

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию СУББОТИНА Сергея Александровича

«МОЛЕКУЛЯРНАЯ СИСТЕМАТИКА И ФИЛОГЕОГРАФИЯ СЕДЕНТАРНЫХ НЕМАТОД ОТРЯДА TYLENCHIDA», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.17 – паразитология

Диссертация посвящена актуальным объектам – опасным фитопатогенным нематодам, наносящим ущерб до 50% урожаю по всему миру. Практическое значение данной работы очевидно, так как карантинный контроль и агроменеджмент всегда включает в список технологических мер списки наиболее опасных седентарных фитогельминтов. Необходимость быстрой и надежной диагностики видов и гаплотипов этих паразитов очевидна, а анализ путей их эволюции и связи с генцентрами культурных растений важен для селекции новых сортов растений и альтернативных мер агроменеджмента в свете концепций «Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации». В связи с этим тема, цели и задачи диссертации, совмещающие молекулярно-генетический подход и филогеографию, чрезвычайно актуальны.

Диссертация состоит из 13 глав, 14 таблиц и 84 рисунка, список литературы содержит 431 источник. По материалам диссертации автором опубликована 51 научная статья в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования.

В диссертации автор выносит на защиту пять положений, которые в дальнейшем подтверждаются выводами.

Что такое седентарные фитонематоды? – автор дает разъяснение этого термина. Это высшие паразиты корней растений, у которых самки неподвижны, заняты только стационарным питанием через измененный паразитом участок тканей хозяина и усиленной репродукцией сотен яиц с находящимися внутри инвазионными диапаузирующими личинками. Это сборная группа, ранее считавшаяся монофилетической, но именно диссертант впервые доказал независимое происхождение седентарных нематод из различных семейств. Из общего числа 4100 видов фитогельминтов седентарные гельминты насчитывают 270 видов, из них 118 цистообразующих и 32 цистойдных нематод из сем. Heteroderidae, 98 видов рода *Meloidogyne* и более 20 видов из надсемейства Tylenchuloidea.

Глава 1. Эта глава содержит критический обзор классификаций отряда тиленхид с анализом того, насколько они близки к естественной системе, т. е. соответствуют друг другу и эволюционному дереву, построенному диссертантом по гену D2-D3 28S рРНК. Автор сразу формирует основную гипотезу исследования о пяти независимых линиях происхождения седентарных нематод.

Глава 2. В этой главе автором описаны сведения об исследованном материале (100 видов, представляющие 400 популяций нематод) и перечень материалов анализа последовательностей генов, депонированный в Генбанке, со ссылками на таблицы Приложений. Очень интересны использованные подходы филогенетического моделирования (МЛ, МП, МЭ) и их инструментарий – компьютерные программы вероятностного анализа. Особый интерес: расчет времени дивергенции (BEAST 2.4.5), прогнозирование вторичных 2D структур областей расширения рРНК в стеблях и петлях с использованием подхода минимизации энергии (Mfold, RNAstat). Отмечу, что данная глава — это обобщение методов из уже опубликованных исследований диссертанта.

Глава 3 «Филогенетический анализ нематод отряда Tylenchida и происхождение седентарного паразитизма» посвящена проверки основной альтернативной гипотезы: происхождение седентарного паразитизма – это единичное событие или этот тип отношений формировался многократно в параллельных филогениях? Диссертант применил два подхода: первый подход (МП+БВ, 9 вариантов выравниваний) включал серию филогенетических анализов последовательностей D2-D3 фрагмента 28S рРНК гена для 77 видов Tylenchida, а второй проанализировал 100 видов методом БВ. Автор получил в результате семь клад в отряде тиленхид с разной степенью поддержки. Догадки о самостоятельности этих семи линий уже содержались в некоторых работах морфотаксономистов, и это исследование вывело на передний план важные морфо-маркеры, согласованные с молекулярным деревом. Автором был отвергнут ряд (восемь) устоявшихся взглядов (гипотез) большинства таксономистов, из которых важнейшие для наиболее патогенных групп: нематоды рода *Radopholus* оказались вне сем. Pratylenchidae, галловые и цистообразующие нематоды не единая группа, картофельный дитиленх *Ditylenchus destructor* не принадлежит к стеблевым нематодам сем. Anguinidae. Из семи полученных линий эволюции пять привели к формированию седентарных паразитов. Важным выводом явилось подтверждение монофилии высших фитогельминтов, входящих в предложенный А.А. Парамоновым подотряд Noplolaimina. Однако долиходориды как

