

На правах рукописи

**Субботин
Сергей Александрович**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ СИСТЕМАТИКА И ФИЛОГЕОГРАФИЯ
СЕДЕНТАРНЫХ НЕМАТОД ОТРЯДА TYLENCHIDA**

1.5.17 - Паразитология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Москва
2021

Работа выполнена в Центре паразитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук

**Официальные
оппоненты:**

Иешко Евгений Павлович

Доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории паразитологии растений и животных Института биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук» (КарНЦ РАН)

Медведев Сергей Глебович

Доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией паразитических членистоногих, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Зоологический институт Российской академии наук» (ЗИН РАН)

Гранович Андрей Игоревич

Доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой зоологии беспозвоночных Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ)

**Ведущая
организация:**

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

Защита состоится «___» _____ 2021 года в ___ часов ___ минут на заседании диссертационного совета Д 24.1.109.03 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33. Тел/факс: + 7(495)952-73-24, e-mail: admin@sevin.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский пр.-т, д. 33, на сайте ФГБУН ИПЭЭ РАН по адресу: <http://www.sev-in.ru/> и на сайте Высшей аттестационной комиссии по адресу: <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Кандидат биологических наук

Татьяна Анатольевна Малютина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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.

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 будет способствовать внедрению эффективных карантинных правил.

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 и Субботин, 2012; Subbotin *et al.*, 2013). Использование биоинформатики с ее возможностью анализа большого количества геномных данных – одно 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. 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 разработки интегрированной таксономии, филогении и филогеографии этой группы.

Степень разработанности темы. В настоящее время описано около 4100 видов фитопаразитических нематод, и предполагается, что это только 15% от общего числа известных видов нематод. Все известные в настоящее время фитопаразитические нематоды относятся 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. В настоящее время седентарные нематоды включают более 270 валидных видов, из них 118 цистообразующих и 32 цистоидных нематод из 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. В своих работах Holterman *et al.* (2006), Meldal *et al.* (2007) реконструировали филогенетические взаимоотношения и выявили основные клады нематод на основе 18S рибосомального РНК (рРНК) гена на более широкой выборке таксонов по сравнению с первой молекулярной филогенией нематод, опубликованной Blaxter *et al.* (1998). Однако этот ген оказался недостаточно информативным, чтобы изучить взаимоотношения между близкими видами и родами. Значительный прогресс в области молекулярной систематики седентарных нематод был достигнут нами в результате совместных с коллегами исследований.

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом многолетних исследований (1996–2021 гг.), выполненных лично автором 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.

Целью 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 тилленхидных 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 *cytb* 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 во время совместных работ 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.

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.

Структура диссертации. Работа состоит из введения, 13 глав, которые включают обзор литературы, материалы и методы и 11 глав, содержащих 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Отряд Tylenchida Thorne, 1949 включает самую большую и наиболее экономически важную группу фитопаразитических нематод (Siddiqi, 2000; Subbotin, 2013). За многие годы исследований было предложено несколько классификаций и филогений для тиленхид (Chitwood, Chitwood, 1950; Maggenti, 1971, 1981; Andr ssy, 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. Популярные или наиболее востребованные классификации отражают противоречия относительно взглядов на происхождение Tylenchida и оценки различных эволюционных тенденций в этой группе.

Первая подробная молекулярная филогения отряда Tylenchida на основе анализа D2-D3 фрагмента 28S рРНК гена была опубликована нами (Subbotin *et al.*, 2006). В контексте современных знаний о филогении тиленхид можно заключить, что существует несколько групп седентарных нематод, независимо возникших в процессе эволюции. Это рениформные нематоды рода *Rotylenchulus* (Rotylenchulidae), цистойдные и цистообразующие нематоды (Heteroderidae), галловые (Meloidogynidae) и ложно-галловые нематоды (Pratylenchidae с подсемейством Nacobboderinae), а также тиленхулоидные нематоды из надсемейства Tylenchuloidea. В главе 1 дается обзор литературы, представляющей результаты исследований по этим группам.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Виды и популяции, использованные в настоящем исследовании, приведены в приложении диссертации и указаны в опубликованных статьях. Более 100 видов седентарных нематод из более чем 400 популяций были включены в наши исследования. 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 ДНК-последовательностей, а также анализа специфичности хозяев-нематод и географического распределения исследуемых образцов (Subbotin *et al.*, 2010).

ДНК выделяли из личинок, яиц или взрослых особей с использованием протеиназы К. Несколько фрагментов митохондриальных и рибосомальных РНК генов были амплифицированы и секвенированы по методам, описанным нами (Subbotin, 2021b). Таблицы с праймерами приведены в приложении диссертации. Некоторые продукты ПЦР клонировали в вектор pGEM-T и

трансформировали в компетентные клетки JM109 (Промега). Новые последовательности были депонированы в Генный банк, номера этих последовательностей указаны в таблицах в приложении диссертации и на представленных филогенетических деревьях.

Выравнивания последовательностями генов были получены с использованием программы ClustalX 1.83. Последовательности генов были проанализированы методами максимальной вероятности (МЛ), максимальной экономии (парсимонии) (МП), минимальной эволюции (МЭ) с использованием RAUP* и Байесовским вероятностным (БВ) анализом с использованием программы MrBayes 3.1.2. Апостериорные вероятности (АП) и значения поддержки бутстрепа (БС) были рассчитаны для соответствующих клад на филогенетических деревьях. Альтернативные топологии были проанализированы с помощью МЛ-тестов Шимодайра – Хасегава (Shimodaira – Hasegawa, ШХ) и Кишино – Хасегава (Kishino – Hasegawa, КХ), используя RAUP. Выравнивания для последовательностей генов по некоторым нематодным группам использовали для построения филогенетической сети с помощью метода статистической парсимонии (СП), реализованной в программе POPART. Время дивергенции было рассчитано с помощью программы BEAST 2.4.5 с использованием выравнивания последовательности COI с частотой геномного замещения, равной $7,2 \times 10^{-8}$ на сайт за поколение, как это было рассчитано Howe *et al.* (2010) для *Caenorhabditis briggsae*. Статистический дисперсионно-вариантный анализ (S-DIVA) был выполнен посредством программы RASP 4.0.

Программа Mfold (Zuker, 2003) была использована при прогнозировании вторичных структур для областей расширения рРНК с использованием подхода минимизации энергии. Полученные структуры были визуализированы с помощью программы VARNA (Darty *et al.*, 2010). Статистика нуклеотидного состава в стеблях и петлях, вычисление консенсусной последовательности, кодирование последовательностей и преобразование отдельных последовательностей в формат РНК-структуры были выполнены в программе RNAsat (<http://www.ssubbotin.com/software.html>).

Подробное описание методов молекулярной диагностики и программного обеспечения для проведения филогенетических исследований приводится в наших 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

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. Несколько подходов было использовано в нашем исследовании для выявления филогенетических взаимоотношений между тиленхидами. Первый подход включал серию филогенетических анализов последовательностей D2-D3 фрагмента 28S рРНК гена для 77 видов Tylenchida, а также для нескольких видов Aphelenchida Siddiqi, 1980, выбранных для внешней группы. Филогенетический анализ был основан на методах МП и БВ. Девять выравниваний, полученных при различных параметрах длины разрыва и со штрафами за разрыв, и одно консервативное выравнивание были проанализированы в нашем исследовании. Подробно результаты этого исследования опубликованы в нашей работе: Subbotin *et al.* (2006). Второй анализ включал более 100 таксонов и все основные группы седентарных нематод и был произведен методом БВ (Рисунок 1). Более 300 видов тиленхид были впервые секвенированы нами для наших исследований.

Филогенетический анализ. Консервативное выравнивание было создано нами вручную на основе одного из автоматических выравниваний. Консенсусное дерево, полученное в результате БВ анализа, выявило деление Tylenchida на семь основных клад. Клада I (АП=99%) включала двух представителей надсемейства Iotonchioidea, а клад II (АП=99%) включала три вида семейства Allantonematidae и *Parasitylenchus* sp. Эти клад занимали базальное положение внутри тиленхид. Клада III (АП=99%) включала большинство видов семейства Anguinidae (исключая *Ditylenchus destructor*) и неопределенный вид, найденный у насекомого. Представители семейств Tylenchidae (клада V) и Psilenchidae с подсемейством Merlininae (клада IV) образовывали хорошо поддерживаемую кладу (АП=96%). Клада VI (АП=99%) включала все виды подотряда Criconematina и с ранним ответвлением седентарной нематоды *Sphaeronema alni*. Клада VII (АП=96%) включала всех Hoplolaimina, кроме Psilenchidae и подсемейства Merliniinae. Монофилия таксонов Heteroderidae, Hoplolaiminae, Pratylenchinae, Meloidogynidae была хорошо поддержана (АП>90%). *Radopholus* был объединен с представителями родов *Meloidodera* и *Cryphodera* (АП=84%). *Meloidogyne*, *Pratylenchus* и *Hirschmanniella* были сгруппированы в хорошо поддерживаемую кладу (АП=99%).

Общая тенденция к формированию семи основных клад у тиленхид наблюдалась в филогенетических анализах для девяти автоматических выравниваний, хотя и с разными уровнями статистической поддержки. Топология деревьев зависела от параметров выравнивания и применяемого филогенетического метода. Клада IV (Merliniinae, Psilenchidae и Tylenchidae) поддерживалась от умеренной до высокой (АП=89-99%) степени в БВ деревьях, полученных от пяти автоматических выравниваний, и слабо поддерживалась в МП деревьях из двух выравниваний. Клада VI, включавшая всех представителей подотряда Criconematina, была умеренно или сильно поддержана МП и БВ анализом. Базальная позиция *Sphaeronema alni* ко всем остальным

Criconematina была очевидна на всех деревьях. Клада VII, включавшая нематод из подотряда *Hoplolaimina* (за исключением *Psilenchidae* и *Merliniinae*), имела от слабой до сильной поддержки, в зависимости от параметров выравнивания и методов построения деревьев. Молекулярные данные подтвердили монофилию подсемейств *Heteroderinae* и *Punctoderinae* и монофилию родов *Heterodera* и *Meloidogyne*. На большинстве деревьев *Meloidogyne*, *Pratylenchus* и *Hirschmanniella* были сгруппированы вместе, однако взаимоотношения между этими родами не были хорошо разрешены на большинстве деревьев. *Radopholus* обычно формировал кладу с *Hoplolaimidae* или *Heteroderidae*, хотя во многих случаях их связь с другими родами оставалась неопределенной. Анализ МП дал более низкую поддержку и не позволил разрешить отношения между основными группами тиленхид. Таким образом, наши исследования показали, что положение некоторых клад зависело от параметров выравнивания, однако некоторые тенденции в группировках были очевидны при реконструкции из всех выравниваний и методов построения деревьев.

Проверка альтернативных гипотез. В исследовании мы использовали консервативное и автоматическое выравнивания для того, чтобы сгенерировать несколько деревьев, топологии которых поддерживают традиционные взгляды на взаимоотношения тиленхид. Эти деревья были использованы затем для ШХ и КХ МЛ-тестирования. Тесты для обоих наборов данных опровергли ряд традиционных гипотез, предложенных на основе морфологии: i) монофилия надсемейства *Dolichodoroidea* sensu Siddiqi (2000); ii) положение *Radopholus* в семействе *Pratylenchidae*; iii) родственные связи между цистообразующими (*Heteroderidae*) и галловыми нематодами (*Meloidogynidae*); и iv) *Eutylenchus* как родственник таксон к *Macrotrophurus*. 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.

Во многом филогенетические картины взаимоотношений тиленхид, которые мы получили в результате анализа D2-D3 фрагмента 28S рРНК гена, согласуются с картиной эволюции, полученной из морфологических данных. Наши результаты МП и БВ анализа показывают, что отряд *Tylenchida* включает семь основных линий, которые в основном соответствуют таксономическим категориям, предложенным Siddiqi (2000). Молекулярный анализ также показывает, что седентарный паразитизм возникает как минимум пять раз в процессе эволюции у тиленхид.

Подотряд *Hoplolaimina* (клада VII), состоящий из надсемейств *Dolichodoroidea* и *Hoplolaimoidea*, включает фитопаразитических нематод, которые характеризуются сложными взаимоотношениями в системе паразит – хозяин. Эта клад умеренно или высоко поддерживалась в большинстве анализов, но не в своем традиционном составе. Интересно, что результаты анализа указывают на парафилию надсемейства *Dolichodoroidea* и исключают из него представителей *Merliniinae* и *Psilenchidae*, которые на деревьях помещаются в кладу IV.

Седентарные нематоды семейств Heteroderidae и Meloidogynidae.
Данные по D2-D3 фрагменту 28S гена предоставляют дополнительную информацию о возможном происхождении семейств Heteroderidae (включая цистообразующих нематод) и рода *Meloidogyne* (корневых галловых нематод).

