

*На правах рукописи*

Шеховцов Сергей Викторович

Генетическая изменчивость дождевых червей России  
и ее отражение в морфологии, филогении и филогеографии

1.5.12. – зоология

1.5.7. – генетика

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научный консультант:  
доктор биологических наук, профессор  
Берман Даниил Иосифович

Москва

2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. Обзор литературы.....	19
1.1 История изучения биоразнообразия дождевых червей России .....	19
1.2 Общая характеристика фауны дождевых червей России .....	23
1.3 Морфологические основы систематики дождевых червей .....	27
1.4 Молекулярно-генетические методы в филогении и филогеографии дождевых червей .....	31
1.4.1 Генетическая изменчивость.....	31
1.4.2 Популяционная генетика и филогеография дождевых червей .....	34
1.4.3 Секвенирование транскриптомов дождевых червей.....	36
1.4.4 Анализ RADSeq.....	39
1.5 Исследованные виды дождевых червей .....	43
1.5.1 <i>Eisenia nordenskioldi</i> .....	43
1.5.2 <i>Dendrobaena schmidti</i> .....	48
1.5.3 <i>Perelia diplotetratheca</i> .....	49
1.5.4 <i>Drawida ghilarovi</i> .....	50
1.5.5 Комплекс <i>Aporrectodea caliginosa</i> .....	51
1.5.6 <i>Aporrectodea rosea</i> .....	54
1.5.7 <i>Octolasion tyrtaeum</i> .....	56
1.5.8 <i>Dendrodrilus rubidus</i> .....	57
1.5.9 <i>Lumbricus rubellus</i> .....	59
1.5.10 Сравнительная характеристика изучаемых видов.....	61
1.6 Холодостойкость дождевых червей и ее биохимические основы .....	63

1.6.1 Холодостойкость филогенетических линий <i>E. nordenskioldi</i> .....	63
1.6.2 Биохимические основы устойчивости дождевых червей к замораживанию .....	64
Глава 2. Методы исследования .....	69
2.1 Выделение ДНК .....	69
2.1.1 Выделение высокомолекулярной ДНК фенольным методом.....	69
2.1.2 Выделение ДНК на колонках .....	69
2.1.3 Выделение плазмидной ДНК.....	70
2.2 Выделение РНК .....	71
2.2.1. Выделение РНК реагентом Trizol.....	71
2.2.2. Выделение РНК набором фирмы Vioblabmix .....	71
2.3 Полимеразная цепная реакция.....	72
2.3.1 <i>Eisenia nordenskioldi</i> .....	72
2.3.2 <i>Dendrobaena schmidtii</i> .....	73
2.3.3 <i>Drawida ghilarovi</i> .....	73
2.3.4 <i>Aporrectodea caliginosa</i> .....	74
2.3.5. <i>Aporrectodea rosea</i> .....	74
2.3.6. <i>Octolasion tyrtaeum</i> .....	74
2.3.7. <i>Lumbricus rubellus</i> , <i>Dendrodrilus rubidus</i> и <i>Dendrobaena octaedra</i> .....	75
2.4 Секвенирование транскриптомов.....	75
2.4.1 <i>Eisenia nordenskioldi</i> .....	75
2.4.2 <i>Drawida ghilarovi</i> .....	77
2.5 Анализ RADSeq.....	79
2.6 Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозных гелях .....	80
2.7 Подготовка компетентных клеток <i>E. coli</i> для электропорации.....	81
2.8 Трансформация <i>E. coli</i> плазмидной ДНК .....	81

2.9 Селекция <i>E. coli</i> на наличие плазмиды со вставкой при помощи бета-галактозидазной системы .....	81
2.10 Элюция ДНК из агарозного геля .....	82
2.11 Определение размера генома при помощи проточной цитофотометрии ....	82
2.12 Анализ метаболитов при помощи $^1\text{H}$ ядерного магнитного резонанса.....	83
2.13 Биоинформатический анализ .....	85
Глава 3. Комплекс <i>Eisenia nordenskioldi</i> .....	87
3.1 Открытие филогенетических линий у <i>E. nordenskioldi</i> .....	87
3.2 Филогенетические линии у <i>E. n. pallida</i> .....	98
3.3 Филогеография отдельных филогенетических линий <i>E. nordenskioldi</i> .....	107
3.3.1 Филогеография линии 7 <i>E. n. nordenskioldi</i> .....	107
3.3.2 Филогеография линии 9 <i>E. n. nordenskioldi</i> .....	113
3.4 Филогения комплекса <i>E. nordenskioldi</i> на основании геномных и транскриптомных данных .....	129
3.4.1 Филогения <i>E. nordenskioldi</i> по данным последовательностей митохондриальных геномов .....	129
3.4.2 Оценка работы метода секвенирования транскриптомов .....	138
3.4.3 Филогения <i>E. nordenskioldi</i> : сравнение картин, полученных на основе гена <i>cox1</i> и транскриптомных данных .....	151
3.5 Эволюция размера и хромосомной организации ядерного генома в комплексе <i>E. nordenskioldi</i> .....	161
3.5.1 Размеры геномов филогенетических линий.....	161
3.5.2 Хромосомная изменчивость .....	166
3.6 Морфологическая изменчивость у <i>E. nordenskioldi</i> .....	169
3.7 Изучение возможной гибридизации между филогенетическими линиями <i>E. nordenskioldi</i> при помощи метода RADSeq .....	182
3.8 Холодостойкость <i>E. nordenskioldi</i> .....	185
3.9 История расселения <i>E. nordenskioldi</i> по равнинной части России .....	195

3.10 Заключение .....	201
Глава 4. Эндемики различных регионов России.....	204
4.1 <i>Dendrobaena schmidti</i> .....	204
4.2 <i>Drawida ghilarovi</i> .....	211
4.3 Заключение .....	220
Глава 5. Перегринные виды .....	222
5.1 <i>Aporrectodea caliginosa</i> .....	222
5.1.1 Филогеография <i>A. caliginosa</i> в России.....	222
5.1.2 Морфологические различия между филогенетическими линиями <i>A. caliginosa</i> .....	229
5.2 <i>Aporrectodea rosea</i> .....	239
5.3 <i>Octolasion tyrtaeum</i> .....	249
5.3.1 Филогеография <i>O. tyrtaeum</i> .....	249
5.3.2 Морфологические различия между филогенетическими линиями <i>O. tyrtaeum</i> .....	259
5.4 <i>Dendrobaena octaedra</i> .....	263
5.5 <i>Lumbricus rubellus</i> .....	266
5.6 <i>Dendrodrilus rubidus</i> .....	270
5.7 Сравнение перепегринных видов .....	275
5.7.1 Паттерны генетической изменчивости перепегринных видов .....	275
5.7.2 История расселения перепегринных видов.....	277
5.7.3 Соотношение генетической и хромосомной изменчивости.....	280
Глава 6. Молекулярные основы холодоустойчивости дождевых червей .....	281
ВЫВОДЫ .....	290
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	292

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

AFLP – amplified fragment length polymorphism, полиморфизм длин амплифицированных фрагментов

ddRADSeq – double digest RADSeq

DEPC – diethyl pyrocarbonate, диэтилпирокарбонат

DMSO – dimethyl sulfoxide, диметилсульфоксид

GBS – Genotyping-by-sequencing

ITS – internal transcribed spacer, внутренний транскрибируемый спейсер

ME – minimum evolution, метод минимальной эволюции

ML – maximum likelihood, метод максимального правдоподобия

MP – maximum parsimony, метод максимальной парсимонии

NGS – next generation sequencing, методы секвенирования нового поколения

RADSeq – Restriction site-associated DNA sequencing

RFLP – restriction fragment length polymorphism, полиморфизм по длине продуктов рестрикции

rRNA – ribosomal RNA, рибосомальная РНК

SEM – standard error of measurement, стандартная ошибка измерений

SD – standard deviation, стандартное отклонение

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Огромная роль дождевых червей в формировании и функционировании почвы показана множеством выдающихся исследователей, начиная с Ч. Дарвина [Darwin, 1838, 1881]. Представители этой группы перерабатывают растительный опад, переводя его в гумус почвы и возвращая органику в круговорот вещества и энергии; формируют структуру почвы, а, следовательно, в большой степени определяют продуктивность экосистемы. Во многих ландшафтах дождевые черви имеют наибольшую среди почвенной фауны биомассу, по которой можно оценить степень ее влияния на экосистему. Однако, несмотря на свою выдающуюся экологическую роль, биоразнообразие дождевых червей до сих пор сравнительно мало изучено.

Общее число видов дождевых червей оценивают в 6000 [Reynolds, 1994; Hendrix et al., 2008]; большинство из них обитает в тропиках, и их биоразнообразие исследовано значительно хуже, чем в умеренных широтах Голарктики [Buckley et al., 2011; Decaëns et al., 2016; Maggia et al., 2021].

В России насчитывают всего 56 видов и подвидов дождевых червей [Всеволодова-Перель, 1997]. Почти все они относятся к сем. Lumbricidae; немногие представители других семейств обитают только на периферии страны, куда проникают с сопредельных территорий. Из этих 56 таксонов лишь около полутора десятков распространены широко, остальные – эндемики с небольшими ареалами. Со временем список может расширяться на основе традиционного использования морфологических критериев, но не принципиально.

Несмотря на ограниченный объем фауны, в систематике дождевых червей России есть принципиальные методологические пробелы. Причина этого – относительно малое число диагностических морфологических признаков. В их числе размеры, форма и окраска тела, количество сегментов, строение головной лопасти, число и локализация щетинок, расположение пояска, пубертатных валиков, половых отверстий и спинных пор, а также некоторые особенности

внутреннего строения. На видовом уровне главными из них обычно считают положение пояска и пубертатных валиков, в то время как остальные лишь дополняют определение.

Размеры и окраска дождевых червей в значительной степени зависят от условий обитания, в том числе доступности и состава пищи [Pierce et al. 2002; García, Fragoso 2003]. Большинство других используемых внешних признаков (положение пор, щетинки и т.д.), как и все известные особенности анатомии (строение экскреторной, половой и мышечной систем и др.), применимы только на более высоком уровне, для разграничения родов или семейств. Ограниченность числа морфологических признаков усугубляется высоким уровнем внутривидовой изменчивости, при которой различия между популяциями одного вида и иногда даже особями в пределах одной популяции могут перекрывать межвидовые различия. Такое положение приводит к тому, что на практике не всегда просто различить некоторые внешне сходные виды дождевых червей, иногда – даже представителей разных родов.

Небольшое число признаков, пригодных для разделения видов, сопряжено с «проблемой вида» у дождевых червей. Использование биологической концепции вида в ее прямом смысле – путем экспериментов по возможности получения плодового потомства – на дождевых червях на практике крайне трудоемко и почти не используется [Díaz Cosín et al., 2011]. Кроме того, в данной группе весьма широко распространены партеногенез и полиплоидия [Omodeo, 1952; Jaenike, Selander, 1979; Viktorov, 1997; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008]. В описанную проблему весомый вклад могут внести молекулярно-генетические методы. Последовательности ДНК представляют собой хорошую основу для выяснения филогенетических отношений между группами любого уровня. Они могут использоваться в тех случаях, когда анализ морфологических признаков не дает удовлетворительного разрешения, например, если их мало или они крайне переменчивы. Не случайно основным методом реконструкции филогенетических отношений в последние годы стал молекулярно-генетический анализ, значительно потеснив традиционный анализ морфологических и анатомических признаков.



Применимость ДНК-анализа была продемонстрирована на множестве групп животных [Liming, 1992; Millis et al., 2000; Decaëns et al., 2013].

Кроме того, показано, что дождевые черви – удобный объект для исследований в области биогеографии и, в частности, филогеографии. В настоящее время подавляющее число публикаций в этой области выполнено на позвоночных, некоторых группах насекомых (особенно бабочек и жуков), многих высших растениях [Weider, Hobaek, 2000; Behergaray, 2008; Satler et al., 2021; Lyman, Edwards, 2022; Marske, Boyer, 2022]. У дождевых червей по сравнению с названными группами есть определенные преимущества: большинство видов (за исключением т.н. перегринных, т.е. способных расселяться на большие расстояния) имеют слабую способность к миграции, в связи с чем результаты анализа не осложняются эффектами вторичного расселения.

Для нашей работы была выбрана группа видов дождевых червей, охватывающая возможные варианты как размера ареала (большой/ограниченный), так и способности к расселению (перегринные/оседлые). Среди оседлых были взяты виды с ареалами, расположенными на Кавказе, Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке России.

Главной моделью для изучения генетического разнообразия дождевых червей в нашей работе стал *Eisenia nordenskioldi* – комплекс видов, имеющих в России крайне широкое распространение и приуроченных к самым разным экологическим условиям [Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997; Всеволодова-Перель, Булатова, 2014]. Различными методами была исследована его филогения, филогеография, диапазон размера ядерных геномов у разных филогенетических линий, соответствие морфологической и генетической изменчивости.

Также была проанализирована генетическая изменчивость видов, имеющих в России весьма ограниченные ареалы либо по причине эндемизма, либо находящихся здесь на северном пределе своего распространения. *Dendrobaena schmidti* – кавказский вид, обитающий также и в Предкавказье. В пределах его выделяют до восьми подвидов [Квавадзе, 1985], что принято не всеми специалистами [Всеволодова-Перель, 2003]. Кавказ, как и все горные системы,

имеет условия, способствующие аллопатрическому видообразованию, и здесь следовало ожидать не только большую морфологическую изменчивость, но и вариабельность геномных последовательностей.

*Drawida ghilarovi* – единственный проникающий с юга представитель азиатского семейства Moniligastridae. У него также отмечена большая экологическая и морфологическая изменчивость [Berman et al., 2010; Ганин и др., 2012].

Наряду с перечисленными оседлыми видами, были исследованы самые распространённые перегринные виды дождевых червей, колонизовавшие значительную часть территории России. Среди них *Aporrectodea caliginosa*, *A. rosea*, *Octolasion tyrtaeum*, *Lumbricus rubellus*, *Dendrobaena octaedra* и несколько других. Изучение перегринных видов даёт возможность выявить закономерности, происходящие при быстром расселении, и его пути.

Таким образом, в нашей работе проанализирован ряд видов, относящихся к разным родам и даже семействам, образующих широкий диапазон ареалов. На их примере мы попытались выявить общие закономерности и особенности изменчивости дождевых червей.

## **Разработанность темы диссертации**

Методологические подходы применения молекулярно-генетических методов для изучения изменчивости дождевых червей разрабатывались в основном европейскими учеными. С начала 2000-х годов появляются первые статьи, в которых применяется секвенирование митохондриальных (*cox1*, *cox2*, 16S) и ядерных рибосомальных (18S, 28S) генов [Pop et al., 2003, 2007; Erséus, Källersjö, 2004; Heethoff et al., 2004; Pérez-Losada et al., 2005]. В 2008 году вышла статья King и др. [King et al., 2008], в которой впервые было показано, что самые широко распространенные, многочисленные и наиболее изученные виды дождевых червей имеют крайне высокую генетическую изменчивость: в генетическом пуле каждого из них присутствуют несколько вариантов последовательностей мтДНК, которые отличаются крайне высоким уровнем нуклеотидных замен (10–20%), что обычно

характерно для разных родов и даже семейств животных. Это могло бы означать, что данные виды – на самом деле целый набор видов-двойников. Множество последующих статей [Novo et al., 2009, 2011, 2012a, 2012b; Dupont et al., 2011; Klarica et al., 2012; Kille et al., 2013; Porco et al., 2013; Donnelly et al., 2014; Martinsson, Erséus, 2017a; Taheri et al., 2018; Marchán et al., 2020] подтвердило полученные результаты. В то же время, остался нерешенным важнейший вопрос: выявленная закономерность – исключительно митохондриальный феномен или же различия существуют и на уровне ядерного генома? Было также неизвестно, имеются ли морфологические различия между представителями разных филогенетических линий, и способны ли они к гибридизации между собой.

В России на момент начала нашей работы существовали лишь единичные исследования, посвящённые изучению генетического разнообразия дождевых червей, которые были выполнены Б. Р. Стригановой и коллегами [Шепелева и др., 2008, 2010].

### **Цели и задачи исследования**

Целью работы было изучение генетической изменчивости модельных видов дождевых червей, обладающих разными типами ареалов и возможностями расселения, на примере которых можно охарактеризовать значительную часть видов фауны России.

Были поставлены следующие задачи:

1) Выяснить филогенетические отношения в пределах ряда оседлых видов, имеющих принципиально различные ареалы и выделяющихся значительной морфологической изменчивостью: *Eisenia nordenskioldi*, *Dendrobaena schmidti*, *Drawida ghilarovi*.

2) Выявить филогеографическую структуру вида *E. nordenskioldi*, имеющего среди оседлых видов наибольший ареал и адаптированного к наиболее широкому спектру условий среды.

3) С помощью филогеографического анализа оценить направление миграционных потоков и различие уровней генетической изменчивости

палергринных видов дождевых червей, обитающих на территории России: *Aporrectodea caliginosa*, *A. rosea*, *Octolasion tyrtaeum*, *Lumbricus rubellus*, *Dendrobaena octaedra*, *Dendrodrilus rubidus*.

### **Область исследования**

Работа выполнена в соответствии с Паспортами специальностей 1.5.12. «Зоология» (п. 1. «Систематика, классификация, морфология, биохимия и генетика животных и гетеротрофных протистов. Происхождение и направления эволюции таксонов.»; п. 4. «Зоогеография, филогеография, фаунистика, история формирования фаун.») и 1.5.7. «Генетика» (п. 4. «Геносистематика.»; п. 11. «Теоретические и практические аспекты филогенетического анализа. Молекулярная эволюция биологических систем»).

### **Научная новизна**

Впервые проведено исследование генетического разнообразия дождевых червей России с использованием секвенирования ДНК, в том числе методами новых поколений. Впервые установлено высокое генетическое разнообразие для оседлых видов: *Eisenia nordenskioldi*, *Dendrobaena schmidtii*, *Drawida ghilarovi*; показано, что в состав каждого из них входит несколько криптических видов (видов-двойников). Предложены способы их разделения на монофилетические таксоны.

Впервые изучено генетическое разнообразие палергринных видов дождевых червей, имеющих широкие ареалы на территории России. Показано, что наибольшее генетическое разнообразие наблюдается на западе их ареалов, оно уменьшается по мере продвижения на восток.

Выполнено секвенирование, сборка и анализ митохондриальных геномов для различных филогенетических линий *E. nordenskioldi* и *Aporrectodea rosea*. Осуществлено секвенирование транскриптомов с их последующим анализом для различных филогенетических линий видов *Eisenia fetida*, *E. nordenskioldi*, *E. spelaea*, *E. lucens*, *E. magnifica*, *E. tracta*, *E. balatonica*, *Aporrectodea caliginosa*, *A.*

*rosea*, *Lumbricus rubellus*, *D. octaedra*, *D. ghilarovi*, *Perelia diplotetratheca*, *Octolasion tyrtaeum*.

Впервые получены количественные оценки размера геномов для различных филогенетических линий видов *E. nordenskioldi*. Показано, что между филогенетическими линиями *E. nordenskioldi* возможно образование гибридов первого поколения, как для линий *D. schmidtii*.

Впервые проведен метаболомный анализ изменений в составе малых молекул одной из линий комплекса *E. nordenskioldi* и *D. octaedra* при замораживании. Показано, что дождевые черви в ответ на замораживание синтезируют большое количество глюкозы в качестве криопротектора. Замораживание приводит к активации анаэробного гликолиза и накоплению его продуктов.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Изучена генетическая изменчивость у наиболее характерных представителей фауны дождевых червей России. Для оседлых видов эти данные получены впервые, для перекочующих видов западноевропейского происхождения – дополнена картина, полученная исследователями на зарубежных популяциях.

Впервые показано, что выраженные различия между филогенетическими линиями существуют и на уровне ядерного генома. Получены наборы генов, которые могут быть использованы для построения надежных молекулярно-филогенетических деревьев на основе мультигенных наборов данных. С их помощью установлены филогенетические отношения в комплексах *E. nordenskioldi* и *D. ghilarovi*.

Актуальность исследований и значимость результатов подтверждаются опубликованными статьями в высокорейтинговых отечественных и зарубежных научных журналах.

Практическая значимость работы лежит в плоскости экологических и экотоксикологических исследований, многие из которых проводятся на дождевых червях [Spurgeon et al., 2003; Lowe, Butt, 2007; Lee et al., 2008; Brami et al., 2017;

Buch et al., 2017]. Полученные нами данные показали, что используемые в подобных исследованиях виды подразделяются на ряд филогенетических линий, между которыми имеются заметные морфологические различия, и, следовательно, можно предполагать и различные экологические предпочтения или реакции на разные факторы.

### **Методология и методы исследования**

Работа основана на полевых сборах дождевых червей и изучении их генома различными молекулярно-генетическими методами. Репрезентативные выборки дождевых червей частично собраны автором, частично любезно предоставлены коллегами. Морфологический анализ и морфометрия проводились при помощи бинокулярной лупы, измерение размеров тела – штангенциркулем. Для определения генетической принадлежности особей, а также для построения филогенетических деревьев и изучения филогеографии осуществляли амплификацию целевых генов путем ПЦР и секвенирование методом Сэнгера [Sanger et al., 1977]. Для исследования геномов и транскриптомов применяли секвенирование нового поколения: пиросеквенирование на приборах Ion Torrent [Rusk, 2011; Merriman et al., 2012] и секвенирование на твёрдой подложке методом Illumina [Canard et al., 1994; Meyer, Kircher, 2010]. Анализ RADSeq (секвенирование коротких фрагментов генома, прилегающих к сайтам рестрикции) проведен по методике N. Wendler et al. [2014] с модификациями. Было также проведено измерение размеров ядерного генома методом проточной цитофотометрии [Tiersch et al., 1989]. Количественная идентификация метаболитов у холодоустойчивых дождевых червей выполнена при помощи  $^1\text{H}$  ядерного магнитного резонанса [Weljie et al., 2006; Wishart, 2008; Bharti, Roy, 2012].

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1) Для дождевых червей характерна высокая внутривидовая генетическая изменчивость. Почти все распространенные в России и на сопредельных территориях виды представляют собой совокупность из нескольких

филогенетических линий, нередко имеющих морфологические отличия и частично репродуктивно изолированных. Эти линии могут рассматриваться как отдельные виды, нуждающиеся в описании.

2) В нативных ареалах оседлым и перигридным видам дождевых червей свойственна сложная филогеографическая структура со значительными генетическими и геномными различиями между популяциями. Время дивергенции популяций по данным анализа молекулярных часов варьирует от десятков до сотен тысяч лет, что свидетельствует об их локальном выживании на протяжении длительного времени. Яркий пример – *Eisenia nordenskioldi*, сохраняющийся на севере Азии, вероятно, со среднего плейстоцена.

3) Восточно-европейские, сибирские и дальневосточные популяции перигридных видов и некоторые филогенетические линии оседлых видов дождевых червей характеризуются заметным сокращением генетического разнообразия по сравнению с популяциями из нативных частей ареала, что является следствием их быстрого расселения, в том числе, при участии человека.

4) Холодостойкость дождевых червей основана на низкомолекулярных криопротекторах и активации анаэробного гликолиза. Существуют значительные различия по предельно переносимым температурам и концентрациям важнейших метаболитов как между видами, так и между разными филогенетическими линиями этих видов.

### **Апробация результатов и степень их достоверности.**

Основные результаты работы были представлены на Всероссийской конференции молодых ученых "Экология: традиции и инновации" (г. Новосибирск, 2012 г.), Третьей школе по почвенной зоологии (г. Архангельск, 2013 г.), 20-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 2016 г.), Четвёртой школе по почвенной зоологии (с. Карасук, 2016 г.), 11-ой Международной конференции «Биоинформатика регуляции и структуры геномов и Системная биология» (г. Новосибирск, 2018), 18-ом Всероссийском совещании по почвенной зоологии (Москва, 2018 г.), Пятой

школе по почвенной зоологии (г. Нальчик, 2019 г.), 12-ой Международной конференции «Биоинформатика регуляции и структуры геномов и системная биология» (г. Новосибирск, 2020 г.), VII Полевой школе почвенной зоологии и экологии для молодых ученых (г. Екатеринбург, 2021), 19-ом Всероссийском совещании по почвенной зоологии (г. Улан-Удэ, 2022 г.).

Правильность прочтения нуклеотидных последовательностей обеспечена следованием методическим рекомендациям – секвенированием каждого гена с двух праймеров в случае секвенирования по Сэнгеру, достижением большого покрытия прочтений для высокопроизводительных методов секвенирования. Достоверность результатов филогенетического анализа обусловлена использованием как минимум нескольких независимых ядерных и митохондриальных участков, как максимум – сотен генов, полученных в результате транскриптомного анализа.

Актуальность исследований подтверждена фактом публикации результатов в высокорейтинговых международных изданиях.

### **Публикации по теме диссертации.**

По теме диссертации опубликовано 46 работ, включая сборники трудов конференций. Из них 31 представляет собой рецензируемые научные статьи, опубликованные в журналах, входящих в базы данных Web of Science, Scopus и Перечень научных изданий, рекомендованных ВАК РФ.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертация изложена на 360 страницах машинописного текста, содержит 73 рисунка и 33 таблицы. Текст диссертации состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Методы исследования, Комплекс *Eisenia nordenskioldi*, Эндемики регионов России, Перегринные виды, Молекулярные основы холодоустойчивости, Выводы.



### **Личный вклад автора.**

Диссертационная работа – результат исследований, проведенных в Институте цитологии и генетики СО РАН с 2011 по 2023 гг. Автору принадлежит постановка цели и задач исследования, финальная обработка всех данных, интерпретация результатов и написание статей.

Приблизительно треть материала была собрана автором, остальное – соавторами и волонтерами-сборщиками. Определение материала по морфологическим признакам проводили, главным образом, Е.В. Голованова, а также Т.С. Всеволодова-Перель, И.Б. Рапопорт, А.П. Гераськина, С.А. Ермолов, М.Н. Ким-Кашменская. Молекулярно-генетический анализ был выполнен автором с помощью Т.Н. Полубояровой, Н.Э. Базаровой и А.П. Гераськиной. Выделение фракции поли-А мРНК, синтез кДНК и ее секвенирование проведено в Межинститутском центре секвенирования СО РАН Г.В. Васильевым. Данные, полученные при секвенировании транскриптомов, обработаны автором совместно с Н.И. Ершовым и А.А. Шиповой. Метаболомный анализ выполнен сотрудниками лаборатории протеомики и метаболомики Международного томографического центра СО РАН Ю.П. Центалович и Е.А. Зеленцовой.

### **Благодарности.**

Приношу глубокую признательность своему научному консультанту, д.б.н., проф. Д. И. Берману за всестороннюю помощь в подготовке и осуществлении настоящей работы. Особая благодарность – к.б.н. С. Е. Пельтеку, заведующему лабораторией молекулярных биотехнологий, в которой проводилась работа, а также всему её коллективу. Автор хотел бы поблагодарить к.б.н. Т.В. Полубоярову, помогавшую в выполнении многих молекулярно-генетических работ. Выражаю искреннюю признательность своим коллегам, вместе с которыми были проведены исследования: к.б.н. Е.В. Головановой, к.б.н. Н.А. Булаховой, к.б.н. Е.Н. Мещеряковой, к.б.н. И.Б. Рапопорт, к.б.н. А.П. Гераськиной, С.А. Ермолову. Секвенирование ДНК и биоинформатический анализ были бы невозможны без Г.В. Васильева, А.А. Шиповой и Н.И. Ершова, а метаболомный анализ – без д.б.н. Ю.П.

Центаловича и к.б.н. Е.А. Зеленцовой. Также автор благодарит к.б.н. Н.А. Булахову, д.б.н. О.Э. Костерина, д.б.н. В.С. Богданову, д.б.н. П.М. Бородину, к.б.н. А.А. Махрова и к.б.н. В.С. Артамонову за ценные замечания к данной работе.

Дождевые черви из разных регионов для молекулярного анализа были любезно предоставлены Е.В. Головановой, Н.А. Булаховой, И.Б. Рапопорт, А.П. Гераськиной, Е.А. Держинским, О.Л. Макаровой, О.А. Хрулевой, М.П. Шашковым, Ю.Н. Сундуковым, К.Б. Гонгальским, Н.Н. Винокуровым, Е.В. Демидовой, О.Э. Костериним, И.И. Любечанским, Ю.М. Марусиком, В.А. Устиновым, А.В. Алфимовым, А.Б. Бабенко, А.В. Баркаловым, П.В. Бубякиным, А.П. Бурнашевой, Н.Е. Докучаевым, Н.Н. Дворником, А.Х. Габышевой, Е.В. Кириллиным, А.В. Кондратьевым, С.В. Коняевым, А.В. Лосоровым, И.М. Охлопковым, А.А. Поповым, К.В. Регель, Л.В. Рыбаловым, Р.Р. Сафроновым, Е.В. Шемякиным, М.М. Сидоровым, А.В. Шестаковым, М.М. Следовым, Ю.А. Слепцовым, А.В. Танасевичем, Е.Н. Зыковым и многими другими.

Работы были поддержаны грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований: 12-04-32181\_мол\_а «Филогеография дождевых червей Западной Сибири», 14-04-01121\_а «Филогеография комплекса *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae) в Северной Евразии», 19-04-00661\_а «Скрытая генетическая изменчивость и виды-двойники у дождевых червей», 19-54-04006\_Бел\_мол\_а «Состав и происхождение фауны дождевых червей Беларуси», 20-54-56030\_Иран\_т «История фауны дождевых червей горных территорий Западной Азии», а также грантом Президента Российской Федерации для молодых кандидатов наук № МК-6685.2015.4.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 История изучения биоразнообразия дождевых червей России

В своей *Systema Naturae* Карл Линней привел только один вид дождевых червей – *Lumbricus terrestris* (а всех кольчецов он поделил всего на два вида, *L. terrestris* и *L. marinus*) [Linné, 1766]. В связи с этим первые находки дождевых червей на территории современной России были представлены исключительно *L. terrestris* [Georgi, 1775; Falk, 1786; Двигубский, 1829 – цит. по Кулагин, 1889]. В более поздних работах приводилось несколько ныне невалидных видов, соответствующих, по всей видимости, *L. rubellus* и *Aporrectodea caliginosa* [Eversmann, 1835; Grube, 1851; Gerstfeldt, 1858; Кесслер, 1868 – цит. по Кулагин, 1889]; также в некоторых из этих работ к роду *Lumbricus* отнесены различные водные олигохеты и энхитреиды по указанной выше причине. G. Eisen [1879] приводит для Сибири ряд видов, включая нынешние *Eisenia nordenskioldi*, *Dendrodrilus (Bimastos) rubidus*, *A. caliginosa*, *A. rosea*, *Dendrobaena* sp.

Первая сводка по фауне дождевых червей России (Российской Империи) было сделана Николаем Михайловичем Кулагиным [1889], который привел 12 видов, относящихся к трем родам. Несколько позднее заметный вклад в эту тему внес немецкий ученый Вильгельм Михаэльсен (W. Michaelsen). Он известен своим монументальным 8-томным трудом по олигохетам [Michaelsen, 1900] и сводкой по их географическому распространению [Michaelsen, 1903], в которые вошли результаты его экспедиций по разным континентам [Shorter, 1937; Sherlock, Berridge, 2012]. В ряде его работ был использован и материал из Российской Империи [Michaelsen, 1899, 1901]. Особый вклад Михаэльсен сделал в изучение фауны Кавказа [Michaelsen, 1907, 1909].

Первым монографом дождевых червей (и олигохет в целом) Советского Союза стал Иосиф Иосифович Малевич. Его работы были посвящены фауне дождевых червей Европейской части России [1950; Малевич, Перель, 1958],

Кавказа [1966, 1967], Урала [1954], Дальнего Востока [1956], а также многих республик СССР [1937, 1949, 1953, 1955, 1959, 1970, 1976; Малевич, Матвеева, 1964].

Среди других авторов нельзя не упомянуть П. Г. Светлова, занимавшегося олигохетами в целом [1936], но имевшего и труды, посвященные исключительно дождевым червям различных регионов [1926, 1946, 1957]. Список самых широко распространенных видов и определительную таблицу для них привела О. В. Чекановская в своей монографии [1960].

Кроме упомянутых ученых, занимавшихся исключительно дождевыми червями или олигохетами в целом, в развитие этой области внесли вклад множество почвенных зоологов, не специализировавшихся на этой группе, но затрагивавших ее в своих исследованиях. Всех их невозможно перечислить в этом кратком обзоре, поэтому здесь мы ограничимся только кратким списком. Самым выдающимся почвенным зоологом СССР первой половины советского периода был М. С. Гиляров, внесший огромный вклад в эту область [Гиляров, 2012]. В качестве лишь одного из примеров его вклада в изучение дождевых червей можно вспомнить проведение почвенно-зоологических экспедиций на Дальнем Востоке [Гиляров, Перель, 1973], по результатам которого Г. Э. Гейтс [1969] описал вид *Drawida ghilarovi*, единственный из представителей семейства Moniligastridae в нашей стране. Помимо чисто фаунистических исследований, дождевые черви были объектами множества работ, как по изучению их экологических свойств и морфофизиологии, так и состава фаун почвенных беспозвоночных в целом. Можно назвать целый ряд имен исследователей, таких, как М. М. Алейникова [1964, 1968], Ю. Б. Бызова [1964, 1965, 1967, 1982; Бызова, Чадаева, 1965], В. Г. Матвеева [1966, 1982; Матвеева, Перель, 1982], Н. П. Кривошеина [1968], О. П. Атлавините [1975, 1990], И. В. Кудряшева [1977, 1987, 1998] и многие другие.

Вторая половина XX-го века связана с именем Тамары Семеновны Всеволодовой-Перель. Она пришла в люмбрикологию еще в юном возрасте, занимаясь в школьном кружке, которым руководил И. И. Малевич [Рапопорт и др., 2019]. Тамара Семеновна смогла изучить фауны дождевых червей всех регионов

СССР, причем большая часть материала – ее собственные сборы. Полученные данные были просуммированы в двух монографиях, «Распространение и закономерности распределения дождевых червей фауны СССР» [1979] и «Дождевые черви фауны России: Кадастр и определитель» [1997]. В них были обобщены все полученные данные и сформулированы закономерности географического распределения дождевых червей, состав фаун отдельных регионов и история их развития. Эти монографии остаются самым важным источником информации, с которым сверяют свои находки все исследователи.

Вклад Т. С. Всеволодовой-Перель не ограничен фаунистикой и описанием новых таксонов. Важным вкладом в таксономию дождевых червей было развитие идей об использовании формы нефридиальных пузырей как признака для систематики на родовом уровне [Перель, 1976]. Также Тамара Семеновна дополнила экологическую классификацию Bouché [1971, 1972, 1977 – цит. по Bottinelli et al., 2020]: вдобавок к подстилочной (epigeic), почвенной (endogeic) и норной (anecic) морфо-экологическим группам она выделила также группу почвенно-подстилочных дождевых червей [Перель, 1979]. Она была пионером в использовании хромосомных и молекулярно-генетических методов в этой области. Т. С. Всеволодова-Перель в совместных работах с Н. Ш. Булатовой, А. С. Графодатским и А. Г. Викторовым [Графодатский с соавт., 1982; Перель, Графодатский, 1983, 1984; Перель и др., 1985; Булатова и др., 1987; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008] впервые установили кариотипы многих видов дождевых червей России, открыли широкое распространение полиплоидных рас и исследовали закономерности их эволюции. Работы по хромосомам дождевых червей в дальнейшем были продолжены А. Г. Викторовым в его диссертации [1989, 1993]. Одно из первых исследований, основанных на молекулярно-генетических методах, было проведено Т. С. Всеволодовой-Перель в соавторстве с Т. В. Малининой [Малинина, Перель, 1984]. Было показано, что октоплоидные расы *E. nordenskioldi* возникли независимо друг от друга в разных регионах, что было одним из первых случаев применения этих методов для решения вопросов систематики и эволюции дождевых червей в те годы.

Среди работ других авторов нельзя не отметить книгу Э. Ш. Квавадзе «Дождевые черви Кавказа» [1985]. Хотя речь в ней в первую очередь идет о союзных республиках (главным образом, Грузии), проводимые обобщения касаются и российской части Кавказа. Э. Ш. Квавадзе известен своей таксономической системой дождевых червей [1993, 1996], в которой большую роль сыграли признаки строения половых щетинок, которые устанавливались при помощи электронной микроскопии. Эта система, однако, не была принята большинством современных таксономистов.

В 21 веке в изучение фаун дождевых червей дождевых червей заметный вклад внесла работа Б. Р. Стригановой и Н. М. Порядиной [2005], в которой была исследована почвенная фауна разных типов бореальных лесов Западно-Сибирской равнины. А. В. Тиунов с соавторами провели изучение изменений, которым подверглась фауна дождевых червей европейской части России [Tiunov et al., 2013], а также множество работ по экологии этой группы [Tiunov, Scheu, 2000, 2004; Yurkov et al., 2008; Potapov et al., 2019]. В изучение экологии дождевых червей заметный вклад А. В. Уваров [Uvarov, Scheu, 2004; Uvarov, 2009; Uvarov et al., 2011]. Д. И. Берман с соавторами провели множество работ по определению холодостойкости дождевых червей, попутно уточнив фауну этой группы Северо-Восточной России [Берман и др., 2002, 2010, 2016; Berman, Meshcheryakova, 2013; Meshcheryakova, Berman, 2014]. Изучение антропогенного влияния на дождевых червей Урала проводилось Е. Л. Воробейчиком с соавторами [Воробейчик, 1998; Воробейчик с соавт., 2012, 2019]. К. Б. Гонгальский с коллегами проводили экологические исследования на различных группах почвенной фауны разных регионов страны, в том числе на дождевых червях [Гонгальский, 1998; Гонгальский и др., 2006, 2014; Горбунова и др., 2018, 2020].

Фауны отдельных регионов страны также уточнялись. Так, работы сыктывкарских исследователей посвящены инвентаризации местных фаун почвенных беспозвоночных, включая дождевых червей, для которых были составлены фаунистические списки [Долгин и др., 2012; Акулова и др., 2017; Конакова и др., 2017; Колесникова и др., 2018, 2020; Макарова, Колесникова, 2019].

Е. П. Бессолицына внесла важный вклад в изучение почвенных фаун Средней Сибири [Бессолицына, 2003, 2008, 2012, 2013]. И. Б. Рапопорт изучала фауну различных регионов Северного Кавказа [Рапопорт, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014; Рапопорт и др., 2017], Е. В. Голованова – Сибири и Урала [Голованова, 2010, 2019; Ермаков, Голованова, 2010; Голованова и др., 2015], И. В. Зенкова – Мурманской области [Зенкова и др., 2010, 2011; Зенкова, Рапопорт, 2012, 2017; Зенкова, 2020], А.П. Гераськина и М. П. Шашков – различных регионов Европейской части России [Шашков, 2003; Шашков, Бобровский, 2008; Гераськина, 2016а, 2016б; Гераськина и др., 2017]. Заметный вклад в изучение разнообразия дождевых червей юга Дальнего Востока внес Г.Н. Ганин, который в своих трудах использовал цитологические и молекулярно-генетические методики [Ганин и др., 2012, 2014; Atopkin, Ganin, 2015; Ганин, 2017, 2018; Ganin, Atopkin, 2018]. В целом, исследования дождевых червей продолжают идти в рамках, заданных Т. С. Всеволодовой-Перель, без каких-либо кардинальных изменений. При этом таковые становятся более актуальными в свете новых работ по пересмотру систематики группы, в том числе на основе молекулярно-генетических данных [Csuzdi, Pavlíček, 2005; Csuzdi et al., 2017].

## 1.2 Общая характеристика фауны дождевых червей России

По мнению Т. С. Всеволодовой-Перель [1997], в стране насчитывается 56 видов и подвидов дождевых червей. Они относятся к пяти семействам, для четырех из которых здесь известно только по одному виду: на юге Дальнего Востока обитают *Drawida ghilarovi* Gates, 1969 из сем. Moniligastridae и *Pheretima (Metaphire) hilgendorfi* (Michaelsen, 1892) из сем. Megascolecidae. *Microscolex phosphoreus* (Dugès, 1837) (сем. Acanthodrilidae) отмечен только в одной точке в Западном Закавказье, в окрестностях Сочи. *Criodrilus lacuum* Hoffmeister, 1845 (сем. Criodrilidae) найден как на юго-западе европейской части, так и на Дальнем Востоке, по берегам Амура. На семейство Lumbricidae приходятся все остальные виды дождевых червей России. Более того, из вышесказанного видно, что

дождевые черви из прочих семейств встречаются лишь на юго-западных или юго-восточных окраинах Федерации; подавляющая часть территории страны заселена исключительно видами сем. Lumbricidae.

Виды самого распространенного семейства – Lumbricidae – также имеют неравномерное пространственное распределение. Можно подразделить их на следующие группы (список даётся по Т. С. Всеволодовой-Перель [1997]):

## I. Перегринные виды

### Ia. Широко распространенные

- *Aporrectodea caliginosa caliginosa* (Savigny, 1826)
- *A. c. trapezoides* (Dugés, 1828)
- *A. longa* (Ude, 1895)
- *A. rosea* (Savigny, 1826)
- *Dendrobaena octaedra* (Savigny, 1826)
- *Dendrodrilus rubidus tenuis* (Eisen, 1874)
- *D. r. subrubicundus* (Eisen, 1874)
- *Eisenia balatonica* (Pop, 1943)
- *E. fetida* (Savigny, 1826)
- *Eiseniella tetraedra tetraedra* (Savigny, 1826)
- *Lumbricus castaneus* (Savigny, 1826)
- *L. rubellus* Hoffmeister, 1843
- *L. terrestris* Linnaeus, 1758
- *Octolasion tyrtaeum* (Savigny, 1826) (= *O. lacteum* (Örley, 1881))

### Ib. Перегринные виды с ограниченным ареалом

- *Allolobophora chlorotica* (Savigny, 1826)
- *A. parva* Eisen, 1874
- *Octolasion transpadanum* (Rosa, 1884)



## II. Оседлые

### IIa. Широкоареальные преимущественно равнинные виды/подвиды

- *Eisenia atlavinyteae* Perel et Graphodatsky, 1984
- *E. nordenskioldi nordenskioldi* (Eisen, 1874)
- *E. n. pallida* Malevič, 1956

### IIb. Равнинные виды/подвиды с ограниченным ареалом

- *Aporrectodea dubiosa* (Örley, 1881)
- *A. jassyensis* (Michaelsen, 1891)
- *Dendrobaena schmidti tellermanica* Perel, 1966
- *Eisenia japonica* (Michaelsen, 1891)
- *E. sibirica* Perel et Graphodatsky, 1984

### IIc. Виды Кавказа и сопредельных территорий

- *Allolobophora eiseni* (Levinsen, 1884)
- *Aporrectodea leoni* Michaelsen, 1891
- *A. handlirschi* (Rosa, 1897)
- *Dendrobaena alpina* (Rosa, 1884)
- *D. attemsi* (Michaelsen, 1902)
- *D. byblica* (Rosa, 1893)
- *D. hortensis* (Michaelsen, 1889)
- *D. mariupolensis mariupolensis* (Wyssotzky, 1898)
- *D. schmidti schmidti* (Michaelsen, 1907)
- *D. veneta* (Rosa, 1886)
- *Eisenia colchidica* (Perel, 1967)
- *E. eutypica* (Michaelsen, 1910)
- *E. iverica* (Kvavadze, 1973)
- *E. lagodechiensis* (Michaelsen, 1910)
- *E. transcaucasica* (Perel, 1967)
- *Eiseniella tetraedra hercynia* (Michaelsen, 1890)

- *Helodrilus antipae tuberculatus* (Černosvitov, 1935)
- *H. oculatus* Hoffmeister, 1845
- *H. patriarchalis* (Rosa, 1893)

#### Ид. Эндемики Урала

- *Eisenia intermedia* (Michaelsen, 1901)
- *E. uralensis* Malevič, 1956
- *Perelia diplotetratheca* (Perel, 1976)
- *P. tuberosa* (Svetlov, 1924)

#### Пе. Эндемики гор Южной Сибири

- *Eisenia altaica* (Perel, 1968)
- *E. angusta* Perel, 1994
- *E. malevici* Perel, 1962
- *E. salairica* Perel, 1968
- *E. tracta* Perel, 1985

#### III. Виды с единичными находками

- *Aporrectodea icterica* (Savigny, 1826)
- *Eisenia gordejefi* (Michaelsen, 1899)
- *Lumbricus baicalensis* Michaelsen 1900
- *Octolasion cyaneum* (Savigny, 1826)

Из приведённого списка видно, что равнинные области России, на которые приходится подавляющая часть ее площади, заселены относительно небольшим числом видов. В европейской России почти повсеместно распространены 14 видов и подвидов, относимым к peregrinным – таксонам, легко расселяющимся, зачастую при участии человека. Еще пять видов (*A. chlorotica*, *O. transpadanum*, *A.*

*dubiosa*, *A. jassyensis*, *D. schmidti tellermanica*) известны только с юга и юго-запада Европейской равнины.

На фоне относительной бедности фауны дождевых червей Европейской равнины заметно выделяется их разнообразие на Кавказе. В дополнение к проникающим сюда равнинных видам здесь отмечены еще 18 таксонов. Отчасти это эндемики горной системы, отчасти – малоазиатские виды, заходящие в Россию с юга. Следует отметить, что многие из них в большей или меньшей степени расширили свой ареал на равнины Предкавказья [Квавадзе, 1985; Всеволодова-Перель, 1997].

Как и Кавказ, горные районы Урала и Южной Сибири являются центрами видового разнообразия. На Урале присутствуют по два вида перелий и эйзений, причем в некоторых биотопах они доминируют. К горам южной Сибири (большей частью к Горному Алтаю и Салаирскому кряжу) приурочены 6 эндемичных видов эйзений. По-видимому, разнообразие ими далеко не исчерпывается, так как люмбрикофауны гор юга Восточной Сибири почти не изучены.

В равнинной части юга Сибири к вышеупомянутым широкораспространенным перегринным видам добавляется два близкородственных вида, *E. nordenskioldi* (состоящий из подвидов *E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida*), ареал которых занимает почти всю северную Азию, и *E. atlavinyteae*. Видовое разнообразие дождевых червей уменьшается к северу и востоку, где в зонах тайги и тундры остается только комплекс *E. nordenskioldi*. На юге Дальнего Востока добавляются азиатские люмбрициды *A. parva* и *E. japonica*, а также представитель сем. Moniligastridae *D. ghilarovi*.

### 1.3 Морфологические основы систематики дождевых червей

Для идентификации и классификации дождевых червей используется ряд морфологических признаков [Перель, 1979; Sims, Gerard, 1985; Всеволодова-Перель, 1997; Csuzdi, Zicsi, 2003]. Следует сразу отметить, что сложность данной группы состоит в сравнительно малом количестве доступных признаков, при этом

для них зачастую характерен высокий внутривидовой полиморфизм. Тем не менее, считается, что существует ряд признаков, например, положение пояска и пубертатных валиков, которые, с одной стороны, изменчивы на видовом или более высоких уровнях, и с другой, достаточно стабильны на внутривидовом уровне. В этом разделе мы рассматриваем все традиционные признаки, используемые в анализе, с оценкой возможности их использования как диагностических.

Сегментация. Для дождевых червей, как и для всех Annelida, характерно подразделения тела на сегменты. Внешняя сегментация в целом соответствует внутренней, однако на передней половине тела зачастую можно наблюдать деление каждого сегмента на два. Это деление чисто внешнее и не затрагивает внутренних органов. Количество сегментов обычно варьирует от 80 до 150; считается, что их число в ходе онтогенеза постоянно, однако в пределах вида оно варьирует значительно.

Размеры. Длина тела дождевых червей – от 2–3 см у многих подстилочных видов до более 2 м – у австралийского норника *Megascolides australis* [Van Praagh, 1992, 2002]. Длина тела у живых червей непостоянна, в связи с чем размеры указывают для фиксированных особей. Самые крупные черви – норники, среди которых уже упомянутый австралийский *M. australis* и африканский *Microchaetus rappi* [Plisko, 1999].

В пределах одного вида длина тела также может варьировать довольно широко. Так, особи из разных популяций *E. nordenskioldi* могут иметь длину от 3 до 15 и более см; у *Octolasion tyrtaeum* выделяют мелкую (около 5 см) и крупную (10–15 см) формы [Heethoff et al., 2004].

Форма тела. Хотя форма тела у дождевых червей в целом одинакова – цилиндрическая, в определенной степени она может использоваться как диагностический признак. Так, для норников характерен расширенный и уплощенный хвост, для разных видов может различаться отношение длины к диаметру [Всеволодова-Перель, 1997].

Головная лопасть. На первом сегменте тела (головном, или перистомииуме) расположена головная лопасть, или простомииум. Простомииум выполняет функцию

захвата пищи, а его форма – важный диагностический признак. Различают четыре варианта головной лопасти: танилобическую (идущую через весь первый сегмент до бороздки между первым и вторым сегментами), эпилобическую открытую (частично проходящую через первый сегмент), эпилобическую закрытую (частично проходящую через первый сегмент и отделенную от него складкой) и пролобическую (отделенную бороздкой от первого сегмента). Границы между ними, однако, не всегда могут быть проведены чётко.

Окраска. Один из видовых признаков дождевых червей – пигментация. Считается, что пигменты дождевых червей относятся к группе порфиринов [Laverack, 1960], хотя в некоторых источниках упоминается меланин [Всеволодова-Перель, 1997]. Пигмент накапливается в покровах неравномерно: обычно окрашена дорзальная часть тела, а вентральная не пигментирована [Edwards, Lofty, 1977]. Вдоль тела концентрация пигмента также варьирует: как правило, особи сильнее всего окрашены на передней части тела до пояса. Присутствие пигмента на всей поверхности тела характерно лишь для некоторых видов (*D. octaedra*, *D. rubidus*), однако, только для части популяций. Считается, что у многих собственно почвенных видов отсутствуют какие-либо пигменты. Они имеют бледно-серый, розовый или синеватый цвет. Кроме бурой или пурпурной окраски, обеспечиваемой порфиринами, встречается также чёрная, зеленая и другие типы пигментации; пока неизвестно, какими веществами они обусловлены.

Функции пигментации у дождевых червей не ясны. Возможно, она является лишь следствием накопления пигментов, полученных из растений: интенсивная окраска характерна для видов, живущих в опаде и питающихся им, в то время как собственно почвенные черви, как правило, непигментированы.

Щетинки. На всех сегментах тела дождевых червей, кроме первого, расположены щетинки. У представителей сем. Lumbricidae, на которые приходится подавляющее большинство видов фауны дождевых червей России, на одном сегменте присутствуют четыре пары щетинок, обозначаемых a, b, c и d. У большинства представителей семейства они сильно сближены попарно: a и b, c и d.

Другие семейства дождевых червей, как правило, имеют большее количество щетинок.

Поры и отверстия. Различные поры на теле дождевых червей также играют роль диагностических признаков. На спинной стороне тела открываются спинные поры, служащие для выделения целомической жидкости. Положение первой с головного конца спинной поры варьирует у разных видов. Женские половые отверстия у представителей сем. Lumbricidae располагаются над щетинками *b* на 14-ом сегменте; положение их в пределах семейства не варьирует [Всеволодова-Перель, 1997]. Подобное же постоянство характерно и для положения мужских половых отверстий, которые в пределах сем. Lumbricidae находятся обычно на 15-ом сегменте.

Поясок. Один из важнейших идентификационных признаков дождевых червей – положение пояска. Поясок – участок эпидермиса, богатый железами, участвующими в формировании яйцевого кокона. У зрелых червей он выглядит как утолщение или вздутие, занимающее несколько сегментов на передней половине тела. Различают седловидную форму пояска (с утолщениями на его краях на вентральной части тела) и кольцевую (равномерной толщины). Поясок дождевых червей состоит из нескольких слоёв клеток и наполнен т.н. внешним (экстраовулярным) желтком, синтезируемым специализированными клетками и обеспечивающим питание эмбрионов [Omodeo, 2000]. Положение этого признака является дискретным и достаточно изменчивым, с чем связано его значение для идентификации видов.

По положению пояска хорошо различаются семейства дождевых червей. Так, у люмбрицид поясок расположен позади половых отверстий и занимает от четырех до десяти сегментов между 22 и 38 сегментами. У представителей сем. Megascolecidae он начинается не позднее 14-го сегмента и перекрывается с женским, а иногда и с мужским половым отверстием. Для сем. Criodrilidae характерен поясок, занимающий иногда более чем 30 сегментов. На более низких таксономических уровнях изменчивость этого признака также выражена и

устойчива; особенно важна она на видовом уровне, где зачастую является главным признаком для разграничения видов.

Пубертатные валики – вздутия на вентральной поверхности тела, находящиеся на сегментах, занимаемых пояском, или же рядом с ними. Функция их неизвестна, но, скорее всего, она связана с половым процессом. Форма пубертатных валиков у различных видов варьирует: они могут иметь вид овала, треугольников или же отдельных бугорков на каждом сегменте. Положение пубертатных валиков обычно постоянно внутри вида и используется как важный диагностический признак.

## **1.4 Молекулярно-генетические методы в филогении и филогеографии дождевых червей**

### **1.4.1 Генетическая изменчивость**

Первыми универсальными молекулярными маркерами для работ по популяционной генетике животных и географическим закономерностям их генетической изменчивости (термина “филогеография” еще не существовало) стали изоферменты [Hubby, Lewontin, 1966; Lewontin, Hubby, 1966]. Именно универсальность обусловила популярность метода: с тех пор не надо было для каждого таксона разрабатывать свою систему генетических признаков. К дождевым червям метод изоферментов начали применять в 1980-е [Jaenike et al., 1980; Stille et al., 1980; Robotti, 1982; Малинина, Перель, 1984]. Впервые для установления филогенетических отношений у дождевых червей изоферменты использовали отечественные ученые [Малинина, Перель, 1984] на примере рас вида *E. nordenskioldi* различной ploидности. На основании полученных данных авторы предположили, что октаploидные расы дождевых червей могли возникать несколько раз независимо друг от друга. Но, в связи с ограничениями метода, изоферменты подходят скорее для популяционной генетики, а не для изучения отношений между видами и внутривидовыми таксонами/расами. Популяционно-

генетические работы на дождевых червях исчисляются десятками [Terhivuo, Saura, 1990, 1993a, 1993b, 1997, 2003, 2006; Mezherin et al., 2008, 2010; Шепелева и др., 2008, 2010; Vlasenko et al., 2011]. Кроме того, изоферменты продолжают быть актуальными как маркеры для экологических исследований [Simonsen et al., 2008; Otomo et al., 2011].

Использование последовательностей нуклеиновых кислот для установления родственных отношений между таксонами было теоретически обосновано весьма давно [Zuckerkindl, Pauling, 1965], однако массовые работы в области молекулярной филогении получили своё развитие с разработкой методов секвенирования [Sanger et al., 1977; Sanger, 1981] и разработкой методов ПЦР [Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986]. С этого времени начинает широко применяться амплификация небольшого числа консервативных генов и построения филогенетических деревьев на их основе, появляются данные о последовательностях этих генов для самых разных организмов, конструируются универсальные праймеры, позволяющие амплифицировать последовательности этих генов у любых видов животных [Moritz et al., 1987; Crozier et al., 1989; Kocher et al., 1989; Folmer et al., 1994]. Последнее достижение позволило работать над филогенией любой группы Metazoa без каких-либо предварительных исследований.

Первые филогенетические работы на дождевых червях были проведены на ядерных генах рибосомального кластера и на ряде митохондриальных генов (*cox1*, *cox2*) [Pop et al., 2003, 2007; Heethoff et al., 2004; Pérez-Losada et al., 2005; Huang et al., 2007]. В 2008 году вышла основополагающая работа [King et al., 2008], в которой на примере британских популяций нескольких хорошо известных и широкораспространённых видов дождевых червей был показан очень высокий уровень генетической изменчивости, как внутри-, так и межпопуляционной: в пределах английских популяций переместившихся видов *Allolobophora chlorotica*, *Aporrectodea longa*, *A. rosea* и *Lumbricus rubellus* было обнаружено от двух до пяти монофилетических групп (genetic lineages), различия между которыми по количеству нуклеотидных замен (p-дистанции) составляли до 22%. Настолько



высокая изменчивость в большинстве других групп характерна для представителей разных родов или семейств [Hebert et al., 2003]. В ряде случаев разные филогенетические линии одного и того же вида были обнаружены симпатрично, в одной пробе. Анализ различий между филогенетическими линиями *A. chlorotica*, проведённый в той же работе методом AFLP, подтвердил и наличие изменчивости в ядерном геноме.

Множество последующих работ на самых разных видах дождевых червей подтвердили эту закономерность: почти во всех случаях при достаточном географическом охвате обнаруживалась большая генетическая изменчивость, проявляющаяся не только в большом количестве нуклеотидных замен между гаплотипами на меж- и внутривидовом уровне, но и в существовании филогенетических линий. Больше всего подобных работ выполнено для переломных видов сем. Lumbricidae, которые, как считается, происходят с юга Западной Европы [Hendrix et al., 2008]. В частности, подобные работы были проведены для комплекса *Aporrectodea caliginosa* [Pérez-Losada et al., 2009; Fernández et al., 2011a, 2012, 2013; Porco et al., 2013], *A. longa* [Martinsson et al., 2017a], *A. rosea* [Porco et al., 2013; Fernández et al., 2016], *Lumbricus rubellus* [Donnelly et al., 2013, 2014; Giska et al., 2015; Jones et al., 2016; Martinsson, Erséus, 2017b], *L. terrestris* [James et al., 2010], *L. friendi* [Briones et al., 2022], *Allolobophora chlorotica* [Dupont et al., 2011, 2016; Porco et al., 2013], комплекса *Eisenia fetida*/*E. andrei* [Latif et al., 2017; Martinsson, Erséus, 2018a]. В перечисленных работах использовались различные митохондриальные гены (*cox1*, *cox2*, *ndl*, 12S, 16S), а в ряде случаев выводы были подкреплены и ядерными маркерами (H3, ITS1, ITS2, 18S, 28S).

Для представителей других семейств, обитающих в различных частях света, были выявлены те же закономерности. В качестве примера можно назвать различных представителей сем. Hormogastridae из Средиземноморья [Novo et al., 2009, 2010, 2012a, 2012b; Marchán et al., 2017, 2020a, 2021a], сем. Megascolecidae из Азии [Chang et al., 2008, 2014; Bantaowong et al., 2011; Aspe et al., 2016; Jeratthitikul et al., 2017; Dong et al., 2020] и Новой Зеландии [Buckley et al., 2011], сем.

Glossoscolecidae из Южной Америки [Decaëns et al., 2016; Maggia et al., 2021]. Можно предполагать, что описанная картина характерна для всех дождевых червей в целом.

#### 1.4.2 Популяционная генетика и филогеография дождевых червей

Первые работы по популяционной генетике дождевых червей были проведены с использованием изоферментов на дождевых червях начались с видов *Octolasion tyrtaeum* [Jaenike et al., 1980] и *Aporrectodea tuberculata* [Stille et al., 1980]. Заметный вклад внесли и отечественные ученые [Малинина, Перель, 1984]. В дальнейшем при помощи изоферментного анализа было выполнено множество работ, примерами которых могут служить статьи J. Terhivuo и A. Saura по различным видам дождевых червей Фенноскандии [Terhivuo, 1988; Terhivuo, Saura, 1990, 1993a 1993b, 2006, 2008; Terhivuo et al., 1994, 2002] а также более поздние работы украинских авторов [Власенко, Гарбар, 2007; Гарбар и др., 2007; Межжерин и др., 2007, 2008, 2009].

Начиная с 1990-х гг., методы, основанные на анализе изоферментов стали использоваться все реже. Их постепенно вытесняли секвенирование последовательностей ДНК (вначале, как правило, митохондриальной), анализ микросателлитов (короткие тандемно повторенные последовательностями), и некоторые менее распространенные методы, например, AFLP. В XXI веке к этим методам добавились различные геномные подходы, такие как RADseq (Restriction site-associated DNA sequencing). Работы по филогеографии дождевых червей зачастую обнаруживают генетически обособленные группы с характерными ареалами, которые выделяют в отдельные виды или подвиды.

Невозможно в данном разделе перечислить все статьи по филогеографии дождевых червей, вышедшие к настоящему времени, однако необходимо упомянуть самые главные исследования в этой области. К таковым можно отнести работы испанского коллектива во главе с Díaz Cosín [Novo et al., 2010, 2013, 2015a, 2015b, 2016; Díaz Cosín et al., 2011; Fernández et al., 2010, 2011a, 2011b, 2012, 2020;

De Sosa et al., 2017; Domínguez et al., 2018; Marchán et al., 2016, 2018a, 2018b, 2020a, 2020b, 2021a, 2021b, 2022; Jiménez Pinadero et al., 2021]. Средиземноморье – регион с высоким биоразнообразием, а относительная мягкость климатических изменений во время оледенений и межледниковий, присутствие множества географических барьеров и флуктуации уровня моря обеспечили крайне высокое разнообразие фауны дождевых червей и их генетическую изменчивость. Считается, что именно в этом регионе находились ледниковые рефугиумы семейства Lumbricidae, которое в настоящее время составляет основу фауны дождевых червей умеренных и высоких широт Голарктики.

В ходе проведенной данным коллективом работы было показано, что разделение на обособленные генетические группы у дождевых червей в Средиземноморье складывалось очень давно [Novo et al., 2012, 2015; Marchán et al., 2020b, 2021a, 2022; Jiménez Pinadero et al., 2022]. В частности, различия фаун востока и запада Иберийского полуострова были обусловлены существованием разделяющего их моря в меловом периоде, около 90 млн. лет назад. История расселения дождевых червей по островам Средиземного моря определялась мостами суши, которые формировались между материком и островами во время понижения уровня моря в кайнозой [Novo et al., 2015; Marchán et al., 2020b]. Из-за столь давнего времени дивергенции локальных фаун дождевых червей в этом регионе в настоящее время наблюдается очень высокая степень генетической изменчивости, с большим количеством новых видов и даже родов, выявляемых молекулярно-генетическими методами [Novo et al., 2009, 2010; Jiménez Pinadero et al., 2022].

Следует упомянуть и работы этой группы, посвященные широко распространенным перемещающимся видам. Так, одно из первых масштабных исследований было проведено Fernández и др. [Fernández et al., 2010, 2011a, 2011b, 2012] на *Aporrectodea trapezoides*. Этот вид считается партеногенетиком, и R. Fernández et al. [2010] продемонстрировали, что для разных его популяций характерна разная степень дегенерации мужской половой системы, от почти нормального развития до практически полного исчезновения. Была составлена

масштабная карта распространения филогенетических линий *A. trapezoides* и показано, что их можно подразделить на две группы – средиземноморскую с ограниченным ареалом и евросибирскую, расселившуюся по всему миру [Fernández et al., 2011a, 2011b, 2012]. Сходные результаты получены авторами и для родственного вида *A. rosea* [Fernández et al., 2016].

Ряд работ по филогеографии дождевых червей был проведен в Восточной и Юго-Восточной Азии. Анализ филогеографии группы *Metaphire formosae* (сем. Megascolecidae) [Chang, Chen, 2005; Chang et al., 2008; Shen et al., 2022], обитающей на Тайване и на островах Рюкю, показал, что для нее характерна высокая генетическая изменчивость, обусловленная историей формирования островов в результате столкновения Luzонской вулканической цепи с континентальной плитой, а время дивергенции между видами составляет от 2 до 8 млн. лет. Y. Minamiya et al. [2009] провели реконструкцию истории расселения *Metaphire sieboldi* по Японским островам. Филогеографический анализ вида *Pontodrilus longissimus* показал значительные различия между популяциями, обитающими на побережьях Андаманского моря и Сиамского залива полуострова Индокитай [Seesamut et al., 2019]. Опубликованы работы по филогеографии дождевых червей Тибетского плато [Yuan et al., 2019] и Филиппинских островов [Aspe, James, 2018]. Ряд статей посвящен изучению истории расселения переметрических восточноазиатских видов дождевых червей по территории Северной Америки [Chang et al., 2016, 2018; Schult et al., 2016; Moore et al., 2018].

### 1.4.3 Секвенирование транскриптомов дождевых червей

С развитием методов секвенирования нового поколения широкое распространение получило секвенирование транскриптомов, или RNA-Seq (RNA Sequencing) [Wang et al., 2009; Nagalakshmi et al., 2010]. Транскриптом – набор молекул РНК в клетке. Данные секвенирования транскриптомов могут использоваться как для функционального анализа (определения набора генов, экспрессирующихся в данных условиях, и связь их с фенотипическими

проявлениями), так и для извлечения набора последовательностей для филогении. Как правило, секвенируют только фракцию полиаденилированных и процессированных транскриптов, а из полученных данных извлекают только последовательности белок-кодирующих генов.

У метода RNA-Seq есть заметные плюсы: в отличие от секвенирования тотальной ДНК, где подавляющее большинство выявленных последовательностей будут некодирующими и в подавляющем большинстве случаев им не удастся найти гомологов в других геномах, при секвенировании поли-А мРНК будут получены данные преимущественно о белок-кодирующих генах, предполагаемые функции которых можно идентифицировать [Wen et al., 2015]. Сравнив транскриптомы нескольких родственных видов, можно найти гомологичные гены и на их основе исследовать филогенетические отношения.

Работы по секвенированию транскриптомов осложняются наличием паралогов, т.е. дублицированных генов, у одного или нескольких сравниваемых образцов. Это тем более актуально у дождевых червей, так как для них характерно широкое распространение полиплоидии. Тем не менее, проведение такого анализа возможно: считается, что при полиплоидии происходит относительно быстрая инактивация многих паралогов [Thomas et al., 2006; Buggs et al., 2012; Wen et al., 2015; Soltis et al., 2016]. При этом набор выявляемых при анализе транскриптов обогащен генами «домашнего хозяйства», для которых эта инактивация должна идти особенно быстро, т.к. сохранение паралогов этих генов, скорее всего, привело бы к неблагоприятным для клетки последствиям. На практике изучение филогенетических отношений при помощи транскриптомики проводится даже на таксонах высокого уровня, например, на насекомых с полным превращением (Holometabola) [Peters et al., 2014], моллюсках [González et al., 2015], Spiralia [Marlétaz et al., 2019] и Ecdysozoa [Borner et al., 2014].

Кроме того, используя транскриптомные данные, можно выявить различия в относительных количествах выявленных транскриптов, что отражает уровень экспрессии гена. Это может позволить показать не только качественные (ген

экспрессируется/не экспрессируется), но и количественные отличия между ними, и эти исследования находятся уже на стыке систематики и физиологии.

Транскриптомные работы на дождевых червях по большей части проводятся на хорошо изученных видах, служащих модельными организмами для экологии и экотоксикологии в лабораторных и экологических исследованиях. Самый популярный объект среди дождевых червей – *E. fetida* (и сестринский вид *E. andrei*). Для него собран ядерный геном [Paul et al., 2018a] и проведены работы по сборке транскриптома [Thunders et al., 2017], анализу транскриптома кишечника [Lee et al., 2005] и нервной трубки [Ponesakki et al., 2018]. Кроме того, для *E. fetida* проведены работы по выявлению и анализу генов иммунной системы [Mikami et al., 2015; Kim et al., 2020] и генов, участвующих в регенерации [Bhambri et al., 2017, 2018; Tao et al., 2019; Yang et al., 2019; Shao et al., 2020], а также исследования транскриптомного ответа на высокую концентрацию тяжелых металлов [Asensio et al., 2007; Chai et al., 2020], фунгицидов [Liu et al., 2020; Fang et al., 2021a], гербицидов [Liu et al., 2021; Li et al., 2022], акарицидов [Fang et al., 2021b], инсектицидов [Liu et al., 2018], наночастиц и ионов серебра [Novo et al., 2015], поллютантов и различных веществ, используемых в промышленности [Zhang et al., 2014; Mayilswami et al., 2016, 2017; Jiang et al., 2020]. Видно, что большинство из вышеперечисленных работ выполнены в последние три года, что связано с широким распространением и удешевлением метода.

Другие виды дождевых червей также становятся объектом изучения. В частности, собраны транскриптомы *Dendrobaena octaedra* [Paul et al., 2018b]. Транскриптомика использовалась для изучения реакции на антибиотики у *Metaphire guillelmi* [Zhao et al., 2022], регенерации у *Perionyx excavatus* [Cho et al., 2009] и *Eudrilus eugeniae* [Paul et al., 2021], генов, кодирующих феромоны, у представителей сем. Hormogastridae [Novo et al., 2013], устойчивости к обезвоживанию у *Carpetania matritensis* [Tilikj, Novo, 2022], ответа *Lumbricus rubellus* на ксенобиотики [Owen et al., 2008] и наночастицы серебра в среде [Roelofs et al., 2020].

Есть и несколько работ, в которых транскриптомы используются для изучения филогенетических отношений между дождевыми червями. F. E. Anderson et al. [2017b] секвенировали 38 транскриптомов представителей различных семейств дождевых червей. Было обнаружено, что все дождевые черви подразделяются на две большие клады, включающие, соответственно, семейства, характерные для Северного и Южного полушарий. Авторы связали эту дивергенцию с разделением Пангеи на два суперконтинента, произошедшим в конце триаса – начале юрского периода.

Транскриптомика использовалась и для решения более узких вопросов. Так, M. Novo et al. [2016] исследовали при помощи этого метода филогению семейства *Normogastridae* и реконструировали историю его расселения по Средиземноморскому региону.

#### 1.4.4 Анализ RADSeq

Кроме секвенирования транскриптомов существуют и другие методы получения данных с использованием ядерных геномов. RADSeq расшифровывается как «Restriction site associated DNA sequencing», секвенирование ДНК, ассоциированной с сайтами рестрикции. Как видно из названия, этот метод нацелен на секвенирование последовательностей, располагающихся в геноме вблизи сайтов рестрикции. В результате секвенирования этих последовательностей у набора образцов можно получить набор локусов; поскольку многие из сайтов рестрикции в геноме будут консервативными, большая часть из получаемого набора локусов будут ортологичными. Эти ортологичные локусы затем можно использовать для различных типов анализа.

Существует целый ряд методов описываемого класса. Сам термин RADSeq изначально обозначал конкретную методику, описанную в статье N. A. Baird et al. [2008]. Другое часто используемое название этой группы методов, GBS, Genotyping-by-sequencing, или генотипирование путем секвенирования, также

изначально обозначало лишь конкретную модификацию метода [Narum et al., 2013].

Общим для всех методов данной группы является то, что в качестве матрицы берется геномная ДНК относительно хорошего качества (с большими средними длинами молекул) и подвергается рестрикции. Затем к полученным фрагментам лигируют адаптеры. В методе RADSeq [Baird et al., 2008] ДНК разрезают рестриктазой и проводится лигирование первого адаптера, содержащего участки для посадки праймеров для амплификации и секвенирования, а также баркод длиной 4–5 п.н., к полученным сайтам рестрикции. Затем идет этап механической фрагментации для уменьшения размера и отбора фрагментов нужной длины. К полученным фрагментам лигируют второй адаптер, т.н. Y-адаптер, содержащий неспаренные участки. При амплификации обратный праймер может связаться только с теми последовательностями, которые были достроены с праймера первого адаптера. После амплификации остаются фрагменты, содержащие исходный сайт рестрикции.

В методе GBS [Elshire et al., 2011] ДНК разрезают рестриктазой и к обоим концам фрагментов лигируют адаптеры с сайтами посадки праймеров и баркодами. Затем проводят ПЦР и оценку длины получившихся фрагментов. В ходе ПЦР преимущество получают фрагменты небольшой длины, в связи с чем в этом методе отсутствует этап селекции по размеру (поскольку длина прочтения методов NGS невелика, при получении библиотек стараются ограничить длину фрагмента длиной прочтения). Если распределение фрагментов по размеру соответствует ожидаемому, полученные библиотеки берут для секвенирования.

Еще один из наиболее популярных методов, ddRADSeq (double digest RADSeq) [Peterson et al., 2012] использует не одну, а две рестриктазы. Они подбираются таким образом, чтобы обеспечить нужное количество и длину фрагментов. К полученным фрагментам лигируют адаптеры, содержащие баркоды. Затем проводят отбор фрагментов нужного размера, ПЦР и секвенирование. Подход ddRADSeq, по мнению авторов метода, имеет ряд преимуществ перед вышеперечисленными протоколами: меньшую стоимость, менее строгие



требования к количеству ДНК и большее число получаемых ортологичных локусов.

В другой модификации метода, 2b-RAD [Wang et al., 2012; Guo et al., 2014] применяют рестриктазы класса IIВ, которые разрезают ДНК по обе стороны сайта связывания с образованием продукта фиксированной длины. Так, рестриктаза *BsaXI* образует фрагменты длиной 27 п.н. с липкими концами длиной 3 нуклеотида. Рестриктаза *AlfI* образует фрагменты длиной 36 п.н. с тупыми концами. Полученные фрагменты, хотя они и довольно короткие, могут быть успешно использованы для поиска полиморфных последовательностей.

Предложено множество иных модификаций данного метода, таких, как Sequence-Based Genotyping (SBG) [Truong et al., 2012], Complexity reduction of polymorphic sequences (CRoPS) [Van Orsouw et al., 2007], Reduced Representation Libraries [Van Tassel et al., 2008; Greminger et al., 2014], ezRAD [Toonen et al., 2013], Multiplexed Shotgun Genotyping (MSG) [Andolfatto et al., 2011] и многие другие. Все они различаются деталями экспериментального протокола, используемыми ферментами рестрикции, способами отбора по длине фрагментов и другими нюансами.

Методы RADSeq довольно популярны. Во-первых, как сказано выше, при их помощи можно быстро и относительно дешево получать наборы из сотен и тысяч ортологичных локусов для анализа, причем как для видов с известными референсными геномами, так и для тех, для которых нет вообще никакой геномной информации. Еще один плюс этого класса методов – при достаточном покрытии чтения можно реконструировать аллельные наборы для изучаемых локусов. Таким образом, в отличие от обычного секвенирования ядерных локусов по Сэнгеру или анализа транскриптомов, можно получить набор менделевских аллелей для каждого локуса.

Очевидно, что количество выявляемых ортологичных локусов будет тем выше, чем ближе родство изучаемых организмов. В связи с этим, а также с возможностью реконструкции отдельных аллелей, наибольшее применение методы RADSeq нашли в популяционной генетике и смежных областях. Очевидно,

что с увеличением времени дивергенции информативность метода будет падать. Во-первых, могут возникнуть замены в самих сайтах рестрикции, из-за чего секвенируемые локусы у членов выборки будут не совпадать. Во-вторых, сами секвенируемые участки могут дивергировать настолько, что не будут опознаны как гомологичные. В-третьих, они могут пройти дупликацию, и включение получившихся паралогов в анализ может привести к результатам, не отражающим реальную картину.

Тем не менее, методы RADSeq могут быть применены и для анализа филогенетических отношений. Так, M. Cariou et al. [2013] оценили пригодность данного метода для анализа филогении рода *Drosophila* in silico. Поскольку филогенетические отношения в данном роде уже были реконструированы множеством разных методов, в том числе основанных на полногеномных наборах данных, было возможно провести оценку полученных результатов [Tamura et al., 2004]. Время дивергенции между сравниваемыми видами дрозофил в работе M. Cariou et al. [2013] варьировало от 5 до 63 млн. лет. Соответственно, из имеющихся у *D. melanogaster* 2948 сайтов рестрикции Sbf1 у наиболее близкородственных видов присутствовало около половины. С наиболее же далекими родственниками общими были только около 5% сайтов, т.е. около 140–150. Тем не менее, авторы заключили, что разрешения анализа на полученной выборке достаточно для надежной реконструкции ожидаемых филогенетических отношений.

На дождевых червях был проведен ряд исследований, использующих описанные методы. Так, для *L. rubellus* была опубликованы статьи [Giska et al., 2015; Anderson et al., 2017], в которых проводили оценку степени дивергенции ядерного генома разных филогенетических линий и возможность скрещивания между ними (Раздел 1.5.9). Сходная работа была проведена и для азиатского таксона *Amyntas* YN2017 sp. [Yuan et al., 2020]. Кроме того, H. Liu et al. [2020] получали данные RADSeq для вида *Drawida ghisti* Michaelsen, 1931 с целью разработки микросателлитных маркеров на основе полученных последовательностей.

## 1.5 Исследованные виды дождевых червей

### 1.5.1 *Eisenia nordenskioldi*

Представители *Eisenia nordenskioldi* были впервые собраны в 1875–1876 гг. А. Э. Норденшельдом в ходе его экспедиции по исследованию Северо-Восточного прохода. Норденшельд отправил собранные образцы дождевых червей своему соотечественнику А. Г. Эйзену, который работал в Калифорнийской академии наук. Ряд образцов с о. Вайгач и нескольких точек побережья Енисея Эйзен описал как новый вид *Allolobophora nordenskioldi* [Eisen, 1879].

Последующие экспедиции значительно расширили ареал этого вида. К 1970-м гг. считалось, что он включает в себя не только азиатскую часть России, Урал и большую часть Восточно-Европейской равнины [Малевич, 1954; Соколов, 1956], но и горы Средней Азии [Perel, 1969; Перель, 1979], Крым [Малевич, 1962] и Кавказ [Michaelsen, 1910]. Все авторы отмечали большую морфологическую изменчивость вида, в частности, по окраске. И. И. Малевич [1956] впервые описал непигментированную форму *E. nordenskioldi* в образцах из долины р. Иман (сейчас – р. Большая Уссурка) в Приморье. Он отмечал, что, хотя на поверхностный взгляд кажется, что у данных особей пигментация отсутствует полностью, слабая красноватая пигментация видна в передних сегментах тела при их разрезании. По диагностическим признакам также наблюдалась заметная изменчивость. В дальнейшем форма *pallida* была выделена как подвид *E. n. pallida* Malevič, 1956 [Всеволодова-Перель, 1997].

В связи с описанной выше большой морфологической изменчивостью, кроме вышеупомянутой *E. n. pallida*, из *E. nordenskioldi* было выделено еще несколько отдельных таксонов. Кавказский подвид *E. nordenskioldi lagodechiensis* Michaelsen, 1910 был выделен в отдельный вид *E. lagodechiensis* (Michaelsen, 1910) [Перель, 1979]. Среднеазиатские популяции *E. nordenskioldi* были отнесены к видам *E. acystis* (Michaelsen, 1903) и *E. polyapillata* (Perel, 1969). Кроме того, был признан новый вид *E. atlavinyteae* Perel et Graphodatsky 1984 [Перель, Графодатский, 1984].

Приведенный выше взгляд на таксоны – позиция, принятая российскими учёными вслед за Всеволодовой-Перель. Западные исследователи в пределах *E. nordenskioldi* выделяют до девяти подвигов, не во всём принимая изменения, внесённые Т.С. Всеволодовой-Перель [Blakemore, 2013].

Схематический ареал номинативного подвида показан на рисунке 1.5.1.1. На севере он встречается на некоторых полярных островах: Вайгач, Южный остров Новой Земли, Большой Ляховский, Врангеля. На юге он распространён до Кореи [Hong, Csuzdi, 2016], северо-востока Китая (*E. nordenskioldi* f. *manshurica* [Kobayashi, 1940]), Монголии [Blakemore, 2013] и Казахстана [Перель, 1979; Абуkenова, 2008; Abukenova, 2010].

В азиатской части России *E. n. nordenskioldi* доминирует, часто являясь единственным видом в биотопе. На Урале он становится более редким, частично замещаясь *E. uralensis* и *Perelia diplotetradheca*. К западу от Урала *E. n. nordenskioldi* становится более редким [Всеволодова-Перель, 1997]. В связи с этим, случаи обнаружения этого подвида на западных границах России, а также в Белоруссии и Украине, единичны. Ниже перечислены крайние точки западной границы ареала:

- горы Крыма [Малевич, 1962; Пышкин, 1986; Пышкин, Гладченко, 2016];
- равнины левого берега Днепра [Гиляров, 1953; Перель, 1979; Жуков и др., 2007];
- окрестности г. Чериков, Могилёвская область Белоруссии [Сямёнава, Анісімава, 1992];
- Хибин, Мурманская область [Zenkova, Rapoport, 2013];
- Югорский полуостров [Всеволодова-Перель, 1997];
- остров Вайгач [Eisen, 1879];
- низовья Волги и Дона [Малевич, 1976; Кошманова, Лозовская, 2013].

Не все из вышеприведённых точек можно считать надёжными. Особенно это справедливо для тех точек, для которых известны лишь единичные находки, например, г. Чериков (Р. Беларусь) и Хибин. По нашему мнению, для образцов из этих точек необходим молекулярно-генетический анализ для подтверждения видовой принадлежности.

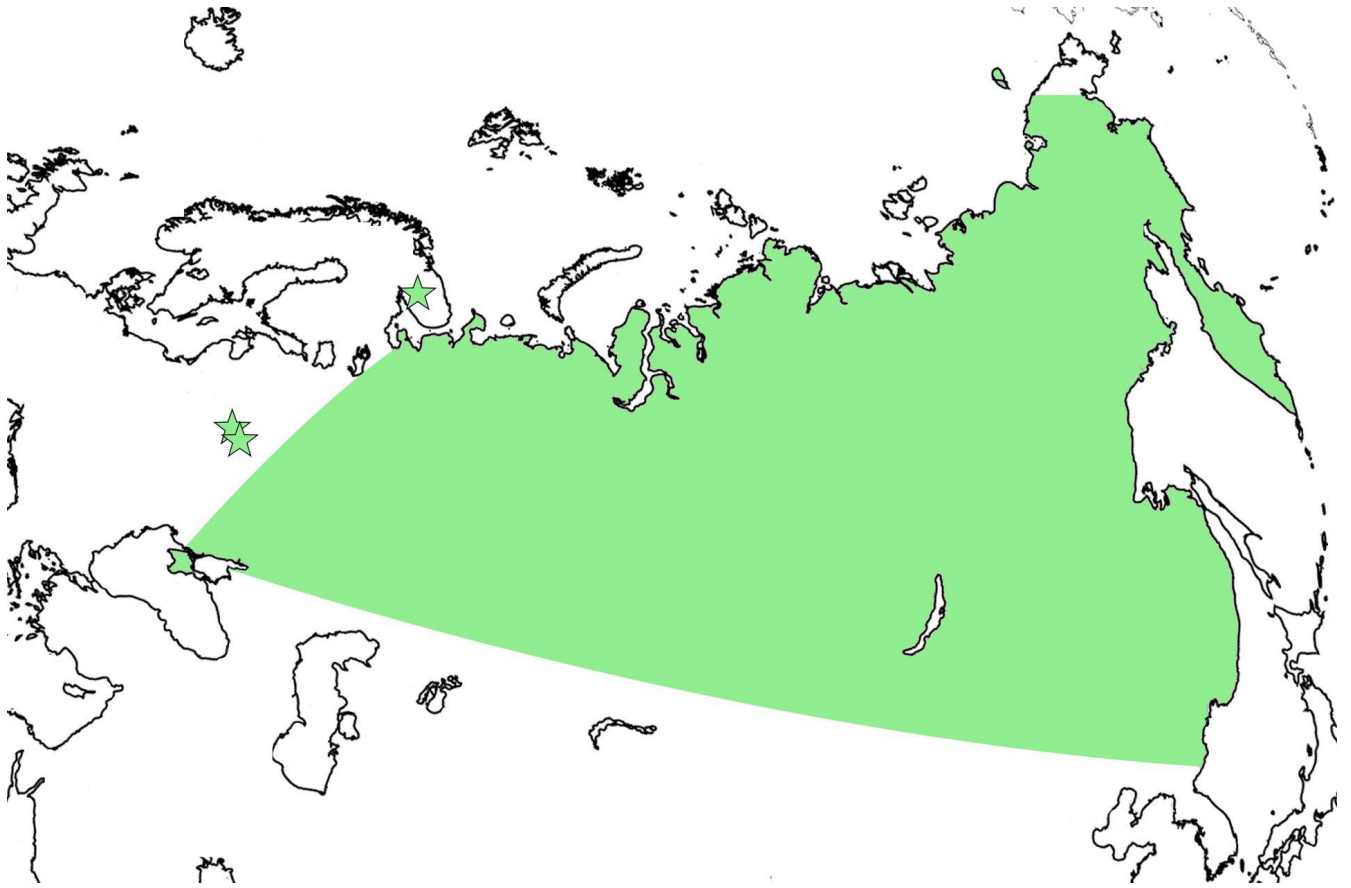


Рисунок 1.5.1.1. Ареал *E. n. nordenskioldi*, построенный по литературным данным с привлечением большинства литературных источников. Западная и южная границы проведены приблизительно, по имеющимся фрагментарным данным о находках этого таксона. Звездочками отмечены крайние западные точки обнаружения таксона.

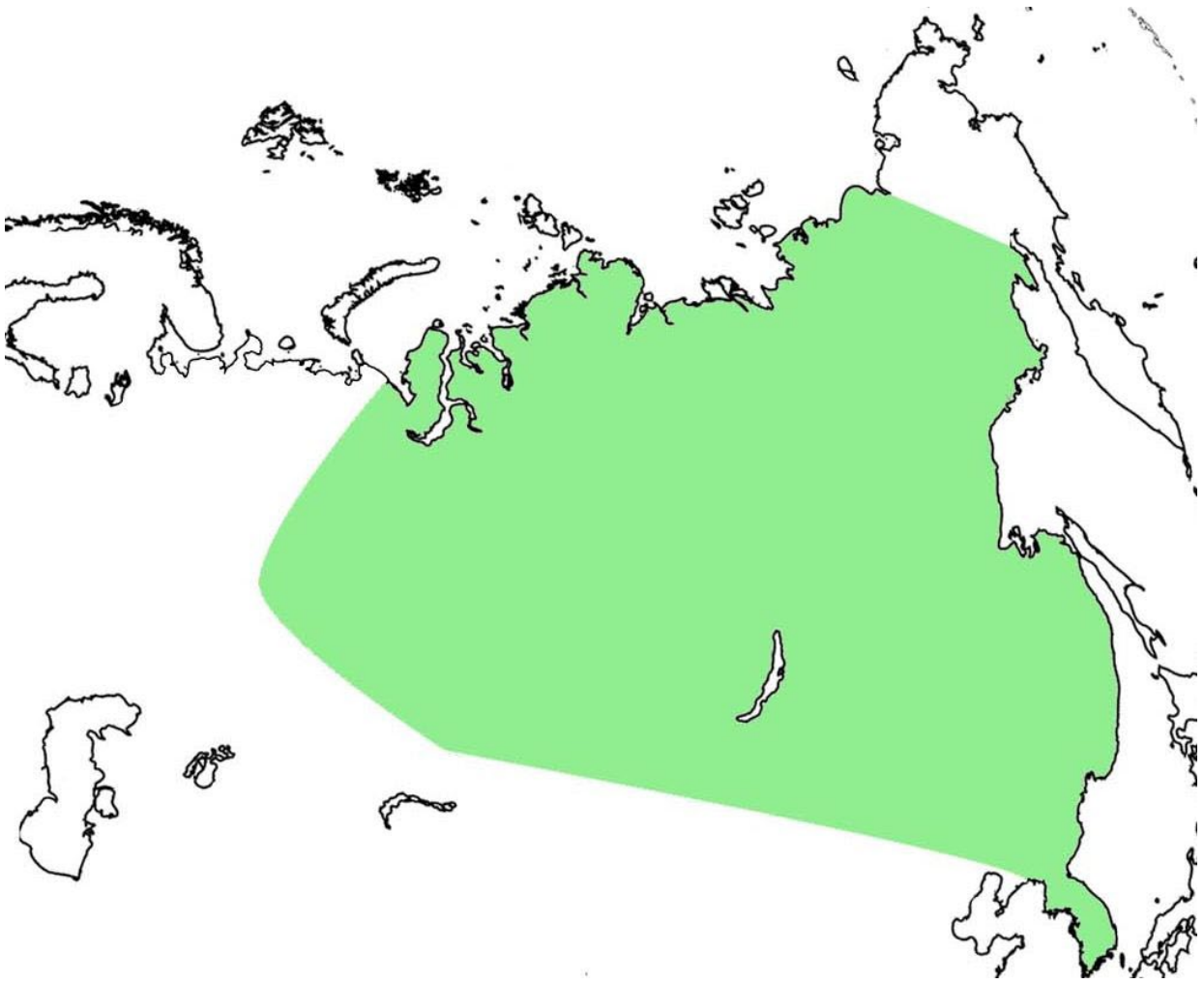


Рисунок 1.5.1.2. Ареал *E. n. pallida*, построенный по литературным данным. Западная и южная границы проведены приблизительно, по имеющимся фрагментарным данным о находках этого таксона.

В таёжной зоне Европейской части России *E. n. nordenskioldi* найден в Республике Коми [Крылова, Акулова, 2011; Гераськина, 2016а; Акулова и др., 2017; Колесникова и др., 2023], Пермской области [Баскина, Фридман 1928; Воронова 1971 – цит. по Перель 1979], Архангельской области и Ненецком Автономном Округе (сборы О.Л. Макаровой). В зоне смешанных лесов *E. n. nordenskioldi* указан в республиках Марий Эл и Татарстан [Алейникова 1972 – цит. по Перель, 1979]; Нижегородской (Ветлужская низина), Московской и Владимирской (р. Клязьма) областях [Гельцер 1963 – цит. по Перель 1979] и Калужской области (заповедник Калужские Засеки) [Шашков, 2003]. Сообщения об обнаружении *E. n. nordenskioldi* в дубравах известны для Курской (Центрально-Чернозёмный заповедник) и

Белгородской областей [Перель, 1979], Воронежской области (Теллермановское лесничество) [Малевиц, Перель, 1958], Республики Чувашия [Алейникова, 1969 – цит. по Перель, 1979].

В европейской части России *E. n. nordenskioldi* распространен довольно широко, однако его встречаемость уменьшается с востока на запад: если в степях Башкирии он считается наиболее широко распространенным червем [Малевиц, 1954], то в более западных районах есть лишь единичные находки. В Азиатской части России *E. n. nordenskioldi*, как считается, встречается повсеместно до побережья Северного Ледовитого и Тихого океанов, включая Камчатку [Перель, 1979; Стриганова, Порядина, 2005]. Восточная граница его находится на Чукотском полуострове, но где – точно неизвестно. Крайняя точка на Чукотке, откуда нами проанализирован материал – посёлок Марково (наши данные).

Южная граница распространения *E. n. nordenskioldi* также неясна. Места обнаружения этого вида отмечены в Центральном Казахстане [Абукенова, 2008], российской и казахстанской частях Алтая [Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997]. В Монголии этот подвида найден в аймаках Сэлэнгэ и Уланбатор [Перель, неопубликованные данные], Дадал [Blakemore, 2013]. О представителях *E. nordenskioldi* в Китае известно немного: для темноокрашенной формы *E. nordenskioldi f. manshurica* отмечены три точки: Цзиньчжоу (Ляонин), Аньшань (Ляонин) и Муданьцзян (Хэйлунцзян) [Kobayashi, 1940 – цит. по Blakemore, 2013]. Пожалуй, самая южная точка, с которой есть достоверные находки вида – остров Чеджудо (Южная Корея) [Hong, Csuzdi, 2016].

Наиболее полные сведения об ареале *E. n. pallida* изложены Т. С. Всеволодовой-Перель и А. Н. Лейрих [2014]. Можно отметить (Рисунок 1.5.1.2), что он более ограничен по сравнению с ареалом номинативного подвида: к берегам Северного Ледовитого океана *E. n. pallida* приближается лишь по долине Енисея [Рыбалов, 2002; Рыбалов, Воробьёва, 2002], в то время как в низовьях Оби, Лены и на Чукотке он не встречается. Наиболее северная точка распространения таксона – около пос. Потапово (69° с.ш.), в лесотундре [Рыбалов, 2002]. Нет его также ни в Европейской части России, ни на Урале; западная граница ареал подвида, по

мнению Т. С. Всеволодовой-Перель и А. Н. Лейрих [2014], находится в долине Тобола в Курганской области.

На юге Приморья и Западной Сибири *E. n. pallida* – доминирующий таксон [Гиляров, Перель, 1973; Курчева, 1977; Всеволодова-Перель, Лейрих; 2014]. За пределами России В. С. Абуkenова [2010] указывает находки для Центрального Казахстана, однако наши данные (Глава 3.2) указывают на то, что это сообщение может быть ошибочным. Непигментированные особи, подходящие под диагноз *E. nordenskioldi*, встречаются в Северной и Южной Корее [Zicsi, 1972 – цит. по Всеволодова-Перель, Лейрих, 2014; Hong, Csuzdi, 2016], вплоть до острова Чеджудо и некоторых других островов в Восточно-Китайском море. Это может оказаться самой южной точкой, до которой доходит *E. nordenskioldi*.

### 1.5.2 *Dendrobaena schmidti*

*Dendrobaena schmidti* (Michaelsen, 1907) – кавказский эндемик, который во многих биотопах является доминантным видом. Вид был описан Михаэльсеном [Michaelsen, 1907], который отмечал его морфологический полиморфизм – присутствие пурпурных и неокрашенных форм. Широко варьируют и размеры тела, от 35 до 160 мм, причем мелкие и крупные, окрашенные и неокрашенные формы часто встречаются симпатрично. Всеволодова-Перель [Перель, 1966] выделила из *D. schmidti* непигментированную форму как партеногенетический подвид *D. schmidti tellermanica*. Данный подвид имеет гораздо больший ареал, выходящий далеко за пределы Кавказа. Впоследствии были найдены популяции *D. s. tellermanica* со зрелыми сперматозоидами и сперматофорами, в связи с чем в 2003 г. Т. С. Всеволодова-Перель вынесла этот подвид в отдельный вид *D. tellermanica* [Всеволодова-Перель, 2003].

Э. Ш. Квавадзе [1985] разделил *D. schmidti* на восемь подвидов. В их число входят: ранее описанные *D. s. schmidti* и *D. s. tellermanica*; две формы, описанные Михаэльсеном – *D. s. surbiensis* и *D. s. montana* и четыре новых подвида – *D. s. colchica*, *D. s. marinae*, *D. s. malevichi* и *D. s. jaloniensis*. Основанием для разделения



были изменчивость в окраске, различия в количестве пар семенных пузырьков, положение пубертатных бугорков. Впоследствии к диагностическим признакам Квавадзе добавил форму двигательных и половых щетинок, установленную при помощи сканирующей электронной микроскопии [Квавадзе, 1985; Kvavadze et al., 2007]. Правомерность выделения этих подвидов оспаривалась, так как различие в диагнозах подвидов было весьма небольшим (за исключением окраски) [Всеволодова-Перель, 2003]. К спорным родственным таксонам можно отнести и возможного родственника комплекса *Dendrobaena baksanensis* Pizl 1984 [Pizl 1984].

И. Б. Рапопорт [2011] разделила *D. schmidtii* на три экологические формы: подстилочную, почвенно-подстилочную и почвенную. При этом различия в условиях обитания этих форм отражаются в их размерах, окраске и форме тела. Кроме того, некоторая специфика отмечена и по другим диагностическим признакам: положению пояска и щетинок пучка ab на папиллах.

Вполне вероятно, что и *D. schmidtii* может быть группой видов. Разграничение их затруднено отсутствием четких морфологических отличий и возможной географической изменчивостью; результаты разных авторов зависят от изученной популяции и использованных методов. Т. С. Всеволодова-Перель [Перель, 1982] предположила, что различия между формами могут обуславливаться разной ploidy. В то же время, по данным N. G. Bakhtadze et al. [2003, 2005], число хромосом у разных подвидов *D. schmidtii* одинаково,  $2n=36$ , в то время как *D. tellermanica* – тетраплоид ( $4n=72$ ).

### 1.5.3 *Perelia diplotetratheca*

Отличительная черта рода *Perelia* среди сем. Lumbricidae – анатомический признак, форма нефридиальных пузырей: они образуют петлю у выхода в нефридиопору. Т. С. Всеволодова-Перель [Перель, 1976] назвала этот род *Svetlovia* в честь эмбриолога П. Г. Светлова, известного работами, в том числе, и по дождевым червям. Однако оказалось, что данное название уже было присвоено О.

В. Чекановской роду водных олигохет (*Svetlovia Chekanovskaya*, 1975), в связи с чем E. G. Easton [1983] присвоил этому роду имя самой Тамары Семеновны Перель.

В России обитают только два вида этого рода, *P. tuberosa* и *P. diplotetratheca*. Они считаются уральскими эндемиками [Всеволодова-Перель, 1997]. По мнению некоторых ученых [Csuzdi, Pavlíček, 2005], *P. diplotetratheca* не относится к роду *Perelia* и может быть выделен в отдельный род.

Несмотря на возможную принадлежность к другому роду, *P. diplotetratheca*, по-видимому, экологически близок к *E. n. nordenskioldi*. В некоторых лесных биотопах этот вид доминирует, подобно *E. n. nordenskioldi* в Сибири; иногда наблюдается замена одного вида другим на длинных временных промежутках.

По данным Е. В. Головановой (личное сообщение), в окрестностях Среднеуральского медеплавильного завода (Свердловская область, г. Ревда) обитают формы *P. diplotetratheca* с различной степенью пигментации. В импактной зоне дождевых червей обнаружено не было. На площадке, расположенной в 4 км от завода, *P. diplotetratheca* представлен только непигментированными особями. По мере удаления от завода растёт и число окрашенных особей, и степень их окраски: в 5 км от завода неокрашенных червей около 15% от общего количества; в 7 км – не более 5%; на контрольной площадке (30 км от СУМЗ) непигментированные особи *P. diplotetratheca* отсутствуют.

#### 1.5.4 *Drawida ghilarovi*

Южная часть Дальнего Востока России относится к Маньчжурской (Маньчжуро-Китайской) подобласти Палеарктики. Фауна дождевых червей этого региона отличается от сибирской. В частности, здесь встречается единственный обитающий в России вид семейства Moniligastridae, *Drawida ghilarovi* Gates, 1969 [Гейтс, 1969], и регион, таким образом, представляет собой самую северную часть ареала семейства, простирающегося на юг вплоть до побережья Индийского океана [Всеволодова-Перель, 1997; Ганин, 2017].

*D. ghilarovi* был описан по морфе серого цвета, однако вскоре были обнаружены морфы других цветов: черная, коричневатая, зеленовато-голубая, голубовато-серая, коричнево-голубая и т.д. [Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997; Ганин, 1997; Берман и др., 2010; Ганин и др., 2012]. Эти морфы различаются и экологически: черные обитают в лугово-болотных пойменных биотопах с лугово-глеевыми или торфяными почвами, другие формы живут в лесах [Ганин, 2013; Ганин и др., 2014].

Г. Н. Ганин с соавторами изучали феномен морф *D. ghilarovi* при помощи различных методов. Исследования хромосомных чисел [Ганин и др., 2014; Ganin et al., 2014; Anisimov et al., 2015] показали, что все изученные формы дравиды имеют одну и ту же ploidy (2n=20) и приблизительно одинаковые размеры генома (2c=2.2 пг). Секвенирование ДНК черной, серой и коричневой морф *D. ghilarovi* продемонстрировало, что отношение между ними неоднозначны. Вид действительно разделился на несколько ветвей (филогенетических линий) [Atopkin, Ganin, 2015], однако ни одна из цветовых форм не была монофилетичной [Ganin, Atopkin, 2018].

Позднее эта же группа авторов выделила из *D. ghilarovi* ряд новых видов: *D. ganini*, *D. changbaishanensis*, *D. ofunatoensis*, а также несколько десятков филогенетических линий, которые они предполагают описать позднее [Ganin et al., 2016; Ганин, 2018; Zhang et al., 2020]. Следует отметить, что все исследования Ганин и др. проводили на ряде митохондриальных генов, а степень различий между ядерными геномами этих групп они не оценивали.

### 1.5.5 Комплекс *Aporrectodea caliginosa*

*Aporrectodea caliginosa* – один из самых широко распространённых и часто встречающихся видов как на территории России, так и Западной Европы. Он самый многочисленный на большинстве сельскохозяйственных и антропогенно нарушенных земель в Европейской части России, за исключением самых северных районов, и на юге Сибири. Кроме того, *A. caliginosa* встречается и часто

доминирует в естественных местообитаниях – в широколиственных и смешанных лесах, лугах, поймах рек.

Таксономия вида сложна. Выделяют группу из четырёх близкородственных видов, так называемый комплекс *A. caliginosa*: *A. caliginosa* Savigny, 1826, *A. trapezoides* Dugés (1828), *A. nocturna* (Evans, 1946) и *A. tuberculata* (Eisen, 1874) [Gates, 1972; Perèz-Losada et al., 2009]. Первоначально W. Michaelsen [1900], признавал близость этих четырёх таксонов, но выделил первые два как подвиды *A. caliginosa caliginosa* и *A. c. trapezoides*, а остальные свёл в синонимы. G. E. Gates [1972] вновь разделил эти виды. *A. caliginosa* и *A. trapezoides* внешне очень близки, за исключением пигментации (*A. caliginosa* непигментирован, в то время как *A. trapezoides* имеет бурую пигментацию) и формы пубертатных валиков. *A. nocturna* также пигментирован, отличается крупными размерами и присутствием щетинок на 12-ом сегменте. *A. tuberculata* пигментирован и отличается от *A. trapezoides* формой пубертатных валиков. Различение этих видов затруднено тем, что встречаются все возможные промежуточные морфологические формы между ними [Briones, 1996]. До сих пор не выработано консенсусного мнения по этому вопросу, однако, в целом, виды *A. caliginosa* и *A. trapezoides* считаются «надёжными» видами, в то время как валидность *A. tuberculata* и *A. nocturna* подвергается сомнению [Briones, 1996]. На территории России встречаются первые два таксона; в отечественной литературе их считают подвидами, т.е. *A. caliginosa caliginosa* и *A. c. trapezoides* [Всеволодова-Перель, 1997]. *A. trapezoides* обитает в южных районах Европейской части России и более адаптирован к степным биотопам [Всеволодова-Перель, 1997].

Молекулярно-генетические исследования прояснили проблему систематики лишь отчасти. M. Perèz-Losada et al. [2009] исследовали филогению комплекса при помощи ядерного гена 28S рРНК и нескольких митохондриальных генов. Авторы сделали следующие выводы: все изученные виды действительно различаются между собой по последовательностям ДНК. *A. caliginosa* и *A. trapezoides* были монофилетичными, но при этом отличались большой генетической изменчивостью и включали в себя по несколько филогенетических линий. В пределах комплекса

выделялись две группы: в одну из них входили *A. caliginosa* и *A. tuberculata*, в другую – *A. trapezoides*, *A. nocturna*, а также норник *A. longa* (Ude, 1826), который, однако, по морфологии хорошо отличается от всех видов комплекса *A. caliginosa*. Кроме того, авторы открыли два потенциальных новых вида, обитающих на Корсике и внешне похожих на *A. trapezoides* и на *A. caliginosa*, соответственно, однако сильно отличающихся от них генетически.

R. Fernández et al. [2012] провели сходный анализ комплекса при помощи ядерных генов 28S рРНК и гистона H3, а также митохондриальных генов *cox1* и *cox2*. Разделение комплекса на две группы, показанное M. Perèz-Losada et al. [2009], подтвердилось. *A. caliginosa*, однако, оказался парафилетичен по отношению к *A. tuberculata*. *A. trapezoides* разделился на две ветви, названные авторами евросибирской и средиземноморской. В первую вошла также группа, включающая в себя *A. longa*, *A. nocturna* и *A. giardia* (Ribaucourt, 1901), причём первый вид был парафилетичен по отношению к остальным двум. Средиземноморская же линия, кроме нескольких филогенетических линий *A. trapezoides*, включала в себя ряд средиземноморских видов дождевых червей: *Nicodrillus monticola* Ontenienta et Babio, 2002, *N. tetramammalis* Ontenienta et Babio, 2002 и *N. carochensis* Ontenienta et Babio, 2002. Время дивергенции всех видов, входящих в комплекс, по данным авторов, приходится на плиоцен – конец миоцена.

Известно, что *A. caliginosa* – диплоид с  $2n=36$ , а *A. trapezoides* – триплоид с  $3n=54$  [Muldal, 1952; Casellato, 1987]. Кроме того, считается, что *A. caliginosa* характеризуется амфимиктичным размножением, а *A. trapezoides* – партеногенетическим [Gates, 1972; Bart et al., 2018]. Накладывая эти данные на филогенетическое дерево, R. Fernández et al. [2012] и I. de Sosa et al. [2017] заключили, что полиплоидия и партеногенез возникали в ходе эволюции комплекса несколько раз.

О высокой изменчивости способов размножения и возможности быстрой эволюции этого признака свидетельствует другая работа этой же группы исследователей [Fernández et al., 2011a]. Изучение морфологии и гистологии сперматек у животных в пяти популяциях *A. trapezoides* из Испании и Франции

показало, что у особей в трёх популяциях зрелые сперматозоиды отсутствовали полностью, а сперматогенез был абберрантным, не доходившим до финальных стадий. В одной популяции сперматозоиды присутствовали, однако активно разрушались после образования. Наконец, животные одной из популяций *A. trapezoides* отличались полным сперматогенезом и присутствием большого количества функциональных сперматозоидов в сперматеках. Таким образом, даже такой важный биологический признак оказывается крайне пластичным.

Для *A. trapezoides*, проведено детальное изучение филогеографии [Fernández et al., 2011b, 2013, 2016]. Как указано выше, вид разделился на две крупных линии, средиземноморскую и евросибирскую. Дивергенция эта произошла, по-видимому, на востоке Иберийского полуострова 5–26 млн. лет назад [Fernández et al., 2016]. средиземноморская линия не вышла за пределы одноимённого региона, в то время как евросибирская расселилась по Земному шару.

Генетическое разнообразие *A. caliginosa* в России ко времени начала нашей работы практически не было исследовано. Изучение генетического разнообразия вида в Республике Коми, вблизи пос. Водный в почве, загрязнённой радионуклидами и тяжёлыми металлами [Rybak et al., 2020], выявили три филогенетические линии. Однако эта работа проводилась методом AFLP, результаты которого, к сожалению, нельзя сравнивать напрямую с данными работ по секвенированию ДНК. Существует также работа по генетическому разнообразию *A. caliginosa* в Чернобыльской зоне отчуждения [Newbold et al., 2019], однако ее авторы не изучали количество филогенетических линий в собранной выборке, ограничившись лишь молекулярно-генетической верификацией видовой принадлежности и сравнением выборок из импактной и буферной зон методом AFLP.

### 1.5.6 *Aporrectodea rosea*

*Aporrectodea rosea* (Savigny, 1826) относится к группе собственно почвенных червей. Он широко распространён в Западной Европе [Fernandez et al., 2016],

встречается в естественных биотопах Восточно-Европейской равнины, на Кавказе [Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997; Рапопорт, 2010]; на периферии ареала (на севере и востоке Восточно-Европейской равнины) приурочен к антропогенным биотопам и поймам рек. По-видимому, *A. rosea* экологически близок к *A. caliginosa*, однако встречается в меньшем числе точек и имеет в среднем заметно более низкую численность.

Для *A. rosea* описаны расы с 36, 54, 72, 90, 108 и 144 хромосомами [Muldal, 1952; Casellato, 1987; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008; Vlasenko et al., 2011]. Раса с 36 хромосомами предположительно диплоидная, остальные – полиплоиды. Размеры тела практически не зависят от числа хромосом [Vlasenko et al., 2011]. Считается, что раса с 36 хромосомами и некоторые расы с 72 и 108 хромосомами предположительно амфимиктичны [Всеволодова-Перель, Булатова, 2008].

Первые работы по генетической изменчивости *A. rosea* основывались на изоферментах и проводились на территории Финляндии [Terhivuo, Saura, 1993] и Украины [Vlasenko et al., 2011]. Из-за ограничений метода получаемые результаты интерпретировались в количестве “клонов” и их относительной частоте, но родственные отношения между “клонами” проследить при помощи данного метода невозможно. В украинской выборке среди 224 образцов выявлено 96 “клонов”. По мнению авторов [Vlasenko et al., 2011], генетическая изменчивость *A. rosea* гораздо выше, чем можно ожидать для партеногенетических популяций, что, вероятно, свидетельствует в пользу преобладания амфимиктического размножения над партеногенезом.

Первые работы по ДНК-штрихкодированию показали, что для *A. rosea* характерно наличие множества филогенетических линий: R. A. King и др. [King et al., 2008;] обнаружили три линии, D. Porco et al. [2013] – четыре. Эти линии зачастую встречались симпатрично, хотя среднее количество нуклеотидных различий между гаплотипами было высоким – 12,35% [King et al., 2008].

R. Fernandez et al. [2016] провели детальное исследование филогеографии вида на территории Западной Европы. Они показали, что в целом вид разделяется на две ветви, которые авторы назвали евросибирской и средиземноморской. Первая

встречается повсеместно, к ней же относятся четыре линии, описанные R. A. King et al. [2008] и D. Porco et al. [2013]; вторая приурочена исключительно к Средиземноморью. Согласно палеогеографическим реконструкциям авторов, эти две линии разошлись в районе, находящемся между Корсикой и Балеарскими островами, в то время, когда эта территория была сушей.

В какой мере филогенетические линии соотносятся с хромосомными расами, неизвестно. Проведённые кариологические работы [Muldal, 1952; Casellato, 1987; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008; Vlasenko et al., 2011], судя по точкам сбора, проводились почти исключительно на евросибирской линии. Изоферментный анализ [Vlasenko et al., 2011] показал, что между хромосомными расами наблюдаются значительные различия, но эти данные пока неинформативны из-за сложности интерпретации изоферментных данных и невозможности их соотнесения с информацией о последовательностях ДНК.

### 1.5.7 *Octolasion tyrtaeum*

*Octolasion tyrtaeum* (Savigny, 1826) – перекрестный вид, широко расселившийся по Голарктике [Tiunov et al., 2006; Hendrix et al., 2008]. Этот вид в отечественной литературе обычно называют *Octolasion lacteum* (Örley, 1885). В отличие от большинства собственно почвенных перекрестных видов он, как правило, не встречается в антропогенно нарушенных местообитаниях [Tiunov et al., 2006]. Считается, что *O. tyrtaeum* предпочитает влажные биотопы, почвы, богатые органикой и кальцием [Всеволодова-Перель, 1997].

Часто встречается утверждение, что *O. tyrtaeum* сумел успешно расселиться благодаря способности к партеногенетическому размножению [Всеволодова-Перель, 1997]. Относительно пloidности этого вида существуют противоположные мнения: Т. С. Всеволодова-Перель и Н. Ш. Булатова [2008] считают его исключительно триплоидом и отвергают сообщения о диплоидных формах, как об ошибке, ссылаясь на S. Casellato [1987 – цит. по Всеволодова-Перель, Булатова, 2008]. Однако С. В. Межжерин и др. [2010], исследуя



генетическое и кариотипическое разнообразие *O. tyrtaeum* на территории Украины, выявили две расы, имеющие 54 и 38 хромосом, соответственно. По предположению авторов, первая является триплоидом ( $3n$ ), вторая – субтриплоидом ( $2n + x$ ). Показано, что раса с 54 хромосомами состоит из более крупных особей (длиной около 8 см), чем с 38 хромосомами (3,7 – 4,5 см).

Западноевропейские авторы указывают, что *O. tyrtaeum* представлен двумя дискретными формами, которые отличаются размерами: мелкая (4–8 см) и крупная (10–15 см) [Meinhardt, 1974; Heethoff et al. 2004], и иногда встречаются симпатрично. Эта размерная изменчивость обусловлена генетически [Meinhardt, 1974]. Первые молекулярно-генетические исследования [Heethoff et al., 2004] показали, что последовательности митохондриальной ДНК мелкой и крупной форм значительно различаются: выявлены две филогенетические линии, или гаплогруппы, различающиеся почти 20% нуклеотидных замен. Крупные и мелкие экземпляры *O. tyrtaeum* относились к «крупной» (L) и «мелкой» (S) филогенетическим линиям, соответственно.

Таким образом, выделяют две генетические линии *O. tyrtaeum*, две хромосомные расы и две размерные формы. При этом однозначное разделение вида на две формы, характеризующиеся четкой совокупностью всех трех признаков, не доказано и не очевидно. Так, размеры форм в разных исследованиях варьируют. Генетические данные также не дают однозначного подразделения: в работе С. В. Межжерина и др. [2010] крупная форма несколько отличалась от мелкой по изоферментному профилю, но эти различия терялись на фоне изменчивости мелкой формы. Сходный высокий уровень изменчивости среди популяций мелкой формы *O. tyrtaeum* на территории Финляндии отмечали и J. Terhivuo и A. Saura (1993) (крупная форма в их выборке отсутствовала).

### 1.5.8 *Dendrodrilus rubidus*

*Dendrodrilus rubidus* (Eisen, 1874) – peregrinный вид, населяющий, главным образом, подстилку, как листовенную, так и хвойную (Гераськина, 2016в; Ермолов,

2020; Воробейчик и др., 2020). Также он обитает в верхних слоях почвы, перегнойных кучах, под корой. *D. rubidus* относится к подстилочным червям [Всеволодова-Перель, 1979].

Систематическое положение *D. rubidus* многократно подвергалось изменениям. Одной из причин тому были различия в анатомии и частично внешней морфологии, которые выявлялись у червей, на первый взгляд относившихся к одному виду. Например, пубертатный валик может быть более или менее выраженным, или же отсутствовать полностью; могут наблюдаться одна или две пары семяприемников, или же ни одной [Sims, Gerard, 1999; Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997]. Вначале виду было дано название *Enterion rubidum* Savigny, 1826, затем *Bimastus constrictus* (Rosa, 1845), а после выявления вышеупомянутой морфологической изменчивости его разделили на два вида, *Bimastus tenuis* (Eisen, 1874) и *Dendrobaena subrubicunda* (Eisen, 1874). Позже оба вида были включены в качестве форм (подвидов) типового вида *D. rubidus* в новом роде *Dendrodrilus* [Omodeo, 1956 – цит. по Csuzdi et al., 2017].

Позже исследователи добавили еще две формы (подвида) *D. rubidus* на основании следующих морфологических различий [Sims, Gerard, 1999; Csuzdi et al., 2017]:

1) У *D. r. tenuis* семяприемники и пубертатные валики полностью отсутствуют. Поясок расположен с 26-го по 31-й сегмент.

2) *D. r. subrubicundus* имеет две пары хорошо развитых заполненных семенной жидкостью семяприемников, расположенных в сегментах 9–10. Поясок занимает с 25-26-го по 31-32-й сегменты. Пубертатные валики четко выражены в виде широких прямоугольных полос на сегментах с 28-го по 30-й.

3) У *D. r. rubidus* семяприемники имеются (на сегментах 9–10), но как правило пустые и слаборазвитые [Csuzdi et al., 2017]. Поясок занимает сегменты с 25–26-го по 31-й, иногда заходит на 32-ой. Пубертатные валики имеют вид нечетких узких полос, расположены на сегментах 29–30 сегментах и разделены бороздкой по границе между сегментами.

4) *D. r. norvegicus* имеет две пары хорошо развитых и заметных семяприемников в 9–10-х сегментах. Пубертатные валики полностью отсутствуют либо представлены узкой полосой на 29–30-м сегментах, поясок занимает с 26-го по 32-й сегменты.

Следует упомянуть, что недавно род *Dendrodrilus* был включен в род *Bimastos* [Csuzdi et al., 2017], однако в нашей работе мы продолжаем придерживаться принятых в отечественной литературе названий.

Считается, что формы *tenuis*, *rubidus* и *subrubicundus* широко распространены, в то время как форма *norvegicus* эндемична для Норвегии, Швеции и Гренландии [Holmstrup, Simonsen, 1996]. Также следует отметить хромосомную изменчивость: у британских популяций формы *rubidus* было найдено 34 хромосомы, формы *tenuis* – 48, а формы *subrubicundus* – 68 [Sims, Gerard, 1999]. В то же время у итальянских популяций формы *subrubicundus* было отмечено 34 хромосомы, а у популяций *rubidus* из Гренландии и *tenuis* из Восточных Альп – 102 хромосомы [Briones et al., 2009]. С. В. Межжерин и др. [2018] обнаружил расы с 34, 68, 85 и 102 хромосомами на Украине; в данной работе не приводятся данные о принадлежности образцов к какой-либо форме. Хромосомные числа формы *norvegicus* неизвестны. При этом показано, что она отличается от формы *rubidus* по профилям четырех аллозимов [Holmstrup, Simonsen, 1996]. Недавно было продемонстрировано [Csuzdi et al., 2017], что у американских популяций *D. tenuis* отсутствуют различия по гену *cox1* между формами *tenuis*, *rubidus* и *subrubicundus*. Таким образом, вопрос о существовании различий между формами (подвидами) поддерживается одними работами и не поддерживается другими, и разъяснение этого вопроса может считаться актуальным направлением.

### 1.5.9 *Lumbricus rubellus*

*Lumbricus rubellus* – дождевой червь средних размеров, очень широко распространенный на территории Евразии, а также занесенный и на другие материки. В отличие от вышеупомянутых переметрических видов он имеет

интенсивную бурую пигментацию, что, по-видимому, указывает на иной тип питания, и, соответственно, на другую экологическую нишу. *L. rubellus* по частоте встречаемости и численности особей, без сомнения, занимает одно из первых мест среди дождевых червей, что и обуславливает интерес исследователей к нему.

В пределах *L. rubellus* по данным анализа мтДНК вначале были обнаружены две филогенетические линии [King et al., 2008; James et al., 2010; Klarica et al., 2012; Porco et al., 2013]. Анализ ядерной ДНК при помощи AFLP и микросателлитов [Andre et al., 2010; Donnelly et al., 2013; Kille et al., 2013] подтвердил самостоятельность этих линий. Более того, независимыми работами двух научных групп [Donnelly et al., 2013; Kille et al., 2013] было показано, что филогенетические линии *L. rubellus* демонстрируют различную устойчивость к загрязнению почвы мышьяком и свинцом. Различия в паттернах метилирования двух линий при содержании в среде, содержащей мышьяк, дали основание выдвинуть гипотезу о том, что адаптация к загрязнению обусловлена различными эпигенетическими механизмами [Kille et al., 2013].

Однако обособленность (филогенетическая и репродуктивная) линий *L. rubellus* не была поддержана данными I. Giska и др. [2015]. Авторы исследовали различия между обнаруженными ими пятью филогенетическими линиями *L. rubellus* при помощи метода RADSeq, который позволяет оценить степень дивергенции по большому числу ядерных локусов, а также выявить последствия гибридизации. Авторы показали, что различия между филогенетическими линиями были гораздо меньше, чем между популяциями, содержащими несколько линий. Таким образом, был сделан вывод, что *L. rubellus* представляет собой не набор видов-двойников, а один вид с высоким полиморфизмом по митохондриальной ДНК.

Это заключение, однако, было не в полной мере поддержано последующими работами других исследователей. G. L. Jones et al. [2016] установили, что две линии *L. rubellus* с неодинаковой устойчивостью к тяжёлым металлам используют неодинаковые водорастворимые феромоны для регуляции репродуктивного поведения. F. E. Anderson et al. [2017a] использовали метод RADSeq и выявили

чёткие генетические различия между филогенетическими линиями, наблюдающиеся в большинстве случаев. Однако эти линии всё же не являются репродуктивно изолированными. Таким образом, комплекс филогенетических линий *L. rubellus* представляет собой скорее не набор давно дивергировавших видов-двойников, но и не один полиморфный вид, а, скорее, виды в процессе формирования механизмов изоляции.

Большую работу по интеграции данных по *L. rubellus* провели S. Martinsson и C. Erséus [2017b]. Авторы выявили 8 филогенетических линий в пределах *L. rubellus*. Процент нуклеотидных различий (p-distance) фрагментов митохондриальных генов *cox1* между этими линиями составляло от 9 до 16,4%. При этом различия по ядерным последовательностям гистона H3 были гораздо меньше (от двух замен). Кроме того, Martinsson и Erséus [2017b] нашли и случаи предполагаемой гибридизации, что позволило сделать вывод о существовании как минимум семи видов-двойников в комплексе *L. rubellus*, однако следует отметить, что эти результаты лимитированы малой разрешающей способностью использованного метода.

### 1.5.10 Сравнительная характеристика изучаемых видов

Для удобства сравнения характеристики изученных видов приведены ниже в Таблице 1.5.10.1.

Таблица 1.5.10.1. Характеристика изученных в данной работе видов. В колонке Размножение указан доминирующий тип размножения для каждого вида; в колонке Число подвидов – их число, принятое в отечественной литературе (по Т. С. Всеволодовой-Перель [1997]).

Вид	Ареал	Оседлость	Размножение	Плоидность (число хромосом)	Число подвидов
<i>Eisenia nordenskioldi</i>	восточноевропейско-североазиатский	оседлый	амфимиксис	2n (36), 4n (72), 6n (96–102), 8n (142–152)	2
<i>Dendrobaena schmidtii</i>	кавказский	-//-	-//-	2n (36)	2
<i>Dravida ghilarovi</i>	манчжурский	-//-	-//-	2n (20)	1
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	космополит	перегринный	-//-	2n (36)	1
<i>Aporrectodea rosea</i>	-//-	-//-	партеногенез	2n (36), 3n (54), 4n (72), 5n (90), 6n (108), 8n (144)	1
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	-//-	-//-	-//-	2n (36), 3n (54), 4n (72)	1
<i>Dendrobaena octaedra</i>	-//-	-//-	-//-	4n (68), 5n (85), 6n (102)	1
<i>Lumbricus rubellus</i>	-//-	-//-	амфимиксис	2n (36)	1
<i>Dendrodrilus rubidus</i>	-//-	-//-	оба типа	2n (34), 4n (68), 5n (85), 6n (102)	4

## 1.6 Холодостойкость дождевых червей и ее биохимические основы

### 1.6.1 Холодостойкость филогенетических линий *E. nordenskioldi*

Как указано выше, некоторые виды дождевых червей населяют холодные области Земли, включающие в себя зону вечной мерзлоты. Соответственно, зимой они подвергаются действию низких температур. При похолодании черви могут мигрировать в нижние слои почвы, в которых температура выше, чем вблизи поверхности, однако этот вариант невозможен на территориях с близко расположенной к поверхности вечной мерзлотой. По данным Д. И. Бермана и А. Н. Лейрих [1985], *E. nordenskioldi* в верховьях Колымы зимует в почве на глубине 3–7 см. Следует отметить, что зимние температуры в почве значительно выше, чем в воздухе из-за утепляющего действия снежного покрова. Так, если среднесуточная температура воздуха в Якутске в январе составляет около  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , то температура почвы на глубине 2 см – около  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (<https://climate-energy.ru>). Тем не менее, живущим в этих условиях почвенным животным приходится переносить отрицательные температуры в течение нескольких месяцев.

По холодоустойчивости дождевых червей были проведены многочисленные экспериментальные работы [Берман, Лейрих, 1985, 2017; Holmstrup, Petersen, 1997; Лейрих и др., 2005; Берман и др., 2016; Berman et al., 2002, 2010, 2019; Berman, Meshcheryakova, 2013; Meshcheryakova, Berman, 2014]. Несколько видов дождевых червей оказались способны переносить замораживание. Так, различные линии комплекса *E. nordenskioldi* переносят от  $-10$  до  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Берман, Лейрих, 1985, 2017; Берман, Мещерякова, 2013; Берман и др., 2016; Holmstrup, Petersen, 1999; Holmstrup et al., 1999; Berman et al., 2002, 2019], *D. octaedra* – от  $-2$  до  $-16,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Berman et al., 2002; Rasmussen, Holmstrup, 2002; Holmstrup et al., 2007b], *D. ghilarovi* – до  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Berman et al., 2010], *A. caliginosa* – до  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Holmstrup, Overgaard, 2007; Meshcheryakova, Berman, 2014].

Яйцевые коконы дождевых червей способны переносить более низкие температуры по сравнению со взрослыми особями того же вида. Более того, у ряда видов коконы способны переносить замораживание, в то время как взрослые особи

не холодоустойчивы [Meshcheryakova, Berman, 2013]. К таковым относятся, например, *L. castaneus* (коконы переносят до -50 °С), *L. rubellus* (до -35 °С), *O. tyrtaeum (lacteum)* (до -15 °С), *A. rosea* и *L. terrestris* (до -5 °С) [Мещерякова, 2005; Meshcheryakova, Berman, 2014]. Выдающийся пример представляет собой *D. rubidus*, чьи коконы способны пережить замораживание в жидком азоте (-196 °С), в то время как взрослые особи погибают при охлаждении до -2 °С [Берман и др., 2010]. Это связано с тем, что у взрослых дождевых червей и коконов принципиально различные механизмы адаптации к низким температурам (см. ниже).

### 1.6.2 Биохимические основы устойчивости дождевых червей к замораживанию

Важнейшее следствие воздействия отрицательных температур на организмы – образование кристаллов льда в теле при замерзании воды, что приводит к разрыву клеток и тканей. Таким образом, пойкилотермные организмы для выживания при отрицательных температурах должны найти способ предотвратить эти повреждения. Выделяют три способа ответа на воздействие отрицательных температур: (1) избегание замораживания, (2) устойчивость к формированию кристаллов льда, (3) витрификация. Последний способ (3) заключается в переходе жидкости в твердое аморфное, а не кристаллическое состояние; он подходит только для организмов очень малого размера. Избегание замораживания (1) состоит в понижении точки переохлаждения, что приводит к тому, что при отрицательных температурах растворы остаются в жидком состоянии. Эта стратегия сопряжена с сильным обезвоживанием организма. В противном случае, если организм подвергается значительным отрицательным температурам, начинается кристаллизация льда.

Устойчивость к замораживанию (2) обусловлена несколькими биохимическими агентами: белками-нуклеаторами, обеспечивающими упорядоченное формирование кристаллов льда в межклеточном пространстве



[Duman, 2001; Lundheim, 2002; Davies et al., 2014]; а также белками-антифризами [DeVries, Wohlschlag, 1969; Chen et al., 1997; Graether et al., 2004; Marshall et al., 2004], липидами/гликолипидами [Marshall et al., 2014; Duman, 2015] и низкомолекулярными криопротекторами [Hochachka, Somero, 2002]. Последние понижают температуру замерзания жидкости и защищают клетки от осмотических повреждений. Животные в качестве низкомолекулярных криопротекторов способны синтезировать целый ряд веществ: сахара (глюкоза, трегалоза, сахароза), многоатомные спирты (глицерин, сорбитол, мио-инозитол, сцилло-инозитол, эритрол), аминокислоты (пролин, аргинин, глицин, таурин, стромбин) [Hochachka, Somero, 2002; Storey, Storey, 2017; Toxopeus, Sinclair, 2018].

Хотя биохимические основы устойчивости к замораживанию у животных принципиально схожи, они зачастую основаны на разных молекулах даже у близкородственных видов. Это связано с тем, что это свойство часто возникает конвергентно на основе метаболических путей, имевшихся у неустойчивых видов. Так, у лягушек, по-видимому, оно возникало несколько раз независимо [Voituron et al., 2009a] и основано на использовании глюкозы, глицерина и мочевины в разных комбинациях и соотношениях [Schmid, 1982; Storey, Storey, 1986, 1987; Voituron et al., 2009b; Costanzo, Lee, 2013; Larson et al., 2014; Costanzo et al., 2015; Costanzo, 2019]. В связи с этим интересна степень сходства путей адаптации к замораживанию у дождевых червей и других изученных в этом отношении групп: позвоночных и насекомых.

Разные жизненные стадии дождевых червей, по всей видимости, реализуют разные стратегии холодоустойчивости: коконы способны к обезвоживанию и переохлаждению (см. ниже), а взрослые особи некоторых видов выдерживают замораживание. Рассмотрим сначала данные по взрослым червям.

Биохимические работы по исследованию механизмов холодоустойчивости *D. octaedra*, самого изученного в этом отношении на данный момент вида дождевых червей, показали, что после инокуляции льдом происходит быстрый синтез больших количеств (до 200 – 300 000 нмоль/г сухого веса) глюкозы [Rasmussen, Holmstrup, 2002; Overgaard et al., 2007]. Эти значительные количества

образуются из запасов гликогена; и выживаемость, предположительно, коррелирует с количеством запасенного гликогена [Overgaard et al., 2007; Calderon et al., 2009]. Глицерин и другие низкомолекулярные криопротекторы у *D. octaedra* найдены не были [Rasmussen, Holmstrup, 2002]. Кроме того, показано, что акклимация к холоду ведет к уменьшению содержания насыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов и увеличению количества ненасыщенных [Holmstrup et al. 2007b; Overgaard et al., 2009].

Более подробные данные о биохимических изменениях у дождевых червей во время замораживания были получены методом  $^1\text{H}$  ядерного магнитного резонанса. Метаболические основы устойчивости к замораживанию были исследованы у *D. octaedra* [Bundy et al., 2003], а также четырех неустойчивых видах – *Aporrectodea icterica*, *A. caliginosa*, *A. longa* и *D. rubidus*. Опытную группу выдерживали при  $-2\text{ }^\circ\text{C}$  в течение двух дней, контрольную – при  $+2\text{ }^\circ\text{C}$ . Авторы подтвердили, что *D. octaedra* накапливает большое количество глюкозы (примерно  $370\ 000 \pm 170\ 000$  нм/г сухого веса), и она, по-видимому, является единственным криопротектором. Среди прочих веществ увеличиваются концентрации инозина, уридина, сукцината и нескольких аминокислот (гистидина, фенилаланина, тирозина, аланина); снижается концентрации мальтозы, а накопления лактата не происходит.

Ни один из четырех нехолодостойких видов не перенес температуру  $-2^\circ\text{C}$ . При этом в экстрактах из замороженных особей также присутствовали большие количества глюкозы, а также относительно большие количества сукцината, по сравнению с *D. octaedra*. В отличие от *D. octaedra*, у трех из четырех неустойчивых видов увеличилась концентрация лактата. По мнению J. G. Bundy et al. [2003], устойчивость *D. octaedra* к замораживанию, помимо синтеза глюкозы, сопряжена с относительно слабой активацией гликолиза.

*E. nordenskioldi* имеет еще более высокую холодостойкость по сравнению с *D. octaedra* [Meshcheryakova, Berman, 2014; Berman et al., 2019]. Д. И. Берман и А. Н. Лейрих [1985] показали, что замороженные особи *E. nordenskioldi* содержат заметные количества глицерина (около  $33\ 000$  нмоль/г) и глюкозы (около  $22\ 000$

нмоль/г). При этом уровни этих веществ у контрольных особей также относительно велики: примерно 11000 и 5500 нмоль/г, соответственно. В то же время Holmstrup et al. (1999) обнаружили, что *E. nordenskioldi* с Таймыра при замораживании накапливают в среднем 94 000 нмоль/г сухого веса глюкозы (увеличение в >150 раз). При этом средняя концентрация глицерина увеличивается примерно вдвое, однако это увеличение статистически недостоверно, и концентрация этого вещества остается на фоновом уровне (около 4 000 нмоль/г).

Отмеченная в Разделе 1.6.1 выдающаяся устойчивость коконов некоторых видов дождевых червей к низким температурам связана, по всей видимости, с их способностью выдерживать сильную дегидратацию [Holmstrup, 1992, 1994; Holmstrup, Westh, 1994, 1995]. Так, по данным М. Holmstrup и Р. Westh [1995], коконы неустойчивых к замораживанию видов способны терять 71–77 % воды, а коконы устойчивых видов – более 85%. По мнению М. Holmstrup [2003], замораживания коконов вообще не происходит вследствие дегидратации и накопления большого количества криопротекторов. Интересно, что в коконах важную роль играют иные метаболиты по сравнению с червями: в коконах *D. octaedra* при обезвоживании наблюдается прежде всего накопление сорбитола, и в меньшей степени, глюкозы, аланина и бетаина [Holmstrup, Zachariassen, 1996; Petersen, 2008].

\*\*\*

Приведенный выше обзор литературы не претендует на полноту сведений о затронутых темах и включает только наиболее релевантные для работы данные. Тем не менее, можно видеть назревшую актуальность ряда вопросов, в первую очередь, соотношения таксономического и генетического разнообразия дождевых червей России. В настоящее время имеется целый ряд доступных исследователю молекулярно-генетических методов, применение которых открывает значительные перспективы для выяснения множества вопросов, главный из которых – исследование феномена филогенетических линий у дождевых червей. Кроме

методов, оценивающих вариабельность последовательностей ДНК, в такую работу обязательно следует включить и морфологическую изменчивость, и установление возможных случаев гибридизации, и доступные для изучения экологические признаки, такие, как холодостойкость. Различия по последней – признак, во многом определяющий ареалы видов и линий, что делает небезынтесным исследование его материальных основ, т.е. биохимии адаптации к замораживанию. В связи с этими выводами целесообразна постановка конкретных исследовательских задач, разрешению которых посвящена представленная работа.

## Глава 2. Методы исследования

### 2.1 Выделение ДНК

#### 2.1.1 Выделение высокомолекулярной ДНК фенольным методом

Для выделения высокомолекулярной ДНК из живых или заспиртованных образцов брали ~100 – 150 мг тканей (целую особь, или несколько хвостовых сегментов в случае крупного червя), переносили в 1,5 мл пробирку Eppendorf и растирали пестиком в 200 мкл лизирующего буфера (100 мМ Tris-HCl pH 8.0, 100 мМ NaCl, 50 мМ ЭДТА, 0,5% SDS, 0,2 М сахароза, 100 мкг/мл РНКазы А, 1 мг/мл протеиназы К) и инкубировали 1 час при 60 °С. Добавляли 500 мкл фенола и перемешивали 1 мин, затем добавляли 150 мкл хлороформа и снова перемешивали; жидкость в пробирке разделялась на верхнюю и нижнюю фазы, разделенные слоем белка (интерфазой). После центрифугирования (5 мин при 14000 об/мин) переносили верхнюю фазу в новую пробирку, не задевая осадок, находившийся в интерфазе, и дважды проводили повторную экстракцию хлороформом как описано выше. После этого к раствору добавляли изопропанол, один объем в случае живых образцов, и полтора – для заспиртованных, инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин. Полученный осадок промывали 75% этанолом, центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин, удаляли водную фазу, высушивали и растворяли в 100 мкл воды или буфера TE.

#### 2.1.2 Выделение ДНК на колонках

Для выделения тотальной ДНК из фиксированных спиртом образцов использовали колонки фирмы «БиоСилика» (Новосибирск). К образцу (~50 мг, несколько хвостовых сегментов тела) добавляли 50 мкл воды и 200 мкл 6 М раствора гуанидинизотиоцианата, растирали пестиком и инкубировали 15 мин при 60 °С. Затем проводили центрифугирование 5 мин при 14 000 об/мин на настольной

центрифуге Eppendorf для избавления от плохо растворяющихся тканей. Супернатант переносили на предварительно смоченную гуанидинизотиоционатом колонку и центрифугировали 1 мин при 2400 об/мин. Затем промывали 250 мкл 4 М раствора гуанидинизотиоцианата (1 мин при 2400 об/мин, 5 с при 14000 об/мин). Филтат удаляли и наносили на колонку 650 мкл 70% этанола с последующим центрифугированием 1 мин при 2400 об/мин, 5 с при 14000 об/мин. На фильтр колонки, с которой связана очищенная ДНК, наносили 100 мкл буфера TE, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и центрифугировали 1 мин при 2400 об/мин, 5 с при 14000 об/мин. Полученную ДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР.

### 2.1.3 Выделение плазмидной ДНК

ДНК плазмид выделяли методом щелочного лизиса. Колонию *E. coli* переносили микробиологической петлей, стеклянным капилляром или зубочисткой в пробирку с 2 мл среды LB и инкубировали ночь при 37 °С при постоянном перемешивании. На следующий день клетки осаждали центрифугированием (1 мин, 14000 об/мин) и ресуспендировали в 200 мкл раствора, содержащего 25 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 50 мМ сахарозы и 20 мМ ЭДТА. Клетки лизировали добавлением 200 мкл раствора, содержащего 0,2 М NaOH и 1% SDS, осторожно перемешивая до тех пор, пока суспензия не становилась вязкой и прозрачной. Затем добавляли 200 мкл 3 М ацетата калия (pH 5.0), перемешивали до формирования творожистого осадка и инкубировали 20 мин при 4 °С. После инкубации добавляли 500 мкл хлороформа, перемешивали и центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин. Супернатант переносили в новую пробирку, добавляли 2 объема абсолютного этанола или 1 объем изопропанола, перемешивали и инкубировали 20 мин при -20 °С. После этого проводили центрифугирование (10 мин при 14000 об/мин), удаляли супернатант и промывали осадок 75% этанолом с последующим центрифугированием (5 мин при 14000 об/мин). Супернатант удаляли, осадок высушивали и растворяли в 100 мкл воды или TE.

## 2.2 Выделение РНК

### 2.2.1. Выделение РНК реагентом Trizol

Для выделения тотальной РНК использовали пластик RNase-free. Для инактивации РНКаз во все водные растворы добавляли 0,5% DEPC, инкубировали 2 ч при 37 °С и автоклавировали. Для подготовки к эксперименту живых червей промывали и сажали по одному в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой, где их выдерживали 3 – 7 дней до опорожнения кишечника.

РНК выделяли из нескольких хвостовых сегментов живого червя, либо из семенников. Часть материала (приблизительно 50 – 100 мкг) фиксировали в спирте для выделения ДНК на колонках как описано выше. Приблизительно 100 мг ткани растирали в пробирке пластиковым пестиком в 600 мкл реагента Trizol. Затем добавляли 150 мкл хлороформа, перемешивали, и центрифугировали 10 мин на 4 °С при 12 000 g. Супернатант смешивали с 300 мкл хлороформа и повторяли центрифугирование. Затем к очищенному супернатанту добавляли 0,5 объема изопропанола, инкубировали 10 мин на -20 °С и центрифугировали 10 мин при 4 °С на 12 000 g. Полученный осадок РНК дважды промывали 75% этанолом, высушивали и растворяли в 50 мкл воды. Полученный раствор РНК хранили при -70 °С.

### 2.2.2. Выделение РНК набором фирмы Biolabmix

Биоматериал дождевых червей для анализа был взят так же, как описано выше (раздел 2.5.1). После проведения гомогенизации в 600 мкл реагента «Лира» (Биолабмикс, Россия) и инкубирования в течении 10 мин при комнатной температуре проводили центрифугирование при 12 000 g и 4 °С в течение 10 мин. К полученному супернатанту добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и проводили центрифугирование

при 12 000 g и 4 °C в течение 5 мин. В результате происходило разделение на три фракции. Верхнюю фракцию переносили в чистую пробирку и добавляли равный объем этанола.

Затем проводили очистку на колонках. Смесь РНК с этанолом наносили на колонку и центрифугировали 1 мин при максимальных оборотах. После этого промывали колонку 2 раза 70% этанолом и проводили смыв РНК при помощи двукратного нанесения 50 мкл бидистиллированной воды. Полученный раствор РНК хранили при -70 °C.

### 2.3 Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторах BioRad (США). При амплификации с помощью Taq-SE полимеразы (Сибэнзим, Россия) использовали буфер, содержащий 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 650 мМ Tris-HCl pH=8.8, 160 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5% Tween-20, 0,2 мМ эквимольной смеси четырех dNTP, по 10 пмоль двух праймеров, 0,05-1 мкг ДНК-матрицы, 0,2-5 е.а. Taq-полимеразы. Амплификацию при помощи наборов фирм Биолабмикс (Россия) или Herculanase (США) проводили в соответствии с протоколом производителя; в смесь для ПЦР добавляли по 10 пмоль двух праймеров и 0,05-1 мкг ДНК-матрицы. Подробности амплификации приведены ниже отдельно для каждого вида.

#### 2.3.1 *Eisenia nordenskioldi*

Амплификация фрагмента гена *cox1* проводилась при помощи универсальных праймеров HCO2198 (5'-TAAAC-TTCAG-GGTGA-CCAAA-AAATC-A-3') и LCO1490m (5'-TACTC-AACAA-ATCACAAGA-TATTG-G-3'). Фрагмент рибосомной ДНК, включающий 3'-часть гена 18S рРНК, ITS1, 58S рРНК, ITS2 и 5'-часть гена 28S рРНК, амплифицировали с использованием универсальных праймеров E18S-2 (5'-GTCGG-TGATC-CGAAA-AGACG-3') и E28S-2 (5'-CC(G/T)CT-TCACT-CGCCG-TTA-3'), которые были разработаны нами с



использованием последовательностей дождевых червей из GenBank. Мы также разработали универсальные праймеры для дождевых червей к гену рРНК 5.8, E58S-F1 (5'-ATCAC-TGGGT-TCGTG-CGT-3') и E58S-R1 (5'-CCGCA-ATATG-CGTTCAAGA-3'), которые использовались для секвенирования. В смесь для амплификации был добавлен 5% DMSO, необходимый для разрушения стабильных вторичных структур, образуемых этим фрагментом ДНК.

Полученные последовательности были депонированы в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) под номерами JX531465–JX531565, JX531567–JX531572, KP670953–KP671007, KP890647–KP890652, KU708313–KU708411, KX601279–KX601656, MT863028–MT863089 (*cox1*) и JX531573–JX531618, KU708412–KU708510 (ITS2).

### 2.3.2 *Dendrobaena schmidti*

Для амплификации фрагмента митохондриального гена *cox1* использовали универсальные праймеры HCO2198 и LCO1490m. Фрагмент рибосомальной ДНК, содержащий последовательность внутреннего транскрибируемого спейсера 2 (ITS2) и фрагменты фланкирующих генов 5,8S и 28S рРНК, нарабатывали при помощи универсальных праймеров E28S-2 и E58S-F1 (см. Раздел 2.3.1). В смесь для амплификации был добавлен 5% DMSO, необходимый для разрушения стабильных вторичных структур, образуемых этим фрагментом ДНК. Полученные последовательности были депонированы в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) под номерами MN340181–MN340200, MN340202–MN340205 (*cox1*) и MN340207–MN340230 (ITS2).

### 2.3.3 *Drawida ghilarovi*

Амплификация фрагмента митохондриального гена *cox1* была проведена с использованием универсальных праймеров HCO2198 и LCO1490m как описано выше (Раздел 2.3.1).

### 2.3.4 *Aporrectodea caliginosa*

Секвенирование фрагментов гена *cox1* *A. caliginosa*, а также родственных видов *A. trapezoides* и *A. longa* проводили при помощи универсальных праймеров LCO1490m (см. Раздел 2.3.1) и COI-E- (5'-TATAC-TTCTG-GGTGT-CCGAA-GAATC-A-3' [Bely, Wray, 2001]). Полученные последовательности были депонированы в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) под номерами MW080717–MW080729, KF471778–KF471786, KF471793–KF471830, KF471843–KF472049, KU358729–KU358873, KP789177–KP789310, KF471787–92 и KF471831–KF471842.

### 2.3.5. *Aporrectodea rosea*

Для амплификации последовательности фрагмента гена *cox1* использовали праймеры LCO1490m и COI-E- (см. Раздел 2.3.4). Фрагмент гена гистона H3 был амплифицирован при помощи разработанных нами праймеров H3-FA (5'-ATGGC-TCGTA-CCAAG-CAGAC-AGC-3') и H3-AR2R (5'-GCATG-ATGGT-GACAC-GCTTG-G-3'). Полученные последовательности были депонированы в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) под номерами MN854051–MN854068 (*cox1*) и MN862071–MN862083 (H3).

### 2.3.6. *Octolasion tyrtaeum*

Фрагмент митохондриального гена *cox1* амплифицировали с использованием праймеров LCO1490m и COI-E-. Для фрагмента митохондриального гена *cox2* были использованы праймеры Otc2-F (5'-AGATG-CCGCA-TCTTC-TGTТА-Т-3', подобран в данной работе) и LumbR2 (5'-GTGAG-GCATA-GAAAT-ACACC-3', [Pérez-Losada et al., 2009]). Спейсер рибосомной ДНК ITS2 с фланкирующими последовательностями 5.8S рРНК и 28S рРНК был амплифицирован с

универсальными праймерами E58S-F1 и E28S-2 (см Раздел 2.3.1). Все последовательности, полученные в данном исследовании, депонированы в GenBank под номерами доступа KM382441–KM382452 (*cox1*), KM382453–KM382464 (*cox2*) и KM382433–KM382440 (ITS2).

### **2.3.7. *Lumbricus rubellus*, *Dendrodrilus rubidus* и *Dendrobaena octaedra***

Аmplификация фрагмента митохондриального гена *cox1* была проведена с использованием универсальных праймеров HCO2198 и LCO1490m как описано выше (Раздел 2.3.1).

## **2.4 Секвенирование транскриптомов**

Проверка качества РНК, выделение поли-А фракции и ее секвенирование проводилось сотрудниками Межинститутского Центра Секвенирования ИЦиГ СО РАН. Подробности анализа для каждого отдельного эксперимента указаны ниже. Полученные сырые данные были депонированы в базе данных Sequence Read Archive (SRA; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) под номерами PRJNA658219 (*E. nordenskioldi*) и PRJNA789117 (*D. ghilarovi*).

### **2.4.1 *Eisenia nordenskioldi***

Секвенирование на приборе Ion PGM было проведено с чипами Ion318v2 с длиной прочтения 400 нуклеотидов. Прочтение было проведено с одного конца (single-end sequencing). Тотальную РНК очищали с использованием набора PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) с обработкой ДНКазой I на колонках. Качество РНК проверяли на приборе Bionalyzer 2100 (Agilent, США) с чипами RNA Nano. Поли-А РНК экстрагировали из 10 мкг тотальной РНК с использованием набора для очистки мРНК Dynabeads (Invitrogen, США).

Подготовку библиотеки RNA-Seq проводили с использованием набора Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Life Technologies, США) по инструкции производителя с модификациями: вместо фрагментации при помощи ферментов использовали химическую фрагментацию РНК в течение 5 мин; была проведена репарация концов РНК для повышения воспроизводимости и доли длинных фрагментов. Всего в качестве матрицы было взято 50 нг фрагментированной мРНК. После 9 циклов амплификации библиотеки очищали при 1,5 В на магнитных шариках Agencourt AMPure XP beads (Agilent, США). Фракции библиотеки размером 290–380 п.н. (медианный размер вставки ~260 п.н.) выделяли с использованием ДНК-чипов LabChip® XT 500 (Perkin-Elmer, США).

Чистоту и концентрацию конечных библиотек оценивали с помощью Bioanalyzer 2100 (Agilent, США) с ДНК-чипом High Sensitivity. Библиотеки для секвенирования Ion Torrent были приготовлены с использованием набора Ion PGM Template OT2 400 Kit, систем One-Touch 2 и One-Touch ES (Life Technologies, США). Библиотеки секвенировали на машине Ion PGM с использованием чипов Ion318v2, нанесенных с полной плотностью, в соответствии с протоколом секвенирования 400 п.н., предоставленным производителем. Полученные сырые данные были собраны при помощи программы Trinity, с дальнейшей обработкой TransDecoder (предсказание белок-кодирующих последовательностей) и CD-HIT (удаление близких последовательностей).

Для проведения пиросеквенирования, РНК очищали набором PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, США) с обработкой ДНКазой I на колонке. Качество РНК оценивали на приборе Bioanalyzer 2100 с чипами RNA Nano. Фракцию поли-А РНК выделяли из 10 мкг тотальной РНК набором Dynabeads mRNA Purification Kit (Invitrogen, США). Подготовку библиотек проводили набором Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Life Technologies, США) по рекомендациям производителя. В качестве субстрата для секвенирования брали 50 нг поли-А РНК. После девяти циклов амплификации, библиотеки очищали при помощи набора Agencourt AMPure XP beads (США). Фракцию длиной 290–380 п.н. выделяли системой LabChip (PerkinElmer, США).

Для проведения секвенирования методом Illumina, РНК очищали набором PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, США). Библиотеки получали из 1 мкг тотальной РНК при помощи набора TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (США) в соответствии с рекомендациями производителя с небольшими изменениями (фрагментация РНК – 4 мин; 12 циклов ПЦР). Качество и количество библиотек оценивали при помощи системы Agilent Bioanalyzer 2100 (США) и DNA High sensitivity kit (Agilent Technologies, США). После нормализации, баркодированные библиотеки объединяли и секвенировали на приборе NextSeq550 с набором NextSeq 550 Mid Output v2 Kit 150 cycles (Illumina, США).

Сборку транскриптомов *de novo* проводили программой Trinity v.2.4.0 [Grabherr et al., 2011] с параметрами «по умолчанию». Предсказание белок-кодирующих последовательностей осуществляли программой TransDecoder v.5.0.0 (<http://transdecoder.github.io>). Близкие по последовательности белок-кодирующие последовательности объединяли программой CD-HIT v.4.6 [Fu et al., 2012], начиная с уровня сходства 99%. Митохондриальные последовательности были удалены из полученной выборки. Наборы данных для анализа получали при помощи алгоритмов ProteinOrtho v.5.16b [Lechner et al., 2011] и HaMStR v.13.2.6 [Ebersberger et al., 2009].

#### 2.4.2 *Drawida ghilarovi*

На основании анализа гена *cox1* было выбрано три образца, относящихся к трем обнаруженным кладам *D. ghilarovi*. Для данных образцов было выполнено выделение РНК при помощи наборов Биолабмикс (Россия). РНК очищали с помощью набора PureLink RNA Micro Kit (Invitrogen, США). Для создания библиотеки RNASeq всего было взято 1 мкг общей РНК. Библиотеки были сконструированы с помощью набора TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina, США). Для оценки количества и качества библиотек использовали систему Agilent Bioanalyzer 2100 и набор для высокой чувствительности ДНК (Agilent Technologies, США). После нормализации, баркодированные библиотеки

были объединены и секвенированы на приборе NextSeq550 с использованием 150 циклов набора NextSeq 550 Mid Output v2 (Illumina, США).

Транскриптомы были собраны с использованием Trinity v. 2.4.0 [Grabherr et al., 2011]. В качестве внешней группы мы взяли транскриптом *Drawida calebi* (SRX6596293) из Индии, штат Одиша, представленный в виде сырых ридов. Данный вид был единственным видом рода *Drawida*, доступным в базах данных. Транскриптом был собран нами с использованием того же протокола. Для всех образцов количество ридов было относительно небольшим, поэтому мы использовали параметр `--no_normalize_reads`. Для предсказания белок-кодирующих последовательностей использовалась программа TransDecoder v. 5.0.0 (<http://transdecoder.github.io>). Белковые последовательности каждого собранного транскриптома также были функционально охарактеризованы с помощью InterProScan v. 5.52 [Jones et al., 2014]. Информация, полученная из базы данных консервативных доменов (CDD) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>), Pfam [El-Gebali et al., 2019] и Gene3D [Lees et al., 2021] был использован для расчета пересечений между транскриптомами изученных образцов дравид. Функциональная аннотация участников пути метаболизма порфиринов ([https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?hsa00860](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa00860)) на основе ортологии KEGG была выполнена с помощью программы KofamScan v. 1.3.0 [Aramaki et al., 2020].

Исходные ортологичные группы были обнаружены с помощью ProteinOrtho v. 6.0.28 [Lechner et al., 2011]. Последовательности ортогрупп были выровнены с использованием MAFFT v. 7.475 [Katoh, Standley 2013]. Выравнивания короче 20 аминокислот были удалены; остальные были отфильтрованы с помощью PhyloTreePruner v. 0.9.7 [Kocot et al., 2013]. Для окончательного набора данных выравнивания ортогрупп мы также извлекли нуклеотидные последовательности. Выравнивания короче 50 п.н. были отброшены. Полученные выравнивания белков и нуклеотидов использовались для построения филогенетического дерева с помощью RAxML и MrBayes.

В качестве внешней группы был взят вид *D. calebi* из Индии, штат Одиша. Это довольно далекий родственник *D. ghilarovi*, но это был единственный вид рода

*Drawida*, для которого были доступны транскриптомные данные. Всего было получено 17,5–19,5 М.п.н. single-end прочтений. Данные для *D. calebi* содержали 48 М.п.н. paired-end ридов (24 М.п.н. + 24 М.п.н.). При помощи программы ProteinOrtho мы выявили 9174 ортогрупп (транскриптов), которые присутствовали во всех четырех образцах. Окончательный отфильтрованный набор данных включал 8990 ортогрупп. Как видно на рисунке 4.2.3, полученные транскрипты в основном присутствуют как у *D. ghilarovi*, так и у *D. calebi*, несмотря на их отдаленное родство. Длина выравнивания белков составляла 2 606 498 аминокислот, а выравнивания нуклеотидов - 11 164 195 п.н.

## 2.5 Анализ RADSeq

ДНК образцов была очищена от загрязнений на магнитных шариках AMPureXP, растворена в воде и её концентрация измерена флуориметрически на приборе Qubit набором DNA HS. Далее ДНК нормализована до концентрации 20 нг\мкл. 10 мкл раствора ДНК (200 нг) использовано в реакции рестрикции ферментами Msp-I (4 е.а.) и Pst-I-HF (4 е.а.). Реакция была проведена в буфере рестрикции NEB Cut Smart. Реакционная смесь инкубировалась 3 часа при 37°C, после чего прогревалась 20 мин. при 70°C для инактивации ферментов. После охлаждения к 20 мкл реакционной смеси приливалось 18 мкл 2х лигазной смеси NEB Instant Sticky-end Ligase Master Mix и по 1 мкл 25nMol двуцепочечных олигонуклеотидных адаптеров с модифицированными основаниями P5-GBS-PstI и P7-GBS-MspI [Wendler et al., 2014]. Лигирование проводилось 1 час при 22°C, после чего проведено осаждение ДНК с использованием 1,2 V магнитных шариков КАРА Beads. ДНК смыта 20 мкл воды.

Для достройки модифицированных выступающих концов лигированных фрагментов проведена обработка BST-полимеразой 10 мин. при 37°C. После этого проведена двустадийная селекция фрагментов по размеру на магнитных шариках. На первой стадии к 40 мкл реакционной смеси добавлен 21,2 мкл AMPureXP. Длинные фрагменты и конкатемеры ДНК осажены на магните вместе с

магнитными шариками, 56 мкл супернатанта, содержащего короткие фрагменты, перенесено к 23,6 мкл AMPureXP.

После осаждения ДНК растворена в 20 мкл воды, Для проведения ПЦР к 7 мкл раствора ДНК добавлялось 6 нМоль универсального праймера S4\_indPCR и 6 нМоль соответствующего индексированного праймера [Wendler et al., 2014], Phusion HotStart PCR MasterMix (NEB) и вода до 30 мкл. ПЦР велась в следующих условиях: 98°C – 30с, 15 циклов (98°C 10с, 60°C 30с, 72°C 5с), финальный шаг 72°C, 10 мин. ПЦР-фрагменты выделялись осаждением на магнитных шариках КАРА Beads (1,4 объёма) и смывались 20 мкл воды. Концентрация измерялась флуориметрически на приборе Qubit набором DNA HS. Библиотеки, предназначенные для секвенирования в ходе одного запуска NextSeq550 смешивались в эквимольных количествах.

Для выделения фракции библиотек размером 240-600 п.н. использован прибор BluePippin, 2% агарозная кассета без красителя, внутренний стандарт длин. Выделенная фракция библиотек очищалась на магнитных шариках AMPureXP и растворялась в 12 мкл воды. Секвенирование проводилось набором NextSeq500/550 High Output Kit v2.5 (150 Cycles), чтение 120 п.н. велось с использованием праймера Read1\_GBS\_PstI и индексного праймера [Wendler et al., 2014].

## **2.6 Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозных гелях**

Для электрофоретического разделения нуклеиновых кислот использовали гели, содержащие 0,7-1,5% агарозы для электрофореза в буфере TAE (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM ацетат натрия, 2 mM ЭДТА). Пробы смешивали с буфером для нанесения, содержащим 50% глицерина и 0,05% бромфеноловый синий. Электрофорез проводили при напряжении 5-10 В/см. Для определения длины фрагментов использовали маркера молекулярных весов производства фирм Биолабмикс, Сибэнзим и Медиген (Россия). Анализ и фотографирование гелей проводили с помощью системы BioRad (США).



## 2.7 Подготовка компетентных клеток *E. coli* для электропорации

Клетки выращивали в двух колбах по 250 мл среды LB при комнатной температуре до оптической плотности  $OD_{600} = 0.45$ , осаждали центрифугированием при 4000 g, 4 °C, ресуспендировали в 200 мл воды и центрифугировали при тех же условиях (4000 g, 4 °C). Указанную процедуру промывки проводили последовательно с 100 и 50 мл воды, затем с 20 мл 10% раствора глицерина. После этого клетки суспендировали в 1200 мкл ледяного раствора 10% глицерина, расфасовывали по 40 мкл и замораживали при -70°C.

## 2.8 Трансформация *E. coli* плазмидной ДНК

К 40 мкл электрокомпетентных клеток добавляли 50-100 нг ДНК в объеме 1-2 мкл, осторожно перемешивали и переносили в предварительно охлажденную до 0 °C кювету для электропорации. Электропорацию проводили на приборе BioRad при 1700 В в течение 4-5 мс. Затем добавляли 1 мл LB, прогретого до 37 °C, инкубировали при 37 °C в течение 1 часа и высевали на агаризованную среду. Чашки Петри с высеянными бактериями инкубировали в течение ночи в термостате при 37 °C, затем оценивали количество колоний.

## 2.9 Селекция *E. coli* на наличие плазмиды со вставкой при помощи бета-галактозидазной системы

Питательную среду, содержащую трансформированные клетки *E. coli*, размазывали по чашке Петри, содержащей агаризованную среду Luria-Bertani (вес/объем: 1% NaCl, 1% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1,5% агар), а также по 50 мг/мл реагентов X-gal (бromo-хлоро-индолил-галактопиранозид) и IPTG (изопропил-бета-галактопиранозид). Чашки Петри инкубировали 12 ч при 37 °C в термостате. Получившиеся колонии, содержащие вставку, имели белый цвет; содержащие исходную плазмиду – синий. Белые колонии рассаживали в жидкую

среду LB или же проводили с ними ПЦР со специфическими или плазмидными праймерами.

### **2.10 Элюция ДНК из агарозного геля**

Элюцию ДНК из агарозных гелей проводили при помощи набора BioSilica (Новосибирск). Фрагмент агарозного геля, содержащий требуемый фрагмент ДНК, вырезали скальпелем в ультрафиолетовом свете и переносили в пробирку Eppendorf. К фрагменту геля добавляли 3 объема 6 М раствора гуанидинизотиоцианата и инкубировали 15 мин при 60 °С до полного растворения. Полученный раствор переносили на предварительно смоченную гуанидинизотиоцианатом колонку и центрифугировали 1 мин при 2400 об/мин. Затем промывали 250 мкл 4 М раствора гуанидинизотиоцианата (1 мин при 2400 об/мин, 5 с при 14000 об/мин). Филтрат удаляли и наносили на колонку 650 мкл 70% этанола с последующим центрифугированием 1 мин при 2400 об/мин, 5 с при 14000 об/мин. На фильтр колонки, с которой связана очищенная ДНК, наносили 100 мкл буфера TE или бидистиллированной воды, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и центрифугировали 1 мин при 2400 об/мин, 5 с при 14000 об/мин. Полученные фрагменты ДНК использовали как субстрат для секвенирования или лигирования.

### **2.11 Определение размера генома при помощи проточной цитофотометрии**

Размер генома у дождевых червей оценивали по интенсивности свечения ядер единичных клеток, окрашенных пропидий йодидом в соответствии с методикой D. W. Galbraith et al. [1997]. Живых червей промывали и сажали по одному в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой, где их выдерживали 3-7 дней до опорожнения кишечника. Ядра клеток выделяли из нескольких хвостовых сегментов живого червя (100-300 мкг), либо из целой особи, если её

размер был мал. Часть материала (приблизительно 50-100 мкг) фиксировали в спирте для выделения ДНК на колонках как описано выше.

Живой материал помещали в чашку Петри с 500 мкл буфера Galbraith: 45 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM 3-[N-морфолино]пропансульфоновая кислота (MOPS), 30 mM цитрат Na, 0,1% Triton X-100 [Galbraith et al., 1983]. Материал измельчали лезвием бритвы (около 500 движений). Жидкую фазу переносили в пробирку Eppendorf. Затем промывали материал 500 мкл буфера Galbraith и снова переносили жидкую фазу в ту же пробирку. Образец инкубировали 15-60 мин, затем фильтровали через фильтр 40 мкм и наносили поверх 2 мл буфера Galbraith, содержащего 3% глицерин. Проводили центрифугирование при 200 g в течение 10 мин; супернатант удаляли, осадок растворяли в 500 мкл буфера Galbraith и добавляли 10 мкл РНКазы (1 е.а./мкл). Образец инкубировали 30 мин, добавляли 100 мкл раствора пропидий йодида (1 мг/мл) и помещали в проточный цитофотометр для анализа. В качестве стандартов размера генома использовали клетки крови курицы (2C = 1250 М.п.н. [Kasai et al., 2012]); селезёнки мыши (2C = 3280 М.п.н. [Redi et al., 2005]) и тела дрозофилы (2C = 170 М.п.н. [Gregory and Johnston, 2008; Ellis et al., 2014]).

## 2.12 Анализ метаболитов при помощи <sup>1</sup>H ядерного магнитного резонанса

В работе были взяты выборки двух видов, устойчивых к замораживанию: *Dendrobaena octaedra* и *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* forma *pallida* 1 (линия 1 формы *pallida*). Контрольные и опытные выборки для каждого таксона включали в себя по шесть особей. Контрольных особей выдерживали при +3 °С. Контейнеры с опытными червями постепенно замораживали до -5 °С. Для метаболомного анализа червей максимально быстро очищали и замораживали в жидком азоте. Особей *D. octaedra* замораживали целиком; у *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* 1 forma *pallida* вырезали среднюю часть тела.

Анализ <sup>1</sup>H ЯМР выполнялся сотрудниками лаборатории протеомики и метаболомики института «Международный томографический центр» СО РАН. Все образцы отбирались в химически чистые пробирки без детергентов, полимеров и

фиксаторов, чтобы избежать влияния химического шума на метаболомные результаты. Ткани замораживали в жидком азоте через минимальное возможное время после взятия, транспортировали в жидком азоте, и хранили при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  до исследования. Образец ткани (от 30 до 200 мг) помещали в стеклянный флакон с добавлением 1,7 мл холодного метанола ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), после чего гомогенизировали с использованием роторного гомогенизатора TissueRuptor II (Qiagen, Нидерланды). 0,85 мл воды и 1,6 мл холодного ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) хлороформа добавляли к гомогенату для получения смеси с приблизительным соотношением растворителей 1: 2: 2 вода / метанол / хлороформ. Смесь встряхивали на шейкере в течение 20 минут и инкубировали при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут, после чего подвергали центрифугированию при 13200 g,  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин. Верхний (MeOH-вода) слой собирали, лиофилизировали и хранили при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  до анализа.

Полученные сухие экстракты растворяли в 600 мкл  $\text{D}_2\text{O}$ , содержащего  $6 \times 10^{-6}\text{ M}$  4,4-диметил-4-силапентан-1-сульфоновой кислоты (DSS) натрия в качестве внутреннего стандарта и 20 mM дейтерированного фосфатного буфера для поддержания pH 7,2. Измерения ЯМР  $^1\text{H}$  проводились на ЯМР-спектрометре AVANCE III HD 700 МГц (Bruker BioSpin, Германия), оснащённом 16.44 криомагнитом Tesla Ascend. Спектры ЯМР протонов для каждого образца были получены с 96 накоплениями. Температура образца при съёмке спектров поддерживалась на уровне  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , импульс детектирования составлял 90 градусов. Время повторения между сканированиями составляло 20 секунд для полной релаксации всех спинов. Перед детектирующим импульсом образец подвергался излучению малой мощности на частоте резонанса воды для предварительного насыщения сигнала воды. Концентрации метаболитов в образцах определяли интегрированием площади пиков соответственно с внутренним стандартом DSS.

Большинство сигналов в спектрах ЯМР соответствовали хорошо известным метаболитам, спектры которых имеются в литературе. Эти метаболиты включают в себя аминокислоты, органические кислоты, спирты, сахара, нуклеотиды и другие. Для большинства этих соединений идентификация проводилась по их ЯМР-спектрам без дополнительного подтверждения. В некоторых случаях отнесение

сигнала было неочевидным; в этих случаях идентификация была подтверждена добавлением в экстракт коммерческих стандартных соединений.

### 2.13 Биоинформатический анализ

Редактирование хроматограмм, полученных секвенированием по Сэнгеру, выполняли в программе Chromas (<http://technelysium.com.au>). Выравнивание последовательностей проводили на сервере ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) [Goujon et al., 2010; McWilliam et al., 2013]. Для построения филогенетических деревьев использовали алгоритмы минимальной эволюции (Minimum Evolution), максимальной парсимонии (Maximum Parsimony), максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) и байесовский анализ (Bayesian analysis). Анализы минимальной эволюции, максимальной парсимонии и максимального правдоподобия выполняли в программе Mega различных версий [Kumar et al., 1994, 2018; Tamura et al., 2007, 2011]. Для построения филогенетических деревьев на больших массивах данных методом максимального правдоподобия также использовали программу RAxML [Stamatakis, 2014]. Модели замен подбирали при помощи программы MrModeltest v. 2 [Nylander, 2004]. Поддержка отдельных ветвей на деревьях оценивалась по значению bootstrap value.

байесовский анализ выполняли в программе MrBayes [Huelsenbeck, Ronquist, 2001; Ronquist et al., 2003, 2012]. Для анализа использовали от 1 000 000 до 20 000 000 шагов; 25% были отброшены как burn-in, а оставшиеся были использованы для построения дерева и оценки апостериорных байесовских вероятностей. Анализ выполнялся с двух независимых цепей Маркова методом Монте-Карло. Модели нуклеотидных и аминокислотных замен были подобраны в программах Mega X и MrModeltest2 (<https://github.com/nylander/MrModeltest2>). Визуализация филогенетических деревьев проводилась в программе FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Анализ молекулярных часов выполняли в программах BEAST и BEAUti [Drummond, Rambaut, 2007; Drummond et al., 2017]. Для анализа использовали модель расслабленных молекулярных часов и оценки скорости эволюции митохондриального гена *cox1*, взятые в литературе [Chang, Chen, 2005; Chang et al., 2009].

Определение параметров популяций (нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие, попарные расстояния Райта  $F_{st}$ , тест попарных замен (mismatch distribution) и т.д.) выполняли в программах Arlequin разных версий [Excoffier et al., 2005; Excoffier, Lischer, 2010]. Сети гаплотипов строили с использованием программ TCS [Clement et al., 2002] и Network [Bandelt et al. 1995, 1999; Polzin, Daneshmand, 2003].

Для автоматического разбиения набора данных на «виды» проводили анализы ABGD и multi-rate Poisson Tree Process. Анализ ABGD [Puillandre et al., 2012] выполняли онлайн на сайте <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>. Метод multi-rate Poisson Tree Process [Kapli et al., 2017] был проведен при помощи сайта <http://mptp.h-its.org/#/tree>. В качестве входных данных было использовано полученное дерево максимального правдоподобия. Попытка реконструкции предковых ареалов была сделана методом S-DIVA (Statistical dispersal-vicariance analysis) в программе RASP v. 4 [Yu et al., 2015, 2020].

Анализ данных RADSeq выполняли алгоритмами Stacks [Catchen et al., 2013] и ipyrad [Eaton, Overcast, 2020]. В обоих случаях сырые последовательности демультиплексировали и собирали в ортологичные локусы без использования референсного генома. При сборке пробовали различные значения важных параметров, таких как: количество сырых ридов на локус, количество замен между аллелями одного локуса, представленности локуса в популяции и т.д.

Методические особенности каждой конкретной работы изложены в начале соответствующих разделов в следующих главах.

## Глава 3. Комплекс *Eisenia nordenskioldi*

### 3.1 Открытие филогенетических линий у *E. nordenskioldi*

Принимая во внимание имеющиеся данные (Раздел 1.5.1), мы ожидали обнаружить у *E. nordenskioldi* высокую генетическую изменчивость. С целью её предварительной оценки в 2007–2011 гг. была собрана коллекция из 97 особей, взятых из 10 географически отдалённых популяций (Рисунок 3.1.1). В качестве внешних групп были также взяты образцы *E. fetida*, *Aporrectodea rosea*, *Dendrodrilus rubidus subrubicundus*, *Lumbricus rubellus* и *Octolasion tyrtaeum*; следует отметить, что в то время имеющиеся в GenBank для сем. Lumbricidae данные были крайне фрагментарными. Из каждого образца была выделена тотальная ДНК, при помощи секвенирования по Сэнгеру получены последовательности митохондриального гена *cox1* и ядерных рибосомальных спейсеров 1 и 2 (ITS1 и ITS2) (Раздел 2.3.1).

В исследованной выборке последовательностей *cox1* не было обнаружено полиморфизма по длине последовательностей. Для этого гена были построены филогенетические деревья методами ME, MP и байесовским анализом. Образцы *E. n. nordenskioldi* разделились на шесть кластеров (Рисунок 3.1.2). Эти кластеры были названы линиями 1– 6, в дальнейшем мы продолжили присваивать вновь обнаруживаемым линиям номера по порядку обнаружения. Каждый из кластеров поддерживался высокими значениями бутстрепна и байесовской апостериорной вероятности; подразделение на кластеры сохранялось и при удалении из выборки третьей позиции кодона.

Нуклеотидные дистанции по гену *cox1* между линиями составляли 13,6–18,4%, что близко к расстояниям между этими линиями и внешними группами из других родов. Предварительный анализ филогеографии показал, что в пределах каждой из линий наблюдались значительные генетические дистанции между

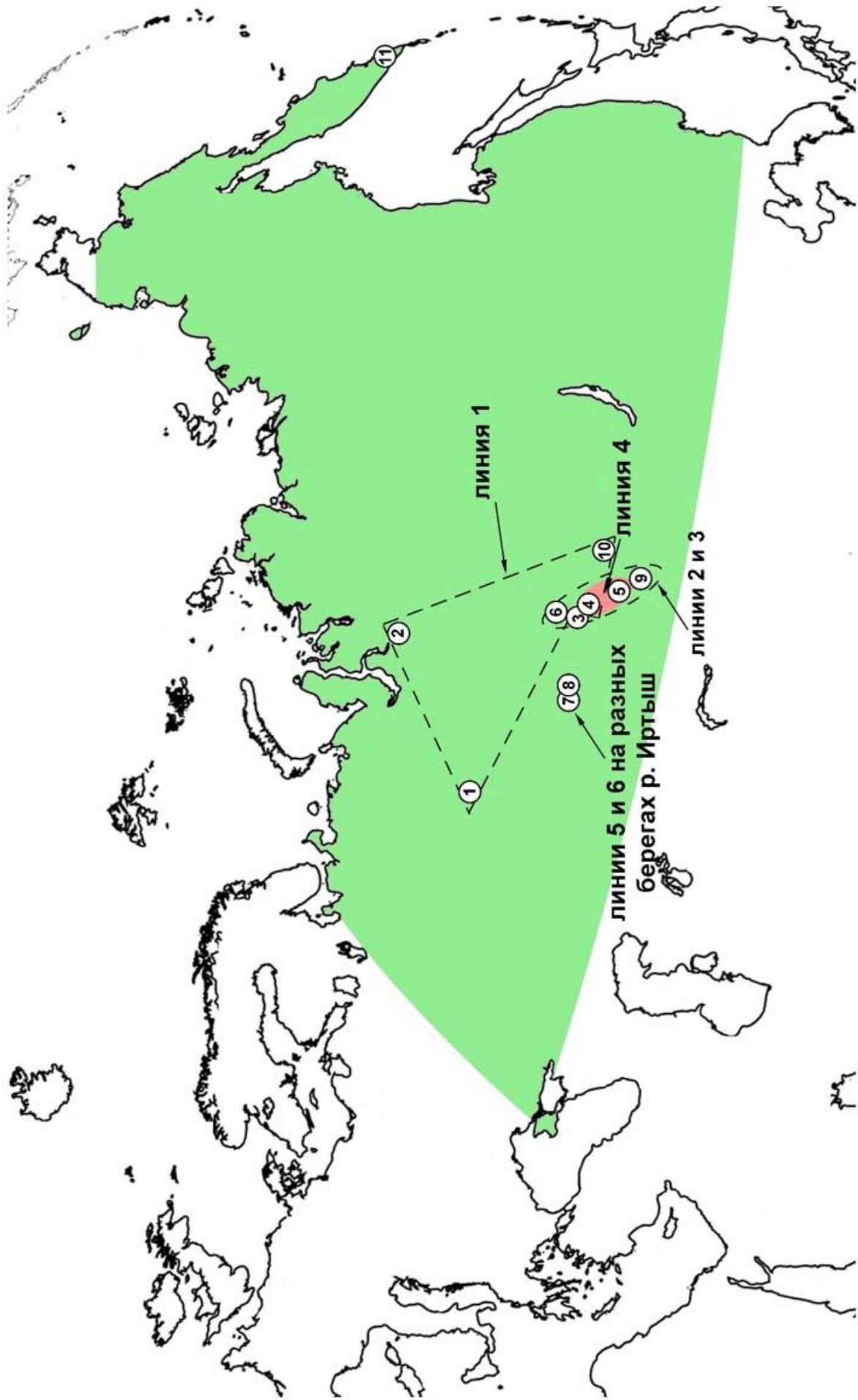


Рисунок 3.1.1.1. Точки сбора образцов *E. n. nordenskiöldi* и выявленные филогенетические линии. Серым цветом отобразен ареал *E. n. nordenskiöldi*.



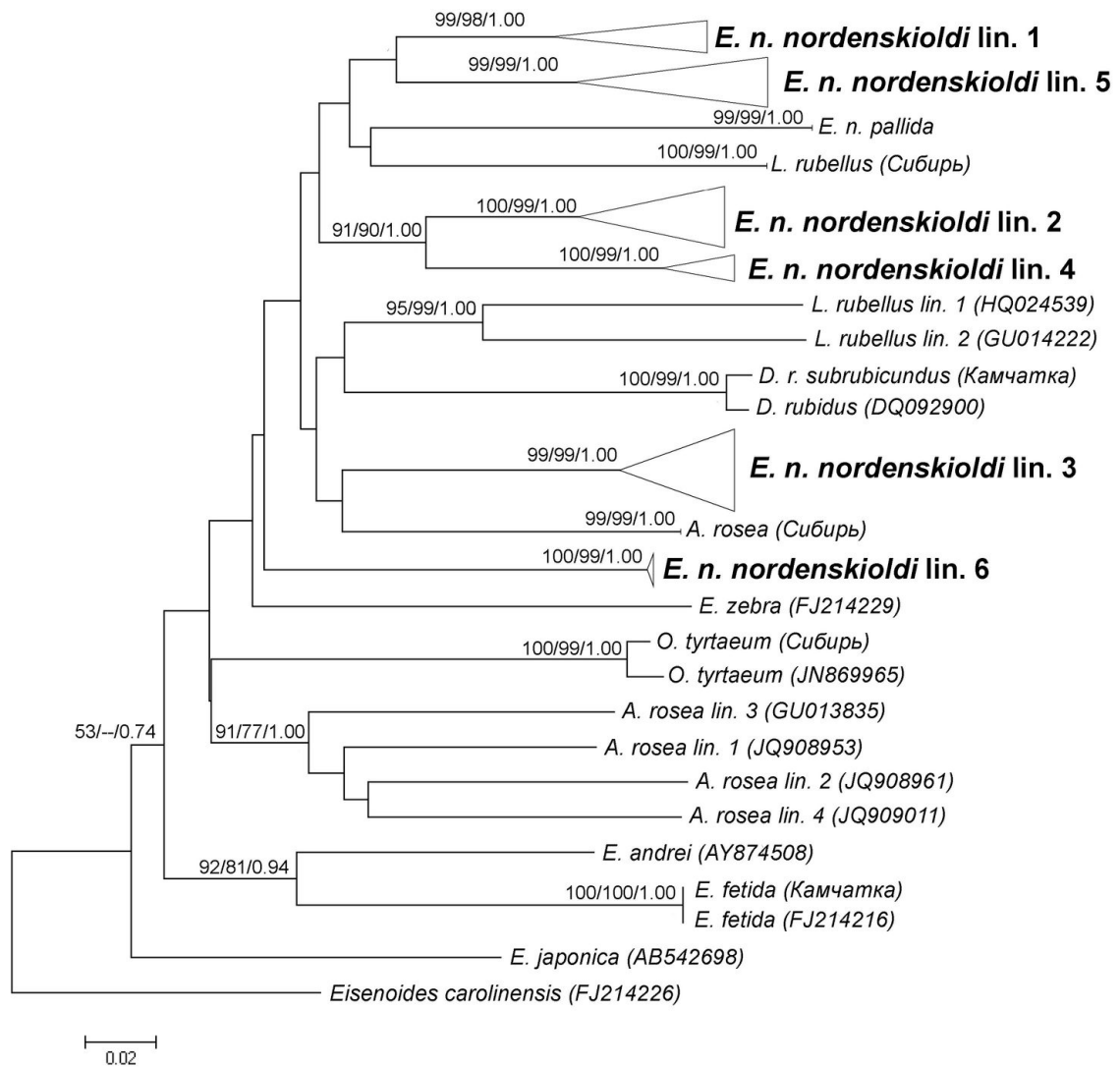


Рисунок 3.1.2. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям гена *cox1* дождевых червей методом минимальной эволюции. Филогенетические линии *E. n. nordenskioldi* показаны в виде треугольников, где их основание пропорционально числу последовательностей, а высота — нуклеотидному разнообразию в пределах ветви. Числа возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку минимальной эволюции / максимальной парсимонии / байесовские апостериорные вероятности. В скобках — номера в базе данных GenBank.

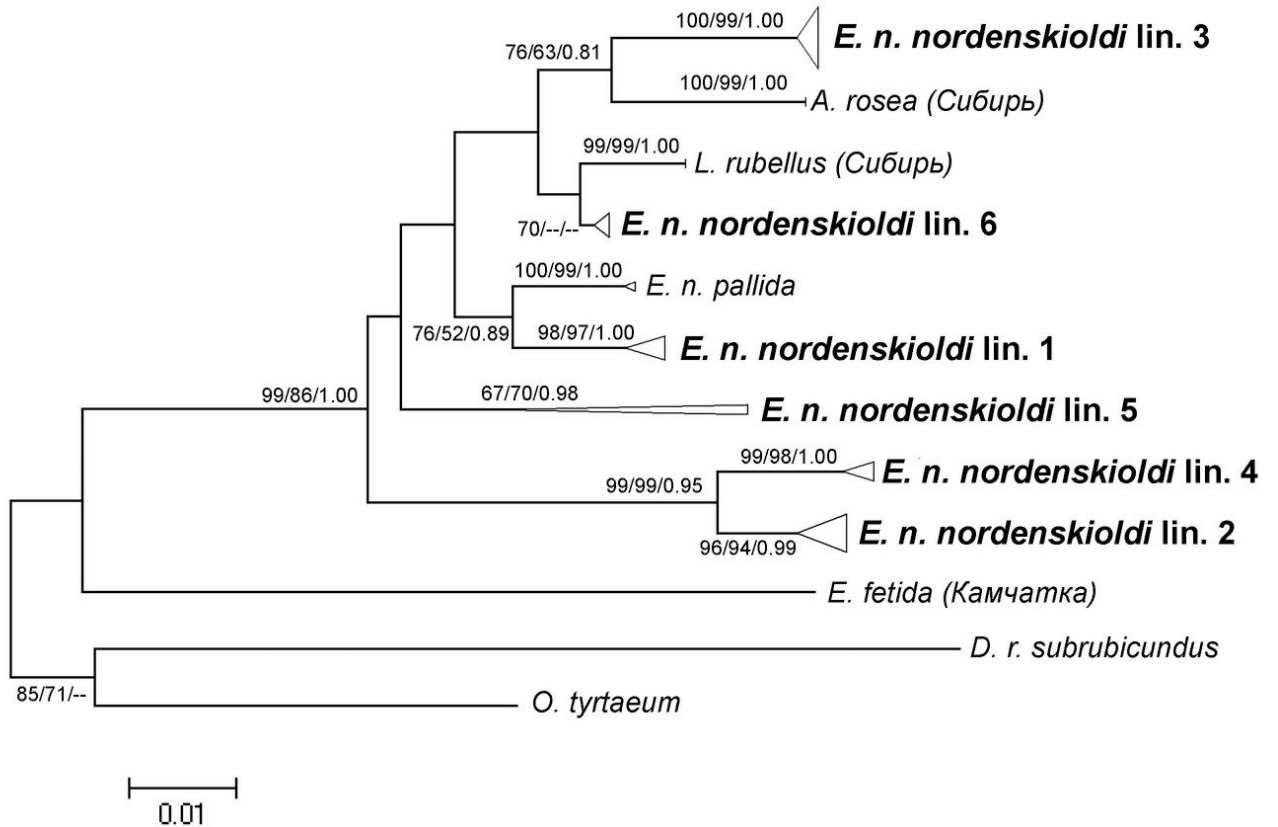


Рисунок 3.1.3. Филогенетическое дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям ITS2 методом минимальной эволюции. Филогенетические линии *E. n. nordenskioldi* показаны в виде треугольников, где их основание пропорционально числу последовательностей, а высота – нуклеотидному разнообразию в пределах ветви. Числа возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку минимальной эволюции / максимальной парсимонии / байесовские апостериорные вероятности.

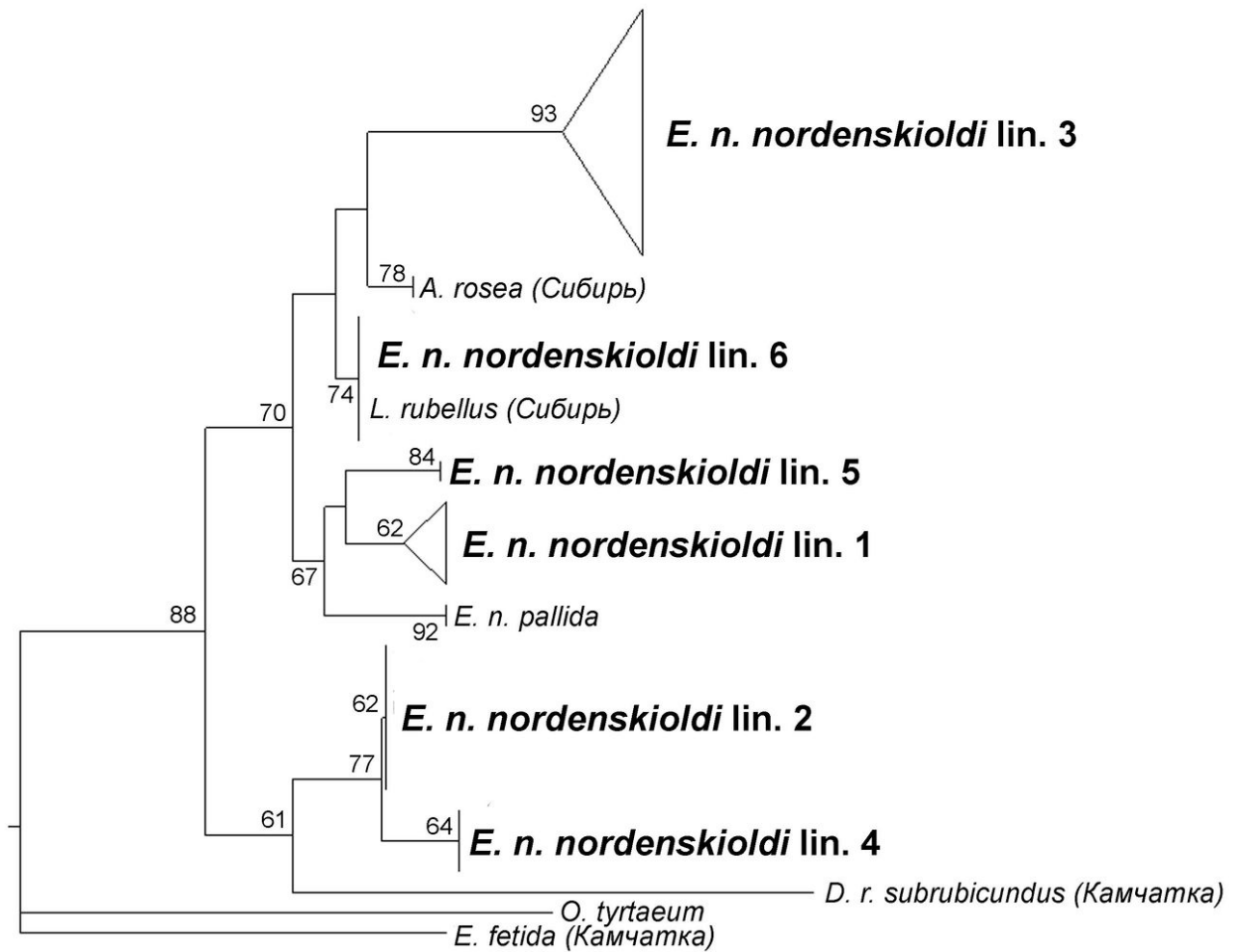


Рисунок 3.1.4. Филогенетическое дерево, построенное по конкатенированным нуклеотидным последовательностям *cox1* + ITS2 методом байесовского анализа. Филогенетические линии *E. n. nordenskioldi* показаны в виде треугольников, где их основание пропорционально числу последовательностей, а высота — нуклеотидному разнообразию в пределах ветви. Числа возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку минимальной эволюции / максимальной парсимонии / байесовские апостериорные вероятности.

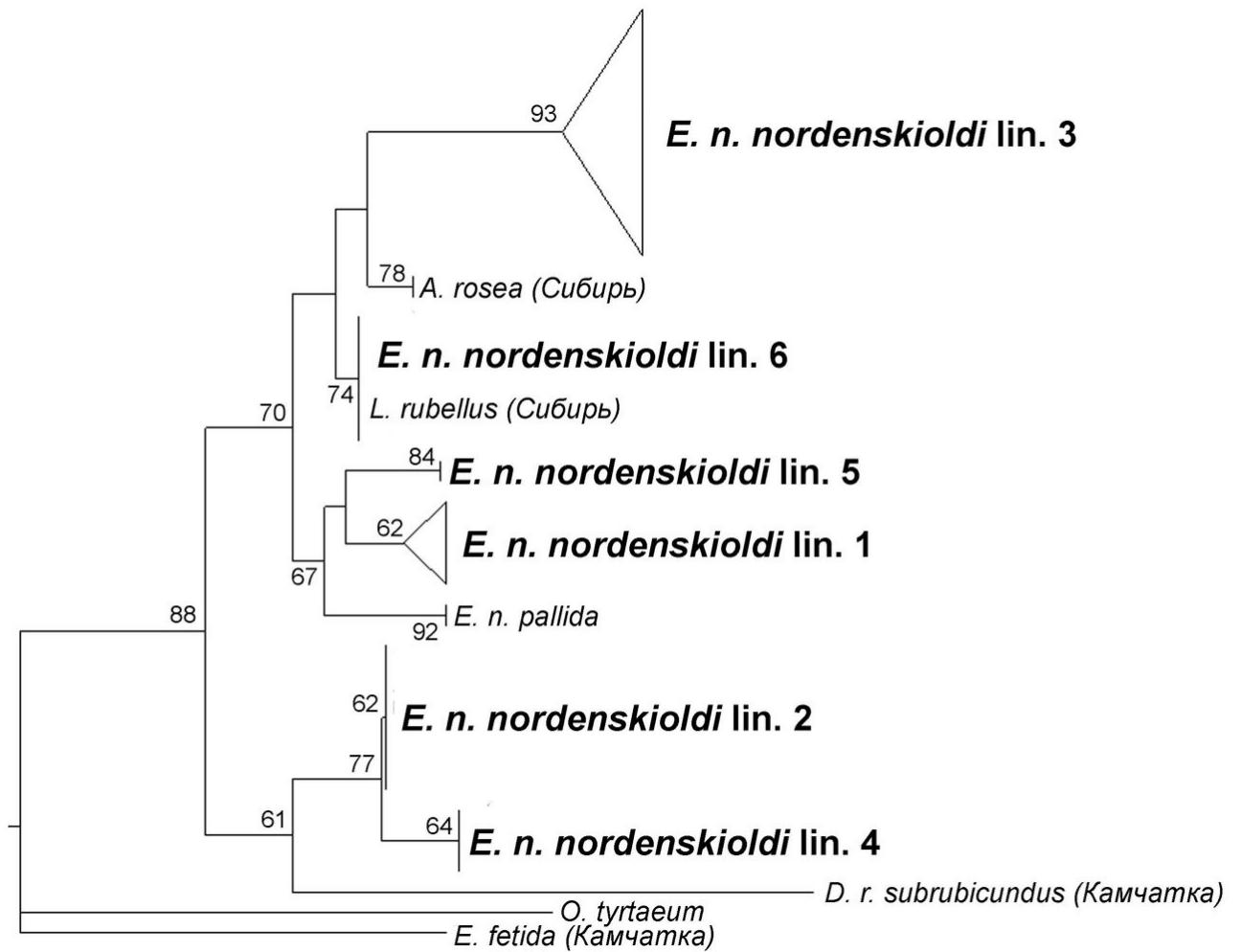


Рисунок 3.1.5. Филогенетическое дерево, построенное по инсерциям/делециям ITS2 методом минимальной эволюции. Филогенетические линии *E. n. nordenskioldi* показаны в виде треугольников, где их основание пропорционально числу последовательностей, а высота – нуклеотидному разнообразию в пределах ветви. Числа возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку минимальной эволюции / максимальной парсимонии / байесовские апостериорные вероятности.

отдалёнными популяциями. Анализ аминокислотных последовательностей гена *cox1*, полученных с использованием митохондриального генетического кода, характерным для беспозвоночных, выявил семь переменных сайтов, в которых было отмечено 9 аминокислотных замен. Количество аминокислотных различий между линиями варьировало от 0 (например, идентичными оказались белковые последовательности линий 3, 4 и 6) до 4.

Так как выводы, полученные только на митохондриальных данных, не могут считаться достаточными для получения уверенных выводов, мы проанализировали и ядерные последовательности ITS1 и ITS2. Оказалось, что количество нуклеотидных замен непосредственно последовательностей спейсеров в несколько раз выше, чем фланкирующих их генов 18S и 28S рРНК. Однако, у многих образцов был обнаружен полиморфизм по длине спейсеров, из-за чего возникали проблемы с секвенированием, делавшие их непригодными для массового анализа. В связи с этим, пришлось ограничиться выборкой в 48 последовательностей ITS2. На филогенетических деревьях, построенных по выборке ITS2 (Рисунок 3.1.3) и по конкатенированным последовательностям *cox1*+ITS2 (Рисунок 3.1.4), выделялись те же шесть филогенетических линий. Также была реконструирована клада более высокого уровня, включающая в себя все линии *E. n. nordenskioldi*, а также *E. n. pallida*, *A. rosea* и *L. rubellus*. На дереве, построенном по инсерциям/делециям ITS2 (Рисунок 3.1.5) выделялась та же клада, которая, однако, включала в себя ещё и *D. r. subrubicundus*. Впоследствии, после обработки более обширной выборки, оказалось, что взятые образцы *A. rosea* и *L. rubellus* были неверно определёнными *E. n. pallida* и *E. n. nordenskioldi*. Таким образом, выделение вышеупомянутой клады оказывается вполне объяснимым.

В результате проведённой работы впервые было показано, что *E. n. nordenskioldi* подразделяется, как минимум, на шесть филогенетических линий. Степень нуклеотидных различий между митохондриальными последовательностями разных линий немного ниже, чем между этими линиями и видами-внешними группами (Таблица 3.1.1 и рисунок 3.1.6); различия по ITS2 выражены более заметно.

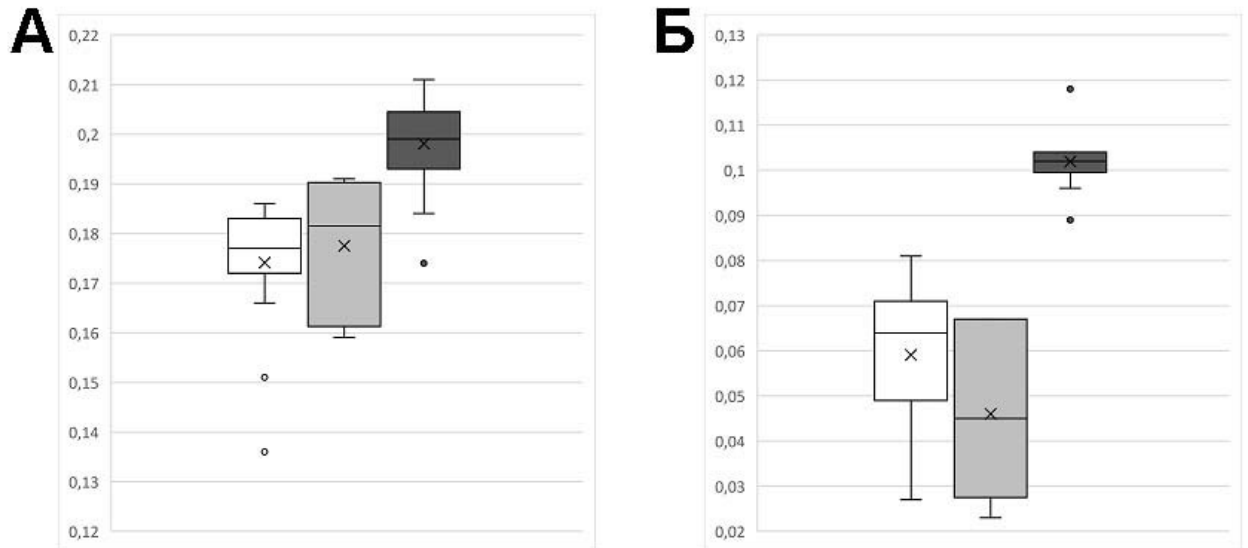


Рисунок 3.1.6 Р-дистанции между последовательностями *cox1* (А) и ITS2 (Б) (верхняя панель). Белые прямоугольники – дистанции между линиями *E. n. nordenskioldi*; светло-серые – между *E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida*; темно-серые – между *E. nordenskioldi* и другими видами (см. таблицу 3.1.1). Черта внутри прямоугольников соответствует медианному значению, крестик – среднее значение, верхняя и нижняя границы – 25й и 75й перцентили, верхний и нижний усы – 1,5 интерквартильных расстояния, кружки – выбросы.

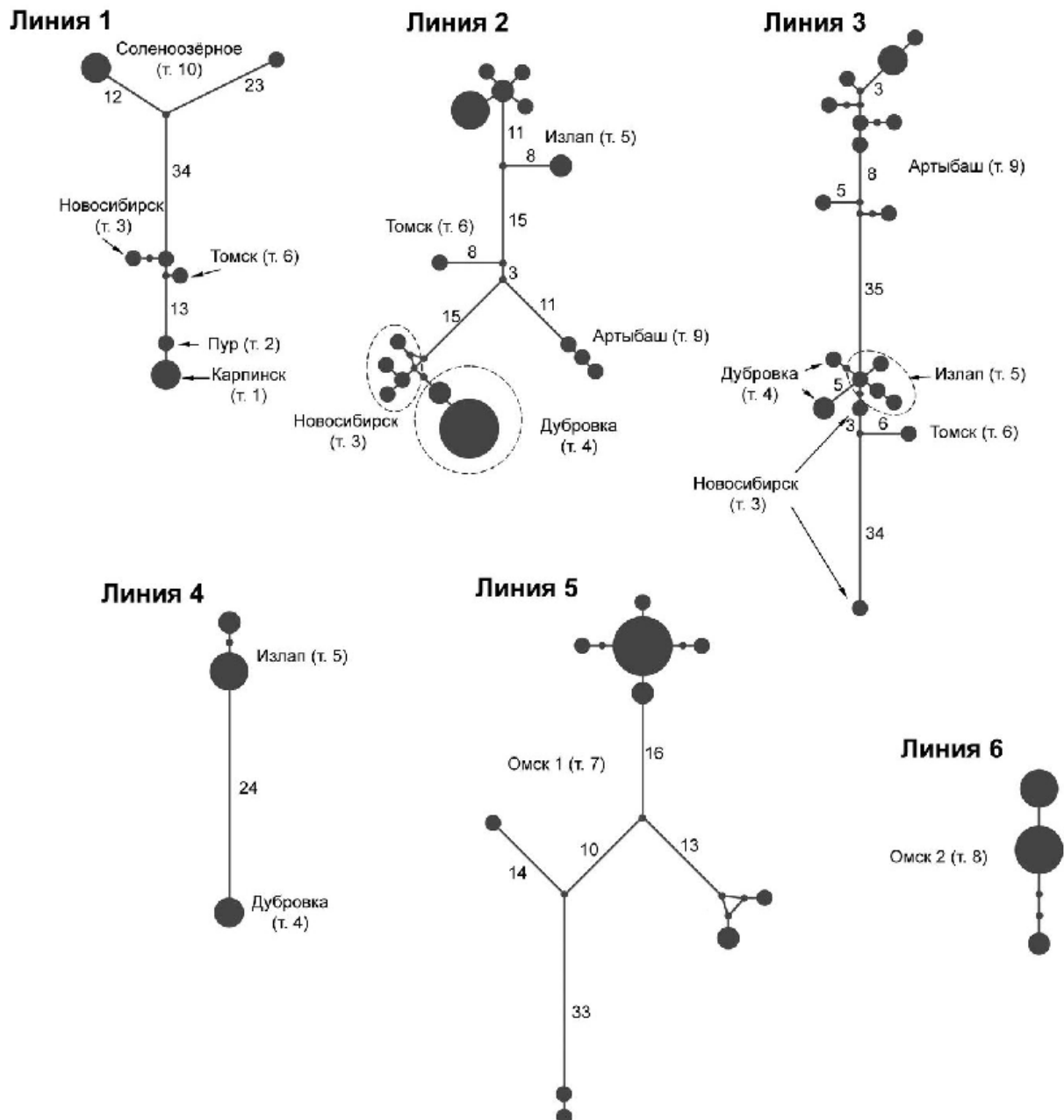


Рисунок 3.1.7. Сети гаплотипов для линий 1–6 *E. n. nordenskioldi*. Числа обозначают количество нуклеотидных замен, точки – отсутствующие гаплотипы. Площади кругов пропорциональны количеству особей, имеющих данный гаплотип.

Таблица 3.1.1. Р-дистанции между линиями *E. n. nordenskiöldi* и различными видами дождевых червей. Над диагональю значения для ITS2, под диагональю – для *cox1*.

	линия 1	линия 2	линия 3	линия 4	линия 5	линия 6	<i>E. n. pallida</i>	<i>tyrtaeum</i>	<i>andrei</i>	<i>E. fetida</i>
линия 1	-	0,069	0,050	0,070	0,049	0,033	0,023	0,102	0,102	0,104
линия 2	0,177	-	0,078	0,027	0,071	0,068	0,067	0,118	0,103	0,104
линия 3	0,172	0,175	-	0,081	0,062	0,032	0,049	0,102	0,101	0,103
линия 4	0,166	0,136	0,180	-	0,076	0,064	0,067	0,118	0,101	0,099
линия 5	0,151	0,185	0,183	0,183	-	0,056	0,041	0,104	0,101	0,104
линия 6	0,175	0,186	0,176	0,183	0,184	-	0,029	0,089	0,096	0,099
<i>E. n. pallida</i>	0,159	0,191	0,190	0,162	0,180	0,183	-	0,089	0,100	0,102
<i>O. tyrtaeum</i>	0,209	0,207	0,198	0,196	0,202	0,184	0,199	-	0,108	0,111
<i>E. andrei</i>	0,192	0,205	0,211	0,196	0,190	0,198	0,191	0,188	-	0,036
<i>E. fetida</i>	0,194	0,204	0,199	0,201	0,205	0,174	0,204	0,195	0,149	-



Таблица 3.1.2. Молекулярно-генетическая изменчивость филогенетических линий *E. n. nordenskioldi*. N – число последовательностей; n – число гаплотипов;  $h \pm SD$  – гаплотипическое разнообразие  $\pm$  стандартное отклонение;  $pi \pm SD$  – нуклеотидное разнообразие  $\pm$  стандартное отклонение, CI – интервал доверительной вероятности. Для ITS2,  $pi$  и  $h$  не вычисляли из-за малого числа последовательностей.

	cox1			ITS2			
	N	n	$h \pm SD$	$pi \pm SD$	время дивергенции, тыс.л.н. (95% CI)	N	n
линия 1	11	7	0,89 $\pm$ 0,07	0,047 $\pm$ 0,025	3276 (4419-2090)	5	5
линия 2	28	16	0,98 $\pm$ 0,02	0,045 $\pm$ 0,022	3055 (4150-1940)	8	8
линия 3	21	18	0,93 $\pm$ 0,03	0,002 $\pm$ 0,001	2364 (3228-1516)	13	13
линия 4	9	5	0,64 $\pm$ 0,13	0,018 $\pm$ 0,010	1406 (2134-808)	4	4
линия 5	17	10	0,88 $\pm$ 0,07	0,039 $\pm$ 0,020	3356 (4617-2206)	2	2
линия 6	11	3	0,69 $\pm$ 0,09	0,038 $\pm$ 0,019	290 (568-119)	5	5
всего	97	59				37	37

На основании полученных данных можно выдвинуть предположение, что выявленные филогенетические линии *E. nordenskioldi* представляют собой виды-двойники. В пользу этого говорит соответствие филогенетических реконструкций на основе ядерных и митохондриальных маркеров, что указывает на отсутствие гибридизации, при том, что многие из этих линий обнаруживаются симпатрично (Рисунок 3.1.1), а также значительные генетические расстояния между этими линиями.

Ещё одним из важных результатов данной работы стало выявление довольно глубоких генетических различий между географически отдалёнными популяциями в пределах одной линии, что показано на рисунке 3.1.7. Считается, что циклы плейстоценовых оледенений привели к значительному уменьшению внутривидового генетического разнообразия фауны Сибири. Эта закономерность верна для большинства изученных животных, большинство которых относится к позвоночным: как правило, генетические различия между популяциями, проживающими в разных регионах Сибири, малы или отсутствуют.

Применительно к дождевым червям, однако, можно заключить, что филогенетические линии дивергировали в далеком прошлом. Мы сделали попытку реконструировать время дивергенции при помощи метода молекулярных часов, используя оценку времени дивергенции в 3,5% замен на миллион лет [Chang, Chen, 2005]. По результатам анализа, расхождение предкового вида на современные филогенетические линии происходило со среднего плиоцена до среднего плейстоцена (3,3 – 1,4 млн. лет назад). Это является ещё одним свидетельством в пользу видовой самостоятельности филогенетических линий *E. nordenskioldi*.

### 3.2 Филогенетические линии у *E. n. pallida*

Как и для номинативного подвида, мы изучили генетическую изменчивость для непигментированного подвида *E. n. pallida* при помощи митохондриальных и ядерных последовательностей. В 2015 г. была собрана и обработана выборка из 99 образцов из 18 точек (Рисунок 3.2.1). В полученном наборе последовательностей

*cox1* было обнаружено 37 гаплотипов и 231 полиморфный сайт. Образцы разделились на пять основных ветвей (филогенетических линий), каждая из которых имела свой ареал. Линия 1 имела широкий ареал, захватывающий Восточную Сибирь, линии 2 и 3 были приурочены к горной системе Сихотэ-Алинь и прилегающим территориям, линия 4 была найдена только в окр. Олекминска (юго-западная Якутия), а линия 5 – в Северо-Восточном Казахстане.

Результаты анализа ядерной ДНК (ITS2) показали, что число замен в этом локусе несколько ниже: было найдено 36 уникальных последовательностей и 112 полиморфных сайтов. В отличие от *cox1*, ITS2 содержал много инсерций/делеций, изменчивость по которым характеризовала не только разные линии, но и разные образцы одной линии. Например, образцы линии 1 из Магадана отличались от других популяций линии инсерцией TG. Топология деревьев, построенных по ITS2, в целом совпадала с таковой, полученной для *cox1*.

Линия 1 *E. n. pallida* выделялась на фоне прочих линий *E. n. pallida* наличием лишь одного гаплотипа *cox1*, несмотря на обширный ареал. Хотя в последовательностях ITS2 была найдена некоторая изменчивость, она гораздо меньше таковой у линии 2, несмотря на значительно больший ареал линии 1. В качестве одного из возможных объяснений можно предложить быстрое расселение линии 1, возможно, при помощи человека. В пользу этого свидетельствует тот факт, что все найденные популяции приурочены к антропогенным местообитаниям. Кроме того, *E. n. pallida* полностью отсутствует в естественных местообитаниях вблизи г. Магадан и в континентальных районах Магаданской области [Berman, Meshcheryakova, 2013].

По данным, полученным Мещеряковой и Берманом [Meshcheryakova, Berman, 2014] для магаданской популяции *E. n. pallida*, относящейся к линии 1, известно, что она отличается значительной устойчивостью к низким температурам, что даёт ей преимущество перед европейскими перелетными видами в регионах с холодными зимами. Экологическими аналогами её можно считать *A. caliginosa* и *A. rosea*. Однако, в отличие от них особи линии 1 из

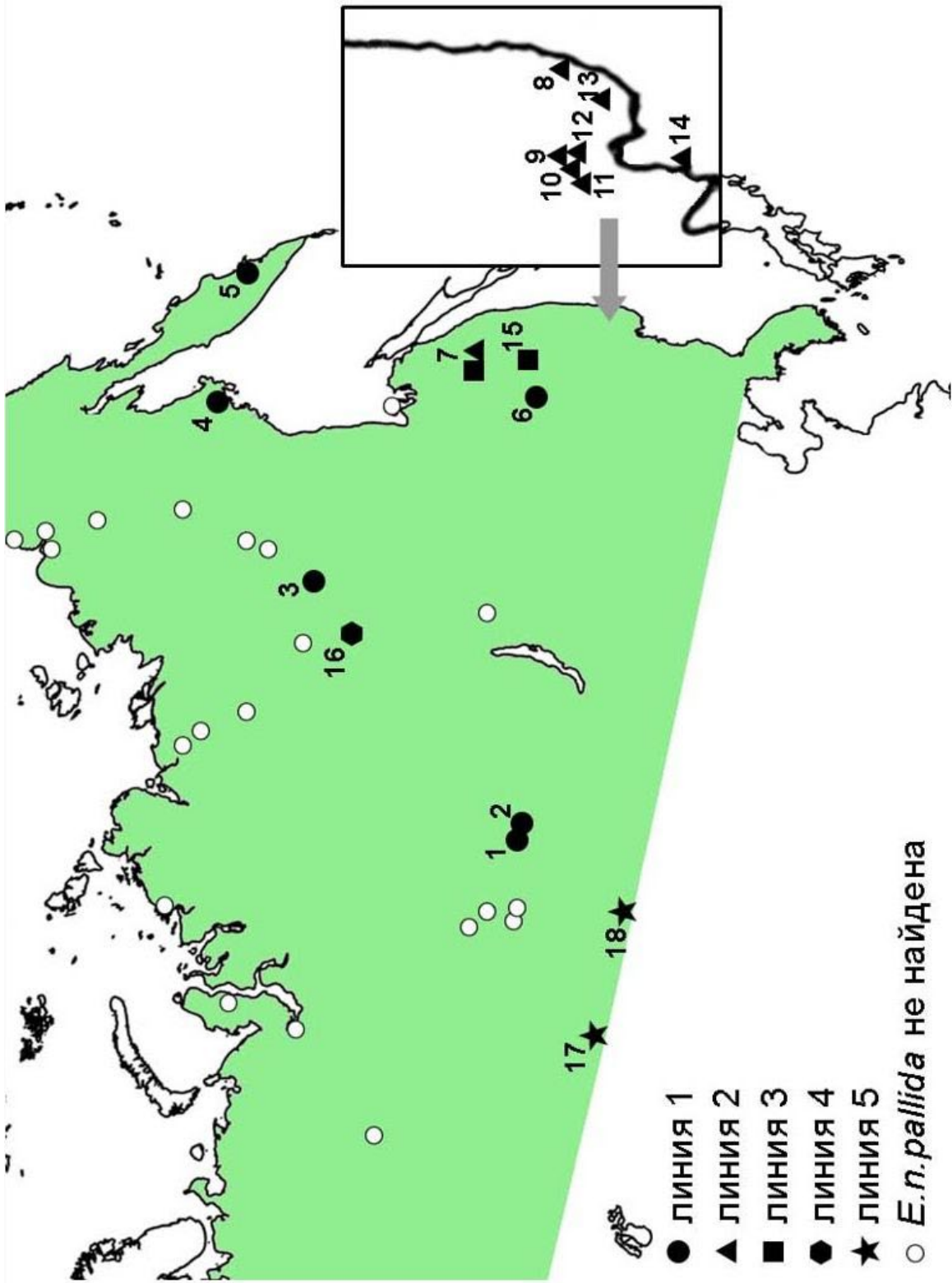


Рисунок 3.2.1 Карта сбора образцов *E. n. pallida*. Номера точек соответствуют таблице 3.2.1 Зеленым цветом показан ареал *E. nordenskioldi*.

Таблица 3.2.1.1. Выборка *E. n. pallida*, использованная в работе. N – число особей, n – число уникальных гаплогенов/генотипов, GD – генное разнообразие, pi – нуклеотидное разнообразие, с.о. – стандартное отклонение

No. Точка	биотоп	соx1		ITS2		
		N	n	GD (с.о.)	pi	
<b>Линия 1</b>						
1	Хакасия, Чёрное озеро	огород				
		5	1	0	0	2
					0,286	0,00048
					(0,196)	(0,00066)
2	Хакасия, Шира	огород	7	1	0	1
3	Якутия, Хоринцы	луг			1,00	0
		2	1	0	0	2
					(0,500)	0
4	Магаданская обл., Магадан	огород	5	1	0	1
5	Камчатская обл.	лес	2	1	0	1
6	Амурская обл., Архара	свалка			0	0
		в лесу	12	1	0	1
					0,784	0,00259
			33	1	0	7
					(0,042)	(0,00177)
<b>Линия 2</b>						
7	Хабаровский край, Пивань	лес			0,667	0,00095
		10	1	0	0	5
					(0,163)	(0,00096)

8	Приморский край, Рудная Пристань	поле	3	1	0	0	2	0,667	0
9	Приморский край, Уссурийск	поле	7	6	0,952	0,00695	2	0,286	0
10	Приморский край, Монакино	лес	12	5	(0,096)	(0,00445)	6	0,849	0,00142
11	Приморский край, Линевичи	поле	2	1	0,7273	0,00573	1	1,00	0,00511
12	Приморский край, Заречное	поле	2	1	0	0	1	(0,500)	(0,00590)
13	Приморский край, Лазо	лес	2	1	0,786	0,00467	1	1,00	0,00170
14	Приморский край, Славянка	поле	8	5	(0,151)	(0,00309)	1	0	0
	Всего		48	24	1,00	0,01165	22	0,667	0,00227
			4	4	(0,179)	(0,00823)	2	(0,204)	(0,00209)
			48	24	(0,023)	(0,03695)	22	(0,018)	(0,00351)
<b>Линия 3</b>									
15	Хабаровский край, Хехцирский запов.	лес	3	3	1,00	0,00810	1	0	0
7	Хабаровский край, Пивань	лес	2	1	(0,272)	(0,0067)	1	0	0
			2	1	0	0	1	0	0

Всего			0.90	0.05258	0,600	0,00203
	5	4	(0.161)	(0.0325)	2	(0,175)
						(0,00180)
<b>Линия 4</b>						
16	Якутия, Олёкминск	поле	0.733	0.00223	0,400	0,00137
	6	3	(0.155)	(0.0018)	2	(0,237)
						(0,00136)
<b>Линия 5</b>						
17	Казахстан, Караганда	берег			0,667	
		ручья	4	1	0	2
		огород	3	1	0	1
18	Казахстан, Катон-Карагай		0.571	0.01650	0,762	0,00951
Всего	7	2	(0.112)	(0.0098)	3	(0,115)
						(0,00591)
<b>Итого</b>	99	34			36	

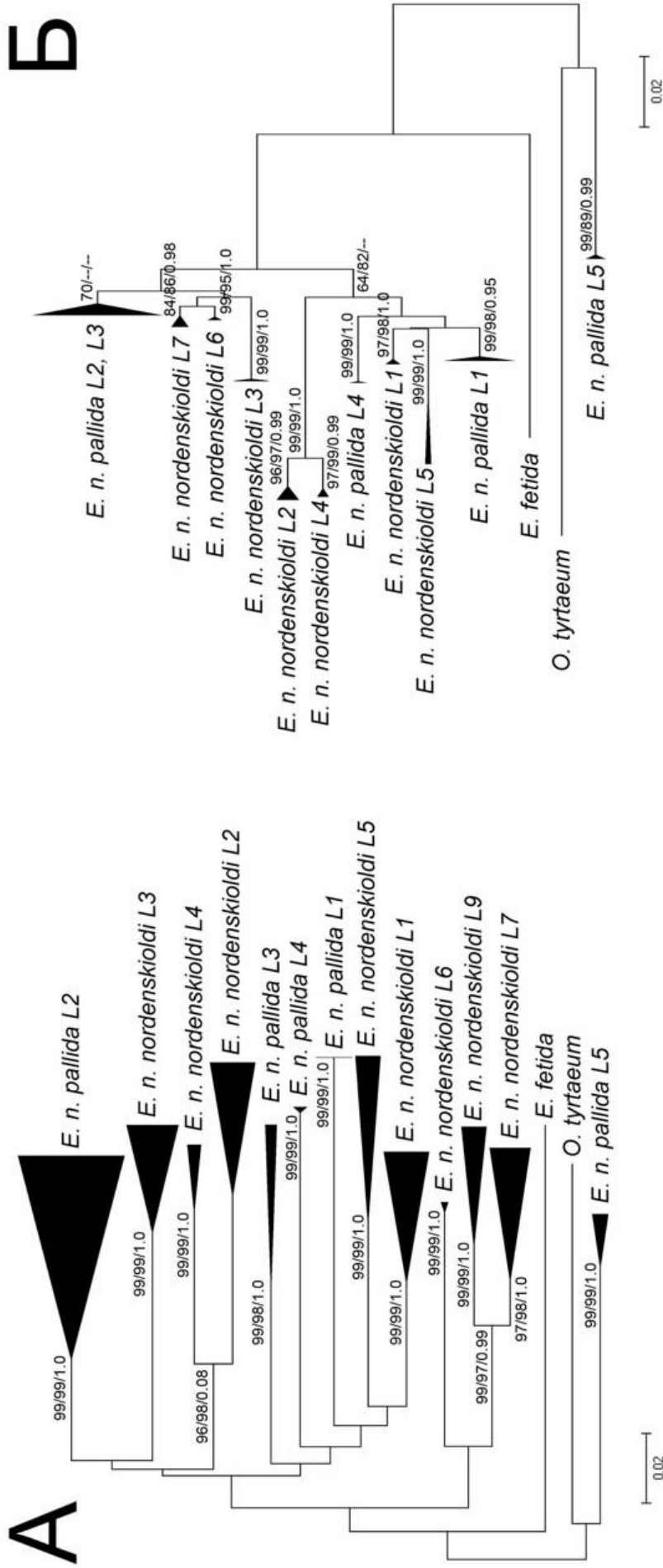


Рисунок 3.2.2 Филогенетические деревья, построенные методом минимальной эволюции для последовательностей *cox1* (А) и ITS2 (Б). Последовательности, относящиеся к одной линии, показаны в виде треугольников. Числа обозначают бутстрепную поддержку методов минимальной эволюции / максимального правдоподобия / байесовскую апостериорную вероятность. Серым цветом отмечены линии *E. n. pallida* 2 и 3



Магадана могут выдерживать до  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$  на стадии коконов), в то время как *A. caliginosa* не выдерживает температуры ниже  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , *A. rosea* –  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  (на стадии коконов,  $-15$  и  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , соответственно [Meshcheryakova, Verman, 2014]).

Филогенетические линии 2 и 3 были найдены в горах Сихотэ-Алиня и на прилегающих равнинах. Этот регион расположен в Маньчжурском субрегионе Палеарктики, в то время как остальные линии были найдены в Сибирском субрегионе. Фауны этих субрегионов различаются значительно. Таким образом, может оказаться, что эти линии *E. n. pallida* являются северными представителями восточноазиатской фауны.

При этом оказалось, что образцы из Приморья, на дереве *cox1* разделившиеся на линии 2 и 3 и сильно отличающихся друг от друга (24,2% нуклеотидных замен по модели Kimura-2-parameter), образовывали только одну ветвь на дереве, построенном по ITS2. Следует отметить, что последовательности ITS2 третьей линии отличались от второй уникальной инсерцией TGT. Кроме того, дальневосточные популяции отличались ещё одним инсерционным полиморфизмом: в северных популяциях линии 2 и у линии 3 присутствовала инсерция TA/CA. Это говорит о присутствии географического полиморфизма в этом регионе.

Подобные случаи несовпадения картин, полученных при помощи митохондриальных и ядерных маркёров, были не раз обнаружены у дождевых червей. В качестве примеров можно привести виды *Allolobophora chlorotica* [Dupont et al., 2011, 2016], *Octolasion tyrtaeum* [Heethoff et al., 2004], *Lumbricus rubellus* [Giska et al., 2015; Martinsson, Erséus, 2017b] и *Aporrectodea longa* [Martinsson et al., 2017a]. Поскольку известно, что история мтДНК может заметно отличаться от истории ядерного генома [Naciri, Linder, 2015; Sloan et al., 2017; Tamashiro et al., 2019]. Таким образом, для прояснения степени различий между филогенетическими линиями необходимо использовать и ядерные последовательности, причем желательно не ограничиваться единственным локусом.

Популяции линий 2 и 3 *E. n. pallida* часто встречаются как в естественных биотопах, так и на полях, в последнем случае зачастую вместе с переплывающим видом *A. caliginosa*. Это согласуется с наблюдениями, приведенными в статье Т. С. Всеволодовой-Перель и А. Н. Лейрих [2014].

Линия 4 *E. n. pallida* пока что обнаружена только вблизи г. Олэксминск. Судя по тому, что она пока не была обнаружена нигде более в мире, несмотря на довольно большое количество исследованных точек, это автохтонная, а не интродуцированная популяция. В связи с недостаточностью имеющейся информации мы пока не можем ничего сказать о её ареале.

Филогенетическая линия 5 была найдена в двух точках в центральном и восточном Казахстане. Последовательности *cox1* линии 5 оказались на 97% сходными с таковыми неопределённого червя из центральной Венгрии (лес к юго-западу от Батапати). Впоследствии было показано, что эти образцы можно идентифицировать как *A. rosea*, которая имеет близкий диагноз. Таким образом, вопрос о присутствии и филогенетической принадлежности *E. n. pallida* в Казахстане остаётся открытым.

Важным результатом описанной работы стали свидетельства в пользу немонофилетичности как *E. n. nordenskioldi*, так и *E. n. pallida*. Это шло вразрез с общепринятым разделением *E. nordenskioldi* на два подвида. Однако, полученные данные нельзя было считать достаточными, так как единственный ядерный локус может оказаться ненадёжным свидетельством. В связи с этим методами секвенирования нового поколения были получены мультилокусные данные, приведенные далее (Глава 3.4).

Высокая изменчивость, характерная для *E. n. pallida*, заставляет предположить, что существует еще несколько пока не обнаруженных филогенетических линий, которые могут быть отнесены к этому таксону. Популяции, обнаруженные впоследствии на Салаирском кряже, не были отнесены ни к одной из описанных линий; мы также предполагаем, что непигментированные черви с Горного Алтая также генетически сильно отличаются от уже описанных линий.

Следует упомянуть также упомянуть данные, приведенные в недавней статье Y. Hong и C. Csuzdi [2016]. Авторы привели последовательности *cox1 E. n. pallida* из Южной Кореи, выявленной при помощи морфологического анализа. Эти последовательности не имеют близкого сходства ни с одной линией *E. nordenskioldi*. Таким образом, *E. n. pallida* отличается не меньшим генетическим разнообразием, чем номинативный подвид.

### 3.3 Филогеография отдельных филогенетических линий *E. nordenskioldi*

#### 3.3.1 Филогеография линии 7 *E. n. nordenskioldi*

Урал – относительно невысокая горная система, высота пиков в разных его частях составляет от ~600 м до 1895 м (г. Народная, Северный Урал). Ширина Уральских гор составляет в разных точках от 40 до 150 км. В целом, фауна Урала не слишком отличается от фаун прилегающих равнин. Однако для дождевых червей горные системы, и Урал, в частности, являются центром эндемизма. В связи с этим можно было ожидать, что генетическое разнообразие *E. n. nordenskioldi* на Урале будет выше, чем на прилегающих равнинных областях. Мы предприняли попытку изучить генетическое разнообразие *E. n. nordenskioldi* на Южном Урале и на Восточно-Европейской равнине. В данном регионе изучаемый вид заметно более редок, чем в Сибири, в связи с чем собранные выборки не всегда были обширными.

Выборка особей *E. n. nordenskioldi* (61 образец из 12 популяций) была собрана в 2012 г. на Урале и в Европейской части России (Рисунок 3.3.1.1) в Саратовской, Оренбургской, Челябинской и Нижегородской областях, республиках Татарстан и Башкирия. Всего было получена 61 последовательность *cox1* (Раздел 2.3.1). В выборке было обнаружено 26 уникальных гаплотипов и 114 полиморфных сайтов.

Последовательности изучаемой выборки формировали на филогенетическом дереве отдельную от других филогенетических линий вида ветвь, названная нами

линией 7 (Рисунок 3.3.1.2), которая была наиболее близка к линии 9, распространённой на севере Сибири. При проведении детального филогенетического анализа, в пределах линии 7 было выявлено несколько групп

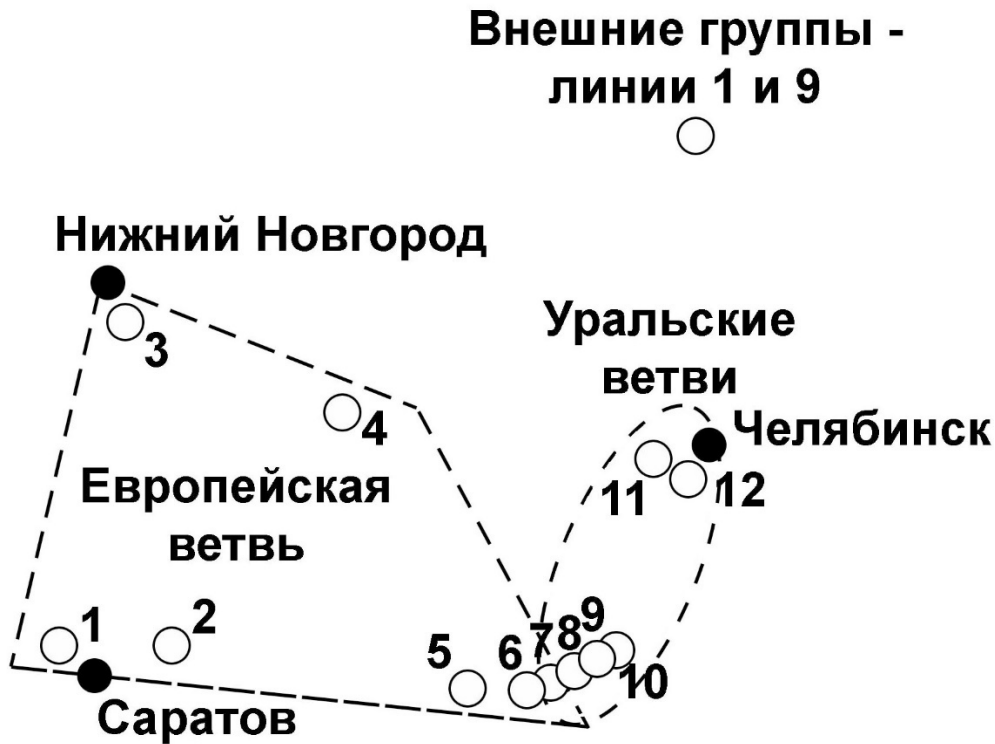


Рисунок 3.3.1.1 Карта сбора образцов филогенетической линии 7 *E. n. nordenskioldi*. Цифры обозначают номера популяций и соответствуют Таблице 3.3.1.1.

(Рисунок 3.3.1.3). Большинство из них не были приурочены к какому-нибудь определённому региону. Однако самая обширная из них включала в себя все образцы с Восточно-Европейской равнины, а также из двух точек (6 и 7) с западного склона Южного Урала. Распространение этой «европейской» группы показано на рисунке 3.3.1.1. В точке 6 обнаружены образцы только из «европейской» группы, в то время как в точке 7 найдены представители как «европейской», так и «уральской» групп.

На рисунке 3.3.1.3 можно видеть, что «европейская» группа монофилетична, в то время как «уральская» является парафилетичной. Обе группы имеют сходные

значения гаплотипического разнообразия (0,919 и 0,924, соответственно, нуклеотидное разнообразие заметно выше у «уральской»: 0,049 против 0,014.

Известны две оценки скорости молекулярных часов у дождевых червей: 3,5% и 4,8% замен на миллион лет для гена *cox1* [Chang, Chen, 2005; Chang et al., 2008].

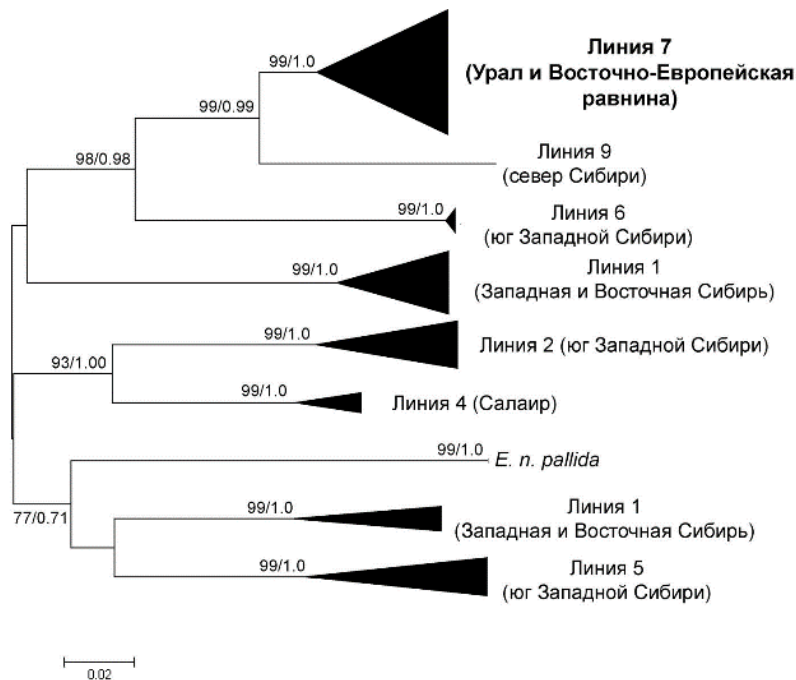


Рисунок 3.3.1.2 Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям *cox1* для филогенетических линий *E. n. nordenskioldi* методом минимальной эволюции. Цифры возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку метода минимальной эволюции / байесовские апостериорные вероятности

Обе эти оценки получены для дождевых червей рода *Metaphire* (сем. Megascolecidae) путём датирования геологических событий на о. Тайвань. Мы использовали эти датировки для оценки основных событий истории филогенетической линии 7.

Проведённый анализ молекулярных часов показал, что линия 7 *E. n. nordenskioldi* дивергировала от наиболее близко родственной к ней линии 9 примерно 1,4 млн. лет назад [доверительный интервал 95%: 1117–1628 тыс. лет назад] или 1,9 млн.

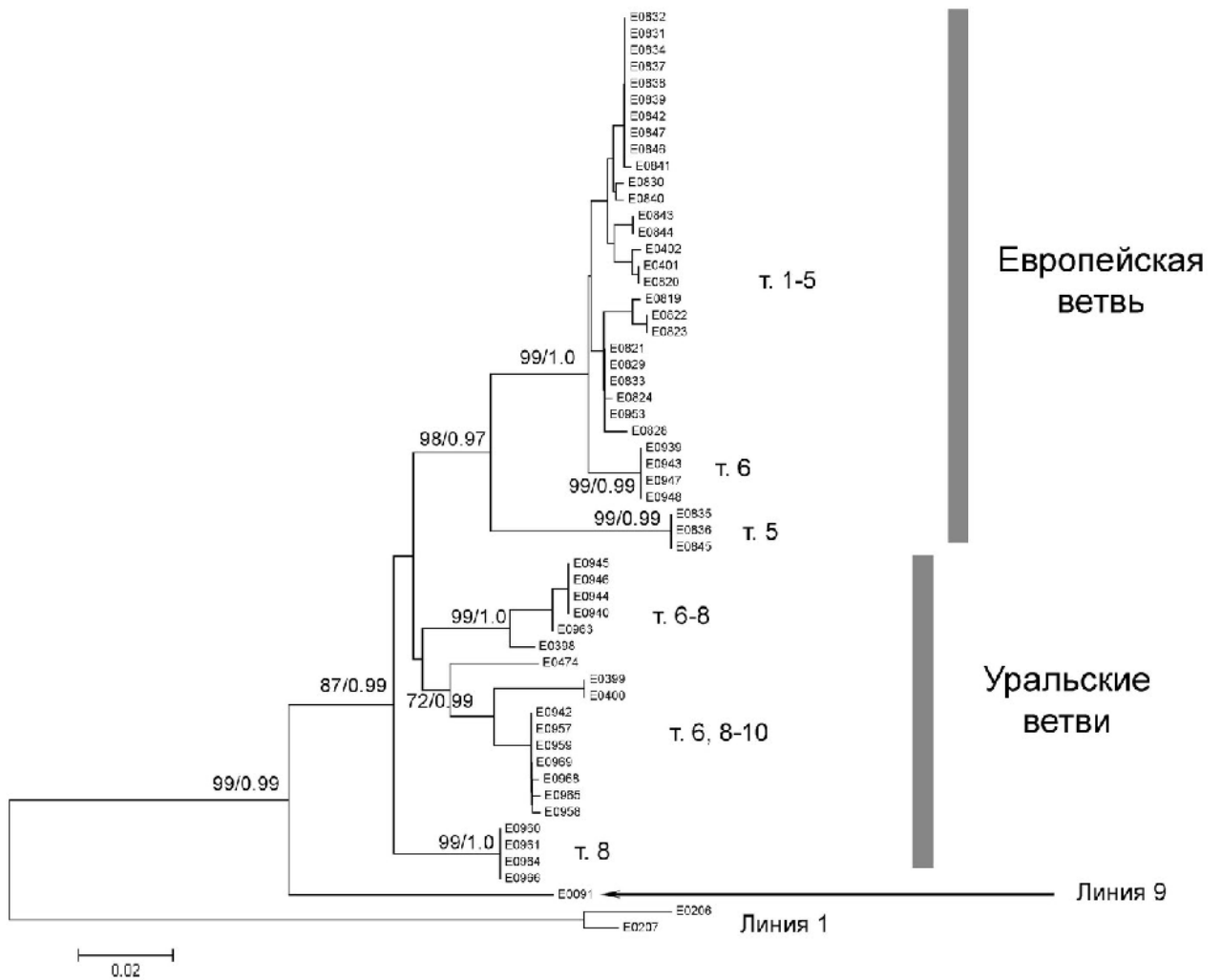


Рисунок 3.3.1.3 Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям *cox1* для филогенетической линии 7 *E. n. nordenskioldi* методом минимальной эволюции. Цифры возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку метода минимальной эволюции / байесовские апостериорные вероятности. Точки соответствуют рисунку 3.3.1.1 и Таблице 3.3.1.1.

Таблица 3.3.1.1 Изученные популяции линии 7. N – число образцов, n – число гаплотипов. Номера популяций соответствуют рисунку 3.3.1.1

№	Точка сбора	N	n
равнинные популяции			
1	Саратовская обл., N51.7762 E45.7121, выс. 265 м	6	3
2	Саратовская обл., Пугачёв, N51.9868, E48.7023, выс. 45 м	1	1
3	Нижегородская обл., N56.0158, E44.9041, выс. 114 м	1	1
4	Татарстан, Набережные Челны, N55.6657, E52.5670, выс. 180 м	1	1
5	Оренбургская обл., N51.9547 E55.2008, выс. 114 м	3	2
Уральские популяции			
6	Башкирия, р. Б. Сурень, N52.1303, E56.7161, выс. 185 м	18	6
7	Башкирия, р. Ямашла, N52.1724, E57.0393, выс. 483 м	10	4
8	Башкирия, N52.2225, E57.3057, выс. 531 м	1	1
9	Башкирия, р. Б. Уртазымка, N52.6081, E58.4722, выс. 481 м	12	6
10	Челябинская обл., Бишкиль, N54.9753, E60.7554, выс. 293 м	2	1
11	Челябинская обл., п. Красногорский, N54.6638, E61.2710, выс. 248 м	1	1
12	Башкирия, N52.5728, E58.3944, выс. 608 м	5	2
	Всего	61	26

Таблица 3.3.1.2 Генетическое разнообразие различных групп линии 7. N – число образцов, n – число гаплотипов, h – гаплотипическое разнообразие,  $p_i$  – нуклеотидное разнообразие, SD – стандартное отклонение.

	N	n	h	SD	$p_i$	SD
равнинные популяции	12	8	0,92	0,06	0,014	0,008
Европейская ветвь	34	15	0,9	0,03	0,02	0,01
Уральские популяции	49	19	0,92	0,02	0,049	0,024
Уральская ветвь	27	11	0,86	0,04	0,037	0,018

лет назад [доверительный интервал 95%: 1568–2209 тыс. лет назад], в зависимости от использованной оценки. Время дивергенции всех гаплотипов линии 7 составило 800 тыс. лет назад [доверительный интервал 95%: 640–934 тыс. лет назад] и 1,1 млн. лет назад [доверительный интервал 95%: 822–1274 тыс. лет назад], соответственно. Для «европейской» группы линии 7, данная оценка составляла, соответственно, 600 тыс. лет назад [доверительный интервал 95%: 438–730 тыс. лет назад] и 800 тыс. лет назад [доверительный интервал 95%: 613–1043 тыс. лет назад]. Если исключить из этой группы уральские гаплотипы, оставив только равнинные, оценка времени дивергенции уменьшается до 300 тыс. лет назад [доверительный интервал 95%: 229–423 тыс. лет назад] и 400 тыс. лет назад [доверительный интервал 95%: 291–545 тыс. лет назад], соответственно.



*E. n. nordenskioldi* – обычный и зачастую доминирующий вид в Азии, при этом к западу от Урала он обычно редок, за исключением некоторых областей Приуралья [Перель, 1979]. В связи с этим считается, что европейские популяции вида распространились в данный регион из Сибири [Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997]. В данной работе мы показали, что популяции вида с Восточно-Европейской Равнины действительно сравнительно недавно распространились в этот регион с Урала. Заселение же Урала имело место сравнительно давно, задолго до плейстоцена, и в целом уральские популяции *E. n. nordenskioldi* являются лишь отдаленными родственниками сибирских, представляя собой отдельную филогенетическую линию. Самой близкой к уральской линии *E. n. nordenskioldi* оказывается линия 9, распространенная на самом севере Азии (Раздел 3.3.2).

### 3.3.2 Филогеография линии 9 *E. n. nordenskioldi*

Во время последнего оледенения, как и в некоторые предыдущие ледниковые эпохи, Северо-запад Европы и север Северной Америки были покрыты ледниковыми щитами, тогда как на остальной территории Северной Европы и Северной Азии существовало лишь горное оледенение: на Полярном и Северном Урале, на плато Путорана, Северо-восточном Таймыре, в Верхоянской горной системе, Сунтар-Хаяте, на Камчатке [Величко и др., 2002]. В более низких горных системах, но с благоприятным соотношением осадки/среднегодовые температуры формировалось горно-долинное или сетчатое оледенение; таковы они были и на Северо-востоке Азии [Хопкинс, 1976; Глушкова, 1984]. Отсутствие ледниковых покровов на равнинах было связано, по единодушному мнению исследователей, не с мягкостью климата, но с его сухостью. Вопреки суровости климата некоторые виды могли переживать его флуктуации *in situ*.

Как было отмечено выше, единственный местный вид дождевых червей в этом регионе (не считая нескольких перегринных видов, ведущих здесь синантропный образ жизни) – *Eisenia nordenskioldi* (пигментированная форма). Эта форма известна очень высокой холодостойкостью [Berman, Meshcheryakova, 2013; Meshcheryakova, Berman, 2014; Berman et al., 2019], в связи с чем его обнаруживают в Евразии на берегах Северного Ледовитого океана и на некоторых полярных островах [Перель, 1979; Всеволодова-Перель, Лейрих, 2014]. В связи с этим мы предположили, что филогеографические паттерны могут представлять большой интерес: они могут прояснить вопрос, расселился ли *E. nordenskioldi* по этому региону недавно (при этом мы нашли бы в разных точках одни и те же гаплотипы) или же какие-то популяции могли переживать оледенения (при этом глубина генетических различий между популяциями должна коррелировать со временем их дивергенции).

В 2012–2015 гг. мы собрали коллекцию из 34 популяций этой линии в Северной Азии (Рисунок 3.3.2.1), в основном восточнее 110° в.д., и провели ее генотипирование по митохондриальному гену *cox1*, который является маркером высокого разрешения для изучения филогеографии дождевых червей.

В настоящее время считается, что филогеографические границы между филогенетическими линиями различных видов животных в северной Азии проходят по крупным рекам, например, Лене, Колыме и Индигирке, что показано как для растений, так и для животных [Норе, 2011; Eidesen et al., 2013]. Для дождевых червей, однако, реки не являются естественными преградами, а напротив, являются каналами их расселения. В пределах изучаемой выборки можно выделить несколько генетических групп, соответствующих бассейнам различных рек (Рисунок 3.3.2.1). В отдельную группу также попадают популяции с побережья Восточно-Сибирского моря и Тауйской губы. В качестве исходной гипотезы мы предположили, что генетически популяции в пределах каждого бассейна будут ближе друг к другу, чем к червям из других бассейнов. Кроме того, мы ожидали, различия между бассейнами рек будут выше, если они разделены географическими барьерами (горными хребтами), чем в случае отсутствия таковых. На изучаемой

территории таковых барьеров несколько: бассейн Лены отделен от бассейнов Яны и Индигирки Верхоянским хребтом и горной системой Сунтар-Хаята. Также отделены от прочих популяций хребтами Чукотских нагорий точка на р. Анадырь (т. 32), Восточным Хребтом, Срединным хребтом и Корякским нагорьем на Камчатке (т. 33), а также точки из западной части ареала (т. 1–3).

Следует отметить, что горные системы – лишь относительный барьер. Тем не менее, мы предположили, что поток генов между выделенными регионами будет заметно меньше, чем в пределах каждого из них. Кроме того, нашей задачей было на основании данных о генетической изменчивости постараться различить "старые" популяции, пережившие несколько циклов оледенения, и новые, распространившиеся по данной территории недавно.

Мы получили последовательности *cox1* 331 образцов линии 9 *E. n. nordenskioldi* из 34 точек. Все последовательности имели длину 658 пн. В пределах выборки линии 9 было обнаружено 186 гаплотипов и большое количество замен – 187, из которых 167 были информативными для анализа парсимонии. Различия между последовательностями достигают 7,6% (в среднем 4%).

Естественно, встает вопрос: не могут ли это быть нефункциональные псевдогены митохондриального происхождения, локализованные в ядерном геноме? Мы можем отвергнуть это предположение, так как при очень большом числе нуклеотидных замен аминокислотных замен мало – всего 11 на 8 полиморфных позиций; из них 4 приводят к смене класса аминокислоты и 7 не приводят. Из восьми полиморфных позиций 4 были информативными для анализа парсимонии (остальные 4 были синглтонами), а большинство образцов отличалось друг от друга одной-двумя аминокислотными заменами. Таким образом, можно утверждать, что, несмотря на очень высокую скорость нуклеотидных замен, последовательность белка *cox1* находится под сильным отбором, и, соответственно, это функциональные митохондриальные последовательности.

На филогенетическом дереве (Рисунок 3.3.2.2) отчетливо выделяются ветви, соответствующие 9-й линии, а также внешним группам – линиям 1 и 3 *E. n. nordenskioldi*. В пределах линии 9 у основания дерева оказывается самая южная

точка из Якутии Т. 17, другие базальные ветви также образуют южноякутские образцы из популяций 11, 12, 14 и 15. Все прочие образцы образовали множество ветвей, отношения между которыми ни одним из филогенетических методов разрешены не были. При этом выделялось ряд географических групп. Так, примерно треть всей выборки образовывали ветвь, которая на рисунке 3.3.2.1 показана красным, в которую вошли образцы из Якутии и бассейнов Яны и Индигирки. Эта ветвь имела высокую статистическую поддержку.

Гаплотипы из популяции Тауйской губы (т. 29–31) довольно близки друг к другу и также образуют отдельную ветвь. Это же может быть сказано и об образцах из Западной Сибири (т. 1–3). Популяции из бассейна Колымы и побережья Восточно-Сибирского моря, за исключением точки 28, также образовали отдельную ветвь. При этом гаплотипы из т. 28 были очень близки к нескольким образцам из т. 20, расположенной в устье Индигирки. Образцы из р. Анадырь (поселок Марково, т. 32) разделились на три ветви. В отдельную ветвь выделяется также и два образца с Камчатки.

Таким образом, на основании филогенетического анализа и географического распределения гаплотипов мы можем выделить ряд групп (Рисунок 3.3.2.1): Уральскую, Колымскую, Тауйскую, группу Певек-Кресты, а также самую большую парафилетичную Якутскую (Якутско-Индигирскую) группу, в пределах которой мы выделяем подгруппу Y1, образующую на филогенетическом дереве отдельную ветвь.

Мы также вычислили значения индекса  $F_{st}$  Райта между географическими регионами, указанными в таблице 3.3.2.1 (Таблица 3.3.2.2). Считается, что  $F_{st} > 0,25$  соответствует большим различиям между выборками, а  $F_{st} < 0,05$  – малым. Видно, что полученные значения  $F_{st}$  в большинстве случаев соответствуют большой дифференциации между популяциями.

Анализ распределения попарных замен (mismatch distribution) свидетельствовал о том, что 9ая линия прошла через демографическую экспансию (рис 3.3.2.3А). Значение  $\tau$  (параметра, оценивающего время, прошедшее со времени популяционной экспансии; из него можно вычислить время, зная скорость

молекулярных часов и время поколени́я) довольно высоко (26,53 (95% интервал доверительно вероятности, 20,31-33,18)), что говорит о большом времени дивергенции популяций линии 9. Таким образом, если мы примем оценки скоростей мутации гена *cox1* как 3.5% [Chang, Chen, 2005], а время поколени́я как 2 года, то время дивергенции 9ой линии составит 1 075 тыс лет (95% интервал доверительно вероятности, 823 – 1 345 тыс. лет). Анализ, проведенный при помощи программы Beast с той же оценкой скорости молекулярных часов также показал большой возраст этой линии: 1 128 тыс лет (95% интервал доверительно вероятности, 788 – 1 486 тыс лет).

Кроме того, мы провели анализ распределения попарных замен (mismatch analysis) для точек, из которых было взято более 15 образцов. В данном анализе все вычисляются количества попарных замен для всех пар образцов во взятой выборке. Одновременно строится расчетная кривая для выборки того же размера и среднего числа замен для случая недавней популяционной экспансии. Некоторые из профилей замен показаны на рисунке 3.3.2.3Б-Г. Видно, что для некоторых точек, как и для всей выборки характерна недавняя популяционная экспансия (Выраженный пик на графике, наблюдаемое значение соответствует ожидаемому для модели популяционной экспансии – рисунок 3.3.2.3Б), для других – недавнее бутылочное горлышко (Экспоненциальная кривая – рисунок 3.3.2.3В), а для третьих – смешение нескольких не близко родственных групп основателей (Несколько пиков – рисунок 3.3.2.3Г).

Как было показано выше (Разделы 3.1 и 3.2), весь вид *E. nordenskioldi* разделяется на множество филогенетических линий. Наша работа по изучению генетическую изменчивость 9ой линии, обитающей на самом северо-востоке Евразии, показала, что эта линия комплекса, в свою очередь, также разделяется на множество ветвей, причем различные ветви могут встречаться симпатрично. Как было показано при помощи анализа синонимичных / несинонимичных замен, разумно считать, что это функциональные митохондриальные последовательности, а не нефункциональные псевдогены митохондриального происхождения, локализованные в ядерном геноме.

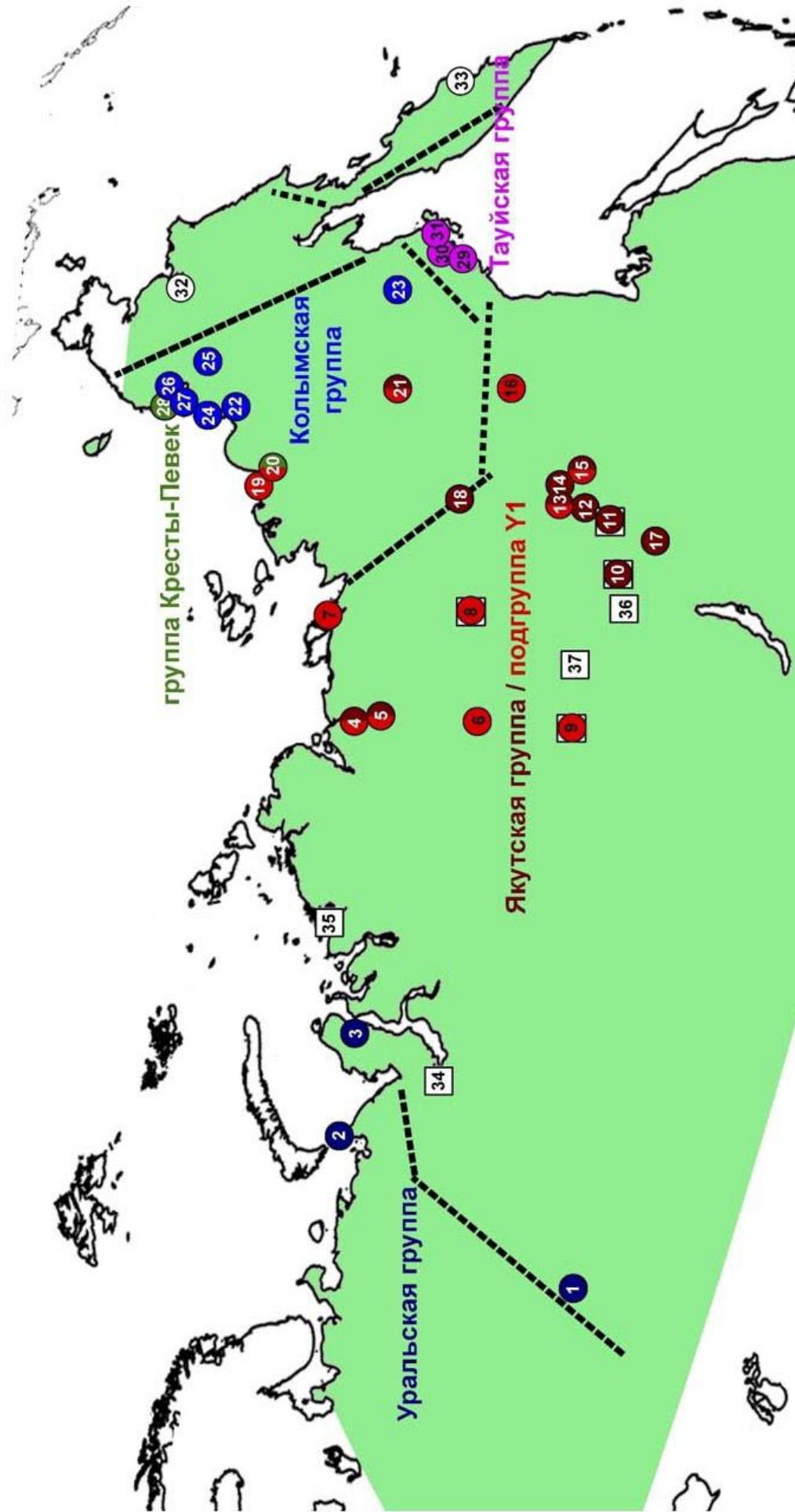


Рисунок 3.3.2.1 Карта сбора образцов *E. n. nordenskioldi*. Пунктиром обозначены основные горные системы. Кругами обозначают линию 9, квадраты – линии 1 и 3. Разными цветами обозначены группы популяций (соответствуют рисунку 3.3.2.2), номера популяций соответствуют таблице 3.3.2.1.

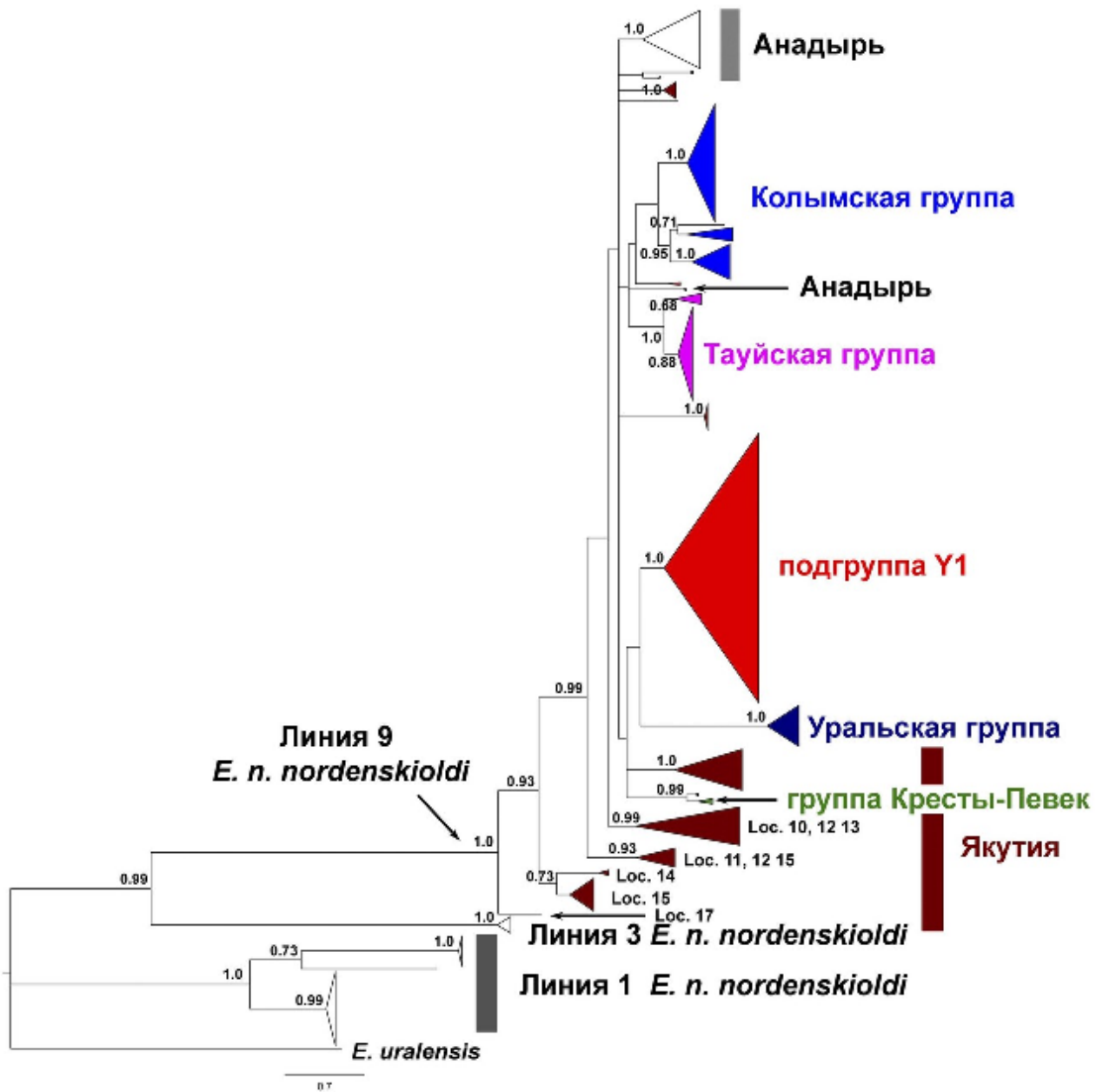


Рисунок 3.3.2.2 Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям *cox1* для филогенетической линии 9 *E. n. nordenskioldi* методом байесовского анализа. Цифры возле ветвей обозначают байесовские апостериорные вероятности. Точки соответствуют рисунку 3.3.2.1

Таблица 3.3.2.1 Изученные популяции. Номера популяций соответствуют таблице

3.3.2.1. N – число особей; n – число уникальных гаплотипов; h – гаплотипическое разнообразие; pi – нуклеотидное разнообразие.

№	Регион	N	n	h (с.о.)	pi (с.о.)	№ GenBank
<b>Линия 9</b>						
<b>Западная Сибирь</b>						
1	Карпинск, Свердловская обл.	1	1	-	-	KX601327
2	О-в. Вайгач, Ненецкий АО	3	1	0	0	KX601639- KX601641
3	Сабетта, ЯНАО	12	2	0,167 (0,134)	0,0023 (0,0017)	KX601445- KX601456
	всего	16	4	0,517 (0,132)	0,0063 (0,0037)	
<b>Бассейн р. Анабар</b>						
4	Юрюнг-Хая, Р. Саха	3	2	0,667 (0,314)	0,0233 (0,0180)	KX601412- KX601414
5	Саскылах, Р. Саха	8	8	1,000 (0,063)	0,0208 (0,0120)	KX601507- KX601513, KX601544
	всего	11	9	0,946 (0,066)	0,0206 (0,0113)	
<b>Бассейн р. Оленек</b>						
6	Olenek, Р. Саха	30	16	0,945 (0,022)	0,0104 (0,0056)	KX601514- KX601543
<b>Бассейн р. Лена</b>						
7	Тикси, Р. Саха	15	9	0,800 (0,108)	0,0102 (0,0057)	KX601593- KX601601, KX601633- KX601638
8	О-в. Аграфена, Р. Саха	2	2	1,000 (0,500)	0,0152 (0,0150)	KX601602- KX601603
9	Мирный, Р. Саха	1	1	-	-	KX601592
10	Хоринцы, Р. Саха	5	5	1,000 (0,127)	0,0312 (0,0195)	KX601502- KX601506
11	Улу, Р. Саха	3	3	1,000 (0,272)	0,0243 (0,0188)	KX601589- KX601591
12	Ленские Столбы, Р. Саха	9	7	0,917 (0,092)	0,0302 (0,0168)	KX601328- KX601333, KX601398- KX601400



13	Якутск, Р. Саха	15	8	0,838 (0,085)	0,0254 (0,0134)	KX601334- KX601339, KX601389- KX601397
14	Хоробут, Р. Саха	19	6	0,784 (0,073)	0,0292 (0,0151)	KX601545- KX601563
15	Амга, Р. Саха	16	4	0,933 (0,034)	0,0182 (0,0097)	KX601608- KX601615, KX601620- KX601627
16	Сетте-Дабан, Р. Саха	8	5	0,857 (0,108)	0,0110 (0,0066)	KX601616- KX601618, KX601628- KX601632
17	Нерюнгрейка, Р. Саха	1	1	-	-	KX601619
	всего	94				
	<b>Бассейн р. Яна</b>					
18	Аркачан, Р. Саха	4	3	0,833 (0,222)	0,0015 (0,0015)	KX601604- KX601607
	<b>Бассейн р. Индигирка</b>					
19	Русское устье, Р. Саха	8	5	0,786 (0,151)	0,0058 (0,0037)	KX601359- KX601366
20	Кресты, Р. Саха	6	5	0,933 (0,122)	0,0302 (0,0180)	KX601415- KX601420
21	Чумпу-Кытыл, Р. Саха	25	4	0,790 (0,074)	0,0294 (0,0150)	KX601564- KX601588
	всего	39	19	0,906 (0,036)	0,0289 (0,0146)	
	<b>Бассейн р. Колыма</b>					
22	Черский, Чукотский АО	14	11	0,934 (0,061)	0,0091 (0,0052)	KX601367- KX601380
23	Сеймчан, Магаданская обл.	6	5	0,933 (0,122)	0,0127 (0,0079)	KX601340- KX601345
	всего	20	16	0,963 (0,033)	0,0154 (0,0082)	
	<b>Побережье Восточно-Сибирского моря</b>					
24	Раучуа, Чукотский АО	4	4	1,000 (0,177)	0,0029 (0,0024)	KX601427- KX601430
25	Билибино, Чукотский АО	32	16	0,895 (0,037)	0,0041 (0,0025)	KX601422- KX601426,

						KX601431- KX601444, KX601642- KX601654 KX601421
26	Валькумей, Чукотский АО	1	1	-	-	
27	О-в. Айопечан, Чукотский АО	8	6	0,929 (0,084)	0,0035 (0,0024)	KX601351- KX601358
28	Певек, Чукотский АО	3	3	1,000 (0,272)	0,0030 (0,0029)	KX601381- KX601383
	всего	48	29	0,946 (0,020)	0,0097 (0,0052)	
	<b>Тауйская губа</b>					
29	О-в. Талан, Магаданская обл.	5	3	0,700 (0,218)	0,0036 (0,0028)	KX601346- KX601350
30	Нюкля, Магаданская обл.	16	6	0,825 (0,069)	0,0021 (0,0015)	KX601384- KX601388, KX601401- KX601411
31	Ола, Магаданская обл.	19	4	0,509 (0,117)	0,0010 (0,0009)	KX601483- KX601501
	всего	40		0,741 (0,062)	0,0038 (0,0023)	
	<b>Бассейн р. Анадырь</b>					
32	Марково, Чукотский АО	26	23	0,991 (0,013)	0,0186 (0,0097)	KX601457- KX601482
	<b>Камчатка</b>					
33	Узон, Камчатский край	2		1,000 (0,500)	0,0030 (0,0037)	KX601655- KX601656
	<b>Всего</b>	33	186	0,990 (0,002)	0,0402 (0,0196)	
	<b>Линия 1</b>					
8	О-в. Аграфена, Р. Саха	8	3	0,607 (0,164)	0,0198 (0,0114)	KX601319- KX601326
9	Мирный, Р. Саха	1	1	-	-	KX601318
10	Хоринцы, Р. Саха	14	1	0	0	KX601292- KX601305
11	Улу, Р. Саха	2	1	0	0	KX601316- KX601317
34	Лабытнанги, ЯНАО	1	1	-	-	JX531501
35	Диксон, Красноярский край	1	1	-	-	KX601286
36	Олекминск, Р. Саха	5	2	0,400 (0,237)	0,0006 (0,0007)	KX601287- KX601291

37	Накын, Р. Саха	10	1	0	0	KX601306- KX601315
	всего	42	6	0,552 (0,064)	0,0354 (0,0176)	

**Линия 3**

37	Накын, Р. Саха	7	3	0,714 (0,127)	0,0013 (0,0012)	KX601279- KX601285
----	----------------	---	---	------------------	--------------------	-----------------------

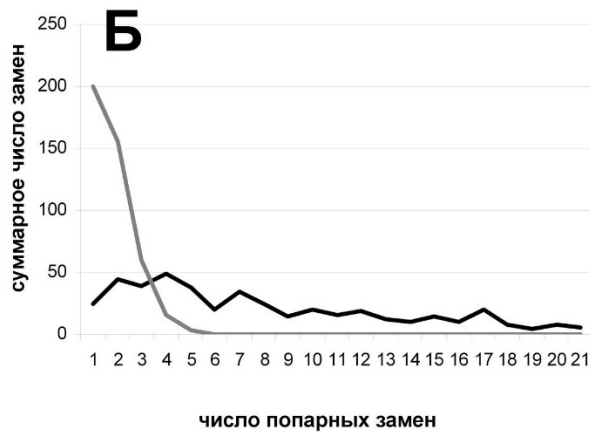
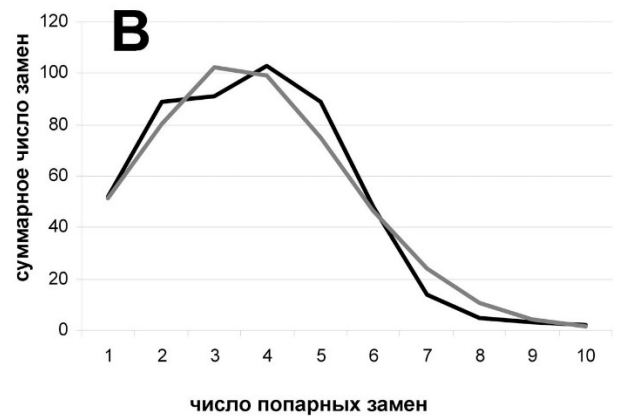
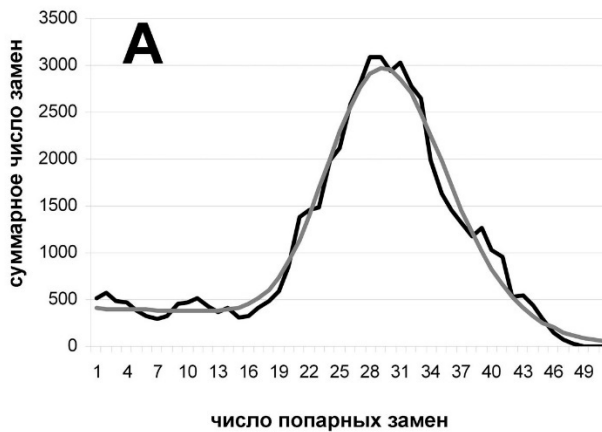


Рисунок 3.3.2.3 Графики распределения попарных замен: А – вся выборка 9ой линии *E. n. nordenskioldi*, Б – Т. 25, В – Т. 6, Г – Т. 32. Наблюдаемое распределение замен показано чёрной линией, рассчитанное теоретически для модели популяционной экспансии – серой

Таблица 3.3.2.2 Значения индекса Fst для попарных сравнений групп популяций из различных географических регионов. Серым цветом отмечены значения ниже 0,25.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Лена	-									
Анабар	0,166	-								
Оленек	0,250	0,489	-							
Яна	0,081	0,414	0,478	-						
Индигирка	0,171	0,285	0,262	0,184	-					
Кольма	0,329	0,530	0,661	0,589	0,528	-				
Тауйская губа	0,375	0,786	0,828	0,888	0,605	0,635	-			
Марково										
(Чукотка)	0,232	0,435	0,635	0,552	0,435	0,511	0,652	-		
Камчатка	0,151	0,436	0,737	0,932	0,367	0,574	0,875	0,398	-	
Урал	0,499	0,797	0,850	0,894	0,667	0,754	0,920	0,766	0,899	-

Такие большие различия между популяциями отчасти объясняются огромным ареалом этой линии. Кроме того, важный вклад вносит тот факт, что этот ареал не сплошной. Большая часть почв ареала непригодна для *E. nordenskioldi* из-за низкого рН (3.5-4), обусловленного малым содержанием карбонатов в материнских породах и низкими температурами, способствующими накоплению кислых торфов. Лишь в некоторых биотопах (осинники на южных склонах гор, окраины степных участков, горно-тундровые луговины, долины рек) рН поднимается до приемлемых значений (выше 4,2 ед.). Большинство из этих участков, однако, занимают незначительную площадь, не более 10 га, и не соединяются между собой. Соответственно, большинство локальных популяций *E. n. nordenskioldi* 9ой линии малы, в них сильно проявляется эффект основателя и дрейф.

Следует отметить, что мы не смогли обнаружить генетические различия между популяциями из тундровых и таежных зон. Очевидно, что приоритетны для червей физико-химические и биологические свойства почвы, а не формирующие их факторы, в том числе состав растительности.

Анализ как молекулярных часов показал значительное время дивергенции линии 9 – около миллиона лет. Таким образом, если время дивергенции популяций различных видов животных, обитающих на данной территории, в большинстве случаев сводятся к последнему ледниковому максимуму, то дождевой червь пережил несколько таких циклов.

Положение у основания 9ой линии занимали популяции с юга Якутии, причем самой базальной была самая южная точка (т. 17). Прочие якутские гаплотипы образовывали множество ветвей на дереве, по сравнению с гораздо меньшим разнообразием для других регионов. Хотя отчасти большее генетическое разнообразие обусловлено несколько большим размером выборки, тем не менее, вероятно, юг Якутии, скорее всего, является исходным ареалом 9ой линии. Возможна и иная интерпретация: наилучшая сохранность на юге Якутии самых древних из выявленных кластеров червей благодаря особенностям местны условий: консервативности климата и обилию известняков, на которых

поддерживается подходящий рН почвы. Кроме того, никак не обследованные нами территории Западной и Средней Сибири могут в будущем значительно изменить наши сегодняшние представления об истории 9ой линии и всего комплекса *E. nordenskioldi* в целом.

Черви линии 9 из прочих регионов выделились в ряд ветвей. Изоляция уральской группы ожидаема, так как от прочих ее отделяет большое расстояние – более 1500 км. На самом востоке ареала играют свою роль в изоляции популяций географические барьеры в виде сплошных горных систем. Так, популяции с побережья Тауйской губы (29–31), отделенные от прочих Колымским нагорьем и хребтом Черского, образуют одну ветвь на дереве и отличаются от прочих популяций. Равно как и популяции из бассейна р. Анадырь (т. 32) и Камчатки (т. 33). Для этих групп, таким образом, географическая изоляция может объяснить генетическую.

В случае с популяциями из Якутии и с запада Чукотки генетическая картина не вполне соотносится с географической. Популяции из бассейнов рек Анабар, Оленек, Лена, Яна и Индигирка, хотя и не образуют монофилетичной ветви на дереве, близки друг к другу. В пределах долины Лены и Северо-Сибирской низменности географических барьеров нет, так что близость популяций из бассейнов Анабара, Оленека и Лены ожидаемы. В то же время последние отделены от Яны и Индигирки Верхоянским хребтом, который, как можно ожидать, на всей своей протяженности является трудно преодолимым барьером для дождевых червей. Контакты между бассейнами этих рек все же могли осуществляться по побережью моря Лаптевых в ходе оледенений при обнажении шельфа.

При этом популяции из бассейна Колымы и с побережья Северо-Восточного моря (точки 22–27) объединялись в одну ветвь, поддержанную статистическим анализом (Рисунок 3.3.2.1), причем образцы этой группы не были родственны якутской группе. Это несколько удивительно, учитывая то, что между долинами Индигирки и Колымы естественных барьеров нет. Большинство популяций из бассейна Колымы объединялись в единую ветвь с популяциями с побережья Восточно-Сибирского моря. Видимо, отдельные случаи переноса на дальние

расстояния все же имеют место: популяции 20 из устья Индигирки и 28 с побережья Восточно-Сибирского моря близки друг к другу.

Считается, что во время максимума последнего оледенения (около 12 000 л.н.) север Европы и Северной Америки были покрыты ледниковыми щитами, что привело к "стиранию" всей биоты. В то же время считается, что на севере Азии сплошного ледникового щита не было, а были лишь локальные оледенения. При этом происходила смена сообществ с тундровых и бореальных на тундростепь и обратно. При этом, судя по нашим данным, многие локальные популяции линии 9 смогли успешно пережить эти изменения. Иными словами, мы можем таким образом суммировать генетическое разнообразие 9ой линии. Она обитает на территории Северо-Восточной Евразии около миллиона лет. Видимо, когда-то ареал линии был непрерывным, но плейстоценовые оледенения на западной части ареала привели к тому, что в это регионе 9ая линия была отеснена в рефугиумы (Северный Урал). После отхода ледников популяции из рефугиумов стали вновь расселяться на север. В пользу этого свидетельствует то, что популяции из точек 1-3 генетически близки друг к другу, по контрасту с популяциями восточной части ареала.

При заселении севера Западной Сибири 9ая линия встретила с линией 1 *E. n. nordenskioldi* (Рисунок 3.3.2.1). По-видимому, линия 1 была принесена на север Западной Сибири течением Оби, или же была завезена человеком, о чем говорит близость северных популяций этой линии с южными.

Большие генетические расстояния между популяциями восточной части ареала свидетельствуют о том, что никаких катастрофических событий (по отношению к адаптивным возможностям червей) за последний миллион лет не происходило. По-видимому, в восточной части ареала 9ая линия – единственная. Лишь в верховьях и среднем течении Лены и притоков вместе с ней встречаются 1ая и 3я линии, а также *E. n. pallida*. Также во всех исследованных точках мы не обнаружили *D. octaedra*, которая часто встречается на севере Европы.

Таким образом, исходный ареал 9ой линии, скорее всего, располагался на юге Якутии. Заселение Западной Сибири и различных районов Северо-Восточной

Сибири, по-видимому, происходило независимо. Об это свидетельствует отсутствие близкого родства между Колымской и Тауйской группой, а также точками 32 (бассейн р. Анадырь) и 33 (Камчатка). По-видимому, нынешние различия популяций Колымы и Индигирки, между которыми нет выраженных географических барьеров - следствие давней аллопатрии.

Как было сказано выше, экология 9ой линии *E. n. nordenskioldi* предполагает малый размер популяций и частые их вымирания и повторного заселения подходящих участков. Анализ распределения попарных замен показывает, что разные популяции действительно оказываются на разных стадиях развития. Некоторые (например, Билибино (Рис 3.3.2.3А) и Ола (не показано)) показывают стадию характерную для быстрой экспансии недавно основанной популяции. Другие же (например, Оленек (Рис 3.3.2.3Б) и Черский (не показано)), по данным анализа, недавно пережили бутылочное горлышко. Многие популяции показывают на диаграммах несколько пиков (Рис 3.3.2.3В), что предполагает, что они произошли от нескольких основателей.

Можно заключить, что 9ая линия *E. n. nordenskioldi* оказалась благодатным объектом для филогеографии. На север Сибири оказали сильное влияние климатические циклы плейстоцена и связанная с ними смена сообществ. Тем удивительней было обнаружить, что локальные популяции 9ой линии пережили эти сильнейшие климатические изменения. Генетическая изменчивость ее так велика, что она может быть использована в палеогеографических реконструкциях на уровне отдельных регионов. Особенно перспективной в этом отношении является юг Якутии.



### 3.4 Филогения комплекса *E. nordenskioldi* на основании геномных и транскриптомных данных

#### 3.4.1 Филогения *E. nordenskioldi* по данным последовательностей митохондриальных геномов

Митохондриальные геномы широко используются в филогенетических исследованиях [Boore, Brown, 1998; Simon et al., 2006]. Их относительно легко секвенировать для получения набора ортологичных генов [DeSalle et al., 2017]. Получив набор транскриптомных данных для ряда филогенетических линий *E. nordenskioldi* (Рисунок 3.4.1.1), мы извлекли из них митохондриальные последовательности и провели сборку геномов, используя *Lumbricus terrestris* (№ Genbank: NC\_001673) в качестве референсного генома. В зависимости от глубины прочтения, было обнаружено от одного до восьми незаконченных участков. Их заполняли при помощи обычной ПЦР, подбирая праймеры на фланкирующие участки.

Особый случай представлял из себя контрольный район мтДНК. Этот участок, как считается, совмещает в себе точку инициации репликации и промоторную область [Zhang, Hewitt, 1997]. Эта последовательность имеет длину от нескольких сотен до нескольких тысяч п.н., обычно является АТ-богатой и содержит поли-АТ тракты и микросателлитные участки различной длины, и, кроме того, формирует различные вторичные структуры. Из-за этих особенностей собрать из ридов или амплифицировать контрольный район у дождевых червей оказывается крайне сложно [Zhang et al., 2016]. В связи с этим, а также с тем, что контрольный район не слишком пригоден для выяснения филогенетических отношений, он не был включён в полученную выборку. Таким образом, анализируемая часть митохондриального генома включала в себя все 13 белок-кодирующих генов, 2 гена рибосомальной РНК, и 20 из 22 генов тРНК (без генов тРНК-Арг и тРНК-Гис) (Рисунок 3.4.1.2).

Известно, что у некоторых таксонов, например, у растений, транскрипты мтДНК проходят редактирование [Steinhauser et al., 1999; Gray, 2003; Sloan, Wu, 2016], из-за чего получаемые при секвенировании транскриптомов последовательности не полностью соответствуют митохондриальному геному. При этом для животных это редактирование, как считается, ограничено, главным образом, полиаденилированием транскриптов и модификацией генов тРНК [Börner et al., 1997; Brennicke et al., 1999; Knoop et al., 2010; Lavrov, Pett, 2016]. В нашей работе мы закрывали фрагменты геномов, которые не были собраны из данных NGS, при помощи ПЦР. При этом во фланкирующих районах, которые перекрывались между контигами, собранными по данным NGS, и ПЦР-фрагментами, мы не находили каких-либо различий. Поэтому мы можем предполагать, что возможные ошибки, вызванные разницей последовательностей генома и транскрипта, не оказывают на результаты филогенетического анализа сколько-либо заметного влияния, т.к. при построении выравниваний гены тРНК плохо выравнивались между собой и поэтому большая их часть была исключена из анализа.

В предпринятой работе мы получили последовательности мтДНК для представителей 8 филогенетических линий *E. nordenskioldi*: шесть для *E. n. nordenskioldi* и две – для *E. n. pallida* (точки сбора образцов указаны на рисунке 3.4.1.1). Кроме того, в качестве внешних групп были использованы три вида рода *Eisenia*: *E. spelaea*, *E. balatonica* и *E. tracta*.

Хотя мтДНК наследуется как единая молекула, филогенетические деревья, построенные по различным её частям, могут различаться. Чтобы выявить возможные различия между компонентами генома, мы извлекли несколько наборов данных:

- а) полное геномное выравнивание (13989 п.н.);
- б) кодирующие последовательности 13 белок-кодирующих генов (11084 п.н.);
- в) аминокислотные последовательности 13 митохондриальных белков (3665 а.к.);
- г) аминокислотные последовательности 11 митохондриальных белков (исключены продукты двух наиболее быстро эволюционирующих генов, *atp8* и *nd2*) (3075 а.к.);

- д) гены 12S и 16S рибосомальной РНК (1795 п.н.);
- е) конкатенированный набор белок-кодирующих генов и генов, кодирующих рРНК (12879 п.н.).

Все полученные выравнивания содержали инсерции/делеции и ненадёжно выровненные участки. Чтобы избавиться от них, мы использовали программу gblocks [Castresana, 2000]. Филогенетические деревья были построены при помощи алгоритмов максимального правдоподобия и байесовского анализа. Размер полученных митохондриальных геномов варьировал от 14473 п.н. у линии 6 *E. n. pallida* до 14658 п.н. у *E. spelaea*; более длинные последовательности содержали частично собранные фрагменты контрольного региона.

Известно, что митохондриальные геномы большинства аннелид (включая и Clitellata), отличаются замечательной устойчивостью взаимного расположения генов [Boore, 2001; Jennings, Halanuch, 2005; Zhong et al., 2008; Weigert et al., 2016]. Эта ситуация отличается от наблюдаемой у большинства остальных типов животных, у которых даже близкородственные виды могут иметь перестановки в митохондриальном геноме [Rawlings et al., 2001; Beaudet et al., 2013]. Такое постоянство можно объяснить тем фактом, что у аннелид вся мтДНК транскрибируется как один транскрипт. Таким образом, любая инверсия в мтДНК становится летальной. В данной работе мы подтвердили наблюдаемую закономерность: все полученные геномы имели типичные для дождевых червей наборы генов (Рисунок 3.4.1.2) [Boore, Brown, 1995; Zhang et al., 2016]. Все гены были закодированы на одной цепи ДНК. Единственной обнаруженной структурной вариацией была делеция длиной ок. 55 п.н. между генами *cytb* и тРНК-Трп (по сравнению с референсным геномом *L. terrestris* NC\_001673).

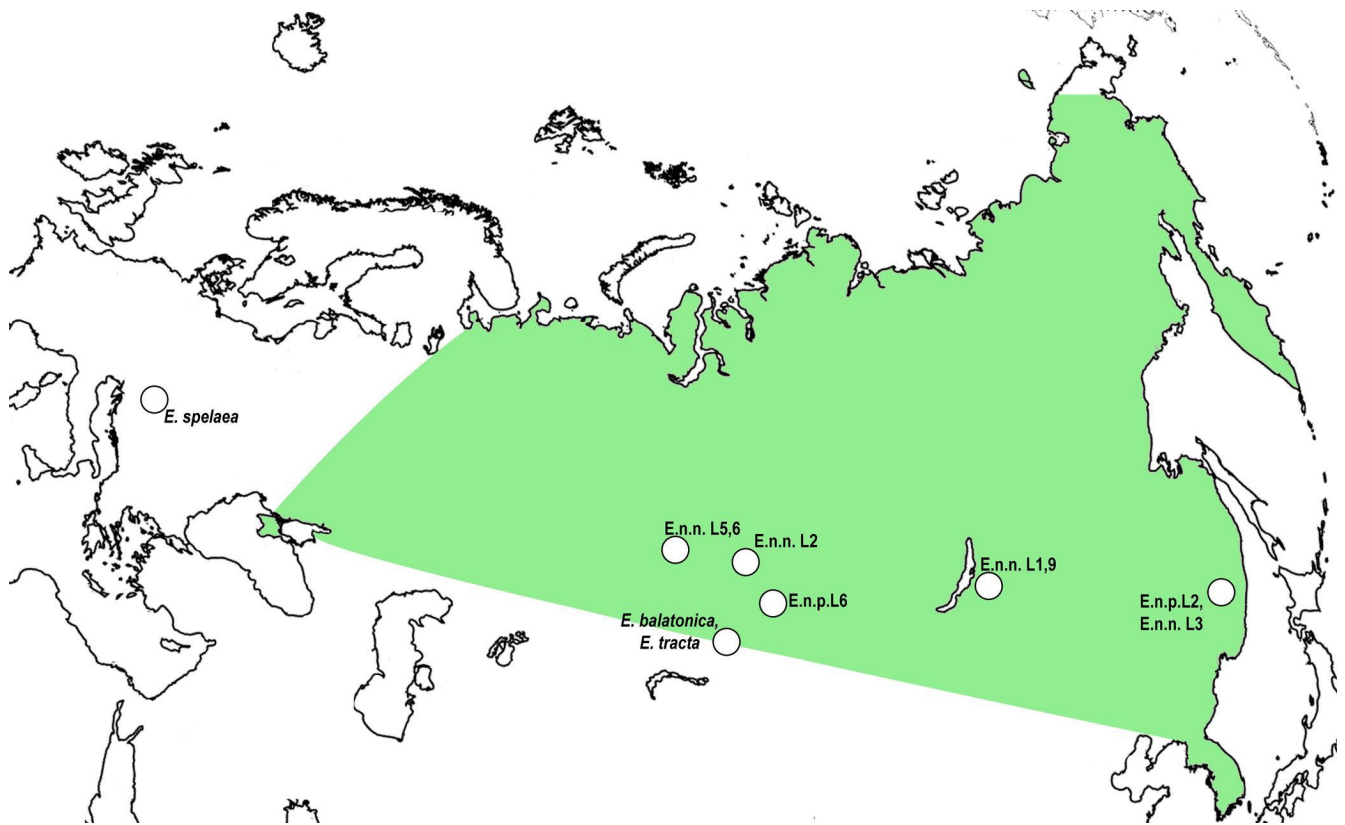


Рисунок 3.4.1.1 Точки сбора образцов для секвенирования митохондриальных геномов. Зеленым цветом показан ареал *E. nordenskioldi*.

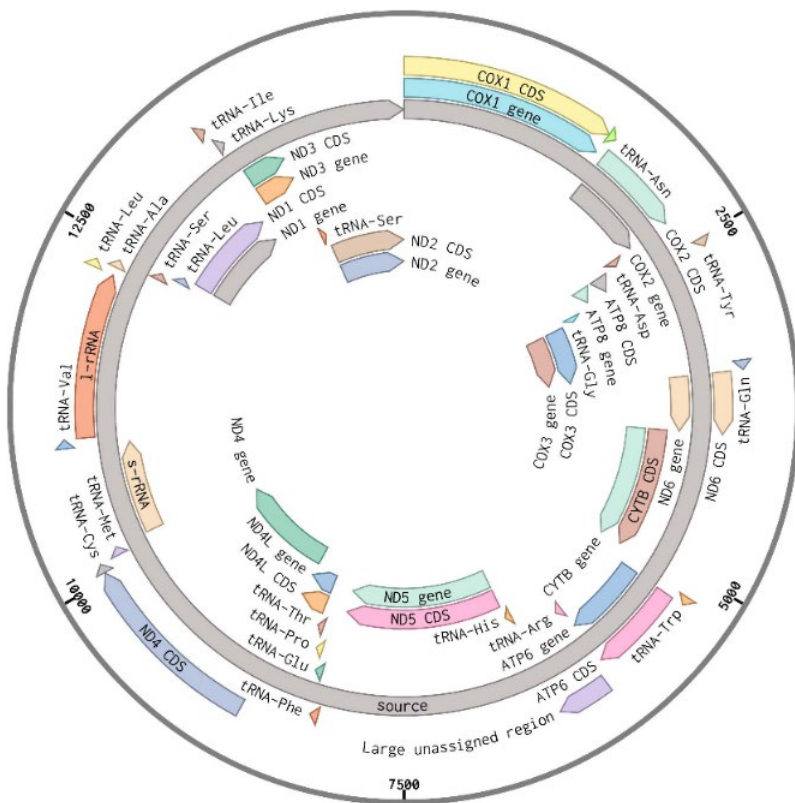


Рисунок 3.4.1.2 Организация митохондриального генома дождевых червей (показана для митохондриального генома линии 9 *E. n. nordenskioldi*).

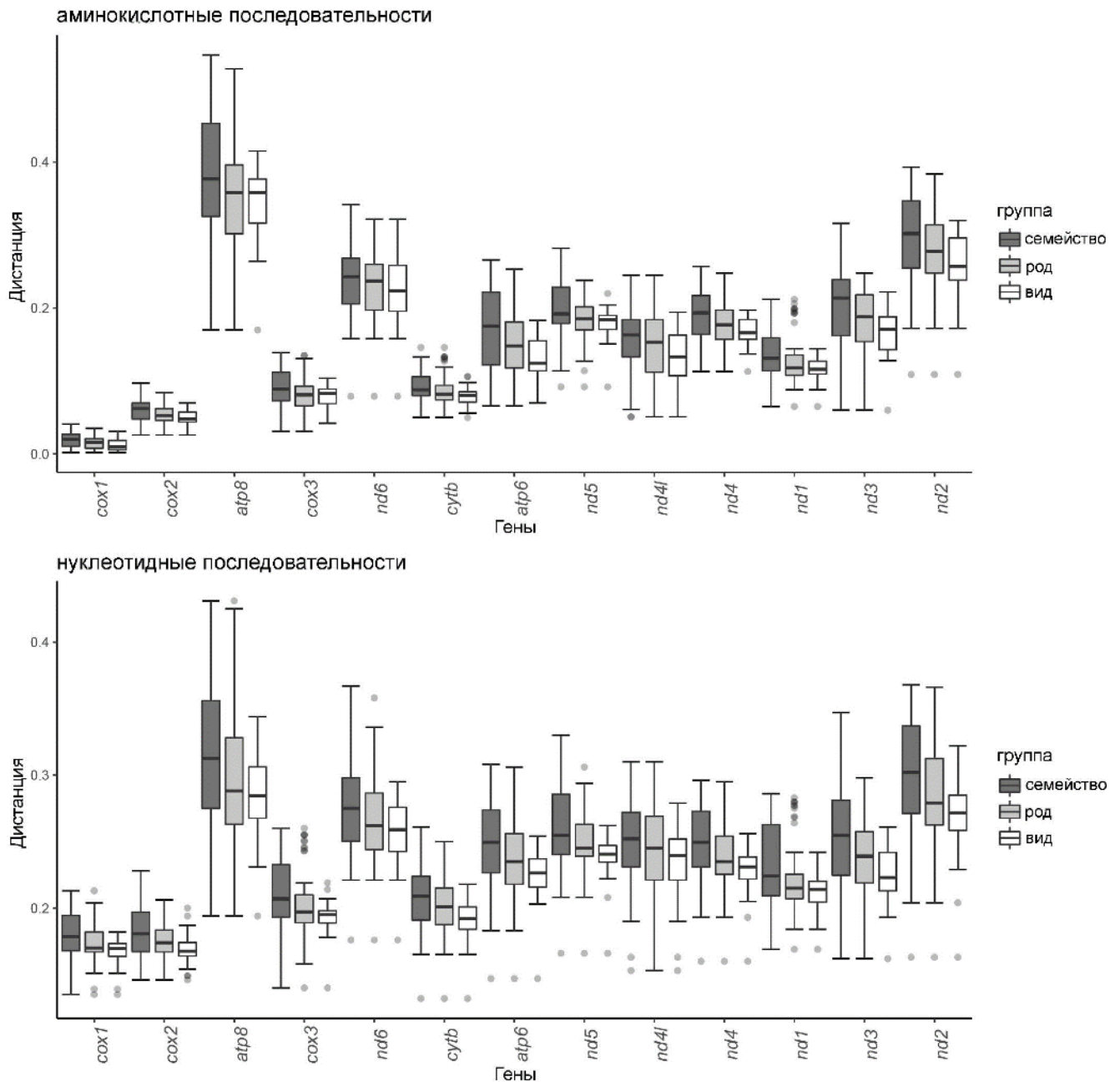


Рисунок 3.4.1.3 Р-дистанции между аминокислотными последовательностями митохондриальных белков (верхняя панель) и нуклеотидными последовательностями отдельных генов митохондриальных геномов (нижняя панель). Белые прямоугольники – филогенетические линии *E. nordenskioldi*; светло-серые – *E. nordenskioldi*, *E. tracta*, *E. balatonica* и *E. spelaea*; темно-серые – все образцы рода *Eisenia* плюс *L. terrestris* и *A. rosea*. Черта внутри прямоугольников соответствует медианному значению, верхняя и нижняя границы – 25й и 75й перцентили, верхний и нижний усы – 1,5 интерквартильных расстояния, кружки – выбросы.