базальное надсем. гоглолаймин оказалось парафилетическим, а его важные для эволюционных построений сем. Psilenchidae и подсем. Merliniinae (линия усиления стилета и головного скелета) оказались вне надсемейства. Подтвердилось единство происхождения пратиленхид и галловых нематод, много лет отрицаемое европейскими таксономистами. Сделан важный вывод о том, что формирование цист (форма диапаузы седентарных) произошло дважды, независимо в двух линиях, у гетеродерид и сферонематид.

Глава 4 «Филогения рода *Rotylenchulus*». На основании 29 новых последовательностей D2-D3 28S рРНК и 41 последовательности гена рРНК ВТС1-5,8S-ВТС2 автором была сделана детальная диагностика этого рода патогенных нематод, и был описан новый вид *R. macrosomoides*, занимающий базальное положение в древе рода. Диссертант впервые доказал, что род *Rotylenchulus* происходит из Эфиопского региона. На основании реконструкция вторичной структуры D2 фрагмента 28S рРНК доказано наличие нескольких типов рРНК в пределах одного вида, причем мутации двух вариантов одного гена оказались компенсаторными для сохранения вторичной структуры гена.

Глава 5 «Молекулярная характеристика и филогенетические взаимоотношения цистоидных нематод сем. Heteroderidae».

На основании анализа упомянутых трех генов и интегрированной в молекулярный анализ детальной морфологии признаков, исследовано семь известных и 17 не описанных видов цистоидных, получены новые последовательности: 38 для D2-D3 28S рРНК, 27 для COI, и кроме полученных индивидуально по каждому гену древ, диссертант провел комбинированное выравнивание по 36 последовательностям. Результатом стал перенос подсем. Verutinae в сем. Heteroderidae из сем. Rotylenchulidae, что подтверждает высказанные ранее гипотезы морфо-систематиков Вутса и Люка. Для рода *Meloidodera* установлена синонимика в пользу отечественного вида *M. sikhotealiniensis*. Другими достижениями стало доказательство полифилетичности подсем. Ataloderinae с новым разграничением этого подсемейства от подсем. Meloidoderinae, сопровождаемым перегруппировкой списка родов *Cryphodera*, *Zelandodera* и *Rhizonemella*. Наиболее впечатляющи филогеографические выводы диссертанта: первичные генцентры группы оказались в Америке, а вторичные во Вьетнаме и Южном Китае, причем скорости видообразования вторичного центра (крифодеры) значительно превышали

коэволюционные процессы в Мезоамериканском генцентре (мелойодеры) и в Калифорнийском генцентре (аталодеры и ризонемеллы).

Глава 6 «Диагностика цистообразующих нематод с помощью ПЦР». Использован новейший ПДРФ анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ВТС рРНК гена. Для всех видов рода *Heterodera* составлен атлас гелей полиморфизма, комбинация профилей семи отдельных ферментов (из 26 тестированных) обеспечивает идентификацию большинства изучаемых видов, для идентификации видов рода *Cactodera* достаточно четырех ферментов. Второй вид экспресс - диагностики по гену 28S, использован в двух вариантах: набор универсальных праймеров и комбинация видоспецифичных праймеров с универсальным. При обнаружении целевого вида появляется две полосы в геле, а его отсутствие дает одну полосу за счет универсального праймера. Третий вид диагностики – ПЦР-тест в реальном времени, проба TaqMan, видоспецифичные праймеры по генам COI и D3 28S рРНК обеспечивают высочайшую точность до 0.002 массы яйца нематоды.