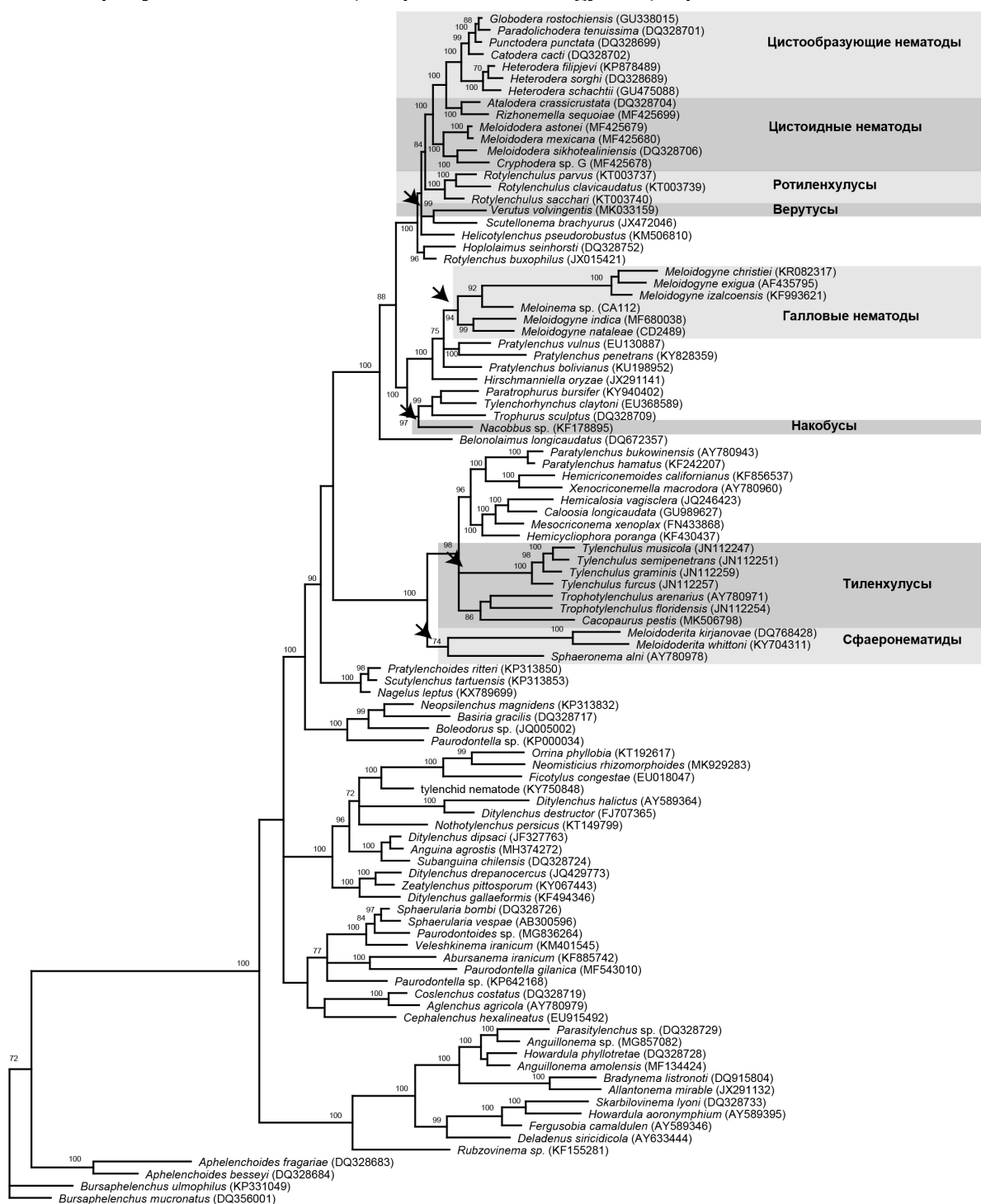


Рисунок 1. Байесовское дерево, полученное с использованием модели GTR+I+G для выравнивания D2-D3 фрагмента 28S рНК гена нематод отрядов Tylenchida и содержащее основные группы седентарных нематод. Значения АП даны в процентах для каждой клады. Группы седентарных нематод отмечены серым цветом. Возможное возникновение седентарного паразитизма у определенных клад тиленхид отмечено стрелками.

Наши молекулярные данные подтверждают, что эти группы не имеют единого общего предка. Интересным новым результатом нашего анализа стало выявление филогенетического положения двух представителей рода *Meloinema* (*Meloinema chitwoodi* и *M. odesanens*) (Nacobboderinae) рядом с базальной группой галловых нематод (Meloidogyninae) (Subbotin, Kim, 2020). Филогенетический анализ также показал, что *Meloinema* и *Nacobbus* (Nacobbinae, Pratylenchidae) не являются близкородственными таксонами.

Результаты настоящего исследования выявили родственные связи *Meloidogyne* с Pratylenchidae (*Pratylenchus* и *Hirschmanniella*), которые наблюдались на большинстве деревьев. Этот результат согласуется с гипотезой, предложенной Рыссом (1988), предположившим, что среди Noplolaimoidea пратиленхиды наиболее сходны с *Meloidogyne* по деталями строения области головы и расположения сенсилл губной области и эти морфологические сходства указывают на общее происхождение Meloidogynidae и Pratylenchidae.

Результаты наших исследований убедительно свидетельствуют о монофилии цистообразующих нематод, а также подтверждают правомерность выделения двух подсемейств – Heteroderinae и Punctoderinae. Наш анализ также показывает, что цистообразование, или способность к формированию цист из отмирающих зрелых самок, у тиленхид произошло независимо в семействе Sphaeronematidae и семействе Heteroderidae.

ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ВИДОВ РОДА *ROTYLENCHULUS* И ФИЛОГЕНИЯ РОДА

Задачами настоящего исследования были: i) анализ видов рода *Rotylenchulus*, с использованием последовательностей ВТС рРНК, D2-D3 28S рРНК, COI и hsp90 генов; ii) изучение филогенетических отношений в пределах рода; iii) разработка ПЦР с видоспецифичными праймерами для быстрой и надежной диагностики вида *R. reniformis*, имеющего важное хозяйственное значение. 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 опубликовано также в нашей работе: Palomares-Rius *et al.* (2018). В исследовании мы охарактеризовали семь валидных видов: *R. clavicaudatus*, *R. leptus*, *R. macrodoratus*, *R. macrosoma*, *R. parvus*, *R. reniformis*, *R. sacchari* и один новый вид – *R. macrosomoides*. Молекулярная характеристика пяти видов была проведена впервые. Анализ нуклеотидных последовательностей COI гена и гена, кодирующего белок hsp90, позволил четко разделить все изученные виды *Rotylenchulus* друг от друга.

Нами было получено 29 новых последовательностей D2-D3 28S рРНК-гена для *Rotylenchulus*. Последовательности *R. reniformis* были распределены на дереве между двумя отдельными кладами: тип А (образцы из Китая, США и Японии) и тип В (образцы из Китая). Только последовательности типа А были получены из всех образцов *R. reniformis* из США, подвергнутых прямому секвенированию продуктов ПЦР. Тип А *R. reniformis* показал родственные отношения с *R. macrosoma*, а тип В показал родственные отношения с *R. macrosomoides*. Различия в последовательностях между *R. reniformis* типами А и В гена D2-D3 28S рРНК 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.). Нами были разработаны видоспецифичные праймеры для диагностики *R. reniformis* на основе различий в последовательности D2-D3 28S рРНК гена.

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 нескольких видов рода *Rotylenchulus* были включены в анализ. Последовательности *Rotylenchulus reniformis* и *R. macrosoma* образовали основную кладу I. *R. reniformis* тип А, содержащий короткий BTC1 (ITS1S) (323-336 п.н.) и включающий как амфимиктические, так и партеногенетические популяции, был распределен по нескольким субкладам. *R. reniformis* типа В, содержащий длинный BTC1 (ITS1L) (488-502 п.н.) участок, был сгруппирован с длинным BTC1 *R. macrosoma* (тип В). Вариация последовательности у *R. reniformis* типа А достигала 17,6% (62 п.н.), а у *R. reniformis* типа В достигала 11,4% (60 п.н.), эти типы отличались до 24,5% (75 п.н.) друг от друга.

Анализ нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих рРНК, позволил четко диагностировать все изученные виды *Rotylenchulus* от нового вида *R. macrosomoides*. Базальная позиция *R. macrosomoides* на филогенетических деревьях подтверждает мнение 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*. Наше настоящее исследование подтвердило результаты предыдущих исследований других авторов, которые обнаружили два разных типа рРНК (18S, BTC и 28S) в геноме *R. reniformis*. Более того, мы также обнаружили различные типы рРНК у других видов: два типа BTC у *R. macrosomoides* и три типа BTC у *R. macrosoma*. Реконструкция моделей вторичной структуры для двух типов D2 фрагмента 28S рРНК молекулы для вида *R. reniformis* и картирование на ее мутаций показали, что обе конфигурации имели одинаковую консервативную структуру и большинство точечных мутаций на них были компенсаторными, таким образом подтверждая, что оба типа рРНК генов являются функциональными. Настоящее исследование также предоставило больше информации о внутривидовой изменчивости генов для

видов *Rotylenchulus*, и эти данные могут помочь в установлении границ видов у рассматриваемой группы нематод.

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

Задачи настоящего исследования заключались в следующем: i) провести молекулярную характеризацию нескольких валидных и неизвестных видов цистоидных нематод с использованием последовательностей D2-D3 фрагмента 28S рРНК, ВТС рРНК и COI генов; ii) проанализировать филогенетические отношения между цистоидными нематодами семейства Heteroderidae; iii) оценить границы видов для цистоидных нематод с использованием морфологического и молекулярного подходов. Результаты этих исследований и подробное обсуждение результатов опубликованы в статьях: Nguyen *et al.*, 2011 и Subbotin *et al.*, 2017, 2018.

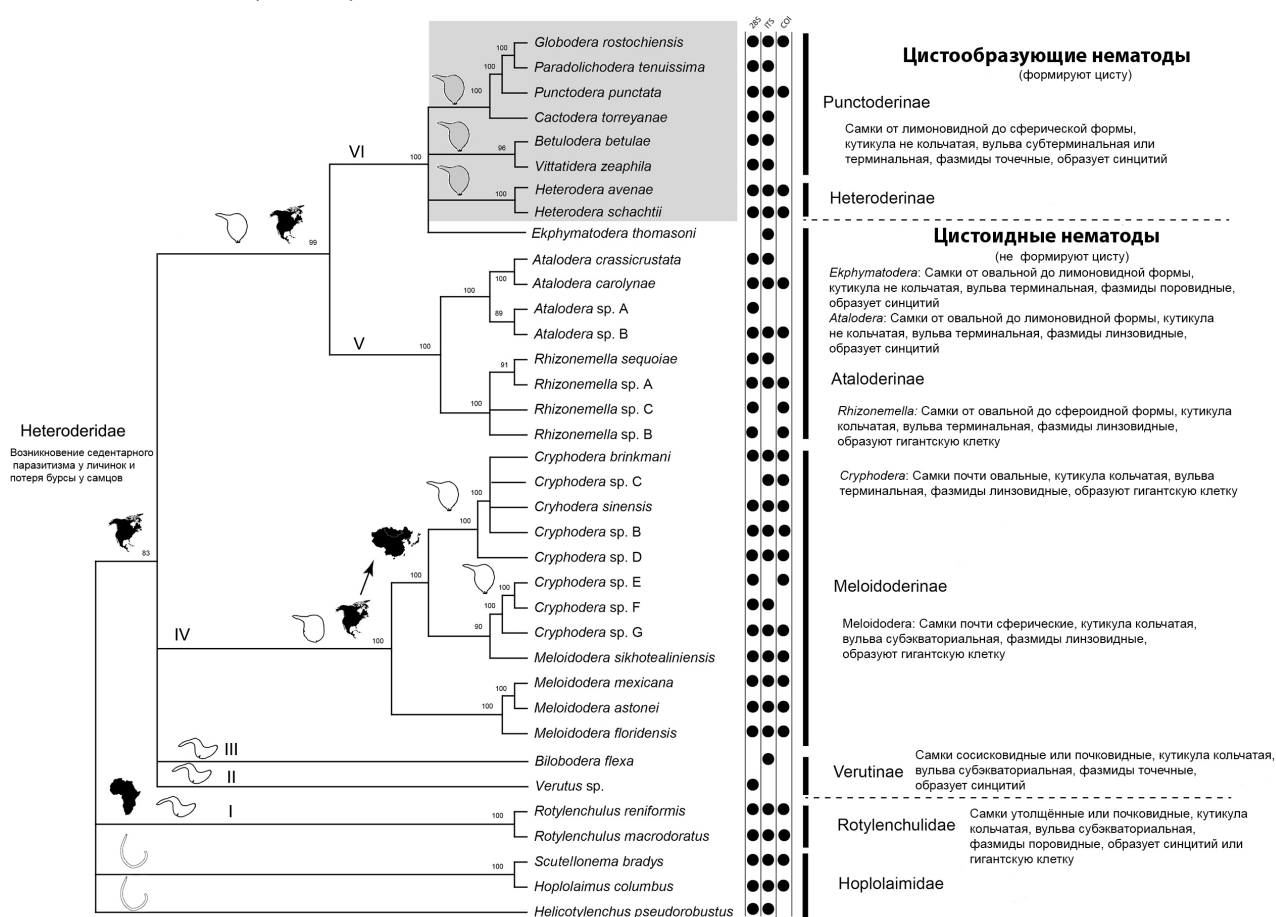


Рисунок 2. Филогенетические взаимоотношения внутри Heteroderidae. Байесовское дерево, полученное на основе анализа выравнивания последовательностей, содержащих фрагменты трех генов, по модели GTR+I+G. АП значения, равные или превышающие 80%, приведены для соответствующих клад. Для некоторых клад даны картирование географических регионов (Африка, Северная Америка и Восточная Азия), формы самки и краткий таксономический диагноз. Также указаны гены, включенные в набор данных для каждого таксона.

