

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу 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.

В настоящее время более чем из 24 000 известных видов нематод около половины относятся к паразитическим формам. Они могут поражать почти все ткани и органы: соединительные ткани, мышцы, кровеносные и лимфатические сосуды, гонады, органы чувств, а также полость тела и т.д. Среди них встречаются как экто-, так и эндопаразиты растений, позвоночных и беспозвоночных животных. Из 4100 видов паразитов растений седентарные гельминты представлены 270 видами, образующими специализированную группу паразитов корневой системы растений, самки которых, находясь в цистах, производят яйца с инвазионными диапаузирующими личинками. Фитопаразитические нематоды имеют большое экономическое значение, поскольку способны наносить значительный ущерб выращиваемым агрокультурам. При этом большая часть этих потерь обусловлена заражением седентарными галловыми и цистообразующими нематодами.

Диссертационная работа Сергея Александровича Субботина представляет результат многолетних исследований актуальных объектов – опасных фитопаразитических седентарных нематод отряда Tylenchida, способных наносить катастрофический урон урожайности массовых сельскохозяйственных культур. Современные аграрные технологии направлены на повышение урожайности сельхозкультур, но при соблюдении мер, связанных с защитой окружающей среды, обязательным условием становятся ограничения по использованию нематоцидов. В силу этих причин правильное определение нематод является основой для разработки экологических мер борьбы и способствует актуализации карантинных правил.

Практическая значимость данной работы не вызывает сомнений. Внедрение современных генетических методов позволяет решить не только задачи по быстрой и достоверной видовой диагностике опасных седентарных фитогельминтов, но и получить возможность для анализа путей их эволюции и связей с культурными растениями. Это играет важнейшую роль в селекции новых, устойчивых к заражению сортов растений и в разработке альтернативных мер по борьбе с патогенными нематодами.

Автором диссертации достигнуты важные результаты и в области фундаментальной науки. Разработаны принципы интегрированной таксономии, сочетающие как традиционные морфо-биологические подходы, так и молекулярно-генетические данные. Полученные новые данные использованы для решения актуальных проблем в нематологии и теоретической паразитологии. Особенно перспективно развитие филогеографии, где применение молекулярных маркеров используется для реконструкции истории видов и популяций. Таким образом, можно согласиться с диссертантом, что представленная работа посвящена молекулярным исследованиям седентарных нематод и описывает подходы к использованию молекулярных данных для разработки интегрированной таксономии, филогении и филогеографии этой группы.

Цель и задачи диссертации, сочетающие изучение эволюционных взаимоотношений, происхождения и филогеографии седентарных нематод отряда Tylenchida с разработкой их диагностики на основании молекулярно-генетических данных, являются чрезвычайно актуальными и новыми.

Диссертационная работа состоит из введения, 13 глав, которые включают обзор литературы, материалы и методы, и 11 глав, содержащие результаты исследований, а также выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Диссертация изложена на 271 странице, включает 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.

Публикационную активность соискателя (по данным Research Gate) характеризует цитируемость 5 677 и индекс Хирша 39.

В главе 1 автором представлен подробный обзор истории изучения и классификации нематод отряда Tylenchida Thorne, 1949, который включает самую большую и экономически наиболее важную группу фитопаразитических нематод. Рассмотрены наиболее востребованные классификации и показаны противоречия относительно взглядов на происхождение Tylenchida и оценки различных эволюционных тенденций в этой группе. Критический анализ построенной молекулярной филогении отряда Tylenchida по гену D2-D3 28S рРНК и анализ современных знаний позволили автору выдвинуть гипотезу о существовании нескольких групп седентарных нематод, независимо возникших в процессе эволюции.

В главе 2 диссертантом приведены сведения об исследованном материале (100 видов нематод, представляющих 400 популяций); приведен перечень последовательностей, депонированный в Генбанке, со ссылками на таблицы, приведенные в Приложении. Представлены различные варианты филогенетического моделирования и программного обеспечения для решения поставленных задач. Как в этой главе, так и в других разделах и главах диссертации приведенные материалы являются обобщением результатов и методов из опубликованных автором статей.

