной структуры молекул рибосомальной РНК в филогенетических исследованиях позволяет реконструировать более реалистичную картину родственных отношений между таксонами, чем использование традиционных моделей ДНК-эволюции.
3. Седентарный паразитизм возник как минимум пять раз в процессе эволюции у тиленхид, три раза – независимо в пределах подотряда Hoplolaimina: i) Meloidogynidae + *Meloinema*, ii) *Nacobbus* и iii) Heteroderidae, и два раза – у надсемейства Tylenchuloidea: iv) Sphaeronematidae и v) Tylenchulidae. Цистообразование, или способность сохранять яйца внутри тела отмершей самки, у тиленхид возникло дважды независимо в семействах: i) Sphaeronematidae и ii) Heteroderidae.
4. Молекулярный анализ подтверждает деление отряда Tylenchida на два подотряда – Hoplolaimina и Triconematina. Виды родов *Pratylenchus* и *Hirschmanniella* образуют общую кладу с седентарными нематодами из родов *Meloidogyne*, *Nacobbus* и *Meloinema*. Род *Radopholus* занимает обособленную позицию, близкую к семейству Hoplolaimidae. Седентарные нематоды из семейств Meloidogynidae и Heteroderidae не являются родственными таксонами. Энтомопаразитические нематоды занимают базальные кладу у тиленхид и не разделяются на классические надсемейства Allantonematoidea, Iotonchioidea и Sphaerularioidea.
5. Доказана монофиличность подсемейств Punctoderinae и Heteroderinae. Подсемейство Verutinae должно быть отнесено к Heteroderidae, а не к Rotylenchulidae. Род *Cryphodera* следует рассматривать в подсемействе Meloidoderinae. Подсемейство Ataloderinae является парафилетическим и требует ревизии. Роды *Bidera* и *Afenestrata* являются искусственными, и их представителей следует отнести в род *Heterodera*. Большинство видов рода *Heterodera* можно разделить на 9 морфологическо-молекулярных групп.

6. Различные группы семейства Heteroderidae ассоциированы с хозяевами, принадлежащими одному или нескольким близким семействам растений, с которыми они коэволюционировали. Некоторые виды из этих групп вторично колонизировали виды растений из неродственных семейств, произрастающие в экологически сходных условиях. Цистообразующие нематоды, обитающие в тропических регионах и регионах с умеренным климатом, образуют самостоятельные филогеографические клады на филогенетических деревьях.
7. Группа Avenae рода *Heterodera* включает 12 валидных и один неописанный вид. Анализ ДНК-последовательностей ВТС рРНК и COI генов позволяет определить границы этих видов. На территории России выявлено широкое распространение вида *H. filipjevi*. Китайская злаковая нематода *H. sturhani* и австралийская злаковая нематода *H. australis* могут быть идентифицированы с использованием последовательности гена COI. COI гаплотипы соответствуют определенным патотипам злаковых цистообразующих нематод.
8. Цистообразующие нематоды из группы Avenae возникли и диверсифицировались в Ирано-Анатолийском регионе, в период плейстоцена (1,6 млн лет назад), а затем распространились из этого региона по всему миру. Современное распространение для видов группы объясняется наличием различных локальных центров их происхождения, а также различным временем их происхождения и наличием географических барьеров на путях распространения, а не антропогенным фактором.
9. Род *Globodera* включает 13 валидных и три неописанных вида и формирует две основные клады на филогенетических деревьях: i) *Globodera* из Южной и Северной Америки, паразитирующие на растениях Solanaceae; ii) *Globodera* из Африки, Европы, Азии и Новой Зеландии, паразитирующие на растениях семейства Asteraceae и других семейств.
10. Виды рода *Globodera* происходят из нескольких центров биоразнообразия, расположенных в горных районах Перу, Боливии, Южной Африки и Новой Зеландии. Возникновение и расселение видов *Globodera* началось в конце позднего плиоцена (2,9 млн лет назад). Выявленное высокое генетическое разнообразие боливийских популяций *G. rostochiensis* по COI и *cytb* генам указывает на то, что этот вид происходит из южной части Боливии или северо-западной части Аргентины. Популяции картофельных цистообразующих нематод в России представлены одним видом – *G. rostochiensis*.
11. Представители рода *Rotylenchulus* имеют несколько типов рРНК генов в геноме, что делает невозможным использование этих генов для выявления внутриродовых филогенетических связей. Гены COI и *hsp90* позволяют более надежно реконструировать

родственные отношения между видами этого рода. Род *Rotylenchulus* происходит из Афротропического (Эфиопского) зоогеографического региона.

12. Виды рода *Meloidogyne* разделяются на 11 основных эволюционных линий, и *M. nataliei* вместе с *M. indica* представляет собой наиболее раннюю обособившуюся ветвь галловых нематод. Филогенетический анализ подтверждает близкую родственную связь *Meloidogyne* с Pratylenchidae и *Meloinema*, а также указывает на то, что амфимиктические виды *Meloidogyne* с низким количеством хромосом являются анцестральными видами. Полиплоидизация и переход к партеногенезу у галловых нематод произошли на позднем этапе их эволюции и привели к биологическому расцвету этой группы. Эта эволюция также сочеталась с возрастающей полифагией, что впоследствии привело к широкому распространению этих нематод в естественных биогеоценозах и агроценозах.
13. Для диагностики важных для сельского хозяйства видов седентарных нематод разработаны быстрые и надежные молекулярные методы идентификации: ПЦР-ВТС-ПДРФ, ПЦР и РПА со специфическими праймерами.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АП (PP) – апостериорная вероятность (*posterior probability*)
- БВ (BI) – метод Байесовой вероятности (*Bayesian inference*)
- БС (BS) – бутстреп поддержка (*bootstrap support*)
- ВТС – внутренний транскрибируемый спейсер (*ITS*)
- ВТС1 – внутренний транскрибируемый спейсер 1 (*ITS1*)
- ВТС2 – внутренний транскрибируемый спейсер 2 (*ITS2*)
- КХ – МЛ тест Кишино-Хасегавы (*Kishino-Hasegawa test, KH*)
- КЦН – картофельная цистообразующая нематода
- мДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота (*mtDNA*)
- МЛ – метод максимального правдоподобия (*maximum likelihood, ML*)
- МП – метод максимальной экономии (*maximum parsimony, MP*)
- МС – межгенный спейсер (*intergenic spacer, IGS*)
- МЭ – метод минимальной эволюции^[1] (*minimum evolution*)
- НС – метод ближайшего связывания (*NJ*)
- п.н. – пара нуклеотидов (*base pair*)
- ПДАФ – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (*AFLP*)
- ПДРФ – полиморфизм длины рестриционных фрагментов (*RFLP*)
- ПЦР – полимеразная цепная реакция (*PCR*)
- РПА – рекомбиназная полимеразная амплификация (*Recombinase Polymerase Amplification* RPA)
- СП – статистическая парсимония (*SP*)
- СФПД – случайно амплифицированный полиморфизм ДНК (*RAPD*)
- ШХ – МЛ тест Шимадайра-Хасегавы (*Shimadaira-Hasegawa test, SH*)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антропова С.А., Карташев А.Г. Пространственное распределение почвенных нематод в ризосферах тополя и березы // Вестник Нижегородского Государственного Университета. – 2016 - Т.2 – С. 41-45.
2. Волкова Т.В., Казаченко И.П. Каталог фитонематод (Nematoda, Tylenchida) Дальнего Востока России. – Владивосток: Дальнаука, 2010 – 121 с.
3. Гроссгейм А.А. К вопросу о графическом изображении системы цветковых растений // Советская ботаника – 1945 - Т. 13 - №3 – С. 3-27.
4. Ерошенко А.С., Волкова Т.В. Нематоды растений Дальнего Востока России. Отряды Tylenchida и Aphelenchida. - Владивосток: Дальнаука, 2005. - 227 с.
5. Ерошенко А.С. Новый вид мелойдодеры (Nematoda, Heteroderidae) из Приморского края // Паразитология. - 1978. - Т. 12. - №.5.- С. 456-459.
6. Казаченко И.П. Цистообразующие нематоды Дальнего Востока и борьба с ними. - - Владивосток, СССР, Дальнаука, 1993 – 77 с.
7. Кралль Э.Л., Кралль Х. К вопросу об эволюции паразитических взаимоотношений фитогельминтов семейства гетеродерид с их растениями-хозяевами // Сборник научных трудов Эстонской с-х академии. - 1970. – Т. 70. –С. 152-154.
8. Кралль Э.Л., Кралль Х. О принципах изучения филогенетических отношений у фитогельминтов рода *Heterodera* Schmidt, 1871 // Материалы VI Прибалтийской научной конференции по вопросам паразитологии. – 1973. – Вильнус – С. 85-88.
9. Кралль Э.Л., Кралль, Х.А. Перестройка системы фитонематод семейства Heteroderidae на основе трофической специализации этих паразитов и сопряженной эволюции их с растениями-хозяевами // Фитогельминтологические исследования. - Москва, СССР, Наука. - 1978.
10. Парамонов А.А. Основы фитогельминтологии. Т. 1. Москва: Наука, 1962. - 480 с.
11. Парамонов А.А. Основы фитогельминтологии. Т. 2. Таксономия фитонематод. М.: Наука, 1964 - 466 с. [1]
12. Парамонов А.А. Основы фитогельминтологии. Т. 3. Москва: Наука, 1970 - 256 с.
13. Рысс А.Ю. Основные направления эволюции паразитизма фитонематод отряда Aphelenchida Siddiqi, 1980 // Паразитология - 2007.- Т. 41 - №6. - С. 484-511.
14. Рысс А.Ю. Типы паразитизма фитонематод и проблема эволюции надсемейств Tylenchoidea и Hoplolaimoidea (Tylenchida) // Паразитологический сборник Зоологического института АН СССР, Ленинград – 1987 - Т. 34, С. 169–191.
15. Рысс А.Ю. Корневые паразитические нематоды семейства Pratylenchidae (Tylenchida) мировой фауны. Наука, Ленинград, 1988 - 368 с.

16. Скарбилович Т.С. Краткая система семейств, подсемейств и родов нематод отряда Tylenchida Thorne, 1949 // Бюллетень Всесоюзного института гельминтологии – 1980 – вып. 26 – С. 66-79.
17. Субботин С.А. Молекулярная филогения фитопаразитических нематод // В книге: *Паразитические нематоды растений и насекомых* (Сонин М.Д., Редактор). Москва, Наука. 2004. – С. 201-215.
18. Субботин С.А. Использование ПЦР для определения нематод. // В книге: *Прикладная нематология* (Зиновьева, С.В. и др. Редакторы). Наука, Россия - 2006.
19. Туркина А.Ю., Чижов, В.Н. Два новых вида нематод отряда Tylenchida (Nematoda) паразитов ольхи серой // *Зоологический журнал* - 1986. – вып. 65 – С. 620-624.
20. Тихонова, Л.В. Биологические и экологические особенности овсяной цистообразующей нематоды – *Heterodera avenae* (Wollenweber, 1924) Filipjev, 1934 // *Фитогельминтологические исследования*. М., СССР, Наука, 1978 - С. 136-146.
21. Филипьев И.Н. Нематоды вредные и полезные в сельском хозяйстве. Москва-Ленинград: ОГИЗ-СЕЛЬХОЗГИЗ, 1934 - 440 с.
22. Чижов В.Н., Березина Н.В. Строение и эволюция половой системы самок нематод отряда Tylenchida. 2. Первично дидельфные виды // *Зоологический журнал*. – 1988 – Т. 67 – С. 485-494.
23. Чижов В.Н., Кручина С.Н. Филогения нематод отряда Tylenchida (Nematoda) // *Зоологический журнал*. - 1988. – Т. 67. - С. 1282-1293.
24. Чижов В.Н., Кручина С.Н. Особенности становления различных форм фитопаразитизма и филогения нематод отряда Tylenchida (Nematoda) // *Труды Гельминтологической лаборатории*. - 1989 – Т. 37. - С. 174-195.
25. Чижов В.Н., Кручина С.Н. Система нематод отряда Tylenchida (Nematoda) // *Зоологический журнал*. – 1992 - Т. 71. - С. 5-16.
26. Чижов В.Н. Энтомопатогенные нематоды отряда Tylenchida (Nematoda) // В книге: Сонин М.Д. (Ред.). *Паразитические нематоды растений и насекомых*. Москва, Наука, 2004. – С. 277-293.
27. Чижов В.Н., Приданников, М.В., Субботин, С.А. Галловые нематоды семейства Meloidogynidae Skarbilovich, 1959 // В книге: *Фитопаразитические нематоды России* (Зиновьева, С.В. и Чижов, В.Н., Редакторы). КМК издание, Москва. 2012. – С. 89-118.
28. Чижов В.Н., Субботин С.А. Современные подходы к изучению филогенеза класса Nematoda // В книге: *Фитопаразитические нематоды России* (Зиновьева С.В. и Чижов В.Н., Редакторы). КМК издание, Москва. 2012. – С. 46-53.
29. Abidou, H., Valette, S., Gauthier, J.P., Rivoal, R., El-Ahmed, A., Yahyaoui, A. Molecular

- polymorphism and morphometrics of species of the *Heterodera avenae* group in Syria and Turkey // *Journal of Nematology* – 2005. – V. 37. – P. 146-154.
30. Adams B.J., Dillman A.R., Finlinson C. Molecular taxonomy and phylogeny in *Root-knot nematodes* / Perry, R.N., Moens, M., Starr, J.L. eds / - 2009. - CAB International, Wallingford, UK - P.119–138.
 31. Agudelo P., Robbins R.T., Stewart J.McD. & Szalanski A. Intraspecific variability of *Rotylenchulus reniformis* from cotton-growing regions in the United States // *Journal of Nematology* – 2005 – V.37. - P. 105-114.
 32. Al-Hazmi A.S., Cook R., Ibrahim A.A.M. Pathotype characterisation of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, in Saudi Arabia // *Nematology*. - 2001. – V. 3. – P. 379-382.
 33. Alenda C., Gallot-Legrand A., Fouville D., Grenier E. Sequence polymorphism of nematode effectors highlights molecular differences among the subspecies of the tobacco cyst nematode complex // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 2013. - V.84. – P. 107-114.
 34. Aleshin V.V., Kedrova O.S., Milyutina I.A., Vladychenskaya N.S., Petrov N.B. Relationships among nematodes based on analysis of 18S rDNA gene sequences: Molecular evidence for monophyly of chromadorian and secernentian nematodes // *Russian Journal of Nematology*. - 1998. – V.6. – P. 175–184.
 35. Alfaro M.E., Zoller S., Lutzoni F. Bayes or bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence // *Molecular Biology and Evolution*. - 2003. - V.20 – P. 255-266.
 36. Ali N., Tavoillot J., Mateille T., Chapuis E., Besnard G., El Bakkali A, Cantalapiedra-Navarrete C., Liébanas G., Castillo P., Palomares-Rius J.E. A new root-knot nematode *Meloidogyne spartelensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae) in Northern Morocco // *European Journal of Plant Pathology*. - 2015. – V.143 - P. 25–42.
 37. Alvarez-Ortega S., Brito J.A., Subbotin S.A. Multigene phylogeny of root-knot nematodes and molecular characterization of *Meloidogyne nataliei* Golden, Rose & Bird, 1981 (Nematoda: Tylenchida) // *Scientific Report*. – 2019 – V. 9 – P. 11788.
 38. Amiri S., Subbotin S.A., Moens M. Identification of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by PCR // *European Journal of Plant Pathology*. – 2002. – V. 108. – P. 497-506.
 39. Andersen S., Andersen, K. Suggestions for determination and terminology of pathotypes and genes for resistance in cyst-forming nematodes, especially *Heterodera avenae* // *EPPO Bulletin*. – 1982 - V.12 – P. 379–386.
 40. Andrassy I. *Evolution as a basis for the systematization of nematodes*. London, UK, Pitman Publishing, 1976 - 288 p.

41. Andrásy I. *Free-living nematodes of Hungary (Nematoda errantia)*. Vol. 2. In: C. Csuzdi & S. Mahunka (Eds.), *Pedozoologica Hungarica* No. 4. Hungarian Natural History Museum, Budapest, Hungary. - 2007. - P. 1-496
42. Anonymous. *Meloidogyne enterolobii* / *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. - 2014. – V. 44. - P. 159-163.
43. Anonymous. *Meloidogyne enterolobii* / *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. - 2016. – V. 46. – P. 190-201.
44. Archidona-Yuste A., Cantalapiedra-Navarrete C., Liébanas G., Rapoport H.F., Castillo P., Palomares-Rius J.E. Diversity of root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne* Göeldi, 1892 (Nematoda: Meloidogynidae) associated with olive plants and environmental cues regarding their distribution in southern Spain // *PLoS ONE*. – 2018. – V.13. - P. e0198236
45. Armstrong M.R., Blok V.C., Phillips M.S. A multipartite mitochondrial genome in the potato cyst nematode *Globodera pallida* // *Genetics*. – 2000 - V. 154. - P. 181–192.
46. Armstrong M.R., Husmeier D., Phillips M.S., Blok V.C. Segregation and recombination of a multipartite mitochondrial DNA in populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida* // *Journal of Molecular Evolution*. – 2007 - V. 64. - P. 689–701.
47. Babu B, Ochoa-Corona F.M. & Paret M.L. Recombinase polymerase amplification applied to plant virus detection and potential implications // *Analytical Biochemistry*. – 2018 - V. 546. – P. 72-77.
48. Baldwin J.G., Bell A.H. *Cactodera eremica* n. sp., *Afenestrata africana* (Luc *et al.*, 1973) n. gen., n. comb., and an emended diagnosis of *Sarisodera* Wouts and Sher, 1971 (Heteroderidae) // *Journal of Nematology*. - 1985. - V.17. - P. 187–201.
49. Baldwin J.G., Mundo-Ocampo, M. Heteroderinae, cyst and non-cyst-forming nematodes. // In: *Manual of agricultural nematology*. (Nickle, W.R., ed.) New York, NY, USA, Marcel Dekker Inc., 1991 - P. 275-362.
50. Baldwin J.G., Schouest Jr, L.P. Comparative detailed morphology of the Heteroderinae Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941, *sensu* Luc *et al.* (1988): Phylogenetic systematics and revised classification // *Systematic Parasitology*. - 1990. – V.15. - P. 81-106.
51. Baldwin J.G. Testing hypothesis of phylogeny in Heteroderidae. In: *Cyst Nematodes* / Lambert, F. & Taylor, C.E., Eds). New York & London, Plenum Press, 1986 - P. 75-100.
52. Baldwin J.G. Evolution of cyst and non-cyst-forming Heteroderinae // *Annual Review of Phytopathology*. - 1992. – V. 30. - P. 271-290.
53. Baldwin J.G., Bernard E.C., Mundo-Ocampo M. Four new species of Heteroderidae including *Ekphymatodera* n. gen. from California // *Journal of Nematology*. - 1989. - V.21. – P. 48-68.

54. Baldwin J.G., Nadler S.A., Adams, B.J. Evolution of plant parasitism among nematodes // *Annual Review of Phytopathology*. - 2004a. – V. 42. – P. 83-105.
55. Baldwin J.G., Ragsdale E.J., Bumbarger D. Revised hypotheses for phylogenetic homology of the stomatostylet in tylenchid nematodes // *Nematology*. - 2004b. – V. 7 – P. 623-632.
56. Bandelt H., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Molecular Biology and Evolution*. - 1999. – V. 16. - P. 37-48.
57. Bandelt H.J., Forster P., Sykes B.C., Richards M.B. Mitochondrial portraits of human populations using median networks // *Genetics*. - 1995. – V. 141. – P. 743-753.
58. Bekal S., Gauthier J.P., Rivoal R. Genetic diversity among a complex of cereal cyst nematodes inferred from RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer region // *Genome*. - 1997. – V. 40 – P. 479-486.
59. Bernard E.C. Three new species of Heteroderoidea (Nematoda) from the Aleutian Islands // *Journal of Nematology*. - 1981. – V. 13. - P. 499-513.
60. Bert W., Leliaert F., Vierstraete A.R., Vanfleteren J.R., Borgonie G. Molecular phylogeny of the Tylenchina and evolution of the female gonoduct (Nematoda: Rhabditida) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. - 2008. – V. 48. – P. 728-744.
61. Billoud B., Guerrucci M.A., Masselot M. & Deutsch J.S. Cirripede phylogeny using a novel approach: molecular morphometrics // *Molecular Biology and Evolution*. - 2000. – V.17. - P. 1435–1445.
62. Blaxter M.L., De Ley P., Garey J.R., Liu L.X., Scheldeman P., Vierstaete A., Vanfleteren J.R., Mackey L.Y., Dorris M., Frisse L.M., Vida J.T. & Thomas W.K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda // *Nature*. - 1998. – V. 392. – P. 71–75.
63. Blok V.C., Malloch G., Harrower B., Phillips M.S., Vrain T.C. Intraspecific variation in ribosomal DNA in populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida* // *Journal of Nematology*. - 1998. – V. 30. – P. 262–274.
64. Blok V.C., Phillips M.S., Fargette M. Comparison of sequence differences in the intergenic region of the ribosomal cistron of *Meloidogyne mayaguensis* and the major tropical root-knot nematodes // *Journal of Nematology*. - 1997. – V. 29. – P. 16-22.
65. Blok V.C., Wishart J., Fargette M., Berthier K., Phillips M.S. Mitochondrial DNA differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes // *Nematology*. - 2002. – V. 4. – P. 773-781.
66. Boucher A.C., Mimee B., Montarry J., Bardou-Valette S., Bélair G., Moffett P., Grenier E. Genetic diversity of the golden potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* and determination of the origin of populations in Quebec, Canada // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. - 2013. – V. 69. – P. 75–82.

67. Bouckaert R., Heled J., Kühnert D., Vaughan T., Wu C-H., Xie D., Suchard M.A., Rambaut A. & Drummond A.J. BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis // *PLoS Computational Biology*. - 2014. – V.10. – N.4. – P. e1003537.
68. Braun-Kiewnick A., Viaene N., Folcher L., Ollivier F., Anthoine G., Niere B., Sapp M., van de Vossen B., Toktay H., Kiewnick S. Assessment of a new qPCR tool for the detection and identification of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* by an international test performance study // *European Journal of Plant Pathology*. - 2016. – V. 144. – P. 97-108.
69. Braun-Kiewnick A., Kiewnick, S. Real-time PCR, a great tool for fast identification, sensitive detection and quantification of important plant-parasitic nematodes. *European Journal of Plant Pathology*. – 2018. - V.152. – P. 271–283.
70. Brito J., Powers T.O., Mullin P.G., Inserra R.N., Dickson D.W. Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida // *Journal of Nematology*. - 2004. – V. 36. - P. 232-240.
71. Brito J.A., Kaur R., Cetintas R., Stanley J.D., Mendes M.L., McAvoy E.J., Powers T.O., Dickson D.W. Identification and isozyme characterization of *Meloidogyne* spp. infecting horticultural and agronomic crops, and weed plants in Florida // *Nematology*. - 2008. – V.10. – P. 757-766.
72. Brito J.A., Subbotin S.A., Desaegeer J., Achinelly F., Qiu A. First report of the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) infecting hops (*Humulus lupulus*) in Florida, USA // *Journal of Nematology*. - 2018. – V. 50. – P. 543-544.
73. Brito J.A., Subbotin S.A., Han H., Stanley J.D., Dickson, D.W. Molecular characterization of *Meloidogyne christiei* Golden and Kaplan, 1986 (Nematoda, Meloidogynidae) topotype population infecting Turkey oak (*Quercus laevis*) in Florida // *Journal of Nematology*. - 2015. - V.47. – P. 169–175.
74. Brücher E. Über das Wildvorkommen des Nematodes *Heterodera rostochiensis* in Nord-Argentinien // *Naturwissenschaften*. - 1959. – V. 47. – P. 21.
75. Cantalapiedra-Navarrete, C., Navas-Cortés, J.A., Liébanas, G., Vovlas, N., Subbotin, S.A., Palomares-Rius, J.E., Castillo, P. Comparative molecular and morphological characterisations in the nematode genus *Rotylenchus*: *Rotylenchus paravitis* n. sp., an example of cryptic speciation // *Zoologischer Anzeiger*. – 2013. – V. 252. – P. 246-268.
76. Canto-Saenz, M. & de Scurrah, M.M. Races of the potato cyst nematode in the Andean region and a new system of classification // *Nematologica*. – 1977. – V.23. – P. 340–349.
77. Cares, J.E., Baldwin, J.G. Fine structure of sperm of *Ekphymatodera thomasoni* (Heteroderinae, Nematoda) // *Journal of Nematology*. – 1994. – V. 26. – P. 375-383.