Используя подход, объединяющий доступные морфологические признаки и молекулярные критерии, мы выделили семь валидных и семнадцать 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*, шесть неопределенных видов *Cryphodera*, три неопределенных вида *Rhizonemella*, *Zelandodera* sp. из Новой Зеландии, предположительно новый род семейства Verutinae из Борнео, Малайзия, и три вида *Verutus*, включая *V. volvingensis* из типового местонахождения.

Тридцать восемь новых последовательностей D2-D3 28S рРНК гена были получены в настоящем исследовании. Полученное филогенетическое дерево содержало пять высоко поддерживаемых основных клад: Heteroderinae, содержащие виды рода *Heterodera* с представителями Punctoderinae, которые были разделены на клады с видами, относящимися к i) *Globodera*, *Paradolichodera*, *Punctodera*, *Cactodera*, *Vittatidera*, *Betulodera*; ii) Ataloderinae, содержащие виды *Atalodera* и *Rhizonemella*; iii) Rotylenchulinae, содержащий виды *Rotylenchulus*; iv) Meloidoderinae, содержащие представителей *Meloidodera* и *Cryphodera*; v) Verutinae, содержащие неидентифицированный вид *Verutus*.

Двадцать семь новых последовательностей COI гена были получены в настоящем исследовании. Полученное филогенетическое дерево содержало три основные клады с высокой степенью поддержки (АП=92-100%): i) Ataloderinae; ii) Punctoderinae и Heteroderinae; и iii) Meloidoderinae. *Meloidodera sikhotealiniensis* с российского Дальнего Востока была сгруппирована с образцом *Meloidodera* из Германии, идентифицированным нами прежде как *M. alni*, и их последовательности отличались на 6,6% (29 п.н.). Учитывая то, что различия в последовательностях COI и ВТС рРНК генов между *M. sikhotealiniensis* и *M. alni* были невелики и находились в пределах диапазона внутривидовых изменений, а морфологические и морфометрические признаки, используемые для дифференциации этих видов, незначительны и их растения-хозяева перекрываются, мы предложили рассматривать *M. alni* как младший синоним *M. sikhotealiniensis*.

Комбинированное выравнивание включало 36 ДНК-последовательностей. Конденсное филогенетическое дерево представлено на Рисунке 2 и состоит из шести основных клад для седентарных нематод: i) Rotylenchulidae; ii) *Verutus* sp.; iii) *Bilobodera flexa*; iv) *Meloidodera* и *Cryphodera*; v) *Atalodera* и *Rhizonemella*; vi) *Ekphymatodera thomasoni* и цистообразующие нематоды. Клады *Atalodera* и *Rhizonemella* была сгруппированы с кладой *E. thomasoni* и цистообразующими нематодами. В этом исследовании мы впервые представляем филогенетический анализ Heteroderidae и Rotylenchulidae. Основываясь на объединенном наборе данных, подсемейство Verutinae с двумя родами *Bilobodera* и *Verutus* сгруппированы в Heteroderidae, таким образом, подтверждается мнение нескольких авторов (Wouts, 1985; Luc *et al.*, 1988;

Baldwin, Mundo-Ocampo, 1991; Andrásy, 2007), предполагающих, что Verutinae следует рассматривать в пределах Heteroderidae, а не в пределах Rotylenchulidae. В нашем дополнительном исследовании (Subbotin *et al.*, 2018) мы включили три вида рода *Verutus* и один неописанный род из этого подсемейства в молекулярный анализ. Представители Verutinae также располагались в составе клады Heteroderidae на большинстве деревьев.

Конденсное дерево также показало, что *Ekphymatodera thomasoni* сгруппирована с цистообразующими нематодами, что делает подсемейство Ataloderinae парафилетическим. Подсемейство Ataloderinae нуждается в ревизии с возможным созданием нового подсемейства для вида *E. thomasoni*.

Филогенетический анализ подтвердил положение родов *Atalodera* и *Rhizonemella*, но не рода *Cryphodera* в подсемействе Ataloderinae. Род *Cryphodera* следует рассматривать в подсемействе Meloidoderinae. Цистоидная нематода из Новой Зеландии, предварительно морфологически идентифицированная как *Cryphodera* sp., в нашем исследовании была определена как представитель рода *Zelandodera*, близкого к роду *Cryphodera*. Наш молекулярный анализ показал, что *Zelandodera* представляет отдельную эволюционную линию внутри Meloidoderinae, таким образом, подтверждается обоснованность выделения этого рода.

Филогеография. Северная Америка, вероятно, является основным центром происхождения цистоидных нематод. Анализ видового и генетического разнообразия позволил выявить локальные первичные центры разнообразия и происхождения для цистоидных нематод, которые совпадают с основными зонами 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 выявил близкородственные связи между *Atalodera carolynae* из Калифорнии и *A. crassicrustata* с Камчатки и североамериканскими мелойдодерами с азиатскими *Cryphodera*, что свидетельствует о древнем распространении цистоидных нематод из Северной Америки в Азию. Вторичный центр происхождения и разнообразия цистоидных нематод расположен в горах северного Вьетнама и южного Китая. Высокий уровень видового разнообразия *Cryphodera* вместе с наличием местных эндемиков и нескольких неописанных новых гетеродеридных родов может указывать на относительно высокую скорость видообразования у данной группы нематод в этом регионе.

ГЛАВА 6. ДИАГНОСТИКА ЦИСТООБРАЗУЮЩИХ НЕМАТОД С ПОМОЩЬЮ ПЦР

Диагностика нематод на основе анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) ВТС рРНК гена имеет много преимуществ. Однако для того, чтобы иметь возможность применять эти методы в качестве рутинной процедуры для карантинных инспекций или служб

защиты растений, необходимо создать каталог ПДРФ для ВТС области широко распространенных видов нематод. Наше исследование подтверждает, что ПЦР-ВТС-ПДРФ позволяет дифференцировать важные с точки зрения сельского хозяйства цистообразующие виды нематод друг от друга и от видов-двойников.

ПЦР-ВТС-ПДРФ диагностика. В своем исследовании мы успешно амплифицировали ВТС рРНК ген для всех видов рода *Heterodera*. Метод ПДРФ с использованием только семи рестрикционных ферментов позволил дифференцировать 21 вид цистообразующих нематод. В нашей монографии по цистообразующим нематодам приводится таблица с рестрикционными профилями для 45 видов гетеродерид (Subbotin *et al.*, 2010).

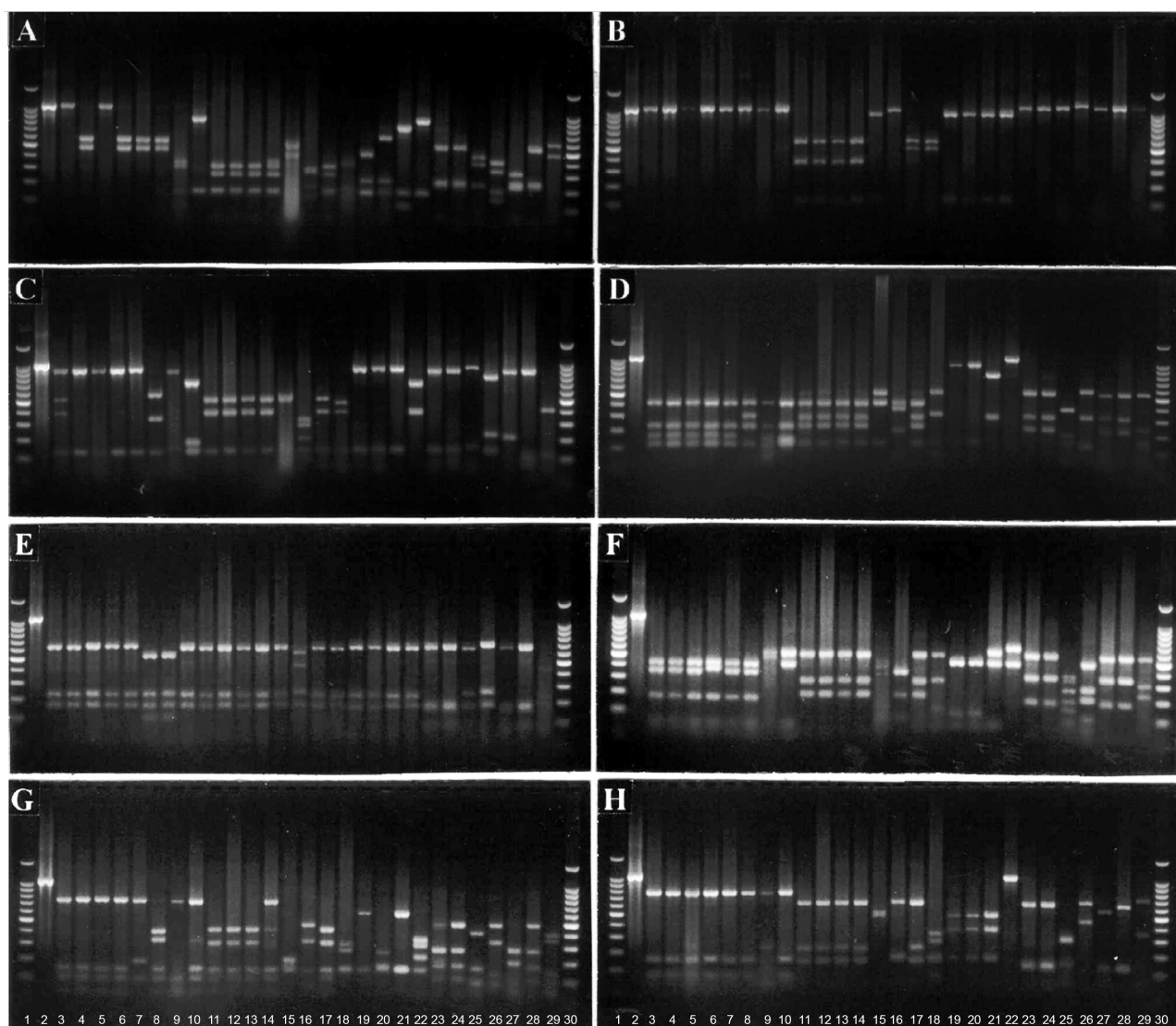


Рисунок 3. ПЦР-ВТС-ПДРФ. А: *AluI*; В: *AvaI*; С: *Bsh1236I*; D: *BsiZI*; E: *Bsp143I*; F: *BsuRI*; G: *CfoI*; H: *DdeI*. Дорожки: 1 и 30 - 100 п.н. ДНК маркер, 2 – нерасщеплённый продукт, 3 – *H. avenae* (тип А), 4 – *H. avenae* (тип В), 5 – *H. arenaria*, 6 – *H. filipjevi*, 7 – *H. aucklandica*, 8 – *H. ustinovi*, 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 sikhotealinensis*.

Спектры рестрикции для всех изученных видов были получены после использования 23 из 26 ферментов. 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, фермент *CfoI* (рис. 3G) дал 16 полиморфных профилей, позволяющих отличить 12 из 26 видов нематод. *AluI* (рис. 3A), *BsuRI* (рис. 3F), *Bsh1236I* (Рисунок 3C) и *ScrFI* каждый продуцировал 15 полиморфных профилей и различал 9, 10, 11 и 9 видов соответственно. Предложенная нами комбинация профилей, полученных с помощью семи отдельных ферментов, позволила дифференцировать большинство изучаемых видов.

Расщепление продуктов ПЦР-ВТС-рРНК, полученных от видов *Globodera*, одним из четырех рестрикционных ферментов (*Bsh1236I*, *HinfI*, *PstI* или *RsaI*) позволило различить наиболее достоверные и еще не описанные виды этого рода. Четыре рестрикционных фермента (*Bsh1236I*, *HinfI*, *HpaII* и *PstI*) дифференцировали несколько видов *Cactodera* друг от друга.

ПЦР с видоспецифическими праймерами. ПЦР со специфическими праймерами – другой надежный метод диагностики, основанный на амплификации только участка гена для определенного вида нематод. В результате проведенных исследований мы разработали эту диагностику для свекловичной (*H. schachtii*), соевой (*H. glycines*) цистообразующих нематод, а также для *H. cajani*, паразита голубинового гороха. Эти результаты опубликованы в наших статьях (Subbotin *et al.*, 2001; Amiri *et al.*, 2002; Madani *et al.*, 2005; Roubtsova и Subbotin, 2021). Для разработки ПЦР-идентификации мы использовали два набора праймеров. Первый набор включал видоспецифические праймеры и универсальный праймер. Второй набор праймеров содержал универсальные праймеры, которые амплифицировали участок 28S рРНК гена и указывали на присутствие ДНК нематоды в образце. Все образцы, содержащие *H. schachtii* или *H. Schachtii*, всегда показывали два разных фрагмента на геле, с соответствующими наборами видоспецифических праймеров, тогда как все образцы, не содержащие целевую ДНК, показали только один фрагмент.