В главе 3 приведены результаты проведенного анализа филогенетических отношений в отряде Tylenchida на уровне нижних таксонов (подотрядов, надсемейств и семейств). В развитии интегрированной таксономии выполнена проверка соответствия существующих морфологически и биологически обоснованных классификаций тиленхид с филогениями, реконструируемых на основе молекулярных данных. С использованием различных подходов диссертантом была выполнена серия филогенетических анализов, показавших достоверность гипотезы, выдвинутой автором о происхождении седентарного паразитизма у тиленхид. Проведенные исследования автора позволили выявить пять потенциальных точек его возникновения, иллюстрируя параллельные процессы эволюции паразитизма в

нескольких кладах. У представителей двух семейств Sphaeronematidae и Heteroderidae выявляется параллельное формирование способности к цистообразованию.

Глава 4. «Филогения рода *Rotylenchulus*». Проведенная диагностика патогенных нематод с использованием последовательностей D2-D3 28S рРНК и последовательностей гена рРНК BTC1-5,8S-BTC2 позволила автору описать новый вид *R. macrosomoides* и показать, что род *Rotylenchulus* происходит из Афротропического (Эфиопского) зоогеографического региона.

В главе 5 на основании генетического анализа и детальной морфологии признаков исследовано 24 вида цистоидных нематод сем. Heteroderidae. В результате филогенетического анализа автор подтвердил положение родов *Atalodera* и *Rhizonemella* в подсемействе Ataloderinae, были получены доказательства парафилии этого подсемейства.

Глава 6. «Диагностика цистообразующих нематод с помощью ПЦР» демонстрирует ПДРФ анализ полиморфизма длины фрагментов BTC рРНК гена, составлен атлас гелей полиморфизма для видов рода *Heterodera*, комбинация профилей семи отдельных фрагментов обеспечивает идентификацию большинства изучаемых видов нематод. Второй вид экспресс-диагностики по гену 28S разработан в двух вариантах со специфичными и универсальными праймерами, третий вид диагностики, ПЦР-тест, – в реальном времени с видоспецифичными праймерами по генам COI и D3 28S рРНК.

Глава 7 представляет филогенетические отношения у цистообразующих нематод, выявленные на основе анализа последовательностей BTC областей рибосомальной ДНК, влияния выбора филогенетического метода и моделей ДНК эволюции, в частности, применения сложной модели вторичной структуры рРНК молекулы и оценки ее влияния на результаты анализа. В этой главе также дается характеристика девяти групп внутри рода *Heterodera*: *Afenestrata*, *Avenae*, *Bifenestra*, *Cardiolata*, *Cyperi*, *Goettingiana*, *Humuli*, *Sacchari* и *Schachtii*, и приводятся результаты анализа коэволюции цистообразующих нематод с растениями-хозяевами.

Глава 8 посвящена ДНК-баркодированию, филогении и филогеографии нематод видов рода *Heterodera* группы *Avenae*. Автором было проанализировано более чем 150 популяций нематод, собранных в 26 странах. Дается классификация гаплотипов, а также показано, что нематоды из этой группы возникли и диверсифицировались в Ирано-Анатолийском регионе в период плейстоцена, а затем распространились из этого региона по всему миру.

В главе 9 автор рассматривает ДНК-баркодирование, филогению и филогеографию видов цистообразующих нематод из рода *Globodera* и приходит к важным выводам, что эти нематоды происходят из нескольких центров биоразнообразия, расположенных в горных районах Перу, Боливии, Южной Африки и Новой Зеландии, а возникновение и расселение видов *Globodera* началось в конце позднего плиоцена (2,9 млн лет назад). Полученные новые данные также показали высокое генетическое разнообразие боливийских популяций *G. rostochiensis* по COI и *cytb* генам, указывающим на то, что этот вид происходит из южной Боливии или северо-западной части Аргентины.