78. Carranza S., Giribet G., Riberat C., Baguna J., Riutort M. Evidence that two types of 18S rDNA coexist in the genome of *Dugesia (Schmidtea) mediterranea* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) // *Molecular Biology and Evolution*. – 1996. – V.13. – P. 824-832.
79. Castagnone-Sereno P. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes // *Heredity*. – 2006. – V. 96. – P. 282–289.
80. Castagnone-Sereno P., Danchin E.G., Perfus-Barbeoch L., Abad, P. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era / *Annual Review of Phytopathology*. – 2013. – V. 51. – P. 203–220.
81. Castillo P. Vovlas N., Subbotin S., Troccoli A. A new root-knot nematode: *Meloidogyne baetica* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) parasitizing wild olive in Southern Spain // *Phytopathology*. – 2003a. – V.93. – P. 1093-1102.
82. Castillo P., Vovlas N. & Troccoli A. The reniform nematode, *Rotylenchulus macrosoma*, infecting olive in southern Spain // *Nematology*. – 2003b. – V.5. – P. 23-29.
83. Castillo P., Vovlas N., Troccoli A., Liébanas G., Palomares Rius J.E., Landa B.B. A new root-knot nematode, *Meloidogyne silvestris* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), parasitizing European holly in northern Spain // *Plant Pathology*. – 2009. – V. 58. – P. 606–619.
84. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis // *Molecular Biology and Evolution*. – 2000. – V.17. – P. 540–552.
85. Chawla M.L. Occurrence of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans* Cobb, 1913) on roots of mangosteen (*Garcinia mangostana*) // *Indian Journal of Nematology*. – 1980. – V.10. – P. 240-242.
86. Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T.J., Higgins D.G., Thompson J.D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – V. 31. – P. 3497-3500.
87. Chitambar J.J. *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback, 1983. – 2016. – <http://blogs.cdfa.ca.gov/Section3162/?p=2376>
88. Chitambo O., Haukeland S., Fiaboe K.K.M., Grundler F.M.W. African nightshade and African spinach decrease root-knot nematode and potato cyst nematode soil infestation in Kenya // *Plant Disease*. – 2019. – (in press).
89. Chitwood B.G. Root-knot nematodes. Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887 // *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. – 1949. – V. 16. – P. 90-104.
90. Chitwood B.G. The golden nematode of potatoes // USDA, Washington, D.C. *Circular*. – 1951. – V. 875. – 48 p.

91. Chitwood B.G., Birchfield, W. Citrus root nematode a native to Florida soils // *Plant Disease Reporter*. – 1957. – V. 41. – P. 525.
92. Chitwood B.G., Chitwood M.B. *An introduction to Nematology*. – Baltimore, Monumental Print Co. – 1950. – 213 p.
93. Chitwood B.G., Hannon C.J. & Esser R.P. A new nematode genus *Meloidodera* linking the genera *Heterodera* and *Meloidogyne* // *Phytopathology*. – 1956. – V. 46. – P. 364-366.
94. Chizhov V.N, Pridannikov M.V., Nasonova L.N. & Subbotin S.A. *Heterodera cruciferae* Franklin, 1945, parasite of *Brassica oleraceae* L. from floodland fields in the Moscow region, Russia // *Russian Journal of Nematology*. – 2009. – V.17. – P. 107-113.
95. Chizhov, V.N. Butorina N.N. & Subbotin S.A. Entomoparasitic nematodes of the genus *Skarbilovinema*: *S. laumondi* and *S. lyoni* (Nematoda: Tylenchida), parasites of the flies of the family Syrphidae (Diptera) with phylogeny of the suborder Hexatylnina // *Russian Journal of Nematology*. – 2012. – V. 20. – P. 141-155.
96. Cid Del Prado Vera I., Rowe, J.A. *Cactodera evansi* sp. n. and *Meloidodera astonei* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae) from Mexico // *International Journal of Nematology*. – 2000. – V. 10. – P. 159-168.
97. Cid del Prado Vera I., Subbotin S.A. A new cyst nematode, *Cactodera torreyanae* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae), parasitising romerito, *Suaeda torreyana*, in Texcoco, Mexico // *Nematology*. – 2014. – V. 16. – P. 163-174.
98. Cid Del Prado Vera I. Description of *Meloidodera mexicana* n. sp. (Nemata: Heteroderinae) with key to species // *Revue de Nématologie*. – 1991. – V. 14. – P. 537-542.
99. Cid Del Prado Vera I., Lownsbery B.F., Maggenti, A.R. *Rhizonema sequoiae* n. gen, n. sp. from coast redwood *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. // *Journal of Nematology*. – 1983. – V. 15. – P. 460-467.
100. Cobb N.A. Notes on *Mononchus* and *Tylenchulus* // *Journal of the Academy of Sciences*. – 1913. – V. 3. – P. 217-230.
101. Cohn E., Mordechai M. Uninucleate giant cell induced in soybean by the nematode *Rotylenchulus macrodoratus* // *Phytoparasitica*. – 1977. – V. 5. – P. 85-93.
102. Conant G.C., Lewis P.O. Effects of nucleotide composition bias on the success of the parsimony criterion in phylogenetic inference // *Molecular Biology and Evolution*. – 2001. – V. 18. – P. 1024-1033.
103. Cook R., Noel G.R. Cyst nematodes: *Globodera* and *Heterodera* species. // Starr J.L., Cook R., Bridge J. (eds). Plant resistance to parasitic nematodes. – Wallingford, UK, CABI Publishing, 2002. – p. 71-105.

104. Cook R., Rivoal R. Genetics of resistance and parasitism. // Sharma, S.B. (ed.). *The Cyst Nematodes*. London, UK, Chapman and Hall, 1998. – P. 322-352.
105. Coolen, W.A. Methods for extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. // Lamberti F., Taylor C.E. (eds). *Root-knot nematodes (Meloidogyne species)*. Systematics, biology, and control. New York, NY, USA, Academic Press, 1979. – P. 317-329.
106. Coomans A. General principles of systematics with particular reference to speciation // Lamberti F. & Taylor C.E. (eds). *Root knot nematodes (Meloidogyne species)*. Systematics, biology and control. London, UK, Academic Press, 1979 – P. 1-19.
107. Cote C.A., Greer C.L., Peculis B.A. Dynamic conformation model for the role of ITS2 in pre-rRNA processing in yeast // *RNA*. – 2002. – V.8. – P. 786–797.
108. Cowling R.M., Proches S., Partridge T.C. Explaining the uniqueness of the Cape flora: incorporating geomorphic evolution as a factor for explaining its diversification // *Molecular Phylogenetic and Evolution*. – 2009. – V.51. – P. 64-74.
109. Cowling R.M., Heijnis C.E. The identification of broad habitat units as biodiversity entities for a systematic conservation planning in the Cape Floristic Region // *South African Journal of Botany*. – 2001. – V. 67. – P. 15–38.
110. Craw P., Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review // *Lab Chip*. – 2012. – V. 12. – P. 2469-2486.
111. Cui J.K., Huang W.K., Peng H., Liu S.M., Wang G.F., Kong L.A., Peng D.L. A new pathotype characterization of Daxing and Huangyuan populations of cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) in China // *Journal of Integrative Agriculture*. – 2015. – V. 14. – P. 724–731.
112. Da Silva Mattos V., Cares J.E, Gomes C.B, Gomes A.C.M.M., Monteiro J. da M. dos S., Gomez G.M, Castagnone-Sereno P., Carneiro R.M.D.G. Integrative taxonomy of *Meloidogyne oryzae* (Nematoda: Meloidogyninae) parasitizing rice crops in Southern Brazil // *European Journal of Plant Pathology*. – 2018. – V. 151. – P. 649–662.
113. Daher R.K., Stewart G., Boissinot M. & Bergeron M.G. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications // *Clinical Chemistry*. – 2016. – V. 62. – P. 947-958.
114. Dandurand L.M., Zasada I.A., Wang X., Mimee B., De Jong W., Novy R., Whitworth J., Kuhl, J.C. Current status of potato cyst nematodes in North America // *Annual Review of Phytopathology*. – 2019. – V.57. – P. 117-133.
115. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D.. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // *Nature Methods*. – 2012. – V.9. – P. 772.
116. Darty K., Denise A. & Ponty Y. VARNA: interactive drawing and editing of the RNA secondary structure // *Bioinformatics*. – 2010. – V.25. – P. 1974-1975.

117. Dasgupta D.R., Raski D.J., Sher S.A. A revision of the genus *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940 (Nematoda: Tylenchidae) // *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. – 1968. – V. 35. – P. 169-192.
118. De Ley I.T., Karssen G., De Ley, P., Vierstraete, A., Waeyenberge, L., Moens, M. & Vanfleteren, J. Phylogenetic analyses of internal transcribed spacer region sequences within *Meloidogyne* // *Journal of Nematology*. – 1999. – V.31. – P. 530–531.
119. De Ley P., Blaxter M.L. Systematic position and phylogeny. // Lee, D.L. (ed.) *The biology of nematodes*. London, UK, Taylor & Francis, 2002. – P. 1-30.
120. Decraemer, W., Hunt, D.J. Structure and classification. // Perry R.N., Hunt D.J. (eds.) *Plant Nematology*, 2nd Edition Wallington, CAB International, 2013. – P. 3-39.
121. Deng Y.F., Xu H.B., Tian Z.L., Zheng J.W. Interindividual variability of internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA in *Rotylenchulus reniformis* // *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*. – 2015. – V.41. – P. 252- 260.
122. Denver D.R., Morris K., Lynch M., Vassilieva L.L., Thomas W.K. High direct estimate of the mutation rate in the mitochondrial genome of *Caenorhabditis elegans* // *Science*. – 2000. – V. 289. – P. 2342-2344.
123. Derycke S., Vanaverbeke J., Rigaux A., Backeljau T., Moens, T. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes // *PLoS ONE*. – 2010. – V.5. – e13716.
124. Dow R.L., Inserra R.N., Esser R.P., Langdon K.R. Distribution, hosts, and morphological characteristics of *Tylenchulus palustris* in Florida and Bermuda // *Supplement to Journal of Nematology*. – 1990. – V.4S – P. 724-728.
125. Eisenback J.D., Reaver D. First report of the nematode, *Tylenchulus palustris*, parasitizing peach in Virginia // *Plant Disease*. – 2007. – V. 91. – P. 1683.
126. Ekim T., Güner A. The Anatolian Diagonal: fact or fiction? // *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biological Sciences*. – 1989. – V. 86. –P. 69-77.
127. Eroshenko A.S., Subbotin S.A., Kazachenko I.P. *Heterodera vallicola* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae) from elm trees, *Ulmus japonica* in the Primorsky territory, the Russian Far East, with rDNA identification of closely related species // *Russian Journal of Nematology* – 2001. – V.9. – P. 9-17.
128. Escobar-Avila I.M., Lopez-Villegas E.O., Subbotin S.A., Tovar-Soto, A. First report of carrot cyst nematode *Heterodera carotae* in Mexico: morphological, molecular characterization, and host range study // *Journal of Nematology*. – 2018. – V. 50. – P. 229-242.
129. Escobar-Avila I.M., Cruz-Alvarado Y., Tovar-Soto A., Subbotin, S.A. First report of sugar beet cyst nematode, *Heterodera schachtii* on beetroot and broccoli in Mexico // *Plant Disease*, –

2019. – V. 103. – P. 1434.
130. Escobar-Avila I.M., Subbotin S.A., Tovar-Soto, A. *Cactodera solani* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), a new species of cyst-forming nematode parasitising tomato in Mexico // *Nematology*. – 2020. – (in press).
 131. Esser R.P. *Verutus volvingentis* n. gen. n. sp. (Heteroderidae: Tylenchida) in Verutinae n. subf., a phytoparasitic nematode infesting buttonweed in Florida // *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. – 1981. – V. 48. – P. 220-240.
 132. Evans K., Rowe, J.A. Distribution and economic importance. // S.B. Sharma (ed.) *The Cyst Nematodes*. Kluwer Academic, Dordrecht, 1998. – P. 1–30.
 133. Evans K., Franco J., de Scurrah M.M. Distribution of species of potato cyst-nematodes in South America // *Nematologica*. – 1975. – V. 21. – P. 365–369.
 134. Ferris V.R. Evolution, phylogeny and systematics. // S.B. Sharma (ed.) *The Cyst Nematodes*. Kluwer Academic, Dordrecht, 1998. – P. 57– 82.
 135. Ferris V.R. Cladistic approaches in the study of soil and plant parasitic nematodes // *American Zoologist*. – 1979. – V. 19. – P. 1195-1215.
 136. Ferris V.R. Evolution and biography of cyst-forming nematodes // *OEPP Bulletin*. – 1985. – V. 15. – P. 123–129.
 137. Ferris V.R., Ferris J.M., Faghihi J. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes // *Fundamental and Applied Nematology*. – 1993. – V. 16. – P. 177–184.
 138. Ferris V.R., Ferris J.M., Faghihi J., Ireholm A. Comparisons of isolates of *Heterodera avenae* using 2-D PAGE protein patterns and ribosomal DNA // *Journal of Nematology*. – 1994. – V. 26. – P. 144-151.
 139. Ferris V.R., Miller L.I., Faghihi J., Ferris J.M. Ribosomal DNA comparisons of *Globodera* from two continents // *Journal of Nematology*. – 1995. – V. 27. – P. 273–283.
 140. Ferris V.R., Sabo A., Baldwin J.G., Mundo-Ocampo M., Inserra R.N. & Sharma S. Phylogenetic relationships among selected Heteroderoidea based on 18S and ITS ribosomal DNA // *Journal of Nematology*. – 2004. – V. 36. – P. 202-206.
 141. Ferris V.R., Subbotin S.A., Ireholm A., Spiegel Y., Faghihi J., Ferris J.M. Ribosomal DNA sequence analysis of *Heterodera filipjevi* and *H. latipons* isolates from Russia and comparisons with other nematode isolates // *Russian Journal of Nematology*. – 1999. – V. 7. – P. 121-125.
 142. Filipjev I.N. The classification of the free-living nematodes and their relation to parasitic nematodes // *Smithsonian Miscellaneous Collection*. – 1934. – V. 89, – P. 1-63.

143. Franco J., Evans K. Multiplication of some South American and European populations of potato cyst nematodes on potatoes possessing the resistance genes H₁, H₂ and H₃ // *Plant Pathology*. – 1978. – V. 27. – P. 1-6.
144. Franco J. Studies on the taxonomy and biology of potato cyst-nematodes *Globodera* spp. Mulvey and Stone 1976. PhD. Thesis. University of London, 1977.
145. Franco N.F., Cid del Prado Vera I., Lamothe-Argumedo R. *Globodera bravoae* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae) from Mexico // *International Journal of Nematology*. – 2000. – V. 10. – P. 169-176.
146. Fu B., Yuan H.X., Zhang Y, Hou X.S., Nian G.L., Zhang P., Xing X.P., Sun B.J., Riley I.T. & Li H.L. Molecular characterisation of cereal cyst nematodes in winter wheat on the Huang-Huai floodplain of China using RFLP and rDNA-ITS sequence analyses // *Australasian Plant Pathology*. – 2011. – V. 40. – P. 277-285.
147. Fuentes C.C., Cid del Prado Vera I., Zavaleta-Mejia E. Pathogenicity of *Meloidodera mexicana* to *Capsicum annuum* and evaluation of its host range // *International Journal of Nematology*. – 1997. – V. 7. – P. 174-177.
148. Gäbler C., Sturhan D., Subbotin S.A., Rumpfenhorst H.J. *Heterodera pratensis* sp. n., a new cyst nematode of the *H. avenae* complex (Nematoda: Heteroderidae) // *Russian Journal of Nematology*. – 2000. – V. 8. – P. 115-126.
149. Gatesy J., DeSalle R., Wheeler W. Alignment-ambiguous nucleotide site and the exclusion of systematic data // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 1993. – V. 2. – P. 152–157.
150. Geraert E. The systematic position of the families Tylenchidae and Criconematidae // *Nematologica*. – 1966. – V. 12. – P. 362-368.
151. Geric Stare, B., Sirca, S. & Urek, G. Are we ready for the new nematode species of the *Globodera* genus? // Trdan S., Macek, J. (eds.) *Lectures and papers presented at the Slovenian conference on plant protection with international participation (and round table of risks reduction in phyto-pharmaceutical products use in the frame of cropsustain project)*, Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije (Plant Protection Society of Slovenia), 2013. – P. 144-150.
152. Germani G. Caractères morpho-biométriques de trois espèces ouest-africaines de *Rotylenchulus* Linford&Oliveira, 1940 (Nematoda: Tylenchida) // *Revue de Nématologie*. – 1978. – V. 1. – P. 241- 250.
153. Gibson T., Blok V.C., Phillips M.S., Hong G., Kumarasinghe D., Riley I.T. & Downton M. The mitochondrial subgenomes of the nematode *Globodera pallida* are mosaics: evidence of

- recombination in an animal mitochondrial genome // *Journal of Molecular Evolution*. – 2007a. – V. 64. – P. 463–471.
154. Gibson T., Blok V.C., Dowton M. Sequence and characterization of six mitochondrial subgenomes from *Globodera rostochiensis*: multipartite structure is conserved among close nematode relatives // *Journal of Molecular Evolution*. – 2007b. – V. 65. – P. 308-315.
155. Gibson T., Farrugia D., Barrett J., Chitwood D.J., Rowe J., Subbotin S.A., Dowton M. The mitochondrial genome of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* // *Genome*. – 2011. – V. 54. – P. 565–574.
156. Goldman N., Anderson J.P., Rodrigo A.G. Likelihood-based tests of topologies in phylogenetics // *Systematic Biology*. – 2000. – V. 49. – P. 652-670.
157. Goldstein P., Triantaphyllou A.C. The synaptonemal complex of *Meloidogyne nataliei* and its relationship to that of other *Meloidogyne* species // *Chromosoma*. – 1986. – V. 93. – P. 261–266.
158. Grenier E., Bossis M., Fouville D., Renault L., Mugniery D. Molecular approaches to the taxonomic position of Peruvian potato cyst nematodes and gene pool similarities in indigenous and imported populations of *Globodera* // *Heredity*. – 2001. – V. 86. – P. 277-290.
159. Grenier E., Fournet S., Petit E., Anthoine G. A cyst nematode ‘species factory’ called the Andes // *Nematology*. – 2010. – V. 12. – P. 163-169.
160. Gunderson J.H., Sogin M.L., Wollet G., Hollingdale M., de la Cruz V.F., Waters A.P., McCutchan, T.F. Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in *Plasmodium* / *Science*. – 1987. – V. 238. – P. 933-937.
161. Haag-Liautard C., Coffey N., Houle D., Lynch M., Charlesworth B., Keightley P.D. Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster* // *PLoS Biology*. – 2008. – Aug 6(8). – e204.
162. Haddadi F., Mokabli A., Smiley R.W. Characterisation of virulence reactions for *Heterodera avenae* populations from two localities in Algeria // *Phytoparasitica*. – 2013. – V. 41. – P. 449-456.
163. Hallmann J., Subbotin S.A. Methods for Extraction, Processing and Detection of Plant and Soil Nematodes. In: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. 3rd Edition. (Sikora R.A., Coyne D.L., Hallmann J., Timper P., Editors). CABI, UK. 2018.
164. Handoo Z., Carta L., Skantar A.M., Chitwood D.J. Description of *Globodera ellingtonae* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) from Oregon // *Journal of Nematology*. – 2012. – V. 44. – P. 40-57.
165. Handoo Z.A., Subbotin, S.A. Taxonomy, Identification and Principal Species. In: *Cyst Nematodes*. // Perry, R.N., Moens, M. & Jones, J.T., (eds.) CAB International, UK, 2018. – P. 365-397.

166. Hasegawa M., Kishino H., Yano, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // *Journal of Molecular Evolution*. – 1985. – V. 22. – P. 160-174.
167. Hashim Z. Description of *Trophotylenchulus saltensis* n. sp. with a comment on the status of *Trophotylenchulus* Raski, 1957 and a proposal for *Ivotylenchulus* n. gen. (Nematoda: Tylenchida) // *Revue de Nématologie*. – 1983. – V. 6. – P. 179-186.
168. Hazzi N.A., Moreno J.S., Ortiz-Movliav C., Palacio R.D. Biogeographic regions and events of isolation and diversification of the endemic biota of the tropical Andes // *PNAS*. – 2018. – V. 113. – N. 31. – P. 7985–7990.
169. He X.F., Peng H., Ding Z., He W.T., Huang W.K., Peng D.L. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of *Meloidogyne enterolobii* directly from infected plants // *Scientia Agricultura Sinica*. – 2013. – V. 46. – P. 534-544.
170. He Y., Subbotin S.A., Rubtsova T.V., Lamberti F., Brown D.J.F., Moens M., A molecular phylogenetic approach to Longidoridae (Nematoda: Dorylaimida) // *Nematology*. – 2005. – V. 7. – P. 111–112.
171. Heald C. Histopathology of okra and ridge-seed spurge infected with *Meloidodera charis* // *Journal of Nematology*. – 1984. – V. 16. – P. 105-108.
172. Hockland S., Niere B., Grenier E., Blok V., Phillips M., den Nij L., Anthoine G., Pickup J., Viane N. An evaluation of the implications of virulence in non-European populations of *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* for potato cultivation in Europe // *Nematology*. – 2012. – V.14. – P. 1-13.
173. Holterman M., Van der Wurff A., Van den Elsen S., Van Megen H., Bongers T., Holovachov O., Bakker J., Helder J. Phylum-wide Analysis of SSU rDNA Reveals Deep Phylogenetic Relationships Among Nematodes and Accelerated Evolution Toward Crown Clades / *Molecular Biology and Evolution*. – 2006. – V. 23. – P. 1792-1800.
174. Holterman M., Karssen G., van den Elsen S., Van Megen H., Bakker J. & Helder J. Small subunit rDNA-based phylogeny of the Tylenchida sheds light on relationships among some high-impact plant-parasitic nematodes and the evolution of plant feeding // *Phytopathology*. – 2009. – V. 99. – P. 227–235.
175. Hoolahan A.H., Blok V.C., Gibson T., Dowton, M. Paternal leakage of mitochondrial DNA in experimental crosses of populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida* // *Genetica*. – 2011. – V. 139. – P. 1509-1519.
176. Hoolahan A.H., Blok V.C., Gibson T., Dowton M. Evidence of animal mtDNA recombination between divergent populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida* // *Genetica*. – 2012a. – V. 140. – P. 19–29.

177. Hoolahan A.H., Blok V.C., Gibson T., Downton M. A comparison of three molecular markers for the identification of populations of *Globodera pallida* // *Journal of Nematology*. – 2012b. – V. 44. – P. 7–17.
178. Howe D.K., Baer C.F., Denver, D.R. High rate of large deletions in *Caenorhabditis briggsae* mitochondrial genome mutation processes // *Genome Biology and Evolution*. – 2010. – V. 2. – P. 29-38.
179. Hudelot C., Gowri-Shankar V., Jow H., Rattray M., Higgs P.G. RNA-based phylogenetic methods: application to mammalian mitochondrial RNA sequences // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2003. – V. 28. – P. 241–252.
180. Hugall A., Stanton J., Moritz C. Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *Meloidogyne* // *Molecular Biology and Evolution*. – 1999. – V. 16. – P. 157–164.
181. Humphreys-Pereira D.A., Elling A.A. Mitochondrial genomes of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. incognita* (Nematoda: Tylenchina): Comparative analysis, gene order and phylogenetic relationships with other nematodes / *Molecular Biochem. Parasitology*. – 2014. – V. 194. – P. 20–32.
182. Imren M., Toktay H., Bozbuga R., Dababat A., Elekçioğlu I.H. Pathotype determination of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae* (Wollenweber, 1924) in the Eastern Mediterranean Region in Turkey // *Turkish Journal of Entomology*. – 2013. – V. 37. – P. 13-19.
183. Imren M., Waeyenberge L., Viane N., Elekçioğlu I.H., Dababat A. Morphological and molecular identification of cereal cyst nematodes from the eastern Mediterranean region of Turkey // *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. – 2015. – V. 39. – P. 91-98.
184. Inserra R.N., Vovlas N. Cystoid nematodes and their economic importance // *Nematology Circular*. – 1986. – V. 128. –P 1-4.
185. Inserra R.N., Vovlas N., O'Bannon J.H., Esser R.P. *Tylenchulus graminis* n. sp. and *T. palustris* n. sp. (Tylenchulidae) from native flora of Florida, with notes on *T. semipenetrans* and *T. furcus* // *Journal of Nematology*. – 1988a. – V. 20. – P. 266-287.
186. Inserra R.N., O'Bannon J.H., Langdon K.R., Keen W.M. Hosts of *Tylenchulus graminis* and *T. palustris*. // *Nematology Circular*. – 1988b. – V. 154, Florida Department of Agriculture & Consumer Services, Division of Plant Industry – P. 1-4.
187. Inserra R.N., Esser R.P. & O'Bannon J.H. Identification of *Tylenchulus* species from Florida / *Nematology Circular*. – 1988c. – V. 153, Florida Department of Agriculture & Consumer Services, Division of Plant Industry – P. 1-4.
188. Inserra R.N., Vovlas N. & Di Vito M. Identification of second-stage juveniles of *Tylenchulus* spp. on the basis of posterior body morphology // *Nematropica*. – 1994. – V. 24. – P. 25-33.