В нашем исследовании был разработан ПЦР-тест в реальном времени для обнаружения *H. cajani* с использованием видоспецифического праймера и пробы TaqMan. Праймеры и проба были сконструированы для амплификации фрагмента COI гена. В мультиплексном ПЦР-эксперименте со специфическими и универсальными наборами праймер-проб одновременно наблюдались сигналы амплификации COI и D3 28S рРНК генов. Результаты показали, что разработанный метод ПЦР был достаточно чувствительным, чтобы обнаружить ДНК *H. cajani*, выделенную из 0,002 яйца или личинки.

ГЛАВА 7. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ У ЦИСТООБРАЗУЮЩИХ НЕМАТОД, ВЫЯВЛЕННЫЕ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ВТС рРНК ГЕНА

В задачу 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 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 филогенетическая цистообразующих нематод, включающая большинство известных видов и реконструированная на основе БВ анализа, приведена на Рисунке 4.

В этом исследовании мы представляем филогенетический анализ 40 видов и подвидов семейства Heteroderidae, которые охватывают большую часть известного таксономического и морфологического разнообразия этой группы. Наш анализ был основан на 36 новых последовательностях полных областей BTC1-5.8S-BTC2, которые мы проанализировали с помощью нескольких филогенетических методов. Нуклеотидные вставки или делеции обычно обнаруживаются в ВТС рРНК генах цистообразующих нематод, и в настоящее время среди исследователей не существует консенсуса, как анализировать такие выравнивания. Чтобы решить эту проблему, мы сгенерировали несколько выравниваний: i) группу автоматических, компьютерных выравниваний с различной длиной разрыва и штрафами за открытие разрыва, ii) комбинированное выравнивание, полученное в результате объединения всех компьютерных выравниваний, iii) консервативное выравнивание, полученное из одного компьютерного выравнивания после исключения плохо выровненных участков. Топология деревьев, полученных из этих выравниваний, сравнивалась с использованием МП, МЭ и МЛ методов (Таблица 1). Подробно эта работа изложена в статье: Subbotin *et al.*, 2001.

Комбинированное выравнивание. МП анализ позволил получить шесть деревьев с одинаковым количеством изменений и одинаковой длиной. Шесть основных клад было обнаружено 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 Avenae + Sacchari; V – группа Schachtii; и VI – группа Cyperi + *H. orientalis* (= *Afenestrata orientalis*) + *H. cardiolata* + *H. bifenestra*. Монофилия цистообразующих нематод поддерживалась умеренно (БС=84%), тогда как монофилия *Globodera* поддерживалась слабо (БС=69%).

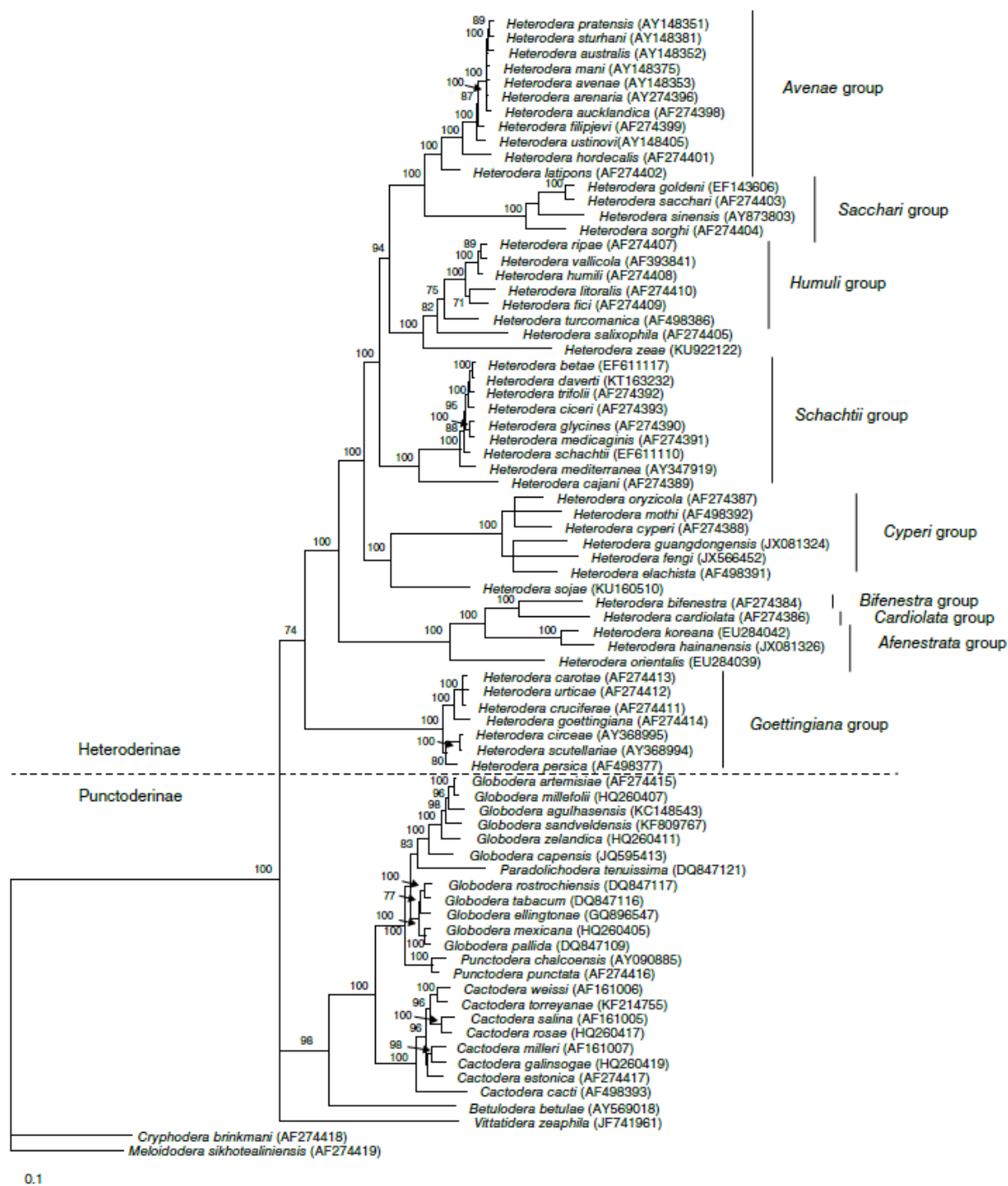


Рисунок 4. Филогенетические взаимоотношения между видами цистообразующих нематод. Байесовское дерево, полученное в результате анализа ВТС рНК гена с моделью GTR + G + I. АП значения более 70% приведены для соответствующих клад.

Консервативное выравнивание. МП метод позволил получить два дерева с наименьшими изменениями. 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 выявил парафилию Heteroderinae, тогда как анализ МЭ

дал неразрешенную политомию среди представителей Punctoderinae, группы Goettingiana и других клад Heteroderinae.

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

Таблица 1 – Параметры выравниваний и статистика для деревьев, полученных в исследовании

Н	ГО	ГЛ	Д	КИ	КП	ТЛ	ТН	CI	HI	RI	RC	g ¹
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 – количество постоянных признаков, ТЛ – длина дерева, ТН – количество деревьев; CI – индекс согласованности; HI – индекс гомоплазии; RI – индекс удержания .

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. cardiolata* и *H. bifenestra*. За исключением клады VI, пять основных клад внутри Heteroderinae были обнаружены почти во всех анализах. Несовпадение между топологиями обычно соответствовало самым слабым узлам в анализах МП и МЭ. Сравнение МЛ дерева, полученного из консервативного выравнивания, со всеми деревьями МП анализа, полученными из компьютерных выравниваний, с помощью КХ теста выявило статистически значимые различия для топологий на основе компьютерных выравниваний 5, 6 и 9. Полученное дерево МП из компьютерного выравнивания 7 было в основном идентично деревьям МП, 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 клада IV статус сестринских таксонов групп *Avenae* и *Sacchari* был сильно или умеренно поддержан во всех деревьях, кроме деревьев МП из выравнивания 8.

Проверка гипотез. Несколько гипотез, полученных на основании МЛ анализа консервативного и комбинированного выравниваний, были оценены с помощью КХ теста (Таблица 2). Топологии, ограничивающие *H. orientalis* (для проверки валидности 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* (проверка правомерности выделения рода *Bidera*) было приемлемым, только при консервативном выравнивании.

Таблица 2 – Результаты тестов альтернативных топологий для филогении цистообразующих нематод

	Комбинированное выравнивание				Консервативное выравнивание			
	лучшие log likelihood	Δ lnL	SD	P	лучшие log likelihood	Δ lnL	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*
<i>Avenae</i> группа + другие гетеродеры ^b	-127926.61973	258.87978	43.90586	<0.0001*	-9871.95430	23.44139	14.06753	0.0960
<i>Avenae</i> группа + <i>H. bifenestra</i> ^c	-129909.14946	2241.40950	89.34631	<0.0001*	-10029.07902	180.56610	23.99201	<0.0001*
<i>Sacchari</i> группа + <i>Cyperi</i> 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.

Влияние методов построения деревьев и процедур выравнивания на результат филогенетического анализа. Наше исследование с использованием ВТС рРНК данных о цистообразующих нематод ясно показывает, что возникновение и положение клад может варьироваться в зависимости от применяемых процедур. Например, хорошо поддерживаемая позиция группы *Cyperi* 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 положение *H. orientalis* было более чувствительно 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 к группе *Cyperi*.

Напротив, монофилия *Globodera* оказалась чувствительной к методу построения деревьев. Монофилия *Globodera* была обнаружена в большинстве МЭ деревьев, хотя деревья МЛ показали родственные отношения *G. artemisiae* с другими видами, относящимися к роду *Punctodera* или *Cactodera*.

Как и ожидалось, наше консервативное выравнивание, после исключения самых неоднозначных фрагментов в последовательностях, имело тенденцию снижать филогенетическое разрешение внутри групп. 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.

Влияние 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. Филогенетические исследования с использованием рРНК 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. Знание вторичной структуры РНК становится все более важным для филогенетического анализа. Во-первых, вторичная структура используется для идентификации гомологичных положений для наборов нуклеотидов и областей последовательностей, которые сложно определить с помощью алгоритмов множественного выравнивания. Во-вторых, вторичная структура может быть использована в качестве дополнительного источника данных, включающих как структурные, так и морфометрические параметры молекул рРНК. В-третьих, вторичная структура используется для выбора более подходящих моделей эволюции. Таким образом, знание вторичной структуры позволяет применять более сложную модель и, следовательно, генерировать картину отношений, которые считаются более реалистичными.

В этой работе мы реконструировали и исследовали вторичную структуру сегментов расширения ВТС2 рРНК молекулы 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 и 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 подход минимизации энергии и анализ сравнительной последовательности, мы реконструировали вторичную структуру ВТС2 для 29 видов цистообразующих нематод. Модели были организованы в четыре основные спирали, выходящие из центрального ядра. Реконструированные в нашем исследовании вторичные структуры для цистообразующих нематод отличались от реконструированных и депонированных в базе данных ВТС2 (Schultz *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 2005). Наши консенсусные структуры для групп *Humuli* и *Avenae* включали на 16 и 19% соответственно больше нуклеотидов в спиралях, чем соответствующие структуры, предложенные в работе (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 к реконструкции с использованием минимизации энергии.

Отношения между основными группами цистообразующих нематод не были четко выявлены для исходных и преобразованных данных. МП анализ конвертированных последовательностей показал, что количество информативных нуклеотидов было в 1,3 раза ниже, чем без конвертации, и это привело к изменению БС для некоторых взаимоотношений: к более высокой поддержке группы *Avenae* с *Sacchari* (53% – без конвертации, 79% – с конвертацией) и более низкой поддержки группы *Humuli* с *H. salixophila* (80% против 49%). Были также выявлены измененные позиции для *H. cyperi* и *H. cajani*, однако их отношения с другими нематодами остались неясными.

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

В настоящем исследовании мы предложили улучшенные модели ВТС2 рРНК молекулы для цистообразующих нематод рода *Heterodera*, используя несколько подходов и процедур оптимизации. Проблема выбора правильной модели для ВТС2 становится более сложной, чем с 18S и 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*. Наши данные для некоторых цистообразующих нематод также показывают, что молекула 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 модели BTC2, предложенные Wolf *et al.* (2005), могут содержать структурные элементы альтернативного складывания.

В наших исследованиях по нескольким группам тиленхидных 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 (Subbotin *et al.*, 2001; Tanha Maafi *et al.*, 2003; Madani *et al.*, 2004).

Группирование видов внутри подсемейства Heteroderinae. В течение долгого времени таксономисты подразделяли цистообразующих нематод из рода *Heterodera* на три группы, основанные на структурах вульварных конусов: группы Schachtii, Goettingiana и Avenae. Также были предложены три дополнительные, частично перекрывающиеся группы: Humuli, Fici-humuli и Latipons. В настоящее время мы выделяем следующие группы внутри рода *Heterodera*: Afenestrata, Avenae, Bifenestra, Cardiolata, Cyperi, Goettingiana, Humuli, Sacchari и Schachtii (Handoo, Subbotin, 2018).

Коэволюция цистообразующих нематод с растениями-хозяевами. 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, 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. Результаты молекулярно-филогенетического анализа показывают, что подсемейство Punctoderinae имеет несколько линий: i) наиболее базальная линия, *Betulodera*, имеющая хозяев из букоцветных (Fagales); ii) *Cactodera*, ассоциированная с гвоздикоцветными (Caryophyllales, сем. Amaranthaceae, Caryophyllaceae и Portulacaceae) и, возможно, сравнительно недавно с астроцветными и злаковыми (Asterales и Poales); iii) *Punctodera* и *Paradolichodera*, паразитирующие на злаковых (Poales); iv) *Globodera* ассоциированная с астроцветными и миртоцветными (Asterales и Myrtales); и v) *Globodera*, паразитирующая на паслёноцветных (Solanales).

