

УТВЕРЖДАЮ
Проректор – начальник
Управления научной политики
МГУ имени М.В.Ломоносова
А.А.Федянин

«25» октября 2021 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Субботина Сергея Александровича

**«Молекулярная систематика и филогеография седентарных нематод отряда
Tylenchida»,**

**представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 1.5.17 – Паразитология**

Представленная диссертация Субботина Сергея Александровича изложена на 271 странице и включает «Введение», 13 глав, «Выводы», «Список сокращений и условных обозначений», «Список литературы» (431 источник, из которых 402 на иностранных языках) и «Приложение», включающее 15 листов таблиц и списков. Диссертация посвящена результатам всестороннего изучения эволюционных отношений, происхождения и филогеографии седентарных нематод отряда Tylenchida, а также разработке методик для их молекулярно-генетической диагностики. Фитонематоды отряда Tylenchida, насчитывающие более 233 валидных родов и 2828 валидных видов, широко распространены и имеют большое экономическое значение, поскольку могут вызывать значительное снижение урожайности многих сельскохозяйственных культур. Несмотря на очевидную прикладную значимость исследований систематики и биологии данных организмов для разработки мер борьбы и внедрения эффективных карантинных правил, таксономические исследования тилехнид с использованием исключительно традиционных морфологических методов затруднены, ввиду их небольших размеров тела и ограниченного числа морфологических признаков. Новейшие методы интегративной систематики и молекулярной филогении могут дать объективное представление о видовых границах, вариабельности морфологических признаков седентарных нематод, а также помогают решать важные вопросы о закономерностях и процессах формирования биоразнообразия и связанной с ним окружающей среды.

Данные положения прекрасно описаны во «Введении», где приведены актуальность исследования, степень разработанности выбранной темы, цели и задачи, научная новизна, практическая значимость работы, основные защищаемые положения. Также приводятся сведения о личном участии автора, об апробации работы, и о публикациях автора по теме диссертации.

Глава 1 «Литературный обзор» представляет собой анализ публикаций, посвященных таксономии, филогенетическим отношениям, биологии и идентификации различных групп отряда Tylenchida. Приведены основные критерии диагностики наиболее важных в практическом аспекте видов. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что филогенетические отношения между основными группами тилехнид изучены недостаточно, а предшествующие методики и подходы не являются исчерпывающими и требуют внедрения новейшего интегративного подхода, объединяющего данные морфологии и филогении. Для полноты картины современного состояния молекулярно-филогенетических исследований рассматриваемой группы полезно было бы привести иллюстрации эволюционных схем, предлагаемых различными авторами. Также в данном разделе автором приведены результаты собственной работы, которые было бы более уместно дать в последующих главах диссертации, например описание пятого вида в составе рода *Tylenchulus* (с. 27-28).

В Главе 2 описаны материалы и методы проведенного исследования. Стоит отметить крайне большой объем исследованного материала: всего было секвенировано 308 видов тилехнид, для которых были получены нуклеотидные последовательности митохондриальных (COI, Cytb) и ядерных (18S, 28S, hsp90) генов, а также последовательности внутренних транскрибируемых рибосомальных спейсеров (BTC1, BTC2). Достаточно подробно изложены методы выделения ДНК, постановки ПЦР, ПЦР-ПДРФ, секвенирования, филогенетического и филогеографического анализов, реконструкции вторичной структуры рДНК. Особо следует отметить разработанную автором методику анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, которая служит удобным механизмом быстрой молекулярной идентификации фитонематод сельскохозяйственных культур. В то же время описания методик ПЦР в реальном времени и РПА, результаты которых приведены в последующих главах, не нашли отражения в этой главе. Также, остались неясными некоторые важные аспекты филогенетического и филогеографического анализов: 1) каким образом и в каких случаях (для каких таксонов и почему?) был использован комбинированный анализ по нескольким маркерам? 2) Каким образом было осуществлено конкатенирование (супердерево/суперматрикс)? 3) как

происходило построение сетей гаплотипов в случае нахождения гетерозиготных состояний BTC1, BTC2? 4) Хотя S-DIVA является базовым и широко используемым алгоритмом для реконструкции предковых ареалов, в программе RASP имеются некоторые другие пакеты, зачастую лучше подходящие для анализа датасета с известными датировками, например LAGRANGE. Также, вероятно, в ряде случаев для молекулярной характеристики таксонов с большим криптическим разнообразием уместно было бы использовать новейшие методы молекулярного разделения видов (ABGD, GMYC, bPTP и др.).