189. Inserra R.N., Vovlas N. & O'Bannon J.H. A classification of *Tylenchulus semipenetrans* biotypes // *Journal of Nematology*. – 1980. – V. 12. – P. 283-287.
190. Inserra R.N., Vovlas N., Nyczepir A.P., Wehunt E.J., Golden A.M. *Tylenchulus palustris* parasitizing peach trees in the United States // *Journal of Nematology*. – 1990. – V. 20, – P. 45-55.
191. James A., Macdonald J. Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. – 2015. – V. 15. – P. 1475-1489.
192. Janssen T., Karssen G., Topalović O., Coyne D., Bert W. Integrative taxonomy of root-knot nematodes reveals multiple independent origins of mitotic parthenogenesis // *PLoS ONE*. – 2017. – V. 12. – e0172190.
193. Janssen T., Karssen G., Verhaeven M., Coyne D., Bert W. Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution // *Scientific Reports*, – 2016. – March 4 – V. 6. – 22591.
194. Jepson S.B. Identification of root-knot nematode (*Meloidogyne* species) (CAB International, Wallingford, UK, 1987.
195. Katsuta A., Toyota K., Min Y.Y., Maung T.T. Development of real-time PCR primers for the quantification of *Meloidogyne graminicola*, *Hirschmanniella oryzae* and *Heterodera cajani*, pests of the major crops in Myanmar // *Nematology*. – 2016. - V.18. – P. 257–263.
196. Kiani M., Mohammadi S., Babaei A., Sefidkon F., Naghavi M.R., Ranjbar M., Razavi S.A., Saeidi K., Jafari H., Asgari D., Potter, D. Iran supports a great share of biodiversity and floristic endemism for *Fritillaria* spp. (Liliaceae): A review // *Plant Diversity*. – 2017. – V. 39. – P. 245-262.
197. Kiewnick S., Dessimoz M., Franck L. Effects of the *Mi-1* and the *N* root-knot nematode-resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars // *Journal of Nematology*. – 2009. – V. 41. – P. 134-139.
198. Kiewnick S., Holterman M., van den Elsen S., van Megen H., Frey J.E., Helder J. Comparison of two short DNA barcoding loci (COI and COII) and two longer ribosomal DNA genes (SSU & LSU rRNA) for specimen identification among quarantine root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and their close relatives // *European Journal of Plant Pathology*. – 2014. – V.140. – P. 97–110.
199. Kiewnick S., Jürg E., Frey J.E., Braun-Kiewnick A. Development and validation of LNA-based quantitative Real-Time PCR assays for detection and identification of the root-knot nematode

- Meloidogyne enterolobii* in complex DNA backgrounds // *Phytopathology*. – 2015. – V. 105. – P. 1245-1249.
200. Kjer K.M. Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 1995. – V.13. – P. 314–330.
201. Kjer K.M. Aligned 18S and insect phylogeny // *Systematic Biology*. – 2004. – V. 53. – P. 506–514.
202. Knoetze R., Swart, A. A survey of the Cape Floristic Region of South Africa for the presence of cyst nematodes (Nematoda: Heteroderidae) // *Zootaxa*. – 2014. – V. 3893. – P. 429-437.
203. Knoetze R., Malan A.P., Mouton, C. Differentiation of South African potato cyst nematodes (PCN) by analysis of the rDNA internal transcribed spacer region // *African Plant Protection*. – 2006. – V.12. – P. 103-110.
204. Knoetze R., Swart A., Tiedt L.R. Description of *Globodera capensis* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) from South Africa // *Nematology*. – 2013. – V. 15. – P. 233–250.
205. Knoetze R., Swart A. Wentzel R., Tiedt L.R. Description of *Globodera agulhasensis* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) from South Africa // *Nematology*. – 2017a. – V. 19. – P. 305-322.
206. Knoetze R., Swart A. Wentzel R., Tiedt L.R. Description of *Globodera sandveldensis* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) from South Africa // *Nematology*. – 2017b. – V. 19. – P. 805-816.
207. Krall E. Different approaches to and recent developments in the systematics and co-evolution of the family Heteroderidae (Nematoda: Tylenchida) with host plants // *Proc. Eston. Acad. Sci. Biol.* – 1990. – V. 39. – P. 259–270.
208. Landa B.B., Palomares-Rius J.E., Vovlas N., Carneiro R.M.D.G., Maleita C.M.N., Abrantes I.M.O., Castillo P. Molecular characterization of *Meloidogyne hispanica* (Nematoda, Meloidogynidae) by phylogenetic analysis of genes within the rDNA in *Meloidogyne* spp. // *Plant Disease*. – 2008. – V.92. – P. 1104–1110.
209. Lau H.Y., Wang Y.L., Wee E.J.H., Botella J.R., Trau M. Field demonstration of a multiplexed point-of-care diagnostic platform for plant pathogens / *Analytical Chemistry*. – 2016. – V. 88. – P. 8074-8081.
210. Lax P., Manduric S., Doucet M.E., Gallardo C., de L'Argentier S.M. Primera cita del nematodo blanco del quiste de la papa, *Globodera pallida*, en Argentina continental // XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. III Taller Argentino de Fitopatología. Córdoba, Argentina. 2005.
211. Lax P., Rondan Dueñas J.C., Franco-Ponce J., Gardenal C.N., Doucet, M.E. Morphology and DNA sequence data reveal the presence of *Globodera ellingtonae* in the Andean region // *Contributions to Zoology*. – 2014. – V. 83. – P. 227-243.

212. Leach M., Agudelo P., Lawton-Rauh A. Genetic variability of *Rotylenchulus reniformis* // *Plant Disease*. – 2012. – V. 96. – P. 30-36.
213. Lehman P.S., Inserra, R.N. Morphometric variations of *Rotylenchulus parvus* and *Rotylenchulus reniformis* populations in the southern United States // *Soil and Crop Science Society of Florida Proceedings*. – 1990. – V. 40. – P. 220-226.
214. Li H.X., Peng H., Peng D.L., Zhu R.D., Xu P.G., Li J.P. Identification of cyst nematode in alpine meadow steppe, Gansu // *Acta Prataculturae Sinica*. – 2015. – V. 24. – P. 174-180.
215. Liu G.K., Chen J., Xiao S., Zhang S.S., Pan, D.M. Development of species-specific PCR primers and sensitive detection of the *Tylenchulus semipenetrans* in China // *Agricultural Sciences in China*. – 2011. – V. 10, – P. 252-258.
216. Londoño M.A, Harmon C.L., Polston J.E. Evaluation of recombinase polymerase amplification for detection of begomoviruses by plant diagnostic clinics // *Virology Journal*. – 2016. V. 13, – P. 48.
217. Long H., Liu H., Xu J.H. Development of a PCR diagnostic for the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* // *Acta Phytopathologica Sinica*. – 2006. – V. 36. – P. 109-115.
218. Loof P.A.A., Oostenbrink M. *Rotylenchulus borealis* n. sp. with a key to the species of *Rotylenchulus* // *Nematology*. – 1962. – V. 7. – P. 83-90.
219. Luc M. A reappraisal of Tylenchina (Nemata). 7. The family Pratylenchidae Thorne, 1949 // *Revue de Nématologie*. – 1987. – V. 10. – P. 203-218.
220. Luc M., Maggenti A.R., Fortuner R. A reappraisal of Tylenchina (Nemata). 9. The family Heteroderidae Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 // *Revue de Nématologie*. – 1988. – V. 11. – P. 159-176.
221. Luc M., Maggenti A.R., Fortuner R., Raski D.J., Geraert E. A reappraisal of Tylenchina (Nemata). 1. For a new approach to the taxonomy of Tylenchina // *Revue de Nématologie*. – 1987. – V. 10. – P. 127-134.
222. Luebert F., Weigend M. Phylogenetic insights into Andean plant diversification // *Frontiers in Ecology and Evolution*. – 2014. – V. 19. – fevo.2014.00027
223. Lunt D.H. Genetic tests of ancient asexuality in root knot nematodes reveal recent hybrid origins // *BMC Evol Biol*. – 2008. – V. 8. – P. 194.
224. Ma H., Overstreet R.M., Subbotin S.A. ITS2 secondary structure and phylogeny of cyst-forming nematodes of the genus *Heterodera* (Tylenchida: Heteroderidae) // *Organisms, Diversity & Evolution*. – 2008. – V.8. – P. 182-193.
225. Madani M., Subbotin S.A., Moens M. Quantitative detection of the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, and the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using Real-Time PCR with SYBR green I dye // *Molecular and Cellular Probes*. – 2005. –V. 29. – P. 81-86.

226. Madani M., Subbotin S.A., Ward L.J., Li X. & De Boer S.H. Molecular characterization of Canadian populations of potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* using ribosomal nuclear RNA and cytochrome *b* genes // *Canadian Journal of Plant Pathology*. – 2010. – V.32. – P. 252-263
227. Madani M., Vovlas N., Castillo P., Subbotin S.A., Moens M. Molecular characterization of cyst nematode species (*Heterodera* spp.) from the Mediterranean basin using RFLPs and sequences of ITS-rDNA // *Journal of Phytopathology*. – 2004. – V.152. – P. 229-234.
228. Madani M., Kyndt T., Colpaert N., Subbotin S.A., Gheysen G., Moens M. Polymorphism among sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii* populations as inferred from AFLP and ITS rRNA gene analyses // *Russian Journal of Nematology*. – 2007. – V. 15. – P. 117-128.
229. Maddison W.P., Maddison D.R. MacClade analysis of phylogeny and character evolution. Version 3.07. Sinauer, Sunderland, MA. 1993.
230. Maggenti A.R. The production of the gelatinous matrix and its taxonomic significance in *Tylenchulus* (Nematoda: Tylenchulinae) // *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. – 1962. – V. 29. – P. 139-144.
231. Maggenti A.R. Nemic relationships and the origins of plant parasitic nematodes. // Zuckerman M., Mai W.F., Rohde, R.A. (eds). *Plant parasitic nematodes*, New York, London, Academic Press, 1971. – P. 65-81.
232. Maggenti, A.R. *General nematology*. New York, Heidelberg & Berlin, Springer Verlag, 1981 – P. 1-372.
233. Maggenti A.R., Luc M., Raski D.J., Fortuner R., Geraert E. A reappraisal of Tylenchina (Nemata). 2. Classification of the suborder Tylenchina (Nemata: Diplogasteria) // *Revue de Nématologie*. – 1987. – V. 10. – P. 135-142.
234. Marché L., Valette S., Grenier E., Mugniéry D. Intra-species DNA polymorphism in the tobacco cyst-nematode complex (*Globodera tabacum*) using AFLP // *Genome*. – 2001. – V. 44. – P. 941-946.
235. Mathews H.J.P. Two new species of cyst nematode, *Heterodera mani* n. sp. and *H. iri* n. sp., from Northern Ireland // *Nematologica*. – 1971. – V. 17. – P. 553-565.
236. McClure M.A., Nischwitz C., Skantar A.M., Schmitt M.E., Subbotin S.A. Root-knot nematodes in golf course greens of the western United States // *Plant Disease*. – 2012. – V. 96. – P. 635–647.
237. Meagher J.W. World dissemination of the cereal-cyst nematode (*Heterodera avenae*) and its potential as a pathogen of wheat // *Journal of Nematology*. – 1977. – V. 9. – P. 9-15.
238. Meldal B.H.M., Debenham N.J., De Ley P., Tandingan De Ley I., VanXeteren J.R., Vierstraete A.R., Bert W., Borgonie G., Moens T., Tyler P.A., Austen M.C., Blaxter M.L., Rogers A.D.,

- Lambshhead P.J.D. An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2007. – V. 42. – P. 622–636.
239. Miles T.D., Martin F.N., Coffey M.D. Development of rapid isothermal amplification assays for detection of *Phytophthora* spp. in plant tissue // *Phytopathology*. – 2015. – V. 105. – P. 265-278.
240. Mokabli A., Valette S., Gauthier J.-P., Rivoal R. Variation in virulence of cereal cyst nematode populations from north Africa and Asia // *Nematology*. – 2002. – V. 4. – P. 521-525.
241. Molnar R.I., Bartelmes G., Dinkelacker I., Witte H., Sommer R.J. Mutation rates and intraspecific divergence of the mitochondrial genome of *Pristionchus pacificus* // *Molecular Biology and Evolution*. – 2011. – V. 28. – P. 2317-2326.
242. Mor M., Sturhan, D. On the identity of *Heterodera latipons* Franklin // *Nematology*. – 2000. – V. 2. – P. 776-777.
243. Mor M., Cohn E., Spiegel Y. Phenology, pathogenicity and pathotypes of cereal cyst nematodes, *Heterodera avenae* Woll. and *H. latipons* (Nematoda: Heteroderidae) in Israel // *Nematologica*. – 1992. – V. 38. – P. 494-501.
244. Morrison D. & Ellis J. Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: A case study of 18S rDNAs of Apicomplexa // *Molecular Biology and Evolution*. – 1997. – V. 14, – P. 428–441.
245. Morrone J.J. *Evolutionary biography of the Andean region*. CRC press, Taylor & Francis Group, USA, 2018. – P. 1-250.
246. Mulvey R.H., Golden A.M. An illustrated key to the cyst-forming genera and species of Heteroderidae in the Western hemisphere with species morphometrics and distribution // *Journal of Nematology*. – 1983. – V. 15. – P. 1–59.
247. Mundo-Ocampo M., Troccoli A., Subbotin S.A., Del Cid J., Baldwin J.G., Inserra R.N. Synonymy of *Afenestrata* with *Heterodera* supported by phylogenetics with molecular and morphological characterisation of *H. koreana* comb. n. and *H. orientalis* comb. n. (Tylenchida: Heteroderidae) // *Nematology*. – 2008. – V. 10. – P. 611-632.
248. Muse S.V. Evolutionary analysis of DNA sequences subject to constraints on secondary structure // *Genetics*. – 1995. – V. 139. – P. 1429–1439.
249. Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., da Fonseca G.A.B., Kents J. Biodiversity hotspots for conservation priorities // *Nature*. – 2000. – V. 403. – P. 853-858.
250. Mylvaganam S., Dennis P.P. Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaeobacterium *Halobacterium marismortui* // *Genetics*. – 1992. – V. 130. – P. 399-410.

251. Nadler S.A., De Ley P., Mundo-Ocampo M., Smythe A.B., Stock P., Bumbarger D.J., De Ley I.T., Holovachov O., Baldwin J.G. Phylogeny of Cephalobina (Nematoda): Molecular evidence for substantial phenotypic homoplasy and incongruence with traditional classifications // *Molecular Phylogenetics and Evolution* – 2006. – V. 40, – P. 696-711.
252. Negretti R.R., Gomes C.B., Mattos V.S., Somavilla L., Manica-Berto R., Agostinetto D., Castagnone-Sereno P., Carneiro R.M.D.G. Characterisation of a *Meloidogyne* species complex parasitising rice in southern Brazil // *Nematology*. – 2017. – V. 19. – P. 403–412.
253. Nguyen C.N., Sturhan D. & Subbotin S.A. Studies on the occurrence and diversity of Heteroderidae and Meloidogynidae (Nematoda: Tylenchida) in natural forests of Vietnam // *Russian Journal of Nematology*. – 2011. – V. 19. – P. 159-172.
254. Nguyen V.C., Villate L. Gutierrez-Gutierrez C., Castillo P., Van Ghelder C., Plantard O., Esmenjaud D. Phylogeography of the soil-borne vector nematode *Xiphinema index* highly suggests Eastern origin and dissemination with domesticated grapevine // *Scientific Report*. – 2019. – V. 9. – P. 7313.
255. Nicholas K.B., Nicholas H.B.Jr., Deerfield D.W.II GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation // *EMBNEW NEWS*. – 1997. – V. 4. – N.14. – P. 59.
256. Nischwitz C., Skantar A., Handoo Z.A., Hult M.N., Schmitt M.E., McClure M.A. Occurrence of *Meloidogyne fallax* in North America, and molecular characterization of *M. fallax* and *M. minor* from U.S. golf course greens // *Plant Disease*. – 2013. – V. 97, – P. 1424–1430.
257. Niu J.H., Jian H., Guo Q.X., Chen C.L., Wang X.Y., Liu Q., Guo, Y.D. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii* // *Plant Pathology*, – 2012. – V. 61. – P. 809-819.
258. Nyaku S.T., Kantety R.V., Tilahun Y., Lawrence K.S., Soliman K.M., Cebert E., Sharma G.C. 18S and ITS1 genomic sequence variations in *Rotylenchulus reniformis* isolates from Alabama // *The Journal of Cotton Science*. – 2013a. – V. 17, – P. 184-194.
259. Nyaku S.T., Sripathi V.R., Kantety R.V., Cseke S.B., Buyyarapu R., Mc Ewan R., Gu Y.Q., Lawrence K., Senwo Z., Sripathi P. *et al.* Characterization of the reniform nematode genome by shotgun sequencing // *Genome*. – 2014. – V. 57. – P. 209-221.
260. Nyaku S.T., Sripathi V.R., Kantety R.V., Gu Y.Q., Lawrence K., Sharma G.C. Characterization of the two intra-individual sequence variants in the 18S rRNA gene in the plant parasitic nematode, *Rotylenchulus reniformis* // *PLoS ONE*. – 2013b. – V. 8. – e60891.
261. Onkendi E.M., Moleleki L.N. Detection of *Meloidogyne enterolobii* in potatoes in South Africa and phylogenetic analysis based on intergenic region and the mitochondrial DNA sequences // *European Journal of Plant Pathology*. – 2013. – V. 136. –P. 1–5.

262. Othman A.A., Baldwin J.G. Comparative morphology of *Meloidodera* spp. and *Verutus* sp. (Heteroderidae) with scanning electron microscopy // *Journal of Nematology*. – 1985. – V. 17. – P. 297-309.
263. Ou S., Peng D., Li Y., Wang Y.J. Restriction fragment length polymorphism and sequences analysis of rDNA-ITS region of cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) on wheat from Zhengzhou // *Acta Phytopathologica Sinica*. – 2008. – V. 38. – P. 407-413.
264. Pagan C., Coyne D., Carneiro R., Kariuki G., Luambano N., Affokpon A. & Williamson V.M. Mitochondrial haplotype-based identification of ethanol-preserved root-knot nematodes from Africa // *Phytopathology*. – 2015. – V.105. – P. 350-357.
265. Page R.D.M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers // *Computer Applications in the Biosciences*. – 1996. – V. 12. – P. 357-358.
266. Palomares-Rius J.E., Subbotin S.A., Liebanas G., Landa B.B., Castillo P. *Eutylenchus excretorius* Ebsary & Eveleigh, 1981 (Nematoda: Tylozorinae) from Spain with approaches to molecular phylogeny of related genera // *Nematology*. – 2009. – V. 11. – P. 343-354.
267. Palomares-Rius J.E., Cantalapiedra-Navarrete C., Archidona-Yuste A., Tzortzakakis E.A., Birmipilis I.G., Vovlas N., Subbotin S.A., Castillo P. Prevalence and molecular diversity of reniform nematodes of the genus *Rotylenchulus* (Nematoda: Rotylenchulinae) in the Mediterranean Basin // *European Journal of Plant Pathology*. – 2018. – V. 150, – P. 439-455.
268. Palomares-Rius J.E., Cantalapiedra-Navarrete C., Archidona-Yuste A., Subbotin S.A., Castillo P. The utility of mtDNA and rDNA for barcoding and phylogeny of plant-parasitic nematodes from Longidoridae (Nematoda, Enoplea) // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – P. 10905.
269. Palomares-Rius J.E., Vovlas N., Subbotin S.A., Troccoli A., Cantalapiedra-Navarrete C., Liébanas G., Chizhov V.N., Landa B.B., Castillo P. Molecular and morphological characterization of *Sphaeronema alni* Turkina & Chizhov, 1986 (Nematoda: Sphaeronematidae) from Spain compared with a topotype population from Russia // *Nematology*. – 2010. – V. 12. – P. 649-659.
270. Peng D.L., Nicol J.M., Li H.M., Hou S.Y., Li H.X., Chen S.L., Ma P., Li H.L. & Riley I.T. Current knowledge of cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) on wheat in China. *Cereal cyst nematodes: status, research and outlook. Proceedings of the First Workshop of the International Cereal Cyst Nematode Initiative*, Antalya, Turkey, 21-23 October 2009, 2009. – P. 29-34.
271. Peng H., Qi X., Peng D., Long H., He X., Huang W., He W. Sensitive and direct detection of *Heterodera filipjevi* in soil and wheat roots by species-specific SCAR-PCR assays // *Plant Disease*. – 2013. – V. 97. – P. 1288-1294.

272. Perry R.N., Subbotin S.A., Moens M. Molecular diagnostics of plant-parasitic nematodes. // Punja Z.K., Boer S.H. de, Sanfaçon H. (eds). *Biotechnology and Plant Disease Management*. CABI, UK. - 2007.
273. Petherbridge F.R., Jones F.G.W. Beet eelworm (*Heterodera schachtii* Schm.) in East Anglia, 1934-43 // *Annals of Applied Biology*. – 1944. – V. 31. – P. 320-322.
274. Phani V., Bishnoi S., Sharma A., Davies K.G., Rao U. Characterization of *Meloidogyne indica* (Nematoda: Meloidogynidae) parasitizing neem in India, with a molecular phylogeny of the species // *Journal of Nematology*. – 2018. – V. 50. – P. 387–398.
275. Philis I. *Heterodera latipons* and *Pratylenchus thornei* attacking barley in Cyprus // *Nematologia Mediterranea*. – 1997. – V. 25. – P. 305-309.
276. Philis I. The life cycle of the Mediterranean cereal cyst nematode *Heterodera latipons* in Cyprus // *Nematologia Mediterranea*. – 1999. – V. 27. – P. 43-46.
277. Phillips W.S., Brown A.M.V., Howe D.K., Peetz A.B., Blok V.C., Denver D.R., Zasada I.A. The mitochondrial genome of *Globodera ellingtonae* is composed of two circles with segregated gene content and differential copy numbers // *BMC Genomics*. – 2016. – V. 17. – P. 706.
278. Picard D., Sempere T., Plantard O. A northward colonisation of the Andes by the potato cyst nematode during geological times suggests multiple host-shifts from wild to cultivated potatoes // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2007. – V. 42. – P. 308-316.
279. Picard D., Sempere T., Plantard O. Direction and timing of uplift propagation in the Peruvian Andes deduced from molecular phylogenetics of highland biotaxa // *Earth and Planetary Science Letters*. – 2008. – V. 271. – P. 326-336.
280. Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L., Armes N.A. DNA detection using recombination proteins // *PLoS Biol*. – 2006. – V. 4. – P. e204.
281. Plantard O., Picard D., Valette S., Scurrah M., Grenier E., Mugniéry D. Origin and genetic diversity of Western European populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida* inferred from mitochondrial sequences and microsatellite loci // *Molecular Ecology*. – 2008. – V. 17. – P. 2208-2218.
282. Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging // *Molecular Biology and Evolution*. – 2008. – V. 25. – P. 1253–1256.
283. Powers T., Harris T., Higgins R., Mullin P., Powers K. Discovery and identification of *Meloidogyne* species using COI DNA barcoding // *Journal of Nematology*. – 2018. – V. 50. – P. 399–412.