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

В этом исследовании мы проанализировали филогенетические отношения внутри видов группы *Avenae* с использованием последовательности ВТС рРНК и COI генов и предложили гипотезы происхождения и распространения видов группы *Avenae*. Было проанализировано более чем 150 популяций нематод, собранных в 26 странах. В результате настоящих исследований было получено 220 новых последовательностей COI гена и 80 новых последовательностей ВТС рРНК гена для видов группы *Avenae*. Результаты нашей работы подробно изложены в нескольких публикациях (Subbotin *et al*, 1996, 1999, 2002, 2003, 2015, 2018).

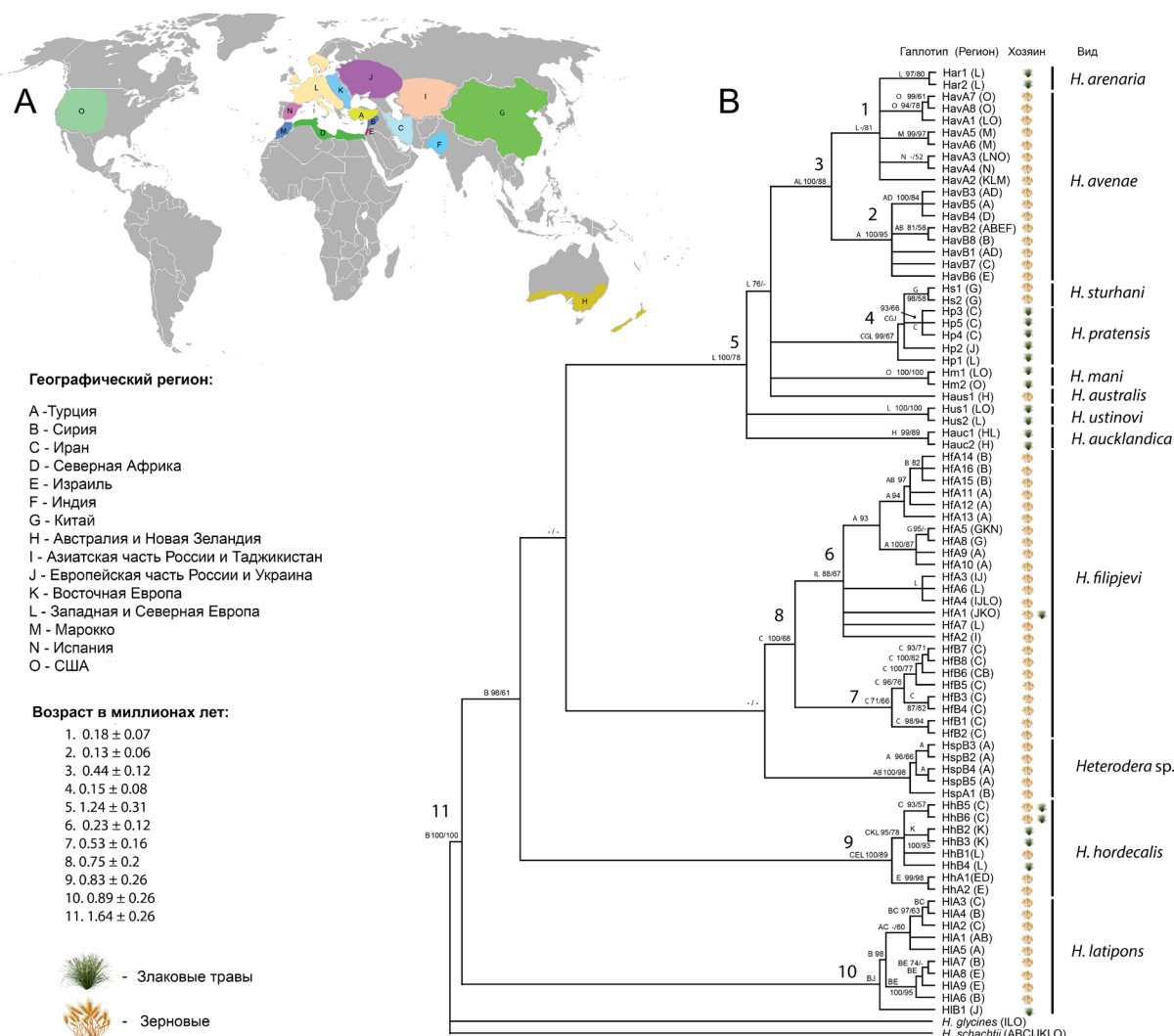


Рисунок 5. Филогенетические отношения между гаплотипами COI гена у видов группы *Avenae*, полученные с использованием Байесовского анализа с картированием регионов и растений-хозяев и указанием возраста для узлов на дереве. А: Карта мира с кодами регионов; Б: Филогенетическое дерево. Коды на дереве представляют наиболее вероятные анцестральные области. АП значения для БВ анализа и значения бутстрепа при МЛ анализе даны для соответствующих клад.

Филогения группы Avenae. Филогенетические взаимосвязи в пределах 11 валидных и одного предполагаемого нового вида группы Avenae, как это было выявлено в результате анализа последовательностей ВТС рРНК гена, показал, что комплекс видов *H. avenae* образовывал умеренную или сильно поддерживаемую кладу, тогда как *Heterodera latipons* и *Heterodera* sp. формировали базальную кладу на дереве. Филогенетическая сеть была реконструирована для более чем 600 ВТС рРНК-последовательностей.

Определение границ видов и ДНК-баркодирование. Результаты настоящего исследования показывают, что основные группы ДНК-последовательностей 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 COI генов (Рисунок 5) был способен дифференцировать все изученные виды группы.

Филогенетический анализ COI гена. В анализ были включены 82 последовательности *H. avenae* и шесть последовательностей *H. Arenaria*. Выявлено два типа гаплотипов для этих видов. Тип А включал восемь гаплотипов *H. avenae* (HavA1-HavA8) из Европы, Северной Америки и Северной Африки (Марокко). Тип В также включал восемь гаплотипов (HavB1-HavB8) из Азии и Северной Африки (Тунис, Египет). HavA1-HavA3 были наиболее распространенными гаплотипами в Европе и США, тогда как HavA5 и HavA6 были обнаружены только в Марокко. HavB2 был самым распространенным гаплотипом в Азии и Северной Африке. В Турции были обнаружены четыре гаплотипа: HavB1, HavB2, HavB3 и HavB5, три гаплотипа, HavB1, HavB3, HavB4, – в Тунисе, а также HavB2 и HavB8 – в Сирии (Рисунок 6А). Два гаплотипа (Har1 и Har2) *H. arenaria* отличались двумя изменениями друг от друга и от гаплотипа *H. avenae* HavA1 (Рисунок 6В).

Нами было проанализировано 75 последовательностей *H. filipjevi*. 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. Гаплотипы типа В были родственны с гаплотипом HfA2, найденным в Таджикистане и Башкортостане, Россия. HfA1 и HfA4 были наиболее распространенными гаплотипами в Центральной, Северной и Восточной Европе, в 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 из Турции.

Биогеография, происхождение и распространение видов группы Avenae. Важным результатом нашего исследования группы Avenae было описание глобальной структуры распределения видов и понимание того, как это распределение видов было достигнуто. Результаты нашего анализа и распределения гаплотипов показали, что Ирано-Анатолийская зона биоразнообразия, вероятно, является основным центром происхождения и

диверсификации группы *Avenae*. Наша оценка различий гаплотипов также указывает на то, что виды группы *Avenae* происходят из разных областей этой зоны и возникли во время плейстоцена. Самое раннее расхождение в группе *Avenae* оценивается в $1,64 \pm 0,26$ млн лет назад. Расхождение ветвей дерева далее разделялось на клады с *H. avenae* A и B – $0,44 \pm 0,12$ 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.

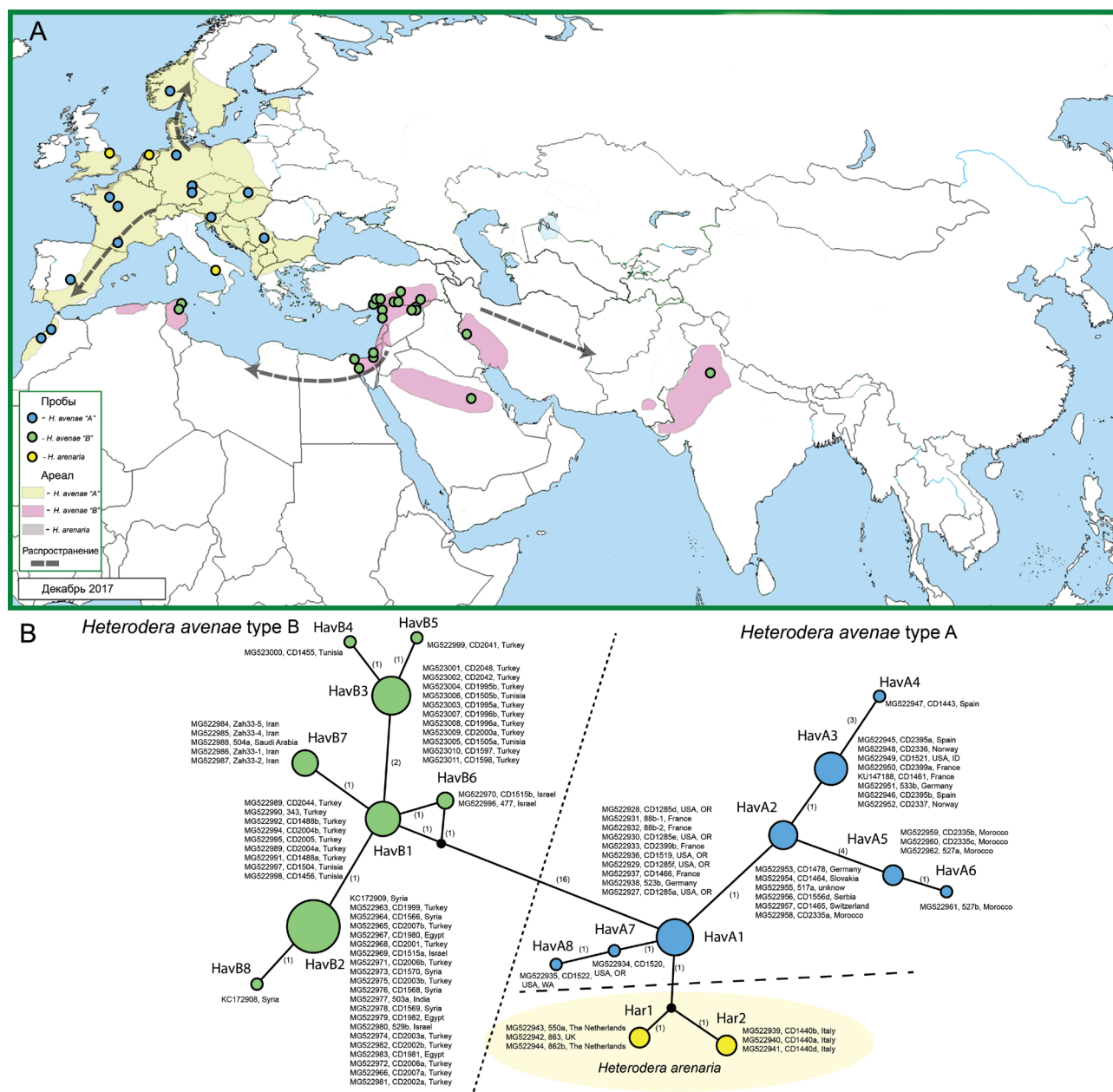


Рисунок 6. А: Карта распространения *Heterodera avenae* и *H. arenaria* с указанием изученных образцов и предполагаемых путей распространения; В: Сеть статистической парсимонии, показывающая филогенетические связи между гаплотипами COI *H. avenae* и *H. arenaria*. Маленькие черные круги представляют собой отсутствующие гаплотипы. Размеры кругов пропорциональны количеству образцов с определенным гаплотипом.

Иранско-Анатолийская зона биоразнообразия состоит из горных и межгорных регионов, которые могли бы иметь решающее значение для долгосрочного выживания и способности к накоплению генетического разнообразия видов группы *Avena*. Два основных региона в Ирано-Анатолийской зоне биоразнообразия предложены 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 ВТС и СОІ гаплотипов в настоящее время регистрируется из Турции и Сирии. Этот вид занимает базальное положение в группе *Avena* и может считаться самым древним в этой группе. Из Анатолии вид *H. latipons*, вероятно, распространился по разным направлениям в Европу, Сирию, Иорданию, Израиль, 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 его многообразия. Другая эволюционная линия, *H. avenae* типа А, диверсифицировалась и распространилась по всей Европе, добравшись до Марокко через Пиренейский полуостров, и колонизировала Северную Африку во время голоцена. Интересно отметить, что не отмечено перекрывание ареалов 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 долгосрочных барьеров, препятствующих генетическому обмену в этом регионе. Гаплотипы из Ирана родственно связаны с восточными, центральными и среднеазиатскими, а не с турецкими гаплотипами, что может указывать на наличие экологических барьеров для распространения. Так называемая Анатолийская диагональ служит значительным экологическим или геофизическим барьером для распределения многих организмов и действует как эффективный барьер для разграничения потока генов между западным и восточным регионами Анатолии. Анатолийская диагональ, возможно, также служит барьером для *H. avenae* типа В, предотвращая его распространение в западные регионы Анатолии из Ирана. Луговая цистообразующая нематода *H. pratensis*, вероятно, также возникла в Иране и сравнительно недавно

распространилась по Голарктике. Иран также является возможным местом для возникновения ячменной нематоды, *H. hordecalis*. Этот вид, вероятно, колонизировал Европу по двум разным маршрутам: один – из Азии, другой – из Северной Африки.