В Главе 3 автором проведен молекулярно-филогенетический анализ и рассмотрены филогенетические отношения нематод отряда Tylenchida. Данную главу можно рассматривать как основополагающую, поскольку на основании полученных оригинальных последовательностей D2-D3 фрагмента 28S рРНК более чем трехста видов тилехнид были проверены филогенетические связи на уровне семейств, надсемейств и подотрядов, подтверждена монофилетичность ряда групп. В целом молекулярная филогения подтвердила некоторые предложенные гипотезы морфологической эволюции тилехнид, однако ряд полученных результатов при интеграции с морфологическими данными все же способствовал пересмотру существующей классификации этой группы. Кроме того, автором были протестированы филогенетические взаимоотношения между седентарными нематодами и сделан вывод о независимом переходе к седентарному паразитизму в разных филогенетических линиях нематод отряда Tylenchida.

В Главе 4 подробно рассмотрены вопросы молекулярной систематики и филогении видов рода *Rotylenchulus*. Были подтверждены данные о наличии двух разных типов оперонов рРНК у вида *R. reniformis*, он является первой нематодой, для которой это явление было описано. Автором также были предложены гипотезы возникновения этой особенности организации генома. Проведенный молекулярно-филогенетический анализ по 5 маркерам подтвердил валидность всех изучаемых видов рода, однако филогенетические отношения большинства видов все еще остаются невыясненными, ввиду небольших поддержек и плохо разрешенной топологии. Хотя автор пишет, что «для выявления надежных филогенетических связей между таксонами следует использовать не один, а несколько генов», вызывает некоторое удивление отсутствие комбинированного анализа по всем изучаемым маркерам, который теоретически мог бы дать новое разрешение базальным филогенетическим отношениям.

Глава 5 посвящена молекулярной характеристике и филогенетическому анализу нематод семейства Heteroderidae. По результатам интегративного анализа разработана

новая система семейства, описано видовое разнообразие группы, представлена молекулярная филогения на основании комбинированного анализа по нескольким маркерам, оценены эволюционные изменения отдельных морфологических признаков цистоидных нематод. Проанализированы закономерности распределения видов и предположены локальные первичные центры разнообразия и происхождения цистоидных нематод, однако в данном случае (в отличие от последующих глав), реконструкция предковых ареалов для более объективной оценки центров происхождения, по-видимому, не применялась.

В Главе 6 описаны результаты диагностики цистообразующих нематод с помощью ПЦР. Данная глава имеет крайне важное практическое значение, поскольку в ней представлены рестрикционные профили широко распространенных видов нематод, разработаны и описаны подходы к диагностике некоторых сельскохозяйственно важных видов нематод методом ПЦР с видоспецифичными праймерами, и ПЦР в реальном времени. Объем изученного материала впечатляет, приведенные результаты являются исчерпывающими и позволят четко дифференцировать важные для сельского хозяйства цистообразующие виды нематод друг от друга и от родственных им видов-двойников, не имеющих экономического значения.

В Главе 7 рассмотрены подходы к изучению эволюционных отношений цистообразующих нематод и оценено влияние выбора метода филогенетического анализа и моделей эволюции ДНК на получаемую топологию филогенетического дерева. В качестве исследуемого маркера были выбраны последовательности ITS рРНК, что не случайно, поскольку они содержат многочисленные вставки и делеции, неправильный анализ которых может оказывать значительное влияние на получение достоверных филогенетических реконструкций. Помимо методологических рекомендаций по улучшению филогенетического сигнала от последовательностей рибосомальных генов, автором были сделаны важные выводы о морфологической и экологической эволюции цистообразующих нематод. Данные молекулярного анализа подтвердили предшествующие гипотезы о связи различных групп гетеродорид с соответствующими растениями-хозяевами. Тем не менее, в ряде случаев была продемонстрирована вторичная колонизация растений-хозяев, не связанных родством с первичных хозяином.

Главы 8 и 9 посвящены вопросам ДНК-штрихкодирования, филогении и филогеографии представителей гетеродеридных нематод группы *Avenae* и рода *Globodera*. Используя различные методы интегративной таксономии, молекулярно-филогенетического и филогеографического анализа автором были проанализированы

видовые границы в пределах соответствующих таксонов, выявлены новые для науки таксоны, проанализированы закономерности распространения видов, эндемизм, реконструированы основные центры происхождения и пути расселения видов и оценены основные причины (палеогеографические, климатические, антропологические), повлиявшие на расселение. Крайне интересен вывод о том, что сельскохозяйственная деятельность человека, по-видимому, не сыграли существенной роли в глобальном распределении фитонематод группы *Avena*, в отличие от, например, картофельных нематод. Кроме того, были получены важные свидетельства гетероплазмии и возможной интрогрессии и рекомбинации мтДНК у картофельных цистообразующих нематод.