Глава 7 «Филогенетические отношения у цистообразующих нематод, выявленные на основе анализа последовательностей ВТС рРНК гена». Использован анализ по вторичной структуре рРНК для 40 видов гетеродерид, к данным Генбанка добавлено 36 последовательностей, выявленных диссертантом (ВТС1-5.8S-ВТС2). Важнейших этап анализа – выравнивания – сделан в трех вариантах – 1) автоматическое со штрафами плохо выровненных участков, 2) комбинированное – с включением всех результатов (давшее наибольшее разрешение и поддержку клад) и 3) с исключением плохих участков. Результаты дали базальную группу: *Cactodera-Punctodera* и монофилию подсем. *Heteroderinae* (группа *Gottingiana* в качестве базального таксона) и рода *Globodera*, куда входят важнейшие патогены нематоды: *Globodera pallida*, *G. rostochiensis* и *G. tabacum*. При анализе вторичной структуры ВТС2 рРНК диссертант предложил новый подход в программе MARNA, с кодами из 28 символов для обозначения парных (в «стеблях») и непарных нуклеотидов (в «петлях»), что позволило учесть в выравниваниях на 16–19 % больше информативных нуклеотидов и существенно повысить поддержку клад. Применение алгоритмов динамической модели и альтернативного складывания существенно влияло на результат, но деревья принципиально не отличались. Полученное древо дало возможность подтвердить гипотезу Кралля и Стоуна по коэволюции

гетеродерид и их хозяев, но детализировать её в пяти линиях: на растениях порядков Fagales, Caryophyllales-Asterales-Poales, Poales и Solanales (Globodera).

Глава 8 «ДНК-баркодирование, филогения и филогеография нематод видов рода *Heterodera* группы *Avena*». Диссертант получил 220 новых последовательностей COI гена и 80 для ВТС рРНК, что позволило доказать монофилию группы, определить базальный таксон *H. latipons* и диагностировать все виды. Однако филогеографический анализ сделан лишь по гаплотипам COI гена по материалам 82 последовательностей *H. avenae*, шести последовательностей *H. arenaria* и 75 последовательностей *H. filipjevi*. Первичный генцентр (с базальным видом *H. latipons*) – Ирано-Анатолийская зона 1.6 млн лет (плейстоцен), а субцентры разделены Анатолийскими горами в Азии и Атласским горами в Африке. По мысли диссертанта всё видовое разнообразие из северного и южного субцентров уже было сформировано и в дальнейшем виды просто расселились вдоль горных барьеров по Европе (тип А) и в Азии (тип В).

Еще один генцентр (предок *H. filipjevi*) – Иранские горы. Субцентры разделены Анатолийской диагональю (плоскогорьем). Диссертант убедительно обосновывает, что проникновение из Европы в Северную Америку произошло не в результате деятельности человека, а гораздо раньше, через Атлантику, сразу после последнего оледенения, причем потомки *H. avenae* расселились в Америке ранее, чем *H. filipjevi*.

Глава 9 «ДНК-баркодирование, филогения и филогеография видов цистообразующих нематод из рода *Globodera*». Использованы гены ВТС рРНК, COI и *cutb*. Изучено 148 популяций из 11 видов (из известных 13). Все виды диагностированы по каждому из генов, а для *G. tabacum* удалось выявить внутривидовые отличия. Наиболее интересна филогеография. Род на основании анализа по ВТС рРНК и COI ожидаемо распадается на две линии: 1) на пасленовых (Американского происхождения) и 2) на сложноцветных (Евразия, Африка, новая Зеландия, т. е. осколки Гондваны). По каждому гену были выделены гаплотипы, объединенные в группы. Диссертант сформулировал три альтернативные гипотезы первичного генцентра. Результаты показали происхождение рода 3 млн лет назад, что отвергает гипотезу Стоуна о происхождении из более древней Гондваны, но указывает на активное расселение по континентам. Остальные две гипотезы «из Южной Америки» или «из Южной Африки» по результатам расчетов диссертанта были почти в равной степени вероятны и составили 2.9 млн лет, а Новая Зеландия оказалась вторичным генцентром. В Америке барьером видообразования служила цепь