В главе 10 рассматривается филогения галловых нематод рода *Meloidogyne*. Впервые показано, что род разделяется на 11 основных эволюционных линий, и *M. nataliei* вместе с *M. indica* представляет собой наиболее раннюю обособившуюся ветвь галловых нематод.

Глава 11 посвящена новым методам диагностики двух видов галловых нематод: *M. enterolobii* и *M. hapla* с использованием метода рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА). Было показано, что весь процесс обнаружения для анализа РПА с иммунострипами может быть завершен в течение примерно 30 минут, включая 4 минуты для приготовления неочищенного экстракта нематод.

В главах 12 и 13 дается молекулярная характеристика и филогения седентарных нематод родов *Tylenchulus*, *Meloidoderita* и *Sphaeronema*. Автором было впервые установлено, что цистообразование или способность сохранять яйца внутри тела отмершей самки у тиленхид возникло также в семействе *Sphaeronematidae*.

Выполненная работа базируется на большом объеме материала, в ходе выполненных исследований соискателем секвенированы более 3400 ДНК последовательностей рибосомальных РНК, митохондриальных и других генов для более 300 видов нематод отряда Tylenchida, более 860 молекулярных последовательностей – для Heteroderidae и 306 для Meloidogynidae. Сделано описание и дана молекулярно-генетическая характеристика *Paradolichodera* – нового рода цистообразующих нематод; нескольким новым видам седентарных нематод, включая девять новых видов цистообразующих нематод.

Впервые на основе морфогенетического анализа дана оценка таксономического разнообразия фауны цистообразующих нематод России. Выполнена ревизия семейства Heteroderidae. Впервые получены сиквенсы для карантинных видов нематод, представлена их филогения и анализ взаимоотношений между представителями Heteroderidae, Meloidogynidae и надсемейства Tylenchuloidea. Основываясь на построенных филограммах и анализе морфологических признаков, определены направления эволюционных преобразований этих групп нематод. Впервые получены новые показатели и создано программное обеспечение в развитии филогенетических построений, основанных на анализе вторичных структур 5.8S и ВТС рРНК и D2-D3 28S рРНК.

Имеются два замечания к диссертации. Соискатель подробно представляет филогеографию и распространение овсяной и картофельной цистообразующих нематод в мире, но, к сожалению, подробно не разбираются появление и распространение этих нематод в России, а такая информация является важной и могла бы быть представлена в отдельных подглавах. Также хотелось, чтобы диссертация завершалась коротким заключением, в котором соискатель смог бы кратко изложить свое видение перспектив развития систематики седентарных нематод и методов их диагностики.

Представленная к защите диссертация является примером глубокого фундаментального исследования. Она представляет результат плодотворной работы автора по изучению различных аспектов эволюции, систематики, филогеографии и коэволюции с хозяевами седентарных нематод отряда

Tylenchida. Диссертация посвящена важным научно-теоретическим и прикладным аспектам паразитологии, которые имеют высокую значимость.

Текст автореферата отражает содержание диссертации. Основные результаты обнародованы в многочисленных публикациях автора (51 научная работа в периодических изданиях, индексируемых международными библиографическими базами WoS/Scopus и рекомендованных ВАК РФ, а также 13 глав в коллективных монографиях и 2 монографии) по теме диссертации.

Диссертация Сергея Александровича Субботина «Молекулярная систематика и филогеография седентарных нематод отряда Tylenchida» полностью соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к докторским диссертациям (пп. 9–14 Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней»), а сам диссертант заслуживает присвоения ему искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.17 – паразитология.

Профессор, главный научный сотрудник, лаборатории
паразитологии животных и растений, Института биологии
КарНЦ РАН, доктор биологических наук

Евгений Павлович Иешко

09.11.2021

185910, Петрозаводск, Республика Карелия,
ул. Пушкинская д.11, тел +7 911 4100958,
e-mail: ieshkoep@gmail.com