Картины распространения гаплотипов для *H. filipjevi* и *H. avenae* типа А, паразитирующих на зерновых, и *H. mani* и *H. ustinovi*, паразитирующих на травах, оказались очень похожи в Европе и в Северной Америке. Это сходство позволяет рассматривать наиболее вероятные сценарии распространения, связанные с дальними и трансатлантическими расселениями этих видов из Западной и Северной Европы в Северную Америку после окончания последнего оледенения через Атлантический океан. Распространение этих видов в Северной Америке происходило не в результате заноса во время колонизации этого континента человеком и недавней сельскохозяйственной деятельности, а в результате более древних и стихийных событий расселения, которые, вероятно, происходили в разное время. Отсутствие каких-либо уникальных гаплотипов COI для *H. filipjevi* в Северной Америке и наличие таковых для *H. avenae* может указывать на то, что *H. avenae* расселилась на этом континенте ранее, чем *H. filipjevi*.

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*, *H. avenae* и других видов группы *Avenae*.

ГЛАВА 9. ДНК-БАРКОДИРОВАНИЕ, ФИЛОГЕНИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ ВИДОВ ЦИСТООБРАЗУЮЩИХ НЕМАТОД ИЗ РОДА *GLOBODERA*

В этой главе подробно представлен анализ филогенетических взаимоотношений и приводятся результаты изучения генетического разнообразия видов и популяций *Globodera* с использованием последовательностей ВТС рРНК, COI и *cytb*. Результаты этой работы подробно описаны в статье (Subbotin *et al.*, 2020). Из 13 валидных видов, принадлежащих к роду *Globodera*, нами были изучены 11 видов. Всего было получено 205 новых генных последовательностей COI, 116 *cytb* и 56 ВТС рРНК из более чем 148 популяций, собранных в 23 странах.

Результаты настоящего исследования показали, что ВТС рРНК, COI и *cytb* гены способны дифференцировать друг от друга 11 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*. Проведенный анализ генов не дает доказательств того, что какие-либо неописанные виды присутствуют среди изученных образцов *G. pallida*.

Характер кластеризации ВТС рРНК, COI и *cytb* генов для *G. pallida* и *G. rostochiensis* указывает на возможные события рекомбинации и селективной интрогрессии у некоторых популяций. Настоящий анализ с использованием COI гена выявил внутривидовую структуру у *G. tabacum*, но не позволил однозначно дифференцировать подвиды.

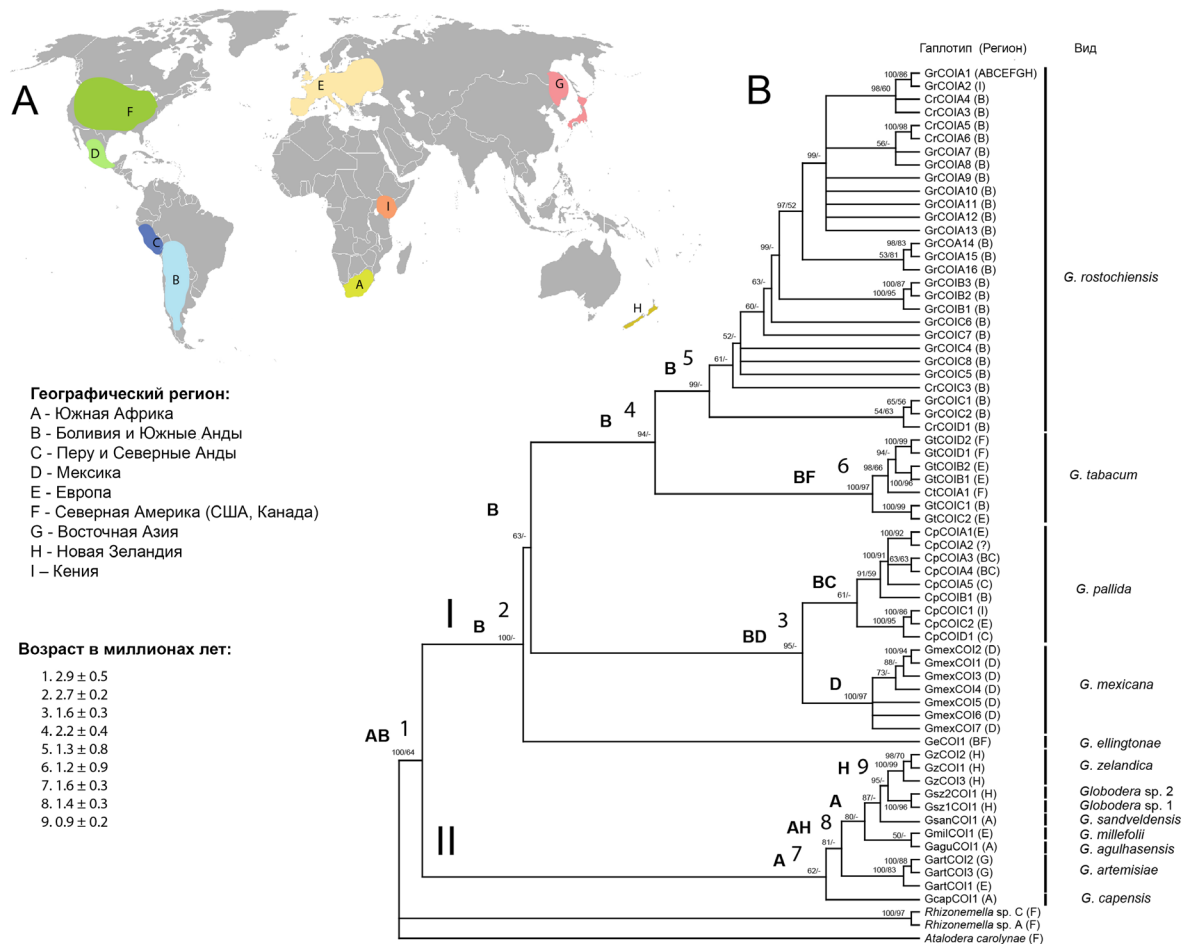


Рисунок 7. Филогенетические взаимоотношения между гаплотипами COI гена для видов *Globodera*, полученные в результате БВ анализа, с картированием анцестральных областей и указанием возраста узлов. А: Карта мира с регионами, где виды *Globodera* естественным образом распространены или имеют уникальные гаплотипы; В: Филогенетическое дерево. Коды на дереве представляют наиболее вероятные анцестральные области. АП значения для БВ анализа и значения бутстрэпа для МЛ анализа даны для соответствующих клад.

Филогения рода *Globodera*. Филогения этого рода, реконструированная на основе анализа гена COI (Рисунок 7), в основном совпадает с филогенией ВТС рРНК гена. Род *Globodera* разделяется на две основные клады: 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 клада подразделяется на две подклады: первая включает *G. pallida* и *G. mexicana*, вторая включает *G. rostochiensis*, *G. tabacum* и *G. ellingtonae*. Вторая основная

клада состоит из трех подклад: i) *G. capensis* из Южной Африки, занимающий базальную позицию, ii) *G. zelandica* и два неописанных вида, собранных с неизвестных растений в Новой Зеландии, iii) виды *G. artemisiae*, *G. millefolii* из Европы и Азии, *G. agulhasensis* из Южной Африки, а также *G. sandveldensis* из Южной Африки и один неописанный вид из Португалии.

Филогенетический анализ последовательностей ВТС рРНК гена. Всего проанализированы 353 последовательности ВТС рРНК гена. Филогенетическая сеть позволила 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%.

Филогенетический анализ последовательностей COI гена. Два подхода были применены для анализа последовательностей COI генов видов *Globodera*. Первый подход включал в себя анализ БВ и МП выравнивания COI генов, содержащего только эталонные последовательности видов, тогда как второй подход включал анализ СП выравниваний последовательностей COI для *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *G. mexicana* и *G. tabacum*. Максимальная дивергенция генной последовательности COI для видов *Globodera*, паразитирующих на пасленовых, составляла 25,7%. Всего было выявлено 29 гаплотипов *G. rostochiensis*. 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. 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. Нами было проанализировано 43 последовательности *G. pallida*. Всего было выявлено 9 гаплотипов, они были разделены на четыре группы: А, В, С и D. Группа А содержала 5 гаплотипов (CrCOIA1-CrCOIA5). Гаплотип CrCOIA1 был зарегистрирован в нескольких европейских странах и США. Гаплотипы CrCOIA3-CrCOIA5 и гаплотипы из групп В и D были обнаружены в Южной Америке.

Филогенетический анализ последовательностей гена *cytb*. Всего в исследование было включено 164 последовательности *cytb* гена. Максимальная дивергенция последовательности гена *cytb* для видов *Globodera* пасленовых составила 26,3%. Всего было проанализировано 58 последовательностей *G. rostochiensis*. 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 (Рисунок 8). Всего было проанализировано 85 последовательностей *Globodera pallida*. В большинстве популяций был

обнаружен только один гаплотип, однако две популяции содержали два гаплотипа, одна популяция содержала три гаплотипа. Тридцать два гаплотипа были разделены на семь групп: A, B, C, D, E, F и G.

Происхождение и филогеография рода *Globodera*. Нами были предложены и проверены три 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 род *Globodera* происходит с территории суперконтинента Гондваны. Анализ молекулярных часов, проведенный в настоящем исследовании, позволил предположить относительно недавнее происхождение рода *Globodera* – 3 млн лет назад или немного позже. Таким образом, наш анализ не поддерживает гипотезу о происхождении этих нематод из западной Гондваны и указывает на относительно недавние события распространения нематод на большие расстояния от основного центра происхождения.

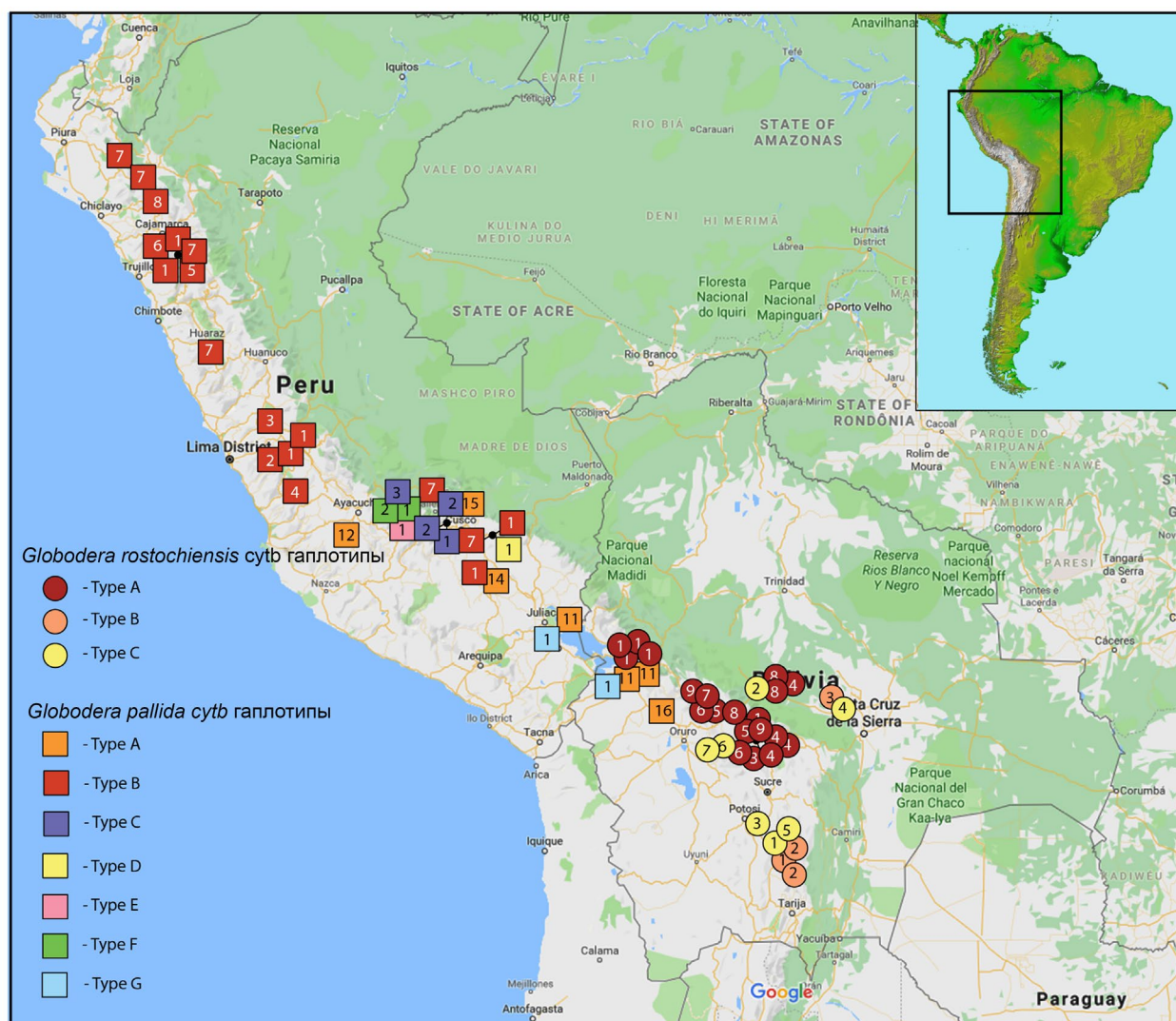


Рисунок 8. Карта Анд с распределением гаплотипов *cytb* для *Globodera rostochiensis* и *G. pallida*, полученных из оригинальных образцов и наборов данных, опубликованных Picard *et al.* (2007) и Plantard *et al.* (2008).