Анд, причем два наиболее патогенных вида картофельной нематоды разделены 15.6° ю. ш. (озеро Титикака), к северу – *G. pallida* с центром в Южном Перу, к югу – *G. rostochiensis* (с генцентром на юге Боливии); оценка построена на уменьшении изменчивости гаплотипов с юга на север. В отличие от выводов по расселению группы *Avenae* (предыдущая глава), диссертант делает вывод о недавнем антропогенном завозе глободер в Европу и Азию с семенным картофелем, поскольку гаплотипы нематоды из этих регионов совпадают с таковыми в провинции Ла-Пас в Боливии, на берегах озера Титикака. Диссертант также указывает на третий близкий к *G. pallida* вид *G. mexicana* и определяет срок дивергенции этих двух видов 1.6 млн лет в горных долинах Мексики.

Глава 10 «Филогения галловых нематод и молекулярная характеристика *Meloidogyne nataliei*». Для анализа филогении использовано пять генов (8S рРНК, D2-D3 28S рРНК, ВТС рРНК, мтДНК COI и фрагмент между COII и 16S) для 56 видов. Получено 11 клад, семь из которых формируют монофилетичную суперкладу, а *Meloidogyne nataliei* и *M. indica* формируют базальную кладу. Автор по результатам анализа подтверждает популярную гипотезу Триантафиллоу (1985, 1987), что амфимиктические виды *Meloidogyne* с малым числом хромосом были предками партеногенетических видов галловых нематод, в том числе тех, которые перешли к митотическому патеногенезу. Автор выдвигает для видообразования галловых концепцию, альтернативную коэволюции узко-специфичных цистоидных: полифагия галловых (широкая специфичность к хозяину) при стационарном паразитизме достигается интенсивной многоуровневой полиплоидизацией функциональных генов (это следует из его генного анализа), что как раз и ведет к быстрому видовому разнообразию, поскольку видовую изоляцию обеспечивают разные способы облигатного партеногенеза.

Глава 11 «Быстрая и высокочувствительная диагностика галловых нематод с использованием метода рекомбиназной полимеразной амплификации». Рекомбиназная полимерная амплификация (РПА) работает при 37–42 град в экстрактах тканей растений, зараженных галловыми, без специального выделения ДНК непосредственно в полевых условиях; результат виден в течение 10–30 мин по флуоресценции и с помощью иммунострипов, с высокой точностью идентифицирует патогенных галловых *M. hapla* и *M. enterolobii* с чувствительностью 1/10 личинки и 1/50 самки, в том числе в смеси из нескольких видов галловых.

Глава 12 «Молекулярная филогения и характеристика видов рода *Tylenchulus*». На материале 61 последовательности, относящейся к пяти видам (один новый *T. musicola* для науки) рода и родственного *Trophotylenchulus floridensis* с использованием 61 последовательности генов ВТС и D2-D3 28S рРНК диссертанту удалось построить кладограмму, однако филогеографических маркеров выявить не удалось. Зато он предложил эффективные методы диагностики: профили ПЦР-ВТС-ПДРФ от четырех рестриктаз, и технологию с видоспецифичными праймерами по гену ВТС, которые были интегрированы С.А.Субботиным в мультиплексный ПЦР тест с чувствительностью одна личинка на образец почвы.

Глава 13 «Молекулярная характеристика и филогенетическая позиция родов *Meloidoderita* и *Sphaeronema* (Sphaeronematidae)». На материале из семи видов автор доказал монофилетичность и базальное положение всех представителей сем. Sphaeronematidae в подотряде Criconematina по молекулярным данным (18S рРНК, 28S рРНК и ВТС рРНК), указав и на уникальный среди криконематин биологический признак – цистообразование самки с яйцами, содержащими инвазионных личинок. Попутно он нашел и перенес в род *Meloidoderita* известный вид *Tumiota whittoni*, описав его цикл.

Заключительные замечания.