В Главе 10 рассмотрена филогения галловых корневых нематод и проведен молекулярный анализ вида *Meloidogyne nataliei*. На основе анализа 56 видов галловых корневых нематод по 4 маркерам реконструирована эволюционная история данной группы. Было показано, что полиплоидизация и переход к партеногенезу появляются на поздних этапах эволюции и связаны с развитием широкой полифагии, что вероятно привело к биологическому успеху данной группы.

Глава 11 является продолжением Главы 10, она посвящена разработке методов быстрой диагностики нематод рода *Meloidogyne* методом рекомбинантной полимеразной амплификации. Данный метод никогда не применялся для обнаружения фитопаразитических нематод, однако представляет большую практическую значимость ввиду высокой чувствительности и простой пробоподготовки. В главе описаны исчерпывающие протоколы проведения диагностики с РПА, оценены преимущества и недостатки метода по сравнению с более традиционными методами молекулярной диагностики.

В Главе 12 рассмотрена молекулярная филогения видов рода *Tylenchulus* рассмотрены методики их быстрой молекулярной диагностики. Была получена молекулярно-филогенетическая реконструкция для данного рода, однако закономерностей по сходству ареалов нематод или растений-хозяев выявлено не было. Результаты молекулярного анализа подтвердили правомерность выделения рода выделения рода *Trophotylenchulus* как отдельного таксона от *Tylenchulus*. Для видов данного рода также были получены рестрикционные профили методом ПЦР-ПДРФ и разработаны видоспецифические праймеры.

Глава 13 включает в себя рассмотрение филогенетических отношений родов *Meloidoderita* и *Sphaeronema*. По результатам данного исследования был решен вопрос о

родовой принадлежности вида *Tumiota* (= *Sphaeronema*) *whittoni* и показаны сестринские отношения родов *Meloidoderita* и *Sphaeronema*.

Диссертационную работу завершают 13 выводов, которые полностью соответствуют поставленным целям и задачам и отражают основные достижения проведенного исследования.

Текст диссертации написан хорошим языком, содержание автореферата отражает и соответствует содержанию диссертационной работы.

Принципиальных недочетов в работе, отличающейся высоким уровнем профессионализма, не выявлено. Можно отметить ряд замечаний технического характера, заключающийся в использовании не совсем удачных формулировок и переводных терминов (например, «Генный банк», «филогенез генов», использование переводной аббревиатуры «BTC1», «BTC2», вместо «ITS1», «ITS2» соответственно и др.). Также в тексте постоянно встречается формулировка «ген BTC», которая является неверной, поскольку спейсеры, разделяющие рибосомальные гены, сами генами не являются. В некоторых случаях не указано авторство видов. Количество опечаток в тексте диссертации минимально.

Актуальность, глубина и крайне высокая практическая значимость представленного исследования, репрезентативность материала, высокий профессиональный и вдумчивый уровень его обработки и анализа, безусловная востребованность полученных результатов, прекрасное знание автором литературы, апробация результатов на множестве научных семинарах и конференциях, освещение основных положений в многочисленных (51) публикациях, свидетельствует о представленной диссертационной работе, как о состоявшемся законченном исследовании. Все высказанные замечания несут рекомендационный или технический характер и не умаляют достоинств представленной диссертационной работы.

Диссертационная работа «Молекулярная систематика и филогеография седентарных нематод отряда Tylenchida» выполнена в соответствии с критериями, установленными пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор – Субботин Сергей Александрович – заслуживает присвоения ученой степени доктора биологических наук специальности 1.5.17 – Паразитология.

Отзыв подготовлен д.б.н., профессором кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова А.Б. Цетлиным и к.б.н., с.н.с. кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ им. М.В.

Ломоносова И.А. Екимовой. Диссертация и отзыв рассмотрены на заседании кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова 21 октября 2021 г. (протокол № 2).

Цетлин Александр Борисович, д.б.н., профессор

Кафедра зоологии беспозвоночных биологического факультета

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

А.Б. Цетлин

22.10.2021 г.

Екимова Ирина Александровна, к.б.н., с.н.с.

Кафедра зоологии беспозвоночных биологического факультета

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

И.А. Екимова

22.10.2021 г.

Малахов Владимир Васильевич, академик РАН, д.б.н., профессор,

заведующий кафедрой зоологии беспозвоночных биологического факультета

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

В.В. Малахов

22.10.2021 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Адрес: 119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1

Телефон: +7 (495) 939-10-00 WWW: www.msu.ru E-mail: info@rector.msu.ru