Несколько лет назад нами было выдвинуто предположение, что центр происхождения, диверсификации и видообразования в основных кладах и подкладах *Globodera* происходил в горных районах (Subbotin *et al.*, 2011, 2016). Известно, что основной центр диверсификации *Globodera*, паразитирующих на пасленовых растениях, находится в горном массиве Анд, который известен как один из самых разнообразных в биологическом отношении регионов на Земле, откуда также произошли многие растения пасленовых. Этот регион является одной из тридцати шести горячих зон биоразнообразия (Тропические Анды).

Виды *Globodera*, принадлежащие ко второй главной кладе, имеют по крайней мере два центра диверсификации: i) горы Западного Кейпа в Южной Африке (Капский флористический регион) и ii) горы Северного и Южного островов в Новой Зеландии. Андский регион, Кейп и австралийский регион с Новой Зеландией относятся к так называемому Австралийскому царству. 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 с использованием программы 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 имеющихся в данный момент данных. Метод анализа с использованием молекулярных часов показал, что расхождение между пасленовыми и непасленовыми линиями произошло примерно $2,9 \pm 0,5$ млн лет назад (Рисунок 7).

Происхождение и популяционная структура картофельных нематод в Андах. 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. Перуанские и Боливийские Анды были признаны как центр происхождения картофельных цистообразующих нематод. 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. Наше настоящее исследование с использованием молекулярного анализа подтвердило эту картину распределения двух видов картофельных нематод. Это место также соответствует географическому барьеру, играющему роль в изоляции и диверсификации некоторых эндемичных организмов в тропических Андах в период между последним миоценом и плейстоценом.

Анализ распределения гаплотипов мтДНК генов предполагает два центра происхождения картофельных нематод: один – для *G. pallida*, другой – для

G. rostochiensis. Центр происхождения *G. pallida*, вероятно, находится на юге Перу между Куско и озером Титикака. По результатам анализа *cytb* гена четко прослеживается характер уменьшения генетической изменчивости с юга на север. Мы также предположили, что центром происхождения *G. rostochiensis* может быть местонахождение на юге Боливии или северо-западе Аргентины. Филогеографический анализ имеющихся в настоящее время данных позволяет предположить, что Южные Анды, включая северо-западную Аргентину, действительно могут считаться другим более древним центром происхождения для *G. rostochiensis*, *G. ellingtonae* и *G. tabacum*. Гаплотипы COI *G. rostochiensis*, обнаруженные в южной Боливии, занимали базальные линии на филогенетическом дереве. У этого вида наблюдалась также тенденция к снижению генетической изменчивости популяций с юга на север. Все это согласуется с предположением о том, что подъем Анд начинался с юга на север. В 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.

Происхождение и распространение европейских и североамериканских популяций картофельных нематод. Появление картофельных нематод в странах Европы, Азии и в Северной Америке было результатом распространения местных популяций из Анд вместе с семенным картофелем. Молекулярные исследования с использованием различных маркеров выявили их сложную эволюционную историю (Рисунок 8). Наш анализ последовательностей генов *cytb* *G. pallida* подтвердил, что источник всех европейских популяций *G. pallida* был единым, и расположен он между северным берегом озера Титикака и Куско на юге Перу. В настоящем исследовании мы представили доказательства высокого уровня разнообразия гаплотипов и сложной внутривидовой структуры для *G. rostochiensis* в Боливии. *Globodera rostochiensis* из Европы, Северной Америки и другие широко распространенные в мире популяции этого вида относятся к одной группе COI и *cytb* гаплотипов. Эти гаплотипы идентичны тем, которые встречаются в основном в боливийском департаменте Ла-Пас, расположенном на западной границе между Боливией и Перу и проходящей по озеру Титикака. Таким образом, мы полагаем, что вид *G. rostochiensis* был завезен из этого места в другие регионы мира также с семенным картофелем.

Анализ последовательностей *cytb* и COI генов показал, что *G. pallida* и *G. mexicana* являются близкородственными видами с датой расхождения 1,6 млн назад. *Globodera mexicana*, паразитирующая на диких пасленовых растениях, вероятно, возникла и диверсифицировалась в Мексике после того, как ее предковая форма была занесена в этот регион из Анд. Наши результаты показывают, что наблюдаемое генетическое разнообразие популяций *G. mexicana* также может быть связано с зонами локальной топографической сложности. Мексику пересекают крупные горные системы, относящиеся к

различным геологическим провинциям, сильно различающимся по возрасту. Эти горы являются важными точками биоразнообразия и эндемизма.

ГЛАВА 10. ФИЛОГЕНИЯ ГАЛЛОВЫХ НЕМАТОД И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *MELOIDOGYNE NATALIEI*

В этой главе приводятся результаты построения филогении галловых нематод с использованием мультигенного набора данных и молекулярного анализа Мичиганской виноградной галловой нематоды *M. nataliei*.

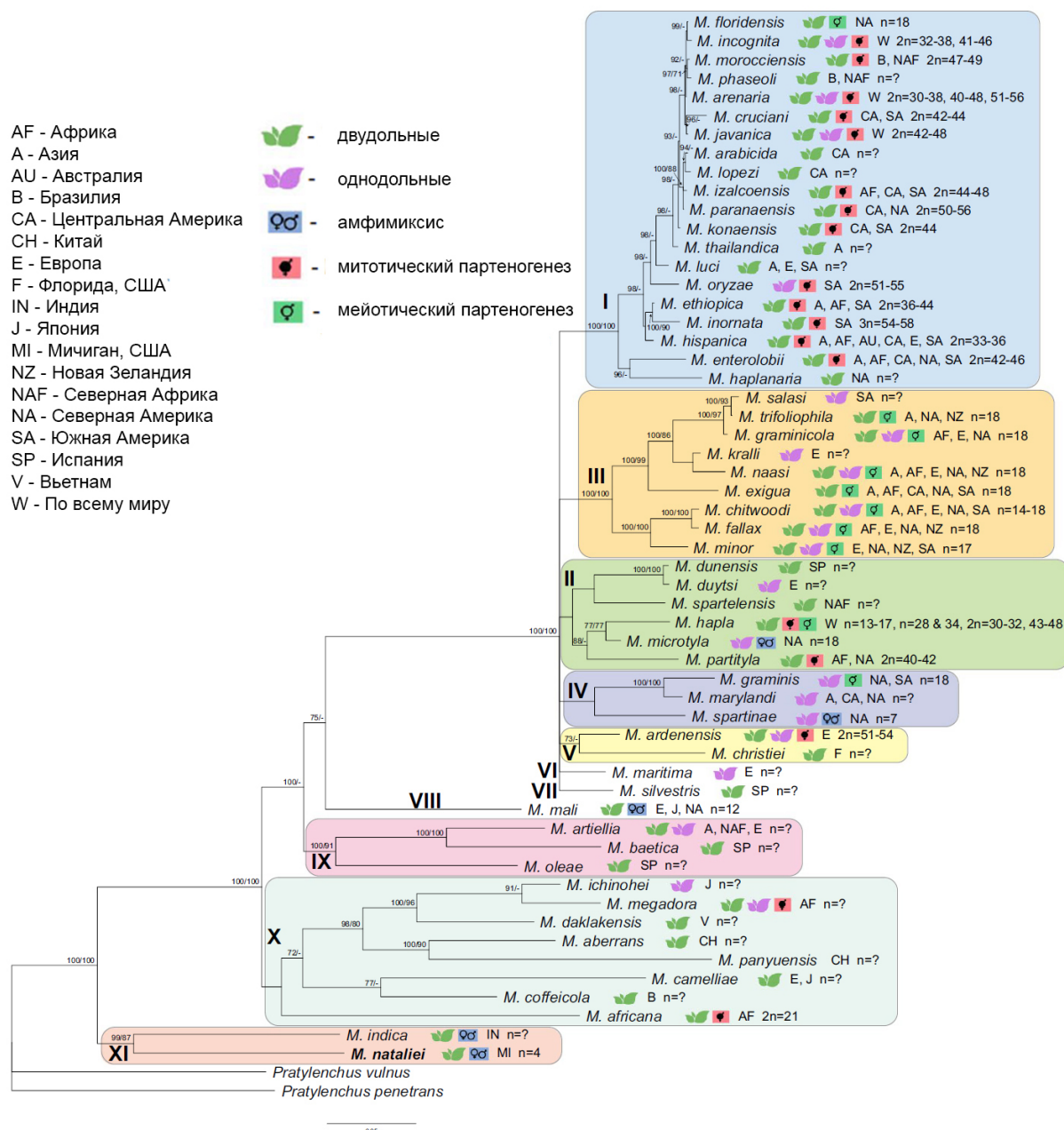


Рисунок 9. Филогенетические взаимоотношения между видами рода *Meloidogyne*, полученные в результате БВ анализа комбинированного выравнивания 18S рРНК, BTC1 рРНК, D2-D3 28S рРНК, COI и COII-16S рРНК генов. АП значения для БВ анализа и значения бутстрепа для МЛ анализа даны для соответствующих клад.

Для филогенетического анализа были использованы эталонные последовательности пяти генов (18S рРНК, D2-D3 28S рРНК, ВТС рРНК, мтДНК COI и фрагмент между COII и 16S) для 56 валидных видов *Meloidogyne* из Генного банка и полученные в результате наших исследований. Эти генные фрагменты были проанализированы отдельно и в комбинированном выравнивании (4022 п.н.). Галловые нематоды были распределены по одиннадцати кладам, семь из которых составляли суперкладу, содержащую 75% изученных видов (Рисунок 9).

Meloidogyne nataliei оказалась близкородственна с *M. indica*. Эти два вида сохранили некоторые анцестральные признаки и представляли собой ранее обособившуюся ветвь галловых нематод. Таким образом, наши результаты отвергают гипотезу Goldstein и Triantaphyllou (1986), о том, что *M. nataliei*, возможно, не относится к роду *Meloidogyne*. Наши данные подтверждают гипотезу Triantaphyllou (1985, 1987) о том, что амфимиктические виды *Meloidogyne* с низким количеством хромосом являются анцестральными видами, из которых впоследствии развились митотические партеногенетические виды галловых.

Увеличение видового многообразия у галловых нематод было сопряжено с дупликацией генома и полиплоидизацией, а также с возможной гибридизацией видов. Сдвиг в репродуктивном режиме от амфимиксиса к партеногенезу, наряду с развитием широкой полифагии, совпадает с быстрой диверсификацией, широким распространением рода *Meloidogyne*, возрастающим значением этих нематод как паразитов сельскохозяйственных культур.

Глава 11. Быстрая и высокочувствительная диагностика галловых нематод с использованием метода рекомбиназной полимеразной амплификации

Рекомбиназная полимерная амплификация (РПА) представляет собой альтернативу ПЦР. РПА использует высокоэффективную вытесняющую полимеразу, которая быстро амплифицирует ДНК при постоянной температуре (37-42°C). В этой главе описана процедура тестирования РПА с использованием видоспецифичных праймеров и проб для диагностики двух видов экономически важных нематод: *M. enterolobii* и *M. hapla* с диагностикой ампликона на агарозном геле, с пробами, позволяющими детектировать флуоресценции в реальном времени, и с помощью иммунострипов (Рисунок 10). Исследование включало три этапа: i) тестирование и отбор комбинаций праймеров; ii) проверка чувствительности и специфичности в реальном времени и с помощью иммунострипов; iii) практическая оценка РПА теста с полевыми образцами. Для исследований использовали экстракты нематод без специального выделения ДНК.

Результаты РПА-анализов с использованием детектирования флуоресценции в реальном времени в серии неочищенных экстрактов нематод

показали надежное обнаружение через 13-20 мин с чувствительностью 1/100 личинки и до 1/1000 самки в пробирках с реакционной смесью для *M. hapla* и с чувствительностью 1/10 личинки и 1/50 самки для *M. enterolobii*. Обнаружение было также подтверждено в присутствии неочищенного экстракта других видов нематод и из экстрактов пораженных нематодой корней. Результаты теста РПАС помощью иммунострипов показали надежное обнаружение *M. hapla* в течение 30 минут с чувствительностью 1/10 личинки и 1/1000 самки. Метод РПА имеет большой потенциал для применения в программах тестирования фитонематод в диагностических лабораториях.