Среди выводов диссертанта, наиболее интересным для паразитолога является тезис о неоднородности эволюции паразито-хозяйинных отношений, подтвержденный молекулярными технологиями и маркерами времени: медленная коэволюция с быстрым последующим расселением из первичного генцентра; и относительно быстрый переход на неродственных экологически близких хозяев во вторичных генцентрах.

Другим важнейшим тезисом служит доказательство многократного происхождения высокоспециализированного седентарного паразитизма, а также вывод о том, что этот тип паразитизма необязательно связан с узкой специфичностью к хозяину («цистоидные» виды), но при условии перехода к партеногенезу может фитонематоды могут сохранить полифагию («галловые» виды).

Третьим важнейшим тезисом служит утверждение о совпадении генцентров нематод с уже известными центрами биоразнообразия культурных растений. Важна и поправка диссертанта с его расчётами сроков молекулярных часов: это эволюционно недавние события, не десятки миллионов лет тому назад, а лишь от 1 до 3 млн лет, что сопоставимо с существованием вида согласно, например, представлениям Э. Майра.

Наконец, автор предложил единый комплекс интегративных молекулярных и морфо-биологических технологий, соединяющих филогению, филогеографию и экспресс-диагностику: генный маркер D2-D3 28S рРНК для макрофилогении на уровне семейств, а ВТС рРНК и COI для целей реконструкции филогении видов на уровне рода и семейства, филогеографии и видовой экспресс-диагностики.

Считаю вклад диссертанта крупным новым достижением и направлением в паразитологии, а самого диссертанта Сергея Александровича Субботина достойным присвоения ему ученой степени доктора биологических наук.

Вопросы:

1). Сколько линий независимого формирования седентарного паразитизма фитонематод, пять или семь?

2). Как Ваша концепция филогеографии – генцентров относится с центрами происхождения культурных растений по Н.И. Вавилову; есть ли полное совпадение ареалов, их границ и иерархии генцентров, а также совпадает ли время формирования основных групп фитонематод с временем происхождения видов и древних сортов растений?

3). В чем смысл использования молекулярных методик и моделей, если в основном положении п. 2 диссертации полученная филогения совпадает с гипотезами морфологической эволюции? Как интегрированный подход изменил древо нематод? – продемонстрируйте на примерах!

4). Какие из использованных генов наиболее информативные как филогенетические маркеры для целей филогеографии: рРНК, COI или *cutb*?

5). Уместен ли термин «горячие точки биоразнообразия» (использованный диссертантом для генцентров), если речь идет об обширных территориях с древней историей земледелия?

6). Пункт 5-й «Положений», вынесенных на защиту, содержит разъяснение процесса коэволюции седентарных нематод и растений хозяев из двух взаимопереходящих процессов: (1) переходом на филогенетически близкого хозяина в рамках одного семейства и (2) более быстрым переходом на экологически близкий вид растения из другого филогенетически далёкого семейства. Можно ли считать второй (быстрый) процесс коэволюцией? Если нет, предложите термин, как назвать этот эволюционный процесс в системе «паразит-хозяин»?

В целом, содержание автореферата отражает содержание диссертации. По материалам диссертации опубликована 51 статья в рецензируемых журналах из списка ВАК, Scopus и Web of Science и две монографии. Кроме того, как видно из списка работ С.А. Субботина, результаты его исследований были многократно доложены на различных научных конференциях.

В заключение хочется отметить, что все высказанные в отзыве замечания носят дискуссионный характер и не связаны с основным смыслом диссертации. В целом, диссертационная работа «МОЛЕКУЛЯРНАЯ СИСТЕМАТИКА И ФИЛОГЕОГРАФИЯ СЕДЕНТАРНЫХ НЕМАТОД ОТРЯДА TYLENCHIDA» представляет собой законченное исследование, соответствующее пп. 9–14 Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», а его автор СУББОТИН Сергей Александрович заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.17 — паразитология.

Официальный оппонент

Сергей Глебович Медведев

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией по изучению паразитических членистоногих, главный научный сотрудник Федерального бюджетного государственного научного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук

199034 Санкт-Петербург, Университетская набережная, дом 1

8(8123)280711

smedvedev@zin.ru

25 октября 2021 г.