284. Powers T.O., Harris T., Higgins R., Sutton L., Powers K.S. Morphological and molecular characterization of *Discocriconemella inarata*, an endemic nematode from north american native tallgrass prairies // *Journal of Nematology*. – 2010. – V. 42. – P. 35-45.
285. Powers T.O., Szalanski A.L., Mullin P.G., Harris T.S., Bertozzi T., Griesbach, J.A. Identification of seed gall nematodes of agronomic and regulator concern with PCR-RFLP of ITS1 // *Journal of Nematology*. – 2001. – V. 33. – P. 191-194.
286. Pylypenko L.A., Phillips M.S., Blok V.C. Characterisation of two Ukrainian populations of *Globodera pallida* in terms of their virulence and mtDNA, and the biological assessment of a new resistant cultivar Vales Everest // *Nematology*. – 2008. – V. 10, – P. 585-590.
287. Qi X.L., Peng D.L., Peng H., Long H.B., Huang W.K. & He W.T. Rapid molecular diagnosis based on SCAR marker system for cereal cyst nematode // *Scientia Agricultura Sinica*. – 2012. – V. 45. – P. 4388-4395.
288. Ramírez-Suárez A., Rosas-Hernández L., Alcasio-Rangel S. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* parasitizing watermelon from Veracruz, Mexico // *Plant Disease*. – 2014. – V. 98, – P. 428.
289. Raski D.J., Luc M. A reappraisal of Tylenchina (Nemata). 10. The superfamily Criconematoidea Taylor, 1936 // *Revue de Nématologie*. – 1987. – V. 10. – P. 409-444.
290. Raski D.J. *Trophotylenchulus* and *Trophonema* two new genera of Tylenchulinae n. fam. (Nematoda) // *Nematologica*. – 1957. – V. 2. – P. 85-90.
291. Reighard G.L., Henderson W.G., Scott S.O., Subbotin S.A. First report of the root-knot nematode, *Meloidogyne floridensis* infecting Guardian peach rootstock in South Carolina, USA // *Journal of Nematology*. – 2019. (in press).
292. Rivoal R., Cook R. Nematode pests of cereals. // Evans K., Trudgill D.L., Webster J.M. (eds). *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture*. CAB International, Wallingford, UK. 1993. – P. 259–303.
293. Rivoal R., Valette S., Bekal S., Gauthier J.P., Yahyaoui A. Genetic and phenotypic diversity in the graminaceous cyst nematode complex, inferred from PCR-RFLP of ribosomal DNA and morphometric analysis // *European Journal of Plant Pathology*. – 2003. – V. 109. – P. 227-241.
294. Riepsamen A.H., Gibson T., Rowe J., Chitwood D.J., Subbotin S.A., Downton M. Poly(T) variation in heteroderid nematode mitochondrial genomes is predominantly an artefact of amplification // *Journal of Molecular Evolution*. – 2011. – V. 72 – P. 182-192.
295. Robinson A.F., Inserra R.N., Caswell-Chen E.P., Vovlas N., Troccoli A. *Rotylenchulus* species: identification, distribution, host ranges, and crop plant resistance // *Nematropica*. – 1997. – V. 27. – P. 127-180.

296. Robinson A.J., Stone A.R., Hooper D.J., Rowe, J.A. A redescription of *Heterodera arenaria* Cooper 1955, a cyst nematode from marram grass // *Fundamental and Applied Nematology*. – 1996. – V. 19. – P. 109-117.
297. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MRBAYES 3 Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics*. – 2003. – V.19. – P. 1572-1574.
298. Roubtsova T.V., Subbotin S.A. Molecular diagnostics of the pigeon pea cyst nematode, *Heterodera cajani* Koshy, 1967 using Real-time PCR // *Nematology* – 2021. - (in press).
299. Rybarczyk-Mydlowska K., Van Megen H., Van den Elsen S., Mooyman P., Karssen G., Bakker J., Helder J. Both SSU rDNA and RNA polymerase II data recognise that root-knot nematodes arose from migratory Pratylenchidae, but probably not from one of the economically high-impact lesion nematodes // *Nematology*. – 2013. – V.16. – P. 125–136.
300. Ryss A., Krall E.. Classification of the superfamilies Tylenchoidea and Hoplolaimoidea with notes on the phylogeny of the suborder Tylenchina (Nematoda) // *Eesti NSV Teaduste Akadeemia Toimetised*. – 1981. – V.30. – P. 288-298.
301. Ryss A.Y. Phylogeny of the order Tylenchida (Nematoda) // *Russian Journal of Nematology*. – 1993. – V. 1. – P. 74-95.
302. Ryss A.Yu., Kazimova G., Subbotin, S.A. Report of *Heterodera mothi* Khan & Husain, 1965 (Tylenchida, Heteroderidae) in Azerbaijan // *Russian Journal of Nematology*. – 2018. – V. 26. – P. 43-49.
303. Sabo A., Vovlas N., Ferris V.R., Phylogenetic relationships based on ribosomal DNA data for four species of cyst nematodes from Italy and one from Syria // *Journal of Nematology*. – 2001. – V. 33. – P. 183–190.
304. Sabo A., Ferris V.R. β -tubulin paralogs provide a qualitative test for a phylogeny of cyst nematodes // *Journal of Nematology*. – 2004. – V.36. - P. 440–448.
305. Sanchez A., Zancada M.C. Characterization of *Heterodera avenae* pathotypes from Spain // *Nematologica*. – 1987. – V. 33. – P. 55-60.
306. Savill N.J., Hoyle D.C., Higgs P.G. RNA sequences evolution with secondary structure constrains: comparison of substitution rate model using maximum-likelihood methods // *Genetics*. – 2001. – V. 157. – P. 399–411.
307. Saylor R.J., Walker C., Goggin F., Agudelo P., Kirkpatrick T. Conventional PCR detection and real-time PCR quantification of reniform nematodes // *Plant Disease*. – 2012. – V.96. – P. 1757-1762.
308. Scholl E.H., Bird D.M. Resolving tylenchid evolutionary relationships through multiple gene analysis derived from EST data // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2005. – V.36. – P. 536-545.

309. Schultz J., Maisel S., Gerlach D., Mueller T., Wolf M. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota // *RNA*. – 2005. – V.11. – P. 361–364.
310. Shinohara M.L., LoBuglio K.F., Rogers S.O. Comparison of ribosomal DNA ITS regions among geographic isolates of *Cenococcum geophilum* // *Current Genetics*. – 1999. – V. 35. – P. 527–535.
311. Showmaker K., Lawrence G.W., Lu S., Balbalian C., Klink V.P. Quantitative field testing *Rotylenchulus reniformis* DNA from metagenomic samples isolated directly from soil // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6. – P. e28954.
312. Siddiqi M.R. The origin and phylogeny of the nematode orders Tylenchida Thorne, 1949 and Aphelenchida n. ord. // *Helminthological Abstracts, Series B*. – 1980. – V. 49. – P. 143-170.
313. Siddiqi M.R. *Tylenchida parasites of plants and insects*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal. 1986. – P.1-645.
314. Siddiqi, M.R. *Tylenchida parasites of plants and insects*, 2nd edition. Wallingford, UK, CABI Publishing. 2000. – P. 1-833.
315. Singh J., Kaur, D.J. Characterization of cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) infecting wheat in Punjab // *Journal of Wheat Research*. – 2015. – V. 7. – P. 48-54.
316. Skantar A.M., Carta, L. Molecular characterization and phylogenetic evaluation of the Hsp90 gene from selected nematodes // *Journal of Nematology*. – 2004. – V. 36. – P. 466-480.
317. Skantar A.M., Handoo Z.A., Zasada I. A., Inghram R.E., Carta L.K., Chitwood D.J. Morphological and molecular characterization of *Globodera* populations from Oregon and Idaho // *Phytopathology*. – 2011. – V. 101. – P. 480-491.
318. Sledge E.B., Christie J.B. *Sphaeronema whittoni* n. sp. (Nematoda: Criconematidae) // *Nematologica*. – 1962. – V.8. – P. 11-14.
319. Smiley R.W., Dababat A.A., Iqbal S., Jones M.G.K., Tanha Maafi Z., Peng D., Subbotin S.A. & Waeyenberge L. Cereal cyst nematodes: a complex and destructive group of *Heterodera* species // *Plant Disease*. – 2017. – V. 101. – P. 1692-1720.
320. Smiley R.W., Gui P.Y., John N.P. Resistance of wheat, barley and oat to *Heterodera avenae* in the Pacific Northwest, USA // *Nematology*. – 2011. – V. 13. – P. 539–552.
321. Smith A.D., Lui T.W.H., Tillier E.R.M. Empirical models for substitution in ribosomal RNA // *Molecular Biology and Evolution*. – 2004. – V. 21. – P. 419–427.
322. Song Z.Q., Yang X., Zhang X.W., Luan M.B., Guo B., Liu C.N., Pan J.P., Mei S.Y. Rapid and visual detection of *Meloidogyne hapla* using recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick (RPA-LFD) assay // *Plant Disease* – 2021 -(in press).

323. Sosa-Moss C. Cyst nematodes in Mexico, Central and South America // *Nematologia Mediterranea*. – 1987. – V. 15. – P. 1-12.
324. Sosa V., De-Nova J.A., Vásquez-Cruz M. Evolutionary history of the flora of Mexico: dry forest cradles and museums of endemism // *Journal of Systematics and Evolution*. – 2018. – V. 56. – P. 523-536.
325. Spears J.F. *The Golden Nematode*. Handbook. United States of America Department of Agricultural Research Service, Washington D.C., USA, 1968. – P. 1-83.
326. Spooner D.M., McLean K., Ramsay G., Waugh R., Bryan G.J. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – V. 102. – P. 14694-14699.
327. Stare B.G., Aydinli G., Devran Z., Mennan S., Strajnar P., Urek G., Sirca S. Recognition of species belonging to *Meloidogyne ethiopica* group and development of a diagnostic method for its detection // *European Journal of Plant Pathology*. – 2019. – V. 154. – P. 621-633.
328. Stone A.R. Head morphology of second-stage juveniles of some Heteroderidae (Nematoda: Tylenchoidea) // *Nematologica*. – 1975. – V. 21. – P. 81– 88.
329. Stone A.R. Co-evolution of nematodes and plants // *Symbolae Botanicae Upsaliensis*. – 1979. – V. 22. – N. 4. – P. 46-61.
330. Sturhan D., Wouts W.M., Subbotin S.A. An unusual cyst nematode from New Zealand, *Paradolichodera tenuissima* gen. n., sp. n. (Tylenchida, Heteroderidae) // *Nematology*. – 2007. – V.9. – P. 561-571.
331. Sturhan D. Wirts-Spezifität bei Zystennematoden und anderen Heteroderiden // *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft*. – 2000. – V. 376. – P. 299.
332. Sturhan D. On the presence or absence of phasmids in males of Heteroderidae (Tylenchida) // *Nematology*. – 2016. – V. 18. – P. 23-27.
333. Sturhan D. Diagnostic and phylogenetic significance of lateral field incisures, phasmids and other morphological characters of juveniles and males of Heteroderidae (Nematoda, Tylenchida), with notes on hosts and phylogeography // *Russian Journal of Nematology*. – 2018. – V. 26. – P. 1-27.
334. Subbotin S.A. Order Tylenchida Thorne, 1949. // Schmidt-Rhaesa A. (ed). *Handbook of Zoology. Nematoda* De Gruyter, Germany. 2013. – P. 613–636.
335. Subbotin S.A. *Heterodera sturhani* sp. n. from China, a new species of the *Heterodera avenae* species complex (Tylenchida: Heteroderidae) // *Russian Journal of Nematology*. – 2015. – V. 23. – P. 145-152.

336. Subbotin S.A. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* // *Nematology*. – 2019. – V. 21. – P. 243-251.
337. Subbotin S.A. Phylogenetic Analysis of DNA Sequence Data. In: *Techniques for Work with Plant and Soil Nematodes*. (Perry, R.N., Hunt, D.J. & Subbotin, S.A., Editors.) CAB International, UK, 2021a. – P. 265-282.
338. Subbotin S.A. Molecular identification of nematodes using the Polymerase Chain Reaction (PCR) // In: *Techniques for Work with Plant and Soil Nematodes*. (Perry, R.N., Hunt, D.J. & Subbotin, S.A., Editors.) CAB International, UK, 2021b. – P. 218-239.
339. Subbotin S.A., Burbridge, J. Sensitive, accurate and rapid detection of the Northern root-knot nematode, *Meloidogyne hapla*, using Recombinase Polymerase Amplification assays // *Plants*. – 2021 – V. 10, P. 336.
340. Subbotin S.A., Mundo-Ocampo M., Baldwin J.G. Systematics of Cyst Nematodes (Nematoda: Heteroderinae) // *Nematology Monographs and Perspectives*, Volume 8A (Series Editors: Hunt, D.J. & Perry, R.N.). Leiden, The Netherlands, Brill, 2010. – P. 1-351.
341. Subbotin S.A., Mundo-Ocampo M. & Baldwin J.G. Systematics of Cyst Nematodes (Nematoda: Heteroderinae) // *Nematology Monographs and Perspectives*, Volume 8B (Series Editors: Hunt, D.J. & Perry, R.N.). Leiden, The Netherlands, Brill, 2010. – P. 1-512.
342. Subbotin S.A., Sturhan D., Vovlas N., Castillo P., Tanyi Tambe J., Moens M., Baldwin J.G. Application of secondary structure model of rRNA for phylogeny: D2-D3 expansion segments of the LSU gene of plant-parasitic nematodes from the family Hoplolaimidae Filipjev, 1934 // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2007. – V. 43. – P. 881-890.
343. Subbotin S. A., Sturhan D., Waeyenberge L., Moens, M. *Heterodera riparia* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae) from common nettle, *Urtica dioica* L., and rDNA-RFLP separation of species from the *H. humuli* group // *Russian Journal of Nematology*. – 1997. – V. 5. – P. 143-157.
344. Subbotin S.A., Chizhov V.N. Report of *Neomisticus rhizomorphoides* (Rühm, 1955) Siddiqi, 1986 (Tylenchida: Anguinidae) from a cherry tree in California, USA // *Russian Journal of Nematology*. – 2019. – V.27. – P. 29-36.
345. Subbotin S.A., Franco J. Cyst nematodes. // Manzanilla-Lopez, R.H., Marban-Mendoza, N. (eds). *Practical Plant Nematology* Colegio de Postgraduados and Mundi-Prensa, Biblioteca Básica de Agricultura. 2012.
346. Subbotin S.A., Skantar A.M. Molecular Taxonomy and Phylogeny. // Perry, R.N., Moens, M. and Jones, J.T. (eds). *Cyst Nematodes*. CAB International, UK, 2018. – P. 398-417.

347. Subbotin S.A., Sturhan D. *Heterodera circeae* sp. n. and *H. scutellariae* sp. n. from Germany, with notes on the *Goettingiana* group (Tylenchida: Heteroderidae) // *Nematology*. – 2004. – V. 6. – P. 343-355.
348. Subbotin S.A., Akanwari J., Nguyen C.N., Cid del Prado Vera, I., Chitambar J.J., Inserra R.N. & Chizhov V.N. Molecular characterization and phylogenetic relationships of cystoid nematodes of the family Heteroderidae (Nematoda: Tylenchida) // *Nematology*. – 2017. – V.19. – P. 1065-1081.
349. Subbotin S.A., Cid Del Prado Vera I., Mundo-Ocampo M., Baldwin J.G. Identification, phylogeny and phylogeography of circumfenestrated cyst nematodes (Nematoda: Heteroderidae) as inferred from analysis of ITS-rDNA // *Nematology*. – 2011. – V. 13. – P. 805-824.
350. Subbotin S.A., Franco J., Knoetze R., Roubtsova T.V., Bostock R.M., Cid del Prado Vera, I. DNA barcoding, phylogeny and phylogeography of the cyst nematode species from the genus *Globodera* (Tylenchida: Heteroderidae) // *Nematology*. – 2020. – V. 22. – P.269-297.
351. Subbotin S.A., Halford P.D., Perry R.N. Identification of populations of potato cyst nematodes from Russia using protein electrophoresis, rDNA-RFLPs and RAPDs // *Russian Journal of Nematology*. – 1999. – V. 7. – P. 57-63
352. Subbotin S.A., Halford P.D., Warry A., Perry R. Variations in ribosomal DNA sequences and phylogeny of *Globodera* parasitising Solanaceae // *Nematology*. – 2000. – V. 2. – P. 591-604.
353. Subbotin S.A., Peng D., Moens, M. A rapid method for the identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* using duplex PCR // *Nematology*. – 2001. – V.3. – P. 365-370.
354. Subbotin S.A., Rumpfenhorst H.J., Sturhan, D. Morphological and electrophoretic studies on populations of *Heterodera avenae* complex from the former USSR // *Russian Journal of Nematology*. – 1996. – V. 4. – P. 29-38.
355. Subbotin S.A., Rumpfenhorst H.J., Sturhan D., Moens M. Description of the Australian cereal cyst nematode *Heterodera australis* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae) // *Russian Journal of Nematology*. – 2002. – V.10. – P. 139-148.
356. Subbotin S.A., Sturhan D., Chizhov V.N., Vovlas N., Baldwin J.G. Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences // *Nematology*. – 2006. – V. 8. –P. 455-474.
357. Subbotin S.A., Sturhan D., Rumpfenhorst H.J., Moens M. Molecular and morphological characterisation of the *Heterodera avenae* complex species (Tylenchida: Heteroderidae) // *Nematology*. – 2003. – V. 5. – P. 515-538.
358. Subbotin S.A., Toumi F., Elekcioglu I.H., Waeyenberge L., Tanha Maafi, Z. DNA barcoding, phylogeny and phylogeography of the cyst nematodes of the *Avenae* group from the genus *Heterodera* (Tylenchida: Heteroderidae) // *Nematology*. – 2018. – V. 20. – P. 671-702.

359. Subbotin S.A., Vau S., Inserra R.N. Molecular characterisation and phylogenetic relationship of *Verutus volvingentis* Esser, 1981 with other cystoid nematodes of the family Heteroderidae (Nematoda: Tylenchida), and some morphological details of its immature life stages // *Russian Journal of Nematology*. – 2018. – V.26. – P. 145-157.
360. Subbotin S.A., Vierstraete A., De Ley P., Rowe J., Waeyenberge L., Moens M., Vanfleteren J.R. Phylogenetic relationships within the cyst-forming nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2001. – V. 21. – P. 1-16.
361. Subbotin S.A., Vovlas N., Crozzoli R., Sturhan D., Lamberti F., Moens M., Baldwin J.G. Phylogeny of Criconematina Siddiqi, 1980 (Nematoda: Tylenchida) based on morphology and D2-D3 expansion segments of the 28S-rRNA gene sequences with application of a secondary structure model // *Nematology*. – 2005. – V. 7. – P. 927-944.
362. Subbotin S.A., Waeyenberge L., Moens M. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLPs // *Nematology*. – 2000. – V. 2, – P. 153-164.
363. Subbotin S.A., Moens M. Molecular Taxonomy and Phylogeny // In: *Plant Nematology* (Perry R. & Moens M., Eds.). CABI, UK. 2006. – P. 33-58.
364. Subbotin S.A., Waeyenberge L., Moens M. Molecular Systematics. // In: *Plant Nematology* (Perry R. & Moens M., Eds.). CABI, UK. 2013. – P. 41-72.
365. Subbotin S.A., Waeyenberge L., Molokanova I.A., Moens M. Identification of species from the *Heterodera avenae* group by morphometrics and ribosomal DNA RFLPs // *Nematology*. – 1999. – V. 1. – P. 195-207.
366. Subbotin, S.A., Kim, D.G. Molecular characterisation and phylogenetic relationships of sedentary nematodes of the genus *Meloinema* Choi & Geraert, 1974 (Nematoda: Tylenchida) // *Nematology*. – 2020. – (in press).
367. Subbotin S.A., Palomares-Rius, J.E., Castillo P. Systematics of Root-knot Nematodes (Nematoda: Meloidogynidae) // *Nematology Monographs and Perspectives*, Volume 14 (Series Editors: Hunt, D.J. & Perry, R.N.). Leiden, The Netherlands, Brill - 2021. (in press).
368. Swofford D.L. *PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)*, version 4.0b 10. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates. 2003.
369. Szalanski A., Sui D.D., Harris T.S., Powers T.O. Identification of cyst nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1 // *Journal of Nematology*. – 1997. – V. 29. – P. 255-267.
370. Szitenberg A., Salazar-Jaramillo L., Blok V.C., Laetsch D.R., Joseph S., Williamson V.M., Blaxter M.L., Lunt D.H. Comparative genomics of apomictic root-knot nematodes:

- hybridization, ploidy, and dynamic genome change // *Genome Biol Evolution*. – 2017. – V.9. – P. 2844–2861.
371. Tandingan De Ley I., De Ley P., Vierstraete A., Karssen G., Moens M., Vanfleteren J. Phylogenetic analyses of *Meloidogyne* small subunit rDNA // *Journal of Nematology*. – 2002. – V.34. – P. 319–327.
372. Tanha Maafi Z., Sturhan D., Handoo Z., Mordehai M., Moens M., Subbotin S.A. Morphological and molecular studies of *Heterodera sacchari*, *H. goldeni* and *H. leuceilyma* (Nematoda: Heteroderidae) // *Nematology*. – 2007. – V.9. – P. 483-497.
373. Tanha Maafi Z., Amani M., Stanley J.D., Inserra R.N., Van den Berg E., Subbotin S.A. Description of *Tylenchulus musicola* sp. n. (Nematoda: Tylenchulidae) from banana in Iran with molecular phylogeny and characterization of species of *Tylenchulus* Cobb, 1913 // *Nematology*. – 2012. – V. 14. – P. 353-369.
374. Tanha Maafi Z., Sturhan D., Subbotin S.A., Moens M. *Heterodera persica* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae) parasitizing Persian hogweed (*Heracleium persicum* (Desf. ExFisch.) in Iran // *Russian Journal of Nematology*. – 2006. – V. 14, – P. 171-178.
375. Tanha Maafi Z., Subbotin S.A., Moens M. Molecular identification of cyst-forming nematodes (Heteroderidae) from Iran and a phylogeny based on the ITS sequences of rDNA // *Nematology*. – 2003. – V.5. – P. 99-111.
376. Tao Y., Xu C., Yuan C., Wang H., Lin B., Zhou K., Liao J. *Meloidogyne aberrans* sp. nov. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode parasitizing kiwifruit in China // *PLoS ONE*. – 2017. – V. 12. – P. e0182627.
377. Telford M.J., Wise M.J., Gowri-Shankar V. Consideration of RNA secondary structure significantly improves likelihood-based estimates of phylogeny: examples from the Bilateria // *Molecular Biology and Evolution*. – 2005. – V. 22. – P. 1129–1136.
378. Tenente G.C.M.V., De Ley P., De Ley I.T., Karssen G., Vanfleteren J.R. Sequence analysis of the D2/D3 region of the large subunit rDNA from different *Meloidogyne* isolates // *Nematropica*. – 2004. – V.34. – P. 1-12.
379. Tigano M., de Siqueira K., Castagnone-Sereno P., Mulet K., Queiroz P., dos Santos M., Teixeira C., Almeida M., Silva J., Carneiro R. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species // *Plant Pathology*. – 2010. – V. 59. – P. 1054-1061.
380. Tigano M.S., Carneiro R., Jejaprakash A., Dickson D.W., Adams B. Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and mitochondrial sequences // *Nematology*. – 2005. – V. 7. – P. 851–862.

381. Tilahun Y., Soliman K., Lawrence K.S., Cseke L.J., Ochieng J.W. Nuclear ribosomal DNA diversity of cotton pest (*Rotylenchulus reniformis*) in the United States // *African Journal of Biotechnology*. – 2008. – V. 7. – P. 3217-3224.
382. Toktay H., Imren M., Bozbuga R., Erginbas Orakci G., Dababat A., Elekcioglu I.H. Pathotype characterization of the cereal cyst nematode *Heterodera filipjevi* (Madzhidov, 1981) Stelter in Turkey // *Turkish Journal of Entomology*. – 2013. – V.37. – P. 213-219.
383. Torres-Machorro A.L., Hernández R., Cevallos A.M., López-Villaseñor I. Ribosomal RNA genes in eu- karyotic microorganisms: witnesses of phylogeny? // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2010. – V.34. – P. 59-86.
384. Toumi F, Waeyenberge L., Viaene N., Dababat A., Nicol J.M., Ogonnaya F., Moens M. Development of a species-specific PCR to detect the cereal cyst nematode *Heterodera latipons* // *Nematology*. – 2013a. – V. 15. – P. 709-717.
385. Toumi F., Waeyenberge L., Viaene N., Dababat A., Nicol J.M., Ogonnaya F., Moens M. Development of two species-specific primer sets to detect the cereal cyst nematodes *Heterodera avenae* and *Heterodera filipjevi* // *European Journal of Plant Pathology*. – 2013b. – V.136. – P. 613-624.
386. Toumi F., Waeyenberge L., Viaene N., Dababat A. A., Nicol J.M., Ogonnaya F.C., Moens, M. Development of qPCR assays for quantitative detection of *Heterodera avenae* and *H. latipons* // *European Journal of Plant Pathology*. – 2015. – V. 143. – P. 305–316.
387. Triantaphyllou A.C. Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes // Sasser J.N., Carter, C.C. (eds.) *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol I, Biology and Control*. North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC, USA. 1985a – P. 113–126.
388. Triantaphyllou A.C. Gametogenesis and the chromosomes of *Meloidogyne nataliei*: not typical of other root-knot nematode // *Journal of Nematology*. – 1985b. – V.17. – P. 1–5.
389. Triantaphyllou A.C. Cytogenetic status of *Meloidogyne (Hypsoperine) spartinae* in relation to other *Meloidogyne* species // *Journal of Nematology*. – 1987. – V.19. – P. 1–7.
390. Trinh Q.P., Le T.M.L., Nguyen T.D., Nguyen H.T., Liebanas G., Nguyen T.A.D. *Meloidogyne daklakensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) in the Western Highlands, Vietnam // *Journal of Helminthology*. – 2019. – V. 93. – P. 242–254.
391. Trisciuzzi N., Troccoli A., Vovlas N., Cantalapedra-Navarrete C., Palomares-Rius J.E., Castillo P. Detection of the camellia root-knot nematode *Meloidogyne camelliae* Golden in Japanese *Camellia bonsai* imported into Italy: integrative diagnosis, parasitic habits and molecular phylogeny // *European Journal of Plant Pathology*. – 2014. – V. 138. – P. 231–235.

392. Troccoli A., Subbotin S.A., Stanley J.D., Inserra, R.N. *Meloidoderita whittoni* (Sledge & Christie, 1962) comb. n. (Tylenchida: Sphaeronematidae) and its parasitic habits on sweet gum (*Liquidambar styraciflua* L.) // *Nematology*. – 2017. – V. 19. – P. 709-722.
393. Turner S.J. & Subbotin S.A. Cyst Nematodes. // Perry, R.N., Moens, M. (eds). *Plant Nematology* CABI, UK. 2013. – P. 110-143.
394. Valocká B., Sabová M., Lišková M. Response of some winter wheat and spring barley cultivars to *Heterodera avenae* pathotype Ha12 // *Helminthologia*. – 1994. – V. 31. – P. 155-158.
395. Van den Berg E., Spaull V.W. Two new species of Tylenchuloidea (Nematoda) on sugar cane // *Phytophylactica*. – 1982. – V. 14. – P. 131-144.
396. Van den Berg E. The genus *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940 (Rotylenchulinae: Nematoda) in South Africa // *Phytophylactica*. – 1978. – V.10. – P. 57-64.
397. Van den Berg E., Palomares-Rius J.E., Vovlas N., Tiedt L.R., Castillo P., Subbotin S.A.. Morphological and molecular characterisation of one new and several known species of the reniform nematode, *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940 (Hoplolaimidae: Rotylenchulinae), and a phylogeny of the genus // *Nematology*. – 2016. – V.18. – P. 67-107.
398. Van den Berg E., Palomares-Rius J.E., Vovlas N., Tiedt L.R., Castillo P., Subbotin S.A. Morphological and molecular characterisation of one new and several known species of the reniform nematode, *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940 (Hoplolaimidae: Rotylenchulinae), and a phylogeny of the genus // *Nematology*. – 2016. – V. 18. – P. 67-107.
399. Van den Berg E., Tiedt L.R., Coyne D.L., Ploeg A.T., Navas- Cortés J.A., Roberts P.A., Yeates G.W., Subbotin S.A. Morphological and molecular characterisation and diagnostics of some species of *Scutellonema* Andrassy, 1958 (Tylenchida: Hoplolaimidae) with a molecular phylogeny of the genus // *Nematology*. – 2013. – V. 15. – P. 719-745.
400. van Megen H., van den Elsen S., Holterman M., Karssen G., Mooyman P., Bongers T., Holovachov O., Bakker J., Helder J. A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences // *Nematology*. – 2009. – V. 11. – P. 927-950.
401. Villesen P. FaBox: an online toolbox for FASTA sequences // *Molecular Ecology Notes*. – 2007. – V.7. – P. 965-968.
402. Vovlas N., Inserra R.N. Istopatologia di radici di olivo infestate da *Rotylenchulus macrodoratus* Dasgupta, Raski et Sher // *Nematologia Mediterranea*. – 1976. – V. 4. – P. 223-230.
403. Vovlas N., Landa B.B., Liebanas G., Handoo Z.A., Subbotin S.A., Castillo P. Characterization of the cystoid nematode *Meloidoderita kirjanovae* (Nematoda: Sphaeronematidae) from South Italy // *Journal of Nematology*. – 2006. – V. 38. – P. 376-382.

404. Vovlas N., Trisciuzzi N., Troccoli A., De Luca F., Cantalapiedra-Navarrete C., Castillo P. Integrative diagnosis and parasitic habits of *Cryphodera brinkmani* a non-cyst forming heteroderid nematode intercepted on Japanese white pine bonsai trees imported into Italy // *European Journal of Plant Pathology*, – 2013. – V. 135. – P. 717-726.
405. Vovlas N., Vovlas A., Leonetti P., Liébanas G., Castillo P., Subbotin S.A., Palomares-Rius J.E. Parasitism effects on white clover by root-knot and cyst nematodes and molecular separation of *Heterodera daverti* from *H. trifolii* // *European Journal of Plant Pathology*. – 2015. – V. 143. – P. 833-845.
406. Vrain T.C., McNamara D.G. Potential for identification of quarantine nematodes by PCR // *EPPO Bulletin*. – 1994. – V. 24. – P. 453-458.
407. Wang Y., Yu S.F., Li Y.G., Hu X.Q., Pu W.Q. [Studies on rDNA of *Tylenchulus semipenetrans* and *Pratylenchus* spp. by ITS-RFLP.] // *Journal of Laiyang Agricultural College*. – 2004. – V.21. – P. 151-153.
408. Wang Y., Zhang Z., Ramanan N. The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes // *Journal of Bacteriology*. – 1997. – V. 179. – P. 3270-3276.
409. Wheeler W.C., Imazu M., Shimizu, T. Elision: A method for accommodating multiple molecular sequence alignment s with alignment-ambiguous sites // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 1995. – V. 4. – P. 1–9.
410. White J.W. Wind-born dispersal of potato root eelworm // *Nature*. – 1953. – V. 172. – P. 686-687.
411. Westphal A., Maung Z.T.Z., Doll D.A., Yaghmour M.A., Chitambar J.J., Subbotin S.A. First report of the peach root-knot nematode, *Meloidogyne floridensis* infecting almond on root-knot nematode resistant 'Hansen 536' and 'Bright's Hybrid 5' rootstocks in California, USA // *Journal of Nematology* – 2019. – V. 51. – P. e2019-2.
412. Wolf M., Achtziger M., Schultz J., Dandekar T., Mueller, T. Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures // *RNA*. – 2005. – V. 11. – P. 1616–1623.
413. Wouts W.M., Baldwin J.G. Taxonomy and identification. // S. B. Sharma (ed.) *The Cyst Nematodes* Kluwer Academic, Dordrecht. 1998. – P. 83–122.
414. Wouts W.M., Sher S.A. The genera of the subfamily Heteroderinae (Nematoda: Tylenchoidea) with a description of two new genera // *Journal of Nematology*. – 1971. – V. 3. – P. 129-144.
415. Wouts W.M., Sturhan D. *Heterodera aucklandica* sp. n. (Nematoda: Heteroderidae) from a New Zealand native grass, with notes on the species of the *H. avenae* group // *New Zealand Journal of Zoology*. – 1995. – V.22. – P. 199-207.

416. Wouts W.M. A revision of the family Heteroderidae (Nematoda: Tylenchoidea). I. The family Heteroderidae and its subfamilies // *Nematologica*. – 1972. – V. 18. – P. 439-446.
417. Wouts W.M. A revision of the family Heteroderidae (Nematoda: Tylenchoidea). I. The family Heteroderidae and its subfamilies // *Nematologica*. – 1973. – V. 18. – P. 439-446.
418. Wouts W.M. Phylogenetic classification of the family Heteroderidae (Nematoda: Tylenchida) // *Systematic Parasitology*. – 1985. – V. 7. – P. 295-328.
419. Wuyts J., Van de Peer Y., De Wachter R. Distribution of substitution rates and location of insertion sites in the tertiary structure of ribosomal RNA // *Nucleic Acids Reseach*. – 2001. – V. 29. – P. 5017–5028.
420. Yan G.P., Smiley R.W., Okubara P.A., Skantar A.M. Species-specific PCR assays for differentiating *Heterodera filipjevi* and *H. avenae* // *Plant Disease*. – 2013. – V. 97. – P. 1611-1619.
421. Yang B., Eisenback J.D. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara earpod tree in China // *Journal of Nematology*. – 1983. – V. 15. – P. 381-391.
422. Yap W.H., Zhang Z.S., Wang Y. Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon // *Journal of Bacteriology*. – 1999. – V. 181. – P. 5201-5209.
423. Ye W.M., Koenning S.R., Zhuo K., Liao J.L. First report of *Meloidogyne enterolobii* on cotton and soybean in North Carolina, United States // *Plant Disease*. – 2013. – V. 97. – P. 1262.
424. Yu Y., Harris A.J., He X.J. S-DIVA (statistical dispersal-vicariance analysis): a tool for inferring biogeographic histories // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2010. – V. 56. – P. 848-850.
425. Yu Y., Harris A.J., Blair C., He X.J. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2015. – V. 87. – P. 46-49.
426. Yuan H.X., Sun J.W., Yang W.X., Xing X.P., Wang Z.Y., Riley I.T., Li H.L. New pathotypes of *Heterodera avenae* (cereal cyst nematode) from winter wheat in Zhengzhou, Henan, China // *Australasian Plant Pathology*. – 2010. – V. 39. – P. 107-111.
427. Zhang Y., Matafeo A., Shi H.L., Zheng J.W. Morphological and molecular characterization and host range of *Rotylenchulus reniformis* population occurring in Hangzhou, Zhejiang, China // *Acta Phytopathologica Sinica*. – 2011. – V. 41. – P. 37-43.

428. Zhang Y., Hu J.Q., Li Q.M., Guo J.Q., Zhang, G.P. Chapter 10 - Detection of microorganisms using recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks // *Methods in Microbiology* - 2020. – V.47 – P. 319-349.
429. Zheng J., Subbotin S.A., Waeyenberge L., Moens M. Molecular characterisation of Chinese *Heterodera glycines* and *H. avenae* populations based on RFLPs and sequences of rDNA-ITS regions // *Russian Journal of Nematology*. – 2000. – V. 8. – P. 109-113.
430. Zheng J. Li X., Zhang Y., Subbotin S.A. Molecular characterization of cyst forming nematode *Heterodera sinensis* Chen & Zheng, 1994 from China // *Russian Journal of Nematology*. – 2008. – V. 16. – P. 159-162.
431. Zhuo K., Wang H.H., Ye W., Peng D.L., Liao J.L. *Cryphodera sinensis* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), a non-cyst-forming parasitic nematode from the root of ramie *Boehmeria nivea* in China // *Journal of Helminthology*. – 2014. – V. 88. – P. 468-480.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Виды нематод из отряда Tylenchida, секвенированные и депонированные в Генный Банк

- | | | |
|---------------------------------------|--|--|
| 1. <i>Afrina sporoboliae</i> | 33. <i>Cactodera torreyanae</i> | 65. <i>Globodera pallida</i> |
| 2. <i>Afrina wevelli</i> | 34. <i>Caloosia longicaudata</i> | 66. <i>Globodera rostochiensis</i> |
| 3. <i>Aglenchus agricola</i> | 35. <i>Cephalenchus hexalineatus</i> | 67. <i>Globodera sandveldensis</i> |
| 4. <i>Amplimerlinius globigerus</i> | 36. <i>Coslenchus costatus</i> | 68. <i>Globodera tabacum</i> |
| 5. <i>Amplimerlinius macrurus</i> | 37. <i>Criconema mutabile</i> | 69. <i>Globodera zelandica</i> |
| 6. <i>Anguina agropyri</i> | 38. <i>Criconema silvum</i> | 70. <i>Helicotylenchus brevis</i> |
| 7. <i>Anguina agropyronifloris</i> | 39. <i>Criconemoides brevistylus</i> | 71. <i>Helicotylenchus broadbalkiensis</i> |
| 8. <i>Anguina agrostis</i> | 40. <i>Criconemoides informis</i> | 72. <i>Helicotylenchus depressus</i> |
| 9. <i>Anguina australis</i> | 41. <i>Criconemoides obtusicaudatus</i> | 73. <i>Helicotylenchus digonicus</i> |
| 10. <i>Anguina danthoniae</i> | 42. <i>Criconemoides parvus</i> | 74. <i>Helicotylenchus dihystra</i> |
| 11. <i>Anguina graminis</i> | 43. <i>Cryphodera brinkmani</i> | 75. <i>Helicotylenchus labidiscinus</i> |
| 12. <i>Anguina funesta</i> | 44. <i>Cryphodera sinensis</i> | 76. <i>Helicotylenchus leiocephalus</i> |
| 13. <i>Anguina microlaenae</i> | 45. <i>Discocriconemella hengsungica</i> | 77. <i>Helicotylenchus martini</i> |
| 14. <i>Anguina paludicola</i> | 46. <i>Discocriconemella limitanea</i> | 78. <i>Helicotylenchus microlobus</i> |
| 15. <i>Anguina phalaridis</i> | 47. <i>Discocriconemella sinensis</i> | 79. <i>Helicotylenchus multicinctus</i> |
| 16. <i>Anguina tritici</i> | 48. <i>Ditylenchus askenasyi</i> | 80. <i>Helicotylenchus paxilli</i> |
| 17. <i>Atalodera carolynae</i> | 49. <i>Ditylenchus destructor</i> | 81. <i>Helicotylenchus platyurus</i> |
| 18. <i>Atalodera crassicrustata</i> | 50. <i>Ditylenchus dipsaci</i> | 82. <i>Helicotylenchus pseudorobustus</i> |
| 19. <i>Basiria gracilis</i> | 51. <i>Ditylenchus gallaeformans</i> | 83. <i>Hemicaloosia vagisclera</i> |
| 20. <i>Belonolaimus maluceroi</i> | 52. <i>Ditylenchus gigas</i> | 84. <i>Hemicriconemoides alexis</i> |
| 21. <i>Betulodera betulae</i> | 53. <i>Ditylenchus laurae</i> | 85. <i>Hemicriconemoides brachyurus</i> |
| 22. <i>Bitylenchus brevilineatus</i> | 54. <i>Ditylenchus oncogenus</i> | 86. <i>Hemicriconemoides californianus</i> |
| 23. <i>Bitylenchus hispaniensis</i> | 55. <i>Ditylenchus weischeri</i> | 87. <i>Hemicriconemoides chitwoodi</i> |
| 24. <i>Bitylenchus iphilus</i> | 56. <i>Dolichodorus costaricensis</i> | 88. <i>Hemicriconemoides cocophillus</i> |
| 25. <i>Bitylenchus maximus</i> | 57. <i>Dolichodorus mediterraneus</i> | 89. <i>Hemicriconemoides macrodorus</i> |
| 26. <i>Bitylenchus parvus</i> | 58. <i>Eutylenchus excretorius</i> | 90. <i>Hemicriconemoides minutus</i> |
| 27. <i>Bitylenchus ventrosignatus</i> | 59. <i>Globodera agulhasensis</i> | 91. <i>Hemicriconemoides ortonwilliamsi</i> |
| 28. <i>Cactodera cacti</i> | 60. <i>Globodera artemisiae</i> | 92. <i>Hemicriconemoides promissus</i> |
| 29. <i>Cactodera estonica</i> | 61. <i>Globodera capensis</i> | 93. <i>Hemicriconemoides silvaticus</i> |
| 30. <i>Cactodera galinsogae</i> | 62. <i>Globodera ellingtonae</i> | 94. <i>Hemicriconemoides strictathecatus</i> |
| 31. <i>Cactodera rosae</i> | 63. <i>Globodera mexicana</i> | 95. <i>Hemicriconemoides wessoni</i> |
| 32. <i>Cactodera solani</i> | 64. <i>Globodera millefolii</i> | 96. <i>Hemicyclophora californica</i> |

97. *Hemicycliophora conida*
 98. *Hemicycliophora epicharoides*
 99. *Hemicycliophora floridensis*
 100. *Hemicycliophora gracilis*
 101. *Hemicycliophora halophila*
 102. *Hemicycliophora hellenica*
 103. *Hemicycliophora iberica*
 104. *Hemicycliophora italiae*
 105. *Hemicycliophora lutosa*
 106. *Hemicycliophora lutosoides*
 107. *Hemicycliophora obtusa*
 108. *Hemicycliophora onubensis*
 109. *Hemicycliophora parvana*
 110. *Hemicycliophora poranga*
 111. *Hemicycliophora raskii*
 112. *Hemicycliophora ripa*
 113. *Hemicycliophora robbinsi*
 114. *Hemicycliophora signata*
 115. *Hemicycliophora similis*
 116. *Hemicycliophora thienemanni*
 117. *Hemicycliophora typica*
 118. *Hemicycliophora vaccinii*
 119. *Heteroanguina caricis*
 120. *Heteroanguina graminophila*
 121. *Heteroanguina ferulae*
 122. *Heterodera arenaria*
 123. *Heterodera australis*
 124. *Heterodera avenae*
 125. *Heterodera bifenestra*
 126. *Heterodera cajani*
 127. *Heterodera carotae*
 128. *Heterodera ciceri*
 129. *Heterodera circaeae*
 130. *Heterodera cruciferae*
 131. *Heterodera cyperi*
 132. *Heterodera daverti*
 133. *Heterodera elachista*
 134. *Heterodera fici*
 135. *Heterodera filipjevi*
 136. *Heterodera glycines*
 137. *Heterodera goettingiana*
 138. *Heterodera goldeni*
 139. *Heterodera guangdongensis*
 140. *Heterodera hordecalis*
 141. *Heterodera humuli*
 142. *Heterodera koreana*
 143. *Heterodera latipons*
 144. *Heterodera litoralis*
 145. *Heterodera mani*
 146. *Heterodera mediterranea*
 147. *Heterodera medicaginis*
 148. *Heterodera mothi*
 149. *Heterodera orientalis*
 150. *Heterodera oryzicola*
 151. *Heterodera persica*
 152. *Heterodera pratensis*
 153. *Heterodera ripae*
 154. *Heterodera sacchari*
 155. *Heterodera salixophila*
 156. *Heterodera schachtii*
 157. *Heterodera scutellariae*
 158. *Heterodera sinensis*
 159. *Heterodera sorghi*
 160. *Heterodera sturhani*
 161. *Heterodera trifolii*
 162. *Heterodera turcomanica*
 163. *Heterodera urticae*
 164. *Heterodera ustinovii*
 165. *Heterodera vallicola*
 166. *Heterodera zeae*
 167. *Hirschmanniella kwazura*
 168. *Hirschmanniella loofi*
 169. *Hirschmanniella oryzae*
 170. *Howardula phyllotretae*
 171. *Macrotrophurus arbusticola*
 172. *Meloidoderita kirjanivae*
 173. *Meloidodera astonei*
 174. *Meloidodera floridensis*
 175. *Meloidodera mexicana*
 176. *Meloidodera sikhotealiniensis*
 177. *Meloidoderita kirjanovae*
 178. *Meloidoderita polygoni*
 179. *Meloidoderita whittoni*
 180. *Meloidogyne atiellia*
 181. *Meloidogyne baetica*
 182. *Meloidogyne chitwoodi*
 183. *Meloidogyne christiei*
 184. *Meloidogyne fallax*
 185. *Meloidogyne floridensis*
 186. *Meloidogyne graminicola*
 187. *Meloidogyne graminis*
 188. *Meloidogyne halpa*
 189. *Meloidogyne javanica*
 190. *Meloidogyne marylandi*
 191. *Meloidogyne minor*
 192. *Meloidogyne naasi*
 193. *Meloidogyne nataliei*
 194. *Meloinema chitwoodi*
 195. *Meloinema odesanens*

196. *Merlinius brevidens*
 197. *Mesoanguina amsinckiae*
 198. *Mesoanguina millefolii*
 199. *Mesonaguina moxae*
 200. *Mesoanguina picridis*
 201. *Mesocriconema solivagus*
 202. *Mesocriconema sphaerocephalum*
 203. *Mesocriconema xenoplax*
 204. *Nagelus leptus*
 205. *Neobakernema variabile*
 206. *Neomisticus rhizomorphoides*
 207. *Neodolichorhynchus phaseoli*
 208. *Ogma decalineatus*
 209. *Paramerlinius neohexagrammus*
 210. *Paratrophurus bhutanensis*
 211. *Paratrophurus bursifer*
 212. *Paratrophurus loofi*
 213. *Paratrophurus striatus*
 214. *Paratylenchus aquaticus*
 215. *Paratylenchus dianthus*
 216. *Paratylenchus hamatus*
 217. *Paratylenchus nanus*
 218. *Pratylenchoides alkani*
 219. *Pratylenchoides ritteri*
 220. *Pratylenchoides utahensis*
 221. *Pratylenchus agilis*
 222. *Pratylenchus bolivianus*
 223. *Pratylenchus brachyurus*
 224. *Pratylenchus coffeae*
 225. *Pratylenchus convallariae*
 226. *Pratylenchus crenatus*
 227. *Pratylenchus delattrei*
 228. *Pratylenchus dunensis*
 229. *Pratylenchus fallax*
 230. *Pratylenchus flakkensis*
 231. *Pratylenchus floridensis*
 232. *Pratylenchus goodeyi*
 233. *Pratylenchus hexincisus*
 234. *Pratylenchus hippeastri*
 235. *Pratylenchus jaehni*
 236. *Pratylenchus loosi*
 237. *Pratylenchus mediterraneus*
 238. *Pratylenchus neglectus*
 239. *Pratylenchus parafloridensis*
 240. *Pratylenchus penetrans*
 241. *Pratylenchus pinguicaudatus*
 242. *Pratylenchus rwandae*
 243. *Pratylenchus scribneri*
 244. *Pratylenchus speijeri*
 245. *Pratylenchus thornei*
 246. *Pratylenchus vulnus*
 247. *Pratylenchus zaeae*
 248. *Psilenchus hilarulus*
 249. *Punctodera chalcoensis*
 250. *Punctodera punctata*
 251. *Radopholus arabocoffeae*
 252. *Radopholus duriophilus*
 253. *Rhizonemella sequoiae*
 254. *Rotylenchulus macrodoratus*
 255. *Rotylenchulus macrosoma*
 256. *Rotylenchulus macrosomoides*
 257. *Rotylenchulus parvus*
 258. *Rotylenchulus reniformis*
 259. *Rotylenchulus sacchari*
 260. *Rotylenchus brevicaudatus*
 261. *Rotylenchus buxophilus*
 262. *Rotylenchus cazorlaensis*
 263. *Rotylenchus eximius*
 264. *Rotylenchus incultus*
 265. *Rotylenchus jaeni*
 266. *Rotylenchus laurentinus*
 267. *Rotylenchus magnus*
 268. *Rotylenchus montanus*
 269. *Rotylenchus paravitis*
 270. *Rotylenchus robustus*
 271. *Rotylenchus unisexu*
 272. *Rotylenchus vitis*
 273. *Scutellonema brachyurum*
 274. *Scutellonema bradys*
 275. *Scutellonema cavenessi*
 276. *Scutellonema clavicaudatum*
 277. *Scutellonema transvaalense*
 278. *Scutellonema truncatum*
 279. *Scutylenchus paniculoides*
 280. *Scutylenchus rugosus*
 281. *Scutylenchus tartuensis*
 282. *Skarbilovinema laumondi*
 283. *Skarbilovinema lyoni*
 284. *Sphaeronema alni*
 285. *Sphaerularia bombi*
 286. *Subanguina chilensis*
 287. *Subanguina radicecola*
 288. *Trophurus impar*
 289. *Trophurus imperialis*
 290. *Trophurus sculptus*
 291. *Tylenchorhynchus aduncus*
 292. *Tylenchorhynchus agri*
 293. *Tylenchorhynchus annulatus*
 294. *Tylenchorhynchus brassicae*

295. *Tylenchorhynchus clarus*
296. *Tylenchorhynchus leviterminalis*
297. *Tylenchorhynchus mediterraneus*
298. *Tylenchorhynchus zaeae*
299. *Tylenchorhynchus dubius*
300. *Tylenchulus floridensis*
301. *Tylenchulus furcus*
302. *Tylenchulus graminis*
303. *Tylenchulus musicola*
304. *Tylenchulus palustris*
305. *Tylenchulus semipenetrans*
306. *Thripinema khrustalevi*
307. *Verutus volvingentis*
308. *Zygotylenchus guevarai*

Таблица 1. Основные праймеры, использованные в настоящей работе.

Название раймера*	Секвенс (5'-3')	Аmplифицируемый ген	Источник
TW81 (f)	GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC	BTC pPHK	Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003)
AB28 (r)	ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT		
F194 (f)	CGT AAC AAG GTA GCT GTA G	BTC pPHK	Ferris <i>et al.</i> (1993)
5368(r)	TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG		Vrain (1993)
D2A (f)	ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG	D2-D3 of 28S pPHK	Nunn (1992)
D3B (r)	TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA		
U831 (f)	AAAY AAR ACM AAG CCN TYT GGA C	hsp90	Skantar & Carta (2005)
L1110 (r)	TCR CAR TTV TCC ATG ATR AAV AC		
D2A (f)	ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG	D2-D3 28 pPHK	Nunn (1992)
R_renif_R1A (r)	GAA AAG GCC TAC CCA ATG TG		This study
D2A (f)	ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG	D2-D3 28 pPHK	Nunn (1992)
R_renif_R2A (r)	CCC GAT ACC ATT TCC ATA CAA G		Van den Berg <i>et al.</i> (2016)
D2A (f)	ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG	D2-D3 28 pPHK	Nunn (1992)
R_renif_R1B (r)	CAC AGA CRC CCR AGC AGC CA		Van den Berg <i>et al.</i> (2016)
JB3 (f)	TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT	COI мтДНК	Bowles <i>et al.</i> (1992)
JB4.5 (r)	TAA AGA AAG AAC ATA ATGA AAA TG		
JB3 (f)	TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT	COI мтДНК	Bowles <i>et al.</i> (1992)
JB5 (r)	AGC ACC TAA ACT TAA AAC ATA ATG AAA ATG		Derycke <i>et al.</i> (2005)
Het-coxiF	TAG TTG ATC GTA ATT TTA ATG G	COI мтДНК	Subbotin (2015)
Het-coxiR	CCT AAA ACA TAA TGA AAA TGW GC		
Het-cybf2	CAR TAT TTR ATR TTT GAR GT	Cytb мтДНК	Subbotin <i>et al.</i> (2019)
Het-cybr3	ACH ARR AAR TTR ATY TCC TC		
D2A	ACA GTA CCG TGA GGA AAG TTG	D2-D3 28 pPHK	Tanha Maafi <i>et al.</i> (2012)
<i>Tylenchulus</i> specific	TAG GYA AAG CKT GCT RTT RCC A		
TW81	GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC	BTC pPHK	Tanha Maafi <i>et al.</i> (2012)
<i>Semipenetrans</i> specific	GGA CTC TGC TCA ACC TGG TAG A		
TW81	GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC	BTC pPHK	Tanha Maafi <i>et al.</i> (2012)
<i>Musicola</i> specific	CGC AGA CTC GCC AGT CGT AG		
TW81	GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC	BTC pPHK	Tanha Maafi <i>et al.</i> (2012)
<i>Furcus</i> specific	ACC AGA CGC ACA AAG TAC AGA C		
TW81	GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC	BTC pPHK	Tanha Maafi <i>et al.</i> (2012)
<i>Graminis</i> specific	GCT ATT GCG AGT CTC CTA GGG		
TW81	GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC	BTC pPHK	Tanha Maafi <i>et al.</i> (2012)
<i>Palustris</i> specific	AGG CTG TCG TAA CGC TTC GCA		
SHF6	GTT CTT ACG TTA CTT CCA	BTC pPHK	Amiri <i>et al.</i> (2002)
rDNA2	TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG		
GlyF1	TTA CGG ACC GTA ACT CAA	BTC pPHK	Subbotin <i>et al.</i> (2001)
rDNA2	TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG		
Het-coxiF	TAG TTG ATC GTA ATT TTA ATG G	COI	Roubtsova & Subbotin (2021)
HcajR1	GTT AAA AAC TGA ATA GAA AGA		
Probe H caj1	TGT TCT TAT TTT GCC TGC CTT TGG TTT		

(f) – прямой; (r) – обратный.

Таблица 2. Положение некоторых клад в топологиях, полученных в результате анализа выравниваний D2-D3 фрагмента 28S рРНК гена методами максимальной экономии (МП) и Баесовой вероятности (БВ).

	КВ		1		2		3		4		5		6		7		8		9	
	МП	БВ	МП	БВ	МП	БВ	МП	БВ	МП	БВ	МП	БВ	МП	БВ	МП	БВ	МП	БВ	МП	БВ
Клада I (Iotonchiidae + Heterotylenchinae)	100	99	100	84	100	98	100	100	100	86	100	91	100	99	100	98	100	100	100	97
Клада II (Allantonematidae + <i>Parasitylenchus</i> sp.)	65	99	61	77	–	–	85	95	76	56	67	99	86	95	82	85	69	64	70	96
Allantonematidae + Iotonchioidea	–	59	54	82	74	96	–	–	–	81	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Клада III (Anguininae* + неопределенная тиленхида)	72	99	72	65	79	98	74	98	63	94	70	89	66	85	55	89	51	84	62	61
Anguininae* + неопределенная тиленхида + <i>Eutylenchus excretorius</i> + <i>Sphaerularia bombi</i>)	–	–	63	99	–	–	66	–	91	97	–	82	92	92	70	97	–	92	65	–
<i>Eutylenchus excretorius</i> + <i>Sphaerularia bombi</i>	–	–	–	92	–	–	–	53	–	88	–	69	–	98	–	97	–	98	–	78
Anguininae*	100	99	100	99	100	99	100	99	100	98	100	91	100	96	100	97	100	99	100	73
Клада VI (Merliniinae + Psilenchidae)	92	100	91	98	78	99	67	100	78	99	89	100	90	99	94	99	87	98	87	98
Клада V (Tylenchidae)	53	96	–	92	58	99	65	99	63	98	–	97	–	98	–	83	–	50	–	52
Merliniinae + Psilenchidae + Tylenchidae	–	96	–	89	–	–	–	99	62	98	59	99	–	92	–	–	–	–	–	–
Tylenchinae (<i>Aglenchus</i> + <i>Coslenchus</i>)	100	99	100	100	100	100	100	99	100	99	100	100	100	99	100	99	100	98	100	100
Boleodorinae (<i>Basiria</i> + <i>Boleodorus</i>)	69	99	82	100	71	100	87	99	78	99	78	100	91	99	68	100	86	98	88	100
Клада VI (Criconematina)	99	99	100	99	99	93	98	99	99	98	99	84	100	99	98	93	97	99	98	72
Базальная позиция <i>Sphaeronema alni</i> в Criconematina	91	99	84	99	92	93	87	99	88	98	79	84	90	99	82	90	79	99	85	97
Клада VII (Hoplolaimoidea + Belonolaimidae + Telotylenchinae + Macrotriphurinae)	75	99	64	82	90	92	77	99	60	85	82	84	76	98	88	93	87	98	94	73
Meloidogynidae + Hirschmanniellinae + Pratylenchinae + Belonolaimidae + Telotylenchinae + Macrotriphurinae	–	74	–	82	58	97	–	88	–	94	–	91	–	97	–	–	–	59	–	–
Нематоды (Heteroderinae + Punctoderinae)	68	100	88	97	90	95	91	99	93	85	85	91	86	98	78	97	87	98	89	73
Heteroderinae (<i>Heterodera</i>)	59	100	87	97	84	95	86	99	87	85	81	91	81	98	80	97	85	98	90	73
Punctoderinae (<i>Punctodera</i> + <i>Globodera</i> + <i>Cactodera</i> + неопределенная цистообразующая нематода)	81	100	84	99	80	99	81	100	78	99	74	100	76	100	86	100	76	100	80	99
Heteroderinae + Punctoderinae + Ataloderinae	50	100	76	97	68	95	66	99	70	85	60	91	63	98	–	97	64	98	65	73
<i>Cryphodera</i> + <i>Meloidodera</i>	74	99	90	100	81	100	78	100	85	100	85	96	85	100	79	97	81	100	82	100
<i>Rhizonemella</i> + <i>Atalodera</i>	78	100	90	100	88	100	85	100	79	99	78	100	76	100	75	100	79	100	78	99
Hoplolaiminae (<i>Scutellonema</i> + <i>Hoplolaimus</i> + <i>Peltamigratus</i>)	–	94	–	–	–	–	–	–	–	–	–	53	–	–	–	61	–	–	–	–
Hoplolaiminae + <i>Radopholus</i>	–	–	–	65	52	64	–	85	–	83	–	–	–	63	–	–	–	60	–	62
Heteroderidae + Hoplolaimidae + Rotylenchulidae + <i>Radopholus</i>	–	–	69	76	52	91	59	88	51	73	–	51	–	74	–	88	66	97	67	73
<i>Meloidogyne</i>	67	100	61	81	85	94	66	96	100	67	77	96	71	99	78	99	81	99	83	75
<i>Meloidogyne</i> + <i>Pratylenchus</i> + <i>Hirschmanniella</i>	–	99	57	81	86	95	76	88	–	96	67	94	65	99	66	97	75	87	78	74
Belonolaimidae + Telotylenchinae + Macrotriphurinae	–	–	68	97	65	90	57	99	63	97	65	92	62	97	–	–	50	–	–	–
<i>Tylenchorhynchus</i> + <i>Macrotriphurus</i>	84	90	85	88	77	92	78	98	84	97	87	93	83	95	87	98	91	96	90	98
Клада VI + Клада VII	–	96	–	80	–	95	–	88	–	–	–	81	–	95	–	92	–	94	–	60

Таблица 3. Виды *Rotylenchulus*, анализированные в настоящем исследовании.

Вид	Место	Растение	Код пробы	Номер в Генном Банке				Источник
				D2-D3 28S рPHK	ВТС рPHK	COI	<i>hsp90</i>	
<i>R. clavicaudatus</i>	Провинция Квазулу-Натал, Южная Африка	Сахарный тростник	CD1357, KZN 1	КТ003739	КТ003785, КТ003786	-	-	Э. Ван ден Берг
<i>R. leptus</i>	Бритс, Северо-Западная провинция, Южная Африка	Сорго	Tv1 2055	-	-	-	-	Э. Ван ден Берг
<i>R. macrodoratus</i>	Паломбаио-Терлицци, провинция Бари, Италия, топотипы	Виноград	TOPIT	КТ003758	КТ003797	КТ003722	-	Н. Вовлас
<i>R. macrodoratus</i>	Бари, провинция Бари, Италия	Виноград	GRAIT	КТ003760, КТ003761	КТ003794	КТ003720, КТ003721	КТ003768	Н. Вовлас
<i>R. macrodoratus</i>	Бари, провинция Бари, Италия	Оливка	OLVIT	КТ003762	КТ003795, КТ003796	КТ003719	КТ003769	Н. Вовлас
<i>R. macrodoratus</i>	Маруджио, провинция Таранто, Италия	Оливка	TARIT	КТ003759	-	-	-	Н. Вовлас
<i>R. macrosoma</i>	Кадис, Испания	Дикая оливка	BAET	КТ003748, КТ003749	КТ003800, КТ003801, КТ003804, КТ003806, КТ003807, КТ003809-КТ003811	КТ003724	КТ003765	П. Кастилло
<i>R. macrosoma</i>	Херес де ла Фронтера, провинция Кадис, Испания	Оливка	J96	КТ003747	КТ003805, КТ003808	КТ003725	КТ003766	П. Кастилло
<i>R. macrosoma</i>	Уевар дель Альхарафе, провинция Севилья, Испания	Оливка	ST79V	КТ003750, КТ003751	КТ003802, КТ003803	КТ003726	КТ003767	П. Кастилло
<i>R. macrosomoides</i>	Коматипорт, провинция Мпумаланга, Южная Африка	Сахарный тростник	TVL2063; CD1482	КТ003752-КТ003757	КТ003787-КТ003792, КТ003798	КТ003723	КТ003764	Э. Ван ден Берг
<i>R. parvus</i>	Винтертон, провинция Квазулу, Натал, Южная Африка	Кукуруза	CD317, N803	КТ003734-КТ003738	КТ003771-КТ003779	КТ003732	КТ003770	Э. Ван ден Берг
<i>R. reniformis</i>	Хомстед, Флорида, США	-	CD746, CD747	-	КТ003793, КТ003799	КТ003727	КТ003763	С.А. Субботин
<i>R. reniformis</i>	Лейк-Уорт, Флорида, США	<i>Yucca elephantipes</i>	CD997	КТ003744	-	КТ003731	-	К. Донг
<i>R. reniformis</i>	Хомстед, Флорида, США	<i>Euphorbia</i> sp.	CD1153	КТ003743	-	КТ003730	-	С.А. Субботин
<i>R. reniformis</i>	Гора Дора, Флорида, США	<i>Sansevieria</i> sp.	CD1395	КТ003745	-	КТ003729	-	К. Донг
<i>R. reniformis</i>	Округ Джефферсон, Арканзас, США	Хлопчатник	CD1748	КТ003746	-	КТ003728	-	Р.Т. Роббинс
<i>R. sacchari</i>	Северная Капская провинция, Южная Африка	Кукуруза	CD1493, NC 2	КТ003740-КТ003742	КТ003780-КТ003784	КТ003733	-	Э. Ван ден Берг

Таблица 4. Виды и популяции цистоидных нематод, использованные в настоящем исследовании.

Вид	Место	Растение	Код пробы	Номер в Генном Банке			Источник
				D2-D3 of 28S рPHK	BTC рPHK	COI	
<i>Atalodera carolynae</i>	США, Калифорния, округ Марин, Томалес Бэй, Кейс Крик	<i>Festuca</i> spp.	CD882, CD891	MF425692, MF425693	MF425714, MF425715	MF425751, MF425752	С.А. Субботин
<i>Atalodera</i> sp. A	США	Неизвестное растение	CD1355	MF425694	-	-	С.А. Субботин
<i>Atalodera</i> sp. B	США, Вашингтон, Олимпийский национальный парк	Неизвестное растение	CD922	MF425689	-	MF425750	С.А. Субботин
<i>Atalodera</i> sp. B	США, Вашингтон, Олимпийский национальный парк	Неизвестное растение	CD946	MF425690	MF425712	MF425749	С.А. Субботин
<i>Atalodera</i> sp. B	США, Калифорния, округ Сакраменто, Ривер Бенд Парк	Неизвестное растение	CD837	MF425691	MF425713	-	С.А. Субботин
<i>Cryphodera sinensis</i>	Вьетнам, провинция Нинь Бинь, национальный парк Кук Фьонг	<i>Musa</i> sp.	1924, CD2230	MF425667	-	-	Ч.Н. Нгуен
<i>C. sinensis</i>	Вьетнам, провинция Нинь Бинь, национальный парк Кук Фьонг	<i>Arundinaria</i> sp.	1800, CD2231	MF425669	-	-	Ч.Н. Нгуен
<i>C. sinensis</i>	Вьетнам, провинция Туйен Куанг, На Ханг	<i>Dicksonia</i> sp.	2012, CD2232	MF425666	MF425718	MF425741	Ч.Н. Нгуен
<i>C. sinensis</i>	Вьетнам, провинция Нинь Бинь, национальный парк Кук Фьонг	Трвава	1794, CD2235	MF425665	-	-	Ч.Н. Нгуен
<i>C. sinensis</i>	Вьетнам, провинция Куанг Бинь, район Бо Трач	Неизвестное растение	1969, CD2243	MF425668	-	-	Ч.Н. Нгуен
<i>C. sinensis</i>	Вьетнам, провинция Нинь Бинь, национальный парк Кук Фьонг	Неизвестное растение	1798, CD2242	MF425670	MF425719	MF425738	Ч.Н. Нгуен
<i>C. sinensis</i>	Вьетнам, Ханой, Национальный парк Ба Ви	Mimoracae	2323	MF425664	-	-	Nguyen et al. (2011)
<i>C. sinensis</i>	Вьетнам, провинция Нинь Бинь, национальный парк Кук Фьонг	Неизвестное растение	2339	-	JF894395, JF894396	MF425737	Nguyen et al. (2011)
<i>C. sinensis</i>	Вьетнам, провинция Нинь Бинь, национальный парк Кук Фьонг	<i>Musa</i> sp.	2327	-	JF894389, JF894393	MF425740	Nguyen et al. (2011)
<i>C. sinensis</i>	Вьетнам, провинция Нинь Бинь, национальный парк Кук Фьонг	<i>Musa</i> sp.	2325	-	JF894388	MF425739	Nguyen et al. (2011)
<i>Cryphodera</i> sp. B	Вьетнам, провинция Нинь Бинь, национальный парк Кук Фьонг	Неизвестное растение	2338	MF425671	JF894400, JF894402	MF425743	Nguyen et al. (2011)
<i>Cryphodera</i> sp. C	Вьетнам, провинция Хайфон, национальный парк Кат Ба	Laugaceae	2348	-	JF894397- JF894399	MF425736	Nguyen et al. (2011)
<i>Cryphodera</i> sp. D	Вьетнам, провинция Донг Най, Национальный парк Нам Кэт Тиен (11.422°N, 107.428°E)	Бамбук	CD2310	MF425672	MF425716, MF425717	MF425744	К. Воркент
<i>Cryphodera</i> sp. E	Вьетнам, провинция Хайфон, национальный парк Кат Ба	Celastraceae	2347	MF425676	-	MF425742	Д. Штурхан. Ч.Н. Нгуен
<i>Cryphodera</i> sp. F	Вьетнам, провинция Нинь Бинь, национальный парк Кук Фьонг	Неизвестное растение	1791, CD2234	MF425675	MF425724	MF425732	Ч.Н. Нгуен
<i>Cryphodera</i> sp. F	Вьетнам, провинция Нинь Бинь, национальный парк Кук Фьонг	Неизвестное растение	1789, CD2238	MF425673	MF425725	MF425731	Ч.Н. Нгуен
<i>Cryphodera</i> sp. F	Вьетнам, провинция Нинь Бинь, национальный парк Кук Фьонг	Неизвестное растение	1795, CD2239	MF425674	MF425723	MF425730	Ч.Н. Нгуен
<i>Cryphodera</i> sp. G	Вьетнам, провинция Нинь Бинь, национальный парк Кук Фьонг	Неизвестное растение	1799, CD2233	MF425678	MF425721, MF425722	MF425728	Ч.Н. Нгуен
<i>Meloidodera astonei</i>	Мексика, муниципалитет Тескоко, штат Мехико	<i>Solanum rostratum</i>	CD1937	MF425679	MF425702,	MF425727	И. Цид Дел Прадо

<i>M. floridensis</i>	США, Флорида, Гейнсвилл	<i>Pinus elliotii</i>	CD1957	MF425684	MF425703 MF425706, MF425707	MF425729	Вера Р. Инсерра
<i>M. mexicana</i>	США, Техас	Неизвестное растение	CD681	MF425681, MF425683	MF425704, MF425705	MF425726	С.А. Субботин
<i>M. mexicana</i>	США, Техас	Перец	CD238	MF425680, MF425682	-	-	С.А. Субботин
<i>M. sikhotealiniensis</i> (= <i>M. alni</i>)	Германия, Бремен	Неизвестное растение	CD2259	-	-	MF425734	Д, Штурхан
<i>M. sikhotealiniensis</i>	Россия, Приморский край	<i>Betula</i> sp.	374, 377	MF425677	MF425720	MF425733	А. Ерошенко
<i>Rhizonemella</i> <i>sequoiae</i>	США, Калифорния, округ Марин, парк Лагунитас Лейк	<i>Sequoia sempervirens</i>	CD889	MF425699	-	-	С.А. Субботин
<i>Rhizonemella</i> sp. A	США, Калифорния, округ Марин, парк Лагунитас Лейк	Неизвестное растение	CD790, CD875	MF425695, MF425696	MF425708, MF425711	MF425746	С.А. Субботин
<i>Rhizonemella</i> sp. A	США, Калифорния, округ Марин, парк Лагунитас Лейк	Неизвестное растение	CD873	MF425697	MF425709, MF425710	MF425745	С.А. Субботин
<i>Rhizonemella</i> sp. B	США, Калифорния, округ Мендосино, Форт Браг	Неизвестное растение	CD780	MF425698	-	MF425747	С.А. Субботин
<i>Rhizonemella</i> sp. C	США, округ Санта-Круз, гора Хермон	Неизвестное растение	CD890	MF425700	-	MF425748	Д. Читамбар
<i>Verutus</i> sp.	Германия	Неизвестное растение	D47, CD322	MF425685	-	-	Д, Штурхан
<i>Rotylenchulus</i> sp.	США, Аризона	Трава	N16-00087, CD2034	MF425701	-	-	Р. Инсерра
<i>Betulodera</i> sp.	США, Калифорния, округ Йоло, Пута Крик	Неизвестное растение	CD1020	MF425688	-	-	С.А. Субботин
<i>Heterodera</i> <i>guangdongensis</i>	Вьетнам, провинция Лао Кай, лес Ван Бан	Неизвестное растение	1952, CD2237	MF425686, MF425687	-	MF425735	Ч.Н. Нгуен

Таблица 5. Положение некоторых клад в топологиях, полученных в результате анализа выравненных ВТС рРНК секвинсов цистообразующих нематод методами максимальной экономии (МП), максимального правдоподобия (МЛ) и минимальной эволюции (МЭ) [17].

	EB			KB			1		2		3		4		5		6		7		8		9					
	МП	МЭ	МЛ	МП	МЭ	МЛ	МП	МЭ	МЛ	МП	МЭ	МЛ	МП	МЭ	МЛ	МП	МЭ	МЛ	МП	МЭ	МЛ	МП	МЭ	МЛ				
Монофилия цистообразующих нематод (Heteroderinae + Punctoderinae)	■			●			●				●					■	■	×	●				■	■				
Heteroderinae + <i>T. crassocrustata</i>								×					●	■	×	■												
Punctoderinae + <i>T. crassocrustata</i>		◆	×	◆	×		●		◆	◆	×	■	×		●	×				●	×	●	●	×	×			
Монофилия Heteroderinae клады	◆	◆	×	●	●		■	■	×	●	◆	×	●	■	×	■	■	×	●	■	×	●	■	×	■	■	×	
Парафилия Heteroderinae клады																												
Goettingiana группа + Heteroderinae	◆	◆	×	●	●		●	●	×	●	●	×	◆	◆	×	■	●	×	■	●	×	■	■	×	●	●	×	
Goettingiana группа с другими Heteroderinae																									●	■	×	
Humuli группа + <i>H. salixophila</i>	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	
Avenae группа + Sacchari группа	◆	◆	×	■	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	■	◆	×	◆	◆	×	■	◆	×	◆	◆	×	
Sacchari группа с другими Heteroderinae																										●		
Cyperi группа + <i>A. orientalis</i> + <i>H. cynodontis</i> + <i>H. bifenestra</i>	◆	◆	×	●			◆	◆	×	■	◆	×		●		●	×			●		●	■	×				
Cyperi группа + <i>H. cynodontis</i> + <i>H. bifenestra</i>																										■	◆	×
Cyperi группа с другими Heteroderinae				●	×					●	●	×	●	×	■						●	×						
<i>A. orientalis</i> + <i>H. cynodontis</i> + <i>H. bifenestra</i>	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×		◆	◆	×	◆	◆	×			
<i>A. orientalis</i> + Goettingiana группа																			■	●	×							
<i>A. orientalis</i> + Cyperi группа + <i>H. cynodontis</i> + <i>H. bifenestra</i>																										■	■	×
Монофилия Punctoderinae клады	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	◆	◆	×	
Монофилия Globodera	●	◆		●			●	■		●			■		●		●	●		●	■		●	●		●		
<i>G. artemisiae</i> + <i>P. punctata</i>				●																								
<i>G. artemisiae</i> + <i>P. punctata</i> + другие Globodera																										●	●	
<i>G. artemisiae</i> + <i>C. estonica</i>		×																									×	

Значение бутстрепа : <70 - ●; 70-90-■; >90-◆

Таблица 6. Виды и популяции цистообразующих нематод из группы *Avenae*, использованные в исследовании.

Вид	Место	Растение	Код пробы	COI гаплотип	COI Номер в Генном Банке	BTC рРНК Номер в Генном Банке	Источник
<i>H. arenaria</i>	Голландия	<i>Ammophila</i>	550a, 862b	Har1	MG522943, MG522944	-	Г. Карссен Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. arenaria</i>	Великобритания, Линкольншир	<i>Ammophila</i>	863	Har1	MG522942	AF274396	Дж. Роу Subbotin <i>et al.</i> (1999, 2001, 2003)
<i>H. arenaria</i>	Италия, Терранова	<i>Ammophila</i>	CD1440	Har2	MG522939-MG522941	MG523155	Н. Вовлас
<i>H. aucklandica</i>	Великобритания, Сент-Олбанс	Трава	CD2391	Hauc1	MG523088, MG523089	AY148380	Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. aucklandica</i>	Новая Зеландия, Окленд	Трава	326, CD2397	Hauc1, Hauc2	MG523085-MG523087	AF274398	В. Бойте; Subbotin <i>et al.</i> (2001)
<i>H. australis</i>	Австралия, полуостров Йорк	Зерновые	CD1485	Haus1	KU147202, MG523101	AY148392, AY148395, AY148396	Subbotin <i>et al.</i> (2003); Subbotin (2015)
<i>H. australis</i>	Австралия	Зерновые	520a	Haus1	MG523103	-	Subbotin <i>et al.</i> (2002, 2003)
<i>H. australis</i>	Австралия, Южная Австралия	Зерновые	607	Haus1	MG523102	AY148394	Subbotin <i>et al.</i> (2002, 2003)
<i>H. australis</i>	Австралия, Виктория	Зерновые	CD1284	Haus1	MG523100	AY148393	Subbotin <i>et al.</i> (2002, 2003)
<i>H. avenae</i>	Франция, Аргентин	Зерновые	CD1466	HavA1	MG522937	AF274395	Р. Ривоал; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. avenae</i>	США, Орегон, округ Юнион	Зерновые	CD1285	HavA1	MG522927- MG522930	-	Р. Смайли
<i>H. avenae</i>	Германия, Бавария, Гравенройт	Зерновые	523b	HavA1	MG522938	-	Д. Штурхан; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. avenae</i>	США, Орегон	Зерновые	CA117	-	-	MG523156	Р. Смайли
<i>H. avenae</i>	США, Орегон, Бухта	Зерновые	CD1519	HavA1	MG522936	-	Р. Смайли
<i>H. avenae</i>	Франция, Вилласавары	Зерновые	88b; CD2399	HavA1, HavA3	MG522931- MG522933, MG522950	AY148372-AY148374	Р. Ривуал; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. avenae</i>	Германия, Бавария, Ринкам	Зерновые	CD1478	HavA2	MG522953	-	Д. Штурхан, Subbotin <i>et al.</i> (1999)
<i>H. avenae</i>	Сербия	Зерновые	CD1556	HavA2	MG522956	-	В. Оро
<i>H. avenae</i>	Словакия	Зерновые	CD1464	HavA2	MG522954	-	Д. Штурхан
<i>H. avenae</i>	-	Зерновые	517a	HavA2	MG522955	-	Г. Римпенхорст
<i>H. avenae</i>	Швейцария	Зерновые	CD1465	HavA2	MG522957	-	Дж. Роу
<i>H. avenae</i>	Марокко, Чауи, Сеттат	Зерновые	CD2335	HavA2, HavA5	MG522958-MG522960	-	Ф. Мокрини
<i>H. avenae</i>	Норвегия	Зерновые	CD2336	HavA3	MG522948	-	Р. Холгальдо
<i>H. avenae</i>	Франция, Сен-Жорж дю Буа	Зерновые	CD1461	HavA3	KU147188	-	Subbotin (2015)
<i>H. avenae</i>	США, Айдахо, Сент-Энтони	Зерновые	CD1521	HavA3	MG522949	-	Р. Смайли
<i>H. avenae</i>	Германия, Нижняя Саксония, Таакен	Зерновые	533b	HavA3	MG522951	AY148353	Д. Штурхан; Subbotin <i>et al.</i> (1999, 2003)
<i>H. avenae</i>	Норвегия	Зерновые	CD2337	HavA3	MG522952	-	Р. Холгальдо
<i>H. avenae</i>	Испания, Санта-Олалья	Зерновые	CD1443, CD2395	HavA3, HavA4	MG522945-MG522947	AY148354-AY148356	М. Ромеро; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. avenae</i>	Марокко	Зерновые	527a, b	HavA5, HavA6	MG522961, MG522962	AY148367-AY148369	С. Амури; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. avenae</i>	США, Орегон, Айленд Сити	Зерновые	CD1520	HavA7	MG522934	-	Р. Смайли
<i>H. avenae</i>	США, Вашингтон, Палус	Зерновые	CD1522	HavA8	MG522935	-	Р. Смайли
<i>H. avenae</i>	Турция, Адана, Сарикам, Дутлука	Пшеница	CD2004	HavB1	MG522993, MG522994	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Турция	Зерновые	CD1488	HavB1	MG522991, MG522992	-	Д. Штурхан
<i>H. avenae</i>	Турция	Зерновые	343	HavB1	MG522990	-	Д. Штурхан
<i>H. avenae</i>	Турция, Адана, Сарикам, Чабутлу	Пшеница	CD2005	HavB1	MG522995	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Турция, Адана, Сарычам, холм Бука	Пшеница	CD2044	HavB1	MG522989	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Тунис, Силиана	Зерновые	CD1456, CD1504	HavB1	MG522997, MG522998	-	Л. Вайнберг

<i>H. avenae</i>	Индия	Зерновые	503a	HavB2	MG522977	AY148362	Х. Римпенхорст; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. avenae</i>	Сирия, Аль-Хасака	Пшеница	-	HavB2	KC172909	-	Toumi <i>et al.</i> (2013b)
<i>H. avenae</i>	Турция, Мардин, Мидят, Идил Роуд	Ячмень	CD2006	HavB2	MG522971, MG522972	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Турция, Диярбакыр, Эргани, Коюналан	Пшеница	CD2002	HavB2	MG522981, MG522982	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Сирия, Аль-Хасака, Блэк Хилл	Ячмень	CD1568	HavB2	MG522976	-	Ф. Туми; Toumi <i>et al.</i> (2015a)
<i>H. avenae</i>	Сирия, Аль-Хасака, Хазна	Ячмень	CD1570	HavB2	MG522973	-	Ф. Туми; Toumi <i>et al.</i> (2015a)
<i>H. avenae</i>	Турция, Диярбакыр, Центр, Багпынар	Пшеница	CD2007	HavB2	MG522965, MG522966	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Турция, Санлыурфа, Биречик, Коджаали	Ячмень	CD1999	HavB2	MG522963	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Сирия, Эль-Хассаке, Ам-Роос	Ячмень	CD1569	HavB2	MG522978	-	Ф. Туми; Toumi <i>et al.</i> (2015a)
<i>H. avenae</i>	Турция, Санлыурфа Центр, Кабахайдар	Пшеница	CD2003	HavB2	MG522974, MG522975	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Египет, Аль Таса	Зерновые	CD1982	HavB2	MG522979	-	М. Баклава
<i>H. avenae</i>	Египет, Абу Султан	Зерновые	CD1981	HavB2	MG522983	-	М. Баклава
<i>H. avenae</i>	Израиль, Ха-хоола	Зерновые	529b	HavB2	MG522980	AY148366	М. Мор; Subbotin <i>et al.</i> (2003).
<i>H. avenae</i>	Египет	Зерновые	CD1980	HavB2	MG522967	-	М. Баклава
<i>H. avenae</i>	Турция, Санлыурфа, Суруч, Чалишканлар	Ячмень	CD2001	HavB2	MG522968	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Сирия, Эль-Хассаке, Сибат	Пшеница	CD1566	HavB2	MG522964	-	Ф. Туми; Toumi <i>et al.</i> (2015a)
<i>H. avenae</i>	Израиль, Низ Оз	Зерновые	CD1515	HavB2, HavB6	MG522969, MG522970	AY148365	Д. Орион; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. avenae</i>	Турция, Хатай	Пшеница	CD1598	HavB3	MG523011	-	Ф. Туми
<i>H. avenae</i>	Тунис, Кайруан	Зерновые	CD1505	HavB3	MG523005, MG523006	-	Л. Вайнберг
<i>H. avenae</i>	Турция, Османье Центр, Гюнязы	Пшеница	CD2000	HavB3	MG523009	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Турция, Османье Центр, Дервиши	Пшеница	CD1996	HavB3	MG523007, MG523008	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Турция, Османье Мустафабейли, Имран	Пшеница	CD1995	HavB3	MG523003, MG523004	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Турция, Адана, Сарикам	Пшеница	CD2042	HavB3	MG523002	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Турция, Килис	Пшеница	CD1597	HavB3	MG523010	-	Ф. Туми
<i>H. avenae</i>	Турция, Хатай, Рейханлы-Мюшрюфе	Пшеница	CD2048	HavB3	MG523001	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Тунис, Загуан	Зерновые	CD1455	HavB4	MG523000	-	Л. Вайнберг
<i>H. avenae</i>	Турция, Османье Центр, Цевдетие	Пшеница	CD2041	HavB5	MG522999	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. avenae</i>	Израиль, Бет Даган	Зерновые	477	HavB6	MG522996	AY148363	Д. Орион; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. avenae</i>	Саудовская Аравия	Зерновые	504a	HavB7	MG522988	AY148361	Х. Римпенхорст; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. avenae</i>	Иран, Илам, Мехран-Реза	Пшеница	Zah33	HavB7	MG522984- MG522987	AF498378	З. Танха Маафи; Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003)
<i>H. avenae</i>	Сирия, Дейр Эззор	Пшеница	-	HavB8	KC172908	-	Toumi <i>et al.</i> (2013b)
<i>H. filipjevi</i>	Сербия	Зерновые	CD1557b	HfA1	MG523053	-	В. Оро; Oro <i>et al.</i> (2012)
<i>H. filipjevi</i>	Россия, Саратов	Овес	561	HfA1	MG523050	AF274399	Subbotin <i>et al.</i> (2001)
<i>H. filipjevi</i>	Россия, Нижегородская область, Городец	Овес	535b	HfA1	MG523049	-	Л. Насонова; Subbotin <i>et al.</i> (1999)
<i>H. filipjevi</i>	США, Орегон	Зерновые	CD1517, CD1518	HfA1	MG523051, MG523052	-	Р. Смайли
<i>H. filipjevi</i>	Россия, Ленинградская область, Пушкин	Пырей	563b	HfA1	MG523048	-	Subbotin <i>et al.</i> (2003)

<i>H. filipjevi</i>	Таджикистан, Душанбе	Пшеница	525a, CD2393	HfA2, HfA3	MG523033- MG523035	AY148402	Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Россия, Башкортостан, Баймак	Пшеница	536, CD2400	HfA2-HfA4	MG523030- MG523032	-	Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Украина, Чабаны	Зерновые	CD1477	HfA3, HfA4	MG523036- MG523038	-	С.А. Субботин
<i>H. filipjevi</i>	США, Вашингтон	Овес	CD1876, CD1878	HfA4	MG523039, MG523040	-	Т.К. Паулитц
<i>H. filipjevi</i>	США, Монтана	Зерновые	CD1989a	HfA4	MG523042	KP878490	А. Скандар; Dyer <i>et al.</i> (2015)
<i>H. filipjevi</i>	Германия, Гимбте, недалеко от Мюнстера	Зерновые	CD1442	HfA4	MG523044	AY148400	Г. Румпенхорст; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Швеция	Зерновые	CD1445b	HfA4	MG523041	-	Д. Рове
<i>H. filipjevi</i>	Россия, Нижегородская область, Вад	Овес	CD1475	HfA4	MG523043	AY148401	Л. Насонова; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Испания, Торральба де Калатрава	Зерновые	560a; CD2392	HfA5	MG523077, MG523078	AY148399	М. Ромеро; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Сербия	Зерновые	CD1584	HfA5	MG523081	-	Ф. Туми
<i>H. filipjevi</i>	Китай, Хенан провинция Киаи	Зерновые	CD2359	HfA5, HfA8	MG523079, MG523080	-	Х-М. Ли
<i>H. filipjevi</i>	Великобритания, Акенхем	Зерновые	526, CD2401	HfA6, HfA7	MG523045- MG523047	AY148403	Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Турция	Зерновые	CD1479	HfA9	MG523082	-	Д. Штурхан
<i>H. filipjevi</i>	Турция, Эскишехир	Зерновые	42B	HfA10	MG523084	-	Ф. Туми; Toumi <i>et al.</i> (2013a, b)
<i>H. filipjevi</i>	Греция, Крит	-	CD2039	HfA10	MG523083	-	З. Ханду
<i>H. filipjevi</i>	Турция, Анкара	Пшеница	CD1567	HfA11	MG523071	-	Ф. Туми
<i>H. filipjevi</i>	Турция, Центральная Анатолия	Овес	CD1476	HfA11	MG523072	-	Г. Румпенхорст
<i>H. filipjevi</i>	Турция, Анкара	Зерновые	Fat23	HfA11	MG523074, MG523075	-	Ф. Туми; Toumi <i>et al.</i> (2013a, b)
<i>H. filipjevi</i>	Турция, К. Марас, Афсин, Эльбистан Роуд	Зерновые	CD1998	HfA11, HfA12	MG523068, MG523069	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. filipjevi</i>	Турция, К. Марас, Эльбистан, Бююк Япалак-II	Пшеница	CD1993	HfA11, HfA12	MG523066, MG523067	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. filipjevi</i>	Турция, К. Марас, Эльбистан, Бююк Япалак-I	Пшеница	CD1991	HfA11, HfA12	MG523064, MG523065	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. filipjevi</i>	Турция, К. Марас, Экинезю, Центр	Пшеница	CD1994	HfA11, HfA12	MG523062, MG523063	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. filipjevi</i>	Турция, дорога Адана Позанты	Пшеница	CD2040	HfA12	MG523070	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. filipjevi</i>	Турция, Афшин, ТЭЦ	Пшеница	CD1990	HfA12	MG523058, MG523059	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. filipjevi</i>	Турция, К. Марас, Афшин, Центр	Пшеница	CD1997	HfA12	MG523060, MG523061	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. filipjevi</i>	Турция	Зерновые	528b	HfA13	MG523076	-	Г. Румпенхорст; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Сирия, Эль-Хассак, Тель-Айол	Ячмень	CD1571	HfA14	MG523057	-	Ф. Туми; Toumi <i>et al.</i> (2015a)
<i>H. filipjevi</i>	Сирия, Аль-Хасак, Гриба	Пшеница	CD1572	HfA15	MG523056	-	Ф. Туми; Toumi <i>et al.</i> (2015a)
<i>H. filipjevi</i>	Сирия, Эль-Хассак, Ханка	Ячмень	CD1617	HfA16	MG523054	-	Ф. Туми; Toumi <i>et al.</i> (2015a))
<i>H. filipjevi</i>	Сирия, Эль-Хассак, Йоллебсан	Зерновые	Fat125	HfA16	MG523073	-	Ф. Туми; Toumi <i>et al.</i> (2015a, b)
<i>H. filipjevi</i>	Сирия, Аль-Хасак, Гриба	Пшеница	CD1573	HfA16	MG523055	-	Ф. Туми; Toumi <i>et al.</i> (2015a)
<i>H. filipjevi</i>	Иран, Восточный Азербайджан, Маранд	Пшеница	Zah34	HfB1, HfB2	MG523012- MG523014	-	З. Танха Маафи; Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Иран, Керман, Бардир	Пшеница	Zah44	HfB3	MG523026	-	З. Танха Маафи; Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Иран, Йезд Марваст	Пшеница	Zah36 CD1460	HfB3, HfB4	MG523023- MG523025, MG523027	-	Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Иран, Персия, Забада, Ташак	Пшеница	CD1439	HfB4	MG523029	-	Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Иран, Марваст	Зерновые	505a	HfB4	MG523028	AY148404	Г. Румпенхорст; Subbotin <i>et al.</i>

<i>H. filipjevi</i>	Иран, Курдистан, Корве	Пшеница	Za8	HfB5	MG523022	-	(2003) З. Танха Маафи; Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Иран, Хамадан, Каботар Аханг	Пшеница	Zah35	HfB6	MG523015, MG523016	-	З. Танха Маафи; Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Иран, Исфахан	Пшеница	Zah37	HfB6	MG523017, MG523018	AF498380	З. Танха Маафи; Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003)
<i>H. filipjevi</i>	Иран, Алигударз	Пшеница	Did15	HfB6	KC172910	JX024208	Toumi <i>et al.</i> (2013a, b)
<i>H. filipjevi</i>	Сирия, Аль-Хасака	Пшеница	Fat125	HfB6	KC172911	-	Toumi <i>et al.</i> (2013a, b)
<i>H. filipjevi</i>	Иран	Зерновые	Fat15	HfB6	MG523021	-	Ф. Туми
<i>H. filipjevi</i>	Иран, Эстахан	Пшеница	CD2365	HfB7	MG523020	-	З. Танха Маафи
<i>H. filipjevi</i>	Иран, Хузестан, Рамшир	Пшеница	CD2364	HfB8	MG523019	-	З. Танха Маафи
<i>H. hordecalis</i>	Израиль, Рейм	Зерновые	CD1492c	HhA1	MG523146	-	М. Мор
<i>H. hordecalis</i>	Тунис	Пшеница	TunisB	HhA1	KC172912	JX024216	Toumi <i>et al.</i> (2013a, b)
<i>H. hordecalis</i>	Израиль, Гелат	Зерновые	CD1491c	HhA2	MG523145	MG523147	М. Мор
<i>H. hordecalis</i>	Швеция	Зерновые	CD1486	HhB1	MG523142	MG523150	Д.. Рове
<i>H. hordecalis</i>	Словакия	Злаки	CD2396 (E1568)	HhB2	MG523140	MG523148	Д. Штурхан
<i>H. hordecalis</i>	Словакия	Злаки	511	HhB3	MG523141	-	Д. Штурхан
<i>H. hordecalis</i>	Германия	Злаки	CD1484	HhB4	MG523143, MG523144	MG523151	Д. Штурхан
<i>H. hordecalis</i>	Иран, Гилан, город Анзали	Злаки	Zah23	HhB5	MG523139	-	З. Танха Маафи
<i>H. hordecalis</i>	Иран, Ардебиль, Мишкин Сити	Пшеница, Злаки	Zah27	HhB5, HhB6	MG523135, MG523136	AF498381, MG523149, MG523152, MG523153	З. Танха Маафи; Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003, 2007)
<i>H. latipons</i>	Сирия, Хасак	Пшеница	CD1590	HIA1	MG523118	-	Ф. Мокрини; Toumi <i>et al.</i> (2013a, b; 2015a)
<i>H. latipons</i>	Турция, Килис, Центр, Йыгматепе	Ячмень	CD2047	HIA1	MG523116	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. latipons</i>	Сурья, Аль-Хасак, Дим Аль-Сукари	Пшеница	CD1609	HIA1	MG523115	-	Ф. Туми; Toumi <i>et al.</i> (2015a)
<i>H. latipons</i>	Турция, Эльбистан, Гёксун Роуд	Зерновые	CD1992	HIA1	MG523117	-	И.Х. Елекчегол
<i>H. latipons</i>	Иран, Зенджан	Зерновые	Zah6	HIA2	MG523123	-	З. Танха Маафи; Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003)
<i>H. latipons</i>	Иран, Западный Азербайджан, Салмас	Зерновые	Zah5, Zah9	HIA2, HIA3	MG523121, MG523122	AF498382	З. Танха Маафи; Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003)
<i>H. latipons</i>	Иран, Зенджан	Пшеница	CD2366	HIA3	MG523120	-	З. Танха Маафи
<i>H. latipons</i>	Сирия, Дейр Эззор	Пшеница	-	HIA4	KC172913	-	Toumi <i>et al.</i> (2013b)
<i>H. latipons</i>	Турция, Килис	Пшеница	CD1595	HIA5	MG523119	-	Ф. Туми
<i>H. latipons</i>	Сирия, Алеппо, Атьен	Ячмень	CD1604	HIA6	MG523127	-	Ф. Туми
<i>H. latipons</i>	Сирия, Алеппо, Ахтарин	Ячмень	CD1606	HIA6	MG523128	-	Ф. Туми
<i>H. latipons</i>	Сирия, Бреда	Зерновые	Breda	HIA7	MG523124	AF274402	У. Шольц; Subbotin <i>et al.</i> (2001)
<i>H. latipons</i>	Израиль, Гелат	Зерновые	Gelat, CD1491b	HIA8, HIA9	MG523123, MG523126	-	М. Мор
<i>H. latipons</i>	Россия, Ростовская область	Злаки	484c	HIB1	MG523129	AY347925	В.Р. Чижов; Madani <i>et al.</i> (2004)
<i>H. mani</i>	США, Вашингтон, Олимпийский национальный парк	Злаки	CD956	Hm1	MG523095, MG523097	-	С.А. Субботин
<i>H. mani</i>	Германия, Бавария	Злаки	519	Hm1	MG523098	AY148378	Г. Румпенхорст; Subbotin <i>et al.</i> (2003)
<i>H. mani</i>	США, Калифорния, округ Сан-Луис-Обиспо	Злаки	CD1237	Hm1	KU147203	MG523157	С.А. Субботин; Subbotin (2015)
<i>H. mani</i>	Германия	Злаки	521a	Hm1	MG523096	-	Г. Румпенхорст; Subbotin <i>et al.</i> (2003)

<i>H. mani</i>	США, Калифорния, округ Монтерей	Злаки	CD1252	Hm2	MG523099		С.А. Субботин
<i>H. pratensis</i>	Германия	Злаки	CD2398	Hp1	MG523104-MG523107	-	Д. Штурхан
<i>H. pratensis</i>	Нидерланды, недалеко от Роттердама	Злаки	559	Hp1	KU147189	AY148388	Subbotin <i>et al.</i> (2003); Subbotin (2015)
<i>H. pratensis</i>	Германия, Миссунде, недалеко от Шлезвига	Злаки	537a	Hp1	KU147194	-	Subbotin (2015)
<i>H. pratensis</i>	Германия	Злаки	555	Hp1	KU147192	-	Subbotin (2015)
<i>H. pratensis</i>	Бельгия, Звин	Злаки	Zwi78	Hp1	KU147191	-	Subbotin (2015)
<i>H. pratensis</i>	Германия	Злаки	601	Hp1	KU147193	-	Subbotin (2015)
<i>H. pratensis</i>	Германия	Злаки	507a	Hp1	KU147190	-	Subbotin (2015)
<i>H. pratensis</i>	Россия, Ленинградская область, Путилово	Пырей	565, 595	Hp2	KU147200, KU147201	AY148351	Subbotin <i>et al.</i> (2002); Subbotin (2015)
<i>H. pratensis</i>	Иран, Гилан, город Анзали	Злаки	Zah46	Hp3, Hp4	MG523110- MG523112	AF498379	З. Танха Маафи; Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003)
<i>H. pratensis</i>	Иран, Тегеран, Гаксар	Злаки	Zah41	Hp5	MG523108	-	Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003, 2007)
<i>H. pratensis</i>	Иран, Ардебиль, Мишкин Сити	Злаки	Zah30	Hp5	MG523109	-	Tanha Maafi <i>et al.</i> (2003, 2007)
<i>H. sturhani</i>	Китай, провинция Цзянсу	Зерновые	CD2360	Hs1	MG523113, MG523114	-	Х-М. Ли
<i>H. sturhani</i>	Китай, Пекин, район Тунчжоу	Зерновые	514a	Hs1	KU147195	AY148382	Subbotin <i>et al.</i> (2003); Subbotin (2015)
<i>H. sturhani</i>	Китай, Пекин, Фан округ	Зерновые	513b	Hs1	KU147196	AY148381	Subbotin <i>et al.</i> (2003); Subbotin (2015)
<i>H. sturhani</i>	Китай, провинция Шанхи, Вэнь	Зерновые	CD1555	Hs1	KU147197, KU147198	-	Subbotin (2015)
<i>H. sturhani</i>	Китай, Пекин, Пинг	Зерновые	515a	Hs2	KU147199	-	Subbotin (2015)
<i>H. ustinovii</i>	США, Аризона	Злаки	DF8	Hus1	MG523090	-	М. МакКлюр
<i>H. ustinovii</i>	США, Аризона	Злаки	DF1	Hus1	MG523091	-	М. МакКлюр
<i>H. ustinovii</i>	Бельгия	Злаки	281, 282, 286	Hus1, Hus2	MG523092-MG523094	AY148407	Subbotin <i>et al.</i> (1999, 2003)
<i>Heterodera</i> sp.	Сирия, Аль-Хасак, Тель Халед	Пшеница	CD1625	HspA1	MG523134	-	Ф. Туми, Toumi <i>et al.</i> (2013a, b; 2015a)
<i>Heterodera</i> sp.	Турция, Кадинтор	Зерновые	524b, 556	HspB2-HspB5	MG523130-MG523133	MG523154	Д. Штурхан

Таблица 7. Виды и популяции цистообразующих нематод из рода *Globodera*, использованные в исследовании.

Вид	Место (патотип)	Растение	Код пробы	COI гаплотип	COI номер в Генном Банке	cytb гаплотип	cytb номер в Генном Банке	ВТС рРНК номер в Генном Банке	Источник
<i>G. agulhasensis</i>	Южная Африка, Западная Капская провинция, Гансбаай	<i>Senecio burchelli</i>	SK18/3, CD1895	GaguCOI1	MN095891	-	-	KC148543	Р. Кнотце, Knoetze <i>et al.</i> (2017a)
<i>G. artemisiae</i> <i>G. artemisiae</i>	Германия, Мюнстер Россия, Приморский край	<i>Artemisia</i> sp. <i>Artemisia</i> sp.	CD2193a CD2178a, b	GartCOI1 GartCOI2, GartCOI3	MN095894 MN095892, MN095893	- -	- -	- -	Д. Штурхан А.С. Ерошенко
<i>G. capensis</i>	Южная Африка, Западный Кейп, Сандвельд, Сандберг Фарм	-	29147, CD1892a	GcapCOI1	MN095880	GcapCb1	MN096070	JQ595413	Р. Кнотце,
<i>G. ellingtonae</i>	США, Орегон, Пауэлл Бьютт	Картофель	CD1988a	GeCOI1	MN095879	-	-	-	Л.-М. Дандуранд, И. Засада, А. Петц
<i>G. mexicana</i>	Мексика, штат Мексика, Сан-Мигель-де-ла-Виктория, образец 34	<i>Solanum nigrum</i>	CD2814, CD2777	GmexCOI1	MN095877, MN095878	-	-	MN258868	И. Цид Дел Прадо Вера, С.А. Субботин
<i>G. mexicana</i>	Мексика, штат Мехико, Тескоко, Эль-Хардин-де-Текексвина, образец 5	<i>S. nigrum</i>	CD2821a, b, d, e	GmexCOI2	MN095873- MN095876	GmexCb2	MN096069	MN258870	И. Цид Дел Прадо Вера, С.А. Субботин
<i>G. mexicana</i>	Мексика, штат Мексика, Амекамека, Сан Диего Хиехаелко, образец 8	<i>S. stoloniferum</i>	CD2792b	GmexCOI3	MN095864	GmexCb1	MN096068	MN258873, MN258874	И. Цид Дел Прадо Вера, С.А. Субботин
<i>G. mexicana</i>	Мексика, штат Мексика, Амекамека, Сан Диего Хиехаелко	<i>S. stoloniferum</i>	CD514	GmexCOI3	MN095863	-	-	HQ260405, HQ260406	И.И. Цид Дел Прадо Вера, Subbotin <i>et al.</i> (2011)
<i>G. mexicana</i>	Мексика, штат Мексика, Амекамека, Сан Диего Хиехаелко, образец 5	<i>S. stoloniferum</i>	CD2809a, d, e	GmexCOI4, GmexCOI5	MN095867- MN095869	-	-	MN258869	И.И. Цид Дел Прадо Вера, С.А. Субботин
<i>G. mexicana</i>	Мексика, штат Мексика, Амекамека, Сан Диего Хиехаелко, образец 6	<i>S. stoloniferum</i>	CD2784	GmexCOI4	MN095870	-	-	MN258872	И. Цид Дел Прадо Вера, С.А. Субботин
<i>G. mexicana</i> (= <i>G. bravoae</i>)	Мексика, Ла Каньяда де Контрерас, Делегация Магдалена Контрерас, Мехико	<i>Jaltomata procumbens</i>	CD1891b, c	GmexCOI4	MN095871	-	-	MN116522	И.И. Цид Дел Прадо Вера
<i>G. mexicana</i>	Мексика, штат Тлакскала, Уамантла, Франциско Вилла Текоак, образец 38	<i>S. rostratum</i>	CD2862e, c, CD2183	GmexCOI5, GmexCOI6, GmexCOI7	MN095865, MN095866, MN095872	-	-	MN258871	И. Цид Дел Прадо Вера, С.А. Субботин
<i>G. millefolii</i>	Эстония	<i>Achillea millefolium</i>	CD2181a, b	GmilCOI1	MN095889, MN095890	-	-	HQ260407	Е. Krall, D. Sturhan, Subbotin <i>et al.</i> (2001)
<i>G. pallida</i>	Кипр, восточная часть, (Pa2/3)	Картофель	CD2739b	GrCOIA1	MN095895	GrCbA1	MN096102	-	Н. Дофине,
<i>G. pallida</i>	Великобритания	Картофель	CD2169a,	GrCOIA1	MN095896,	GrCbA1	MN096110,	-	Д. Рове

<i>G. pallida</i>	Испания, Тенерифе, образец 1	Картофель	CD2664a CD2580a, b	GrCOIA1	MN095900 MN095897, MN095913	GrCbA1	MN096117 MN096104, MN096107	MN116517, MN116518	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Испания, Тенерифе, образец 2	Картофель	CD2577a, b	GrCOIA1	MN095901, MN095904	GrCbA1	MN096105	MN116516	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Испания, Тенерифе, образец 3	Картофель	CD2581b, a	GrCOIA1	MN095906	GrCbA1, GrCbA14	MN096096, MN096108	MN116519	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Швейцария(Pa2/3)	Картофель	CD2743a, b	GrCOIA1	MN095899	GrCbA1	MN096103, MN096112	-	Н. Дофине, Э. Гренье
<i>G. pallida</i>	Голландия (Pa2)	Картофель	CD2740a, b	GrCOIA1	MN095903, MN095910	GrCbA1	MN096100, MN096106	-	Н. Дофине, Г. Карссен
<i>G. pallida</i>	Германия, Дельмсен	Картофель	CD2198a	GrCOIA1	MN095905	-	-	-	Г. Римпенхорст
<i>G. pallida</i>	Германия, Келле	Картофель	CD611, CD2199a	GrCOIA1	MN095898, MN095902	GrCbA1	MN096113	-	Г. Римпенхорст
<i>G. pallida</i>	Германия, Нижняя Саксония	Картофель	CD2869a, b	GrCOIA1	MN095911, MN095912	-	-	-	С. Кевник
<i>G. pallida</i>	Франция, Домен де ла Мотт (Pa2/3)	Картофель	CD2741a, b	GrCOIA1	MN095907, MN095908	GrCbA1	MN096109, MN096111	-	Н. Дофине
<i>G. pallida</i>	США, Айдахо	Картофель	CD2744a	GrCOIA1	MN095909	GrCbA1	MN096101	-	Н. Дауфинайс
<i>G. pallida</i>	Боливия, Ла-Пас, Лос-Андес, Керуни	Картофель	CD2595a	GrCOIA3	MN095915	GrCbA11	MN096116	-	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Перу	Картофель	CD610	GrCOIA3	MN095916	GrCbA16	MN096091	-	Г. Римпенхорст
<i>G. pallida</i>	Боливия, Ла-Пас, Арома, Каяни	Картофель	CD2597a, b	GrCOIA3	MN095917, MN095918	GrCbA16	MN096090, MN096092	MN116521	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Боливия, Ла-Пас, Ингави, Казачута	Картофель	CD2596a, b	GrCOIA3	MN095919, MN095920	GrCbA11	MN096115, MN096118	MN116520	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Перу, Капачица	Картофель	CD2188a, b	GrCOIA4	MN095921, MN095922	GrCbA11	MN096114	HQ260426	Дж. Холлманн, Subbotin <i>et al.</i> , (2011)
<i>G. pallida</i>	Боливия, Лас-Пас, Лос-Андес, Севируйо	Картофель	CD2561b	GrCOIA4	MN095923	GrCbG1	MN096089	-	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Перу, Куско, Паукартамбо, Котатоклла	Картофель	CD2558a, b, c, d	GrCOIA5, GrCOIB1	MN095914, MN095924, MN095925	GrCbC2, GrCbA15	MN096088, MN096093- MN096095	MN116523, MN116524	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Великобритания, P4A	Картофель	CD2706a (c11, c12)	GrCOIC2	MN095926, MN095927	-	-	HQ670257- HQ670262, HQ670269	В. Блок, Hoolahan <i>et al.</i> (2011)
<i>G. pallida</i>	Перу, Куско, Киспиканчи	Картофель	CD2553a, CD2553b, CD2553c	GrCOID1	MN095928	GrCbB1, GrCbB7, GrCbD1	MN096122, MN096128, MN096129	MN116525	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Перу, Куско, Марангани, Канчи	Картофель	CD2554a, b	-	-	GrCbB1	MN096123, MN096124	-	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Перу, Круз Пампа	Картофель	CD2555a, b	-	-	GrCbB1, GrCbB7	MN096126, MN096130	-	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Перу	Картофель	CD2557	-	-	GrCbB1	MN096125	-	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Коста-Рика, вулкан Иразу	Картофель	CD2547	-	-	GrCbB7	MN096127	-	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Перу, Куско, Калька	Картофель	CD2552	-	-	GrCbB7	MN096131	-	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Великобритания, Восточный Лотиан	Картофель	CD2705a	-	-	GrCb14	MN096097	AM409004	В. Блок, Rylyupenko <i>et al.</i> (2008)
<i>G. pallida</i>	Панама	Картофель	CD2560a, b	-	-	GrCbB1	MN096120,	-	Ж. Франко

							MN096121		
<i>G. pallida</i>	Перу, Чоком, Хауха	Картофель	CD2559a	-	-	GpCbB1	MN096119	-	Ж. Франко
<i>G. pallida</i>	Новая Зеландия	Картофель	CD2742a, b	-	-	GpCbA14	MN096099	-	Н. Дофине, Э. Гренье
<i>G. rostochiensis</i>	Германия, Хармерц (Ro5)	Картофель	CD2200	GrCOIA1	MN095979	-	-	-	Г. Римпенхорст, Дж. Холлманн
<i>G. rostochiensis</i>	Немецкий, Ганновер (Ro1)	Картофель	CD2197a	GrCOIA1	MN095933	-	-	-	Г. Римпенхорст, Дж. Холлманн
<i>G. rostochiensis</i>	Великобритания (Ro3)	Картофель	CD2170a	GrCOIA1	MN095965	-	-	-	Д. Рове
<i>G. rostochiensis</i>	Великобритания (Ro4)	Картофель	CD2166a, b	GrCOIA1	MN095931, MN095934	-	-	-	Г. Римпенхорст, Дж. Холлманн
<i>G. rostochiensis</i>	Россия, Белгородская область, образец 1	Картофель	CD2682b	GrCOIA1	MN095977	CrCbA1	MN096142	-	С.А. Субботин
<i>G. rostochiensis</i>	Россия, Калининградская область, Правдинский район	Картофель	CD2176, CD2663a	GrCOIA1	MN095948, MN095975	-	-	-	С.А. Субботин
<i>G. rostochiensis</i>	Россия	Картофель	CD558	GrCOIA1	MN095973	-	-	-	В.Р. Чижев
<i>G. rostochiensis</i>	Россия, Хабаровский край, Комсомольск-на-Амуре	Картофель	CD2168b	GrCOIA1	MN095972	-	-	-	С.А. Субботин
<i>G. rostochiensis</i>	Россия, Примирский край	Картофель	CD2672b	GrCOIA1	MN095940	CrCbA1	MN096136	-	С.А. Субботин
<i>G. rostochiensis</i>	Россия, Примирский край, Владивосток	Картофель	CD2674a	GrCOIA1	MN095937	-	-	-	С.А. Субботин
<i>G. rostochiensis</i>	Россия, Примирский край, Тавриченка	Картофель	CD2665b, CD2673b, CD2164b	GrCOIA1	MN095943, MN095954, MN095955	CrCbA1	MN096171	-	С.А. Субботин
<i>G. rostochiensis</i>	Россия, Владимир	Картофель	CD2669b	GrCOIA1	MN095969	-	-	-	С.А. Субботин
<i>G. rostochiensis</i>	Россия, Смоленск	Картофель	CD2167a, b	GrCOIA1	MN095952, MN095964	-	-	-	С.А. Субботин, Subbotin <i>et al.</i> (2000)
<i>G. rostochiensis</i>	Россия, Белгородская область, образец 2	Картофель	CD2671a, b	GrCOIA1	MN095963	CrCbA1	MN096138, MN096139	-	С.А. Субботин
<i>G. rostochiensis</i>	Россия, Псков	Картофель	CD2173a	GrCOIA1	MN095958	-	-	-	С.А. Субботин
<i>G. rostochiensis</i>	Россия, Ярославская область	Картофель	CD2675a	GrCOIA1	MN095949	CrCbA1	MN096145	-	С.А. Субботин
<i>G. rostochiensis</i>	Россия, Московская область	Картофель	CD2172a	GrCOIA1	MN095944	-	-	-	С.А. Субботин
<i>G. rostochiensis</i>	Россия, Вологодская область	Картофель	CD2678	-	-	CrCbA1	MN096144	-	С.А. Субботин
<i>G. rostochiensis</i>	Киргизия	Картофель	CD2165a, b	GrCOIA1	MN095961, MN095970	-	-	-	А. Чакаева
<i>G. rostochiensis</i>	Новая Зеландия	Картофель	CD2177b	GrCOIA1	MN095957	-	-	-	Д. Рове
<i>G. rostochiensis</i>	США, Нью-Йорк (Ro1)	Картофель	CD2835a	GrCOIA1	MN095936	-	-	-	Х. Ван
<i>G. rostochiensis</i>	США, Нью-Йорк (Ro2)	Картофель	CD2834a, b	GrCOIA1	MN095939, MN095942	-	-	-	Х. Ван
<i>G. rostochiensis</i>	Канада, Квебек	Картофель	CD2738a, b	GrCOIA1	MN095945	CrCbA1	MN096146, MN096147	-	Н. Дофине
<i>G. rostochiensis</i>	Южная Африка, Сандвелд	Картофель	CD2842	GrCOIA1	MN095930	-	-	-	Р. Кнотце, Н. Африкандер
<i>G. rostochiensis</i>	Южная Африка, Гаутенг	Картофель	CD2840	GrCOIA1	MN095947	-	-	-	Р. Кнотце, Н. Африкандер
<i>G. rostochiensis</i>	Южная Африка, Церера	Картофель	CD2841	GrCOIA1	MN095941	-	-	-	Р. Кнотце, Н. Африкандер
<i>G. rostochiensis</i>	Гватемала, образец 32	Картофель	CD2548b	GrCOIA1	MN095953	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Гватемала, образец 48	Картофель	CD2550b	GrCOIA1	MN095967	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Гватемала, образец 10	Картофель	CD2549a, b	GrCOIA1	MN095951, MN095966	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Венесуэла, Марида, Мукуч	Картофель	CD2582b	GrCOIA1	MN095950	CrCbA1	MN096149	-	Ж. Франко

<i>G. rostockiensis</i>	Чили	Картофель	CD2643b, CD2649b, c, CD2644b	GrCOIA1	MN095956, MN095932, MN095960, MN095968	CrCbA1	MN096135, MN096137, MN096140, MN096141	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Ла-Пас, Лос-Андес, Лакайя	Картофель	CD2617a, b	GrCOIA1	MN095935, MN095978	CrCbA1	MN096133, MN096134	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Лас-Пас, Лос-Андес, Севируйо	Картофель	CD2561a	GrCOIA1	MN095962	CrCbA1	MN096143	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Ла Пас, Ахиядеро	Картофель	CD2565b	GrCOIA1	MN095959			-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Мизке, Пикосилья	Картофель	CD2583a, b, c	GrCOIA1	MN095929, MN095938, MN095976	CrCbA1	MN096148, MN096150, MN096170	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Ла Пас, Ингави, Хилата Ста Тринидад	Картофель	CD2573a, b	GrCOIA1	MN095946, MN095974	CrCbA1	MN096132, MN096152	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Ла Пас, Коллана	Картофель	CD2564a	GrCOIA1	MN095971	CrCbA1	MN096151	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Арани, Паредонес	Картофель	CD2604a, b	GrCOIA3	MN095980, MN095981	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Тираке, Кочимита	Картофель	CD2610b	CrCOIA4	MN095982	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Тираке, Торалапа	Картофель	CD2587b	CrCOIA4	MN095983	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Чарка, Параумани	Картофель	CD2571a	GrCOIA5	MN096016	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Чарка, Сурагуа	Картофель	CD2567a	GrCOIA6	MN096017	CrCbC6	MN096176	MN116513	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Альто Чапаре, Илури Гранде	Картофель	CD2606b	GrCOIA7	MN096009	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Тапакари, Чуна Чунуни	Картофель	CD2598a, b	GrCOIA13, GrCOIA7	MN095994, MN096010	CrCbA6	MN096164	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Пуната, Чаки Ноча	Картофель	CD2592a, b	GrCOIA7, GrCOIA13	MN095996, MN096011	CrCbA9	MN096169	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Морочата-Плосилья	Картофель	CD2563a, b	GrCOIA7, GrCOIA9	MN095984, MN096012	CrCbA9, CrCbA7	MN096156, MN096168	MN116512, MN116514	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Альто Чапаре, Ларакти Чико	Картофель	CD2608a, b	GrCOIA8	MN096013, MN096015	CrCbA4	MN096161, MN096162	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия	Картофель	CD579	GrCOIA8	MN096014	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Айюпайя, Патаморочата	Картофель	CD2625a, b	GrCOIA10	MN096003, MN096004	CrCbA5	MN096166	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Мизке	Картофель	CD2594a	GrCOIA10	MN096005	CrCbA5	MN096163	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Айюпая, Иглесиани	Картофель	CD2566a, b, c	GrCOIA10	MN096006, MN096007, MN096008	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Альто Чапаре, Ларати	Картофель	CD2588a	GrCOIA11	MN096002	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Тапакари, Понго	Картофель	CD2619b	GrCOIA13	MN096001	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Альто Чапаре, Канделария	Картофель	CD2603a	GrCOIA12	MN095985	CrCbA8	MN096154	-	Ж. Франко
<i>G. rostockiensis</i>	Боливия, Кочабамба,	Картофель	CD2610a	GrCOIA13	MN095986	-	-	-	Ж. Франко

<i>G. rostochiensis</i>	Тираке, Кочимита Боливия, Кочабамба, Тираке Коари	Картофель	CD2616b	GrCOIA13	MN095987	CrCbA8	MN096155	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Тираке, Вейлла Пухру	Картофель	CD2586b	GrCOIA13	MN095988	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Тираке, Торалапа	Картофель	CD2587c, CD2600b	GrCOIA13	MN095989, MN095993	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Султора Баха	Картофель	CD2620b	GrCOIA13	MN095990	CrCbA6	MN096167	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Арани, Канада Гранде	Картофель	CD2593a, b	GrCOIA13	MN095991, MN095992	CrCbA4	MN096157, MN096165	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия	Картофель	CD577	GrCOIA13	MN095995	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Арани, Сайтай Пампа	Картофель	CD2609a, b	GrCOIA13	MN095997, MN095998	CrCbA4	MN096159, MN096160	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Арани, Саполика	Картофель	CD2605a	GrCOIA13	MN095999	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Альто Чапаре, Чимпа Мелга	Картофель	CD2622a	GrCOIA13	MN096000	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Нор Синти, Арпоха Баха	Картофель	CD2612b	GrCOIA14	MN096018	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Нор Синти, Йоленсия Альта	Картофель	CD2589a, b, c	GrCOIC7, GrCOIA14, GrCOIC4	MN096019, MN096028, MN096033	-	-	MN116515	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Альто Чапаре, Сан Исидро	Картофель	CD2601a, b	GrCOIA15	MN096020	CrCbA8, CrCbC2	MN096153, MN096181	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Потоси, Чимпапата	Картофель	CD2562b	GrCOIA16	MN096021	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Потоси, Лагуна Пампа	Картофель	CD2618a, b	GrCOIB1, GrCOIB3	MN096022, MN096024	CrCbC3	MN096178, MN096179	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Потоси, Сантьяго	Картофель	CD2575b	GrCOIB2	MN096023	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Потоси, Ибаньес, Чарка Микани	Картофель	CD2621a, b	GrCOIC1	MN096025	CrCbC7	MN096177	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Боливар, Пампаджаси	Картофель	CD2591b	GrCOIC2	MN096026	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Нор Синти, Хуканкорани Центр	Картофель	CD2602a	CrCOIC3	MN096030	CrCbC1	MN096183	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Арани, Сага Сага	Картофель	CD2570b	GrCOIC4	MN096029	-	-	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Кочабамба, Арани, Лакина	Картофель	CD2599	-	-	CrCbA4	MN096158	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Нор Синти, Пуэбло Бахо	Картофель	CD2614a, b	CrCOID1, GrCOIC5	MN096027, MN096031	CrCbB2, CrCbB1	MN096173, MN096174	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Нор Синти, Пуэбло Альто	Картофель	CD2584b, a	GrCOIC8, GrCOIC6	MN096032, MN096034	CrCbB2	MN096172	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Сааведра, Мамахота	Картофель	CD2613a, b	-	-	CrCbB3, CrCbC4	MN096175, MN096180	-	Ж. Франко
<i>G. rostochiensis</i>	Боливия, Нор Синти, Чунчали	Картофель	CD2578	-	-	CrCbC5	MN096182	-	Ж. Франко
<i>G. sandveldensis</i>	Южная Африка, Западно-	-	WK1, CD1893	GsanCOI1	MN095888	-	-	KF809767	Р. Кнотце, Knoetze <i>et al.</i> (2017b)

<i>G. tabacum</i>	Капская провинция, Сандвелд, Лейпольдтвиль	<i>S. carolinense</i>	CD2695a, b	GtCOIA1	MN096046, MN096048	GtCb1	MN096083, MN096084	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, стандарт 4А	<i>S. carolinense</i>	CD2205a, b, CD2203a, b, CA140	GtCOIA1	MN096049, MN096055, MN096058, MN096060, MN096061	-	-	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, Бейнс	<i>S. carolinense</i>	CD2684a, b	GtCOIA1	MN096050, MN096051	GtCb1	MN096079, MN096082	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, Андерсон	<i>S. carolinense</i>	CD2692a, b	GtCOIA1	MN096052	GtCb1	MN096080, MN096081	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	Боливия	-	CD2702b	GtCOIA1	MN096053	GtCb1	MN096086	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, Линч	<i>S. carolinense</i>	CD2688b	GtCOIA1	MN096054	-	-	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, Хортон	<i>S. carolinense</i>	CD2206a, CD2699	GtCOIA1	MN096056, MN096064	GtCb1	MN096085, MN096087	HQ260387, HQ260394	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин, Subbotin <i>et al.</i> (2011)
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, Полетт	<i>S. carolinense</i>	CD2689a, b	GtCOIA1	MN096047, MN096057	-	-	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, 52А	<i>S. carolinense</i>	CD2208	GtCOIA1	MN096059	-	-	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, Инби	<i>S. carolinense</i>	CD2690b	GtCOIA1	MN096062	-	-	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, Фишер	<i>S. carolinense</i>	CD2691a	GtCOIA1	MN096063	-	-	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	Аргентина, провинция Жужуй	Табак	CD2186a, b	GtCOIC1	MN096065, MN096066	-	-	-	М. Доцет
<i>G. tabacum</i>	Италия	Табак	CD523	GtCOIC2	MN096067	-	-	HQ260403, HQ260404	М. Миндо-Окампо, Subbotin <i>et al.</i> (2011)
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, стандарт	<i>S. carolinense</i>	CD2202a, c, CD2204a, b, CD2694a	GtCOID1	MN096038- MN096040, MN096042, MN096043	GtCb3	MN096071- MN096073 MN096075	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, Блантон	<i>S. carolinense</i>	CD2693b	GtCOID1	MN096041	GtCb3	MN096074	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, Родос	<i>S. carolinense</i>	CD2700a	GtCOID2	MN096035	GtCb2	MN096077	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, 55А	<i>S. carolinense</i>	CD2696b	GtCOID2	MN096036	GtCb2	MN096078	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	США, Вирджиния, 93А	<i>S. carolinense</i>	CD2697b	GtCOID2	MN096037	GtCb2	MN096076	-	Л.И. Миллер, Д.Г. Болдуин
<i>G. tabacum</i>	Франция	Табак	CD2182a, b	GtCOIB1, GtCOIB2	MN096044, MN096045	-	-	-	М. Мунс
<i>Globodera</i> sp. 1	Новая Зеландия, Северный остров,	-	582b	Gsz1CO1	MN095882	-	-	HQ260408	Д. Штурхан
<i>Globodera</i> sp. 2	Новая Зеландия, Южный остров, Озеро Линдон, Кентерберри	-	CA114	Gsz2CO1	MN095881	-	-	HQ260409	Д. Штурхан
<i>G. zelandica</i>	Новая Зеландия, Южный остров, полуостров Бэнкс	<i>Plagianthus regius</i>	NZ26, CD2195b	GzCOI1	MN095887	-	-	HQ260410	Д. Штурхан
<i>G. zelandica</i>	Новая Зеландия	-	NZ23, CD2194a, b	GzCOI1, GzCOI2	MN095883, MN095884	-	-	-	Д. Штурхан
<i>G. zelandica</i>	Новая Зеландия	-	Z712, CD2184a, b	GzCOI3	MN095885, MN095886	-	-	-	Д. Штурхан