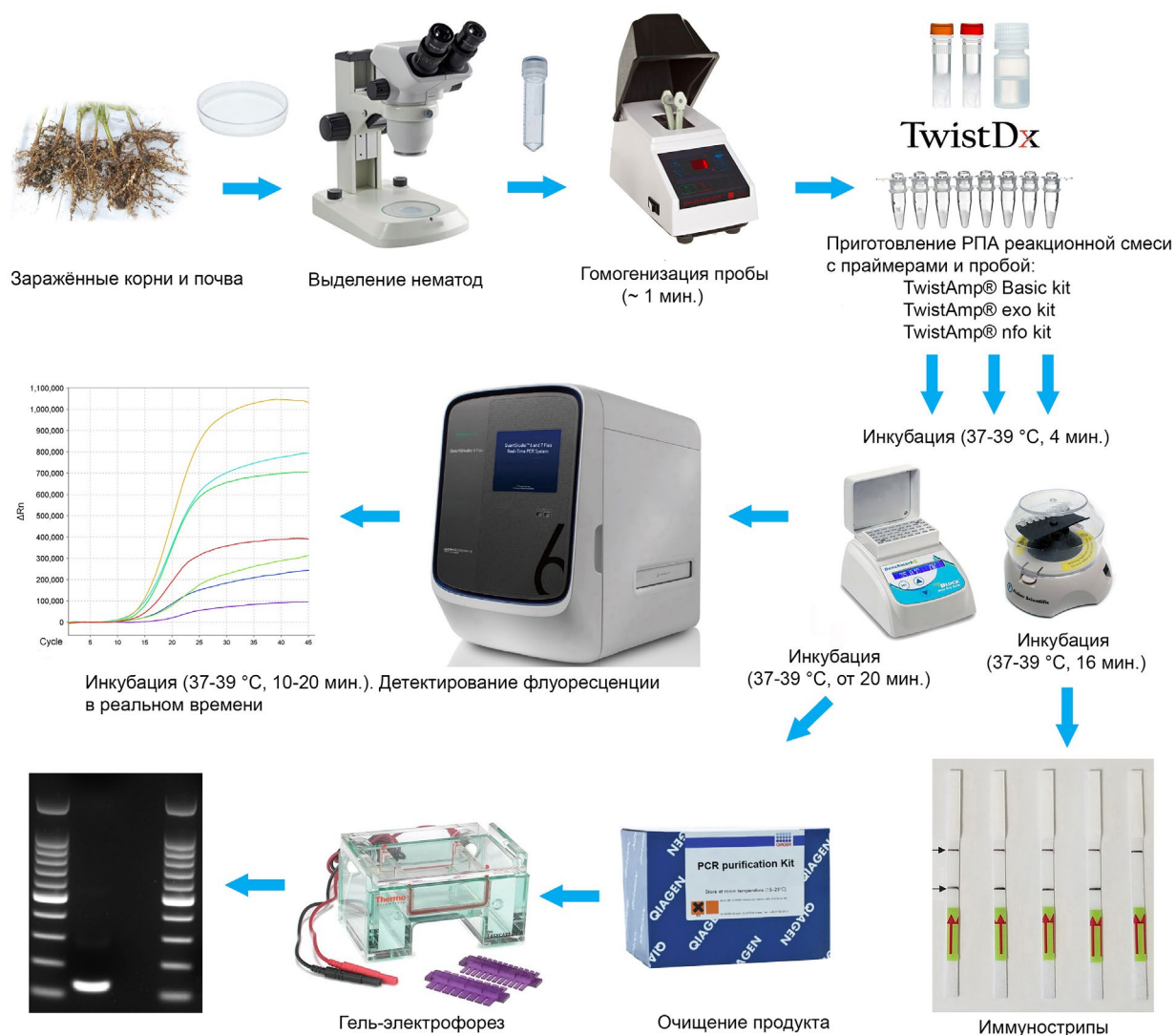


Рисунок 10. Процесс диагностики галловых нематод с использованием наборов китов TwistAmp® (TwistDx, Кембридж, Великобритания) в наших исследованиях.

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

Основными задачами настоящего исследования была молекулярная характеристика известных видов рода *Tylenchulus*: *T. semipenetrans*, *T. graminis*,

T. furcus, *T. palustris* и нового вида *T. musicola*, выделенного из корней банана в Иране, с использованием ВТС рРНК и D2-D3 фрагмента 28S рРНК генов. Выравнивание последовательности гена ВТС рРНК содержало 61 последовательность *Tylenchulus*, 21 из которых были новыми. *Tylenchulus musicola* сформировал высоко поддерживаемую кладу (АП=100%) с цитрусовой нематодой *T. semipenetrans*. Филогенетические анализы не выявили каких-либо группировок среди изолятов *T. semipenetrans* по их ареалу или растению-хозяину. Нами были получены ПЦР-ВТС-ПДРФ профили для пяти видов *Tylenchulus* и *Trophotylenchulus floridensis* с использованием четырех рестриктаз (*AvaI*, *BseNI*, *BsuRI*, *Hin6I*) рестрикции, которые генерируют несложные профили и позволяют ясно идентифицировать *T. semipenetrans* от других видов. Видоспецифичные праймеры были разработаны для каждого вида *Tylenchulus* на основе различий в последовательностях ВТС рРНК генов. Все эти комбинации праймеров были успешно протестированы в мультиплексной ПЦР. Тестирование специфического праймера для *T. semipenetrans* показало, что метод ПЦР может обнаружить одну личинку в образце.

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

Для подробного анализа и выявления филогенетической позиции этой группы седентарных нематод были молекулярно охарактеризованы несколько видов рода *Meloidoderita*: *M. kirjanovae*, *M. polygoni*, *M. whittoni*, несколько популяций *Sphaeronema alni* и два неопределенных вида из этого семейства. Результаты этой работы подробно изложены в наших статьях (Vovlas *et al.*, 2006; Palomares-Rius *et al.*, 2010; Troccoli *et al.*, 2017). Во время обследования нематод, проведенного во Флориде, *Tumiota whittoni* была обнаружена на дереве сладкой камеди в типовом месте обитания этого вида. Результаты нашего молекулярного исследования показали, что *T. whittoni* относится не к роду *Tumiota* или *Sphaeronema*, как ранее предполагалось, а к роду *Meloidoderita*. Наше исследование выявило наличие сфероидных цист с яйцами и личинками у этого вида. Филогенетические взаимоотношения в пределах видов *Sphaeronematidae* и некоторых других исследованных видов *Criconematina*, представляющих разные роды, были проанализированы с последовательностями генов 18S рРНК, 28S рРНК и ВТС рРНК. Наши исследования показали, что представители сферонематид формируют отдельную и базальную кладу в подотряде *Criconematina*.

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 Criconematina. 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 клады 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 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*, и 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 ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования

1. **Subbotin, S.A.**, Kim, D. Molecular characterisation and phylogenetic relationships of sedentary nematodes of the genus *Meloinema* Choi & Geraert, 1974 (Nematoda: Tylenchida) // *Nematology*. – 2021 – V.23. - P. 507-515.
2. 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*. – 2021. – V.23. – P. 1-14.
3. **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.
4. **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.
5. 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.
6. **Subbotin S.A.** Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* // *Nematology*, – 2019. – V. 21. – P. 243-251.
7. 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.
8. **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.
9. **Subbotin S.A.**, Toumi F., Elekcioglu I.H., Waeyenberge L., Tanha Maafi Z. DNA barcoding, phylogeny and phylogeography of the cyst nematode species of the *Avenae* group from the genus *Heterodera* (Tylenchida: Heteroderidae) // *Nematology*. – 2018. – V. 20. – P. 671-702.

10. 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.
11. **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.
12. 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.
13. 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.
14. **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.
15. 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.
16. 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.
17. 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 Hexatyline // *Russian Journal of Nematology*. – 2012. – V. 20. – P. 141-155.
18. McClure M., 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.
19. 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.
20. 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.

21. Gibson T., Farrugia D., Barrett J., Chitwood D., Rowe J., **Subbotin S.A.**, Downton M. The mitochondrial genome of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* // *Genome*. – 2011. – V. 54. – P. 565-574.
22. **Subbotin S.A.**, Cid Del Prado Vera I., Mundo-Ocampo M., Baldwin J.G. Identification, phylogeny and phylogeography of circumfenestrate cyst nematodes (Nematoda: Heteroderidae) as inferred from analysis of ITS-rDNA // *Nematology*. – 2011. – V. 13. – P. 805-824.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. **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.
30. 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.
31. **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.

32. **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.
33. 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.
34. **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.
35. 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.
36. **Subbotin S.A.**, Sturhan D., Rumpenhorst H.J., Moens M. Molecular and morphological characterisation of the *Heterodera avenae* complex species (Tylenchida: Heteroderidae) // *Nematology*. – 2003. – V. 5. – P. 515-538.
37. 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.
38. 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*. – 2003. – V. 93. – P. 1093-1102.
39. **Subbotin S.A.**, Rumpenhorst 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.
40. 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.
41. **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.
42. **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.
43. 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.
44. Amiri S., **Subbotin S.A.**, Moens M. An efficient method for identification of the *Heterodera schachtii sensu stricto* group using PCR with specific primers // *Nematologia mediterranea*. – 2001. – V. 29. – P. 241-246.
45. **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.
46. **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.
47. Gabler C., Sturhan D., **Subbotin S.A.**, Rumpenhorst 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.
48. **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.
49. **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.
50. **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.
51. **Subbotin S.A.**, Rumpenhorst 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.

Главы в коллективных монографиях:

52. **Subbotin S.A.** Phylogenetic analysis of DNA sequence data // In: Perry, R.N., Hunt, D.J. & Subbotin, S.A. (eds) / *Techniques for Work with Plant and Soil Nematodes* - CAB International, UK, 2021a. - P. 265-282.
53. **Subbotin S.A.** Molecular identification of nematodes using the Polymerase Chain Reaction (PCR) // In: Perry, R.N., Hunt, D.J. & Subbotin, S.A. (eds) / *Techniques for Work with Plant and Soil Nematodes* - CAB International, UK, 2021a. - P. 218-239.
54. **Subbotin S.A.**, Skantar A.M. Molecular taxonomy and phylogeny // In: Perry R.N., Moens M., Jones J.T. (eds) / *Cyst Nematodes* - CAB International, UK, 2018. – P. 398-417.
55. Hallmann J., **Subbotin S.A.** Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes // In: Sikora R.A., Coyne D.L., Hallmann J., Timper P., (eds) / *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture* - 3rd Edition. CABI, UK. 2018. - P. 87–119.

56. Handoo Z.A., **Subbotin S.A.** Taxonomy, identification and principal species // In: Perry R.N., Moens M., Jones J.T. (eds) / *Cyst Nematodes* - CAB International, UK, 2018. – P 365-397.
57. **Subbotin S.A.**, Waeyenberge L., Moens M. Molecular systematics // In: Perry R.N. & Moens M. (eds) / *Plant Nematology* - CABI, UK. 2013. – P. 41-72.
58. Turner S.J., **Subbotin S.A.** Cyst nematodes // In: Perry R.N. & Moens M. (eds) / *Plant Nematology* - CABI, UK. 2013. – P. 110-143.
59. **Subbotin S.A.** Order Tylenchida Thorne, 1949 // In: Schmidt-Rhaesa A., (ed). / *Handbook of Zoology. Nematoda* - De Gruyter, Germany. 2013. – P. 613–636.
60. **Subbotin S.A.**, Franco J. Cyst nematodes // In: Manzanilla-Lopez R.H. & Marban-Mendoza N. (eds) / *Practical Plant Nematology* - Colegio de Postgraduados and Mundi-Prensa, Biblioteca Básica de Agricultura. 2012. – P. 299-357.
61. Perry R.N., **Subbotin S.A.**, Moens M. Molecular diagnostics of plant-parasitic nematodes // In: Punja Z.K., Boer S.H. de, Sanfaçon H. (eds) / *Biotechnology and Plant Disease Management* - CABI, UK, 2007 - P. 185-226.
62. **Субботин С.А.** Использование ПЦР для определения нематод // В книге: Зиновьева С.В. и др. (Редакторы) / *Прикладная нематология* - Наука, Россия, 2006. – С. 228-252.
63. Hooper D.J., Hallmann J., **Subbotin S.A.** Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes // In: Luc M., Sikora R.A., Bridge J. (eds) / *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture* - Second Edition. CABI, UK, 2005. – P. 53-86.
64. **Субботин С.А.** Молекулярная филогения фитопаразитических нематод // В книге: Сонин М.Д. (Редактор) / *Паразитические нематоды растений и насекомых* - Москва, Наука. 2004. – С. 201-215.

Монографии:

65. **Subbotin S.A.**, Mundo-Ocampo M., Baldwin J.G. Systematics of Cyst Nematodes (Nematoda: Heteroderinae) // In: *Nematology Monographs and Perspectives*, Volume 8A / Series Editors: Hunt, D.J. & Perry, R.N./ Leiden, The Netherlands, Brill, 2010 – P. 1- 351.
66. **Subbotin S.A.**, Mundo-Ocampo M., Baldwin J.G. Systematics of Cyst Nematodes (Nematoda: Heteroderinae) // In: *Nematology Monographs and Perspectives*, Volume 8B / Series Editors: Hunt, D.J. & Perry, R.N./ Leiden, The Netherlands, Brill, 2010. – P. 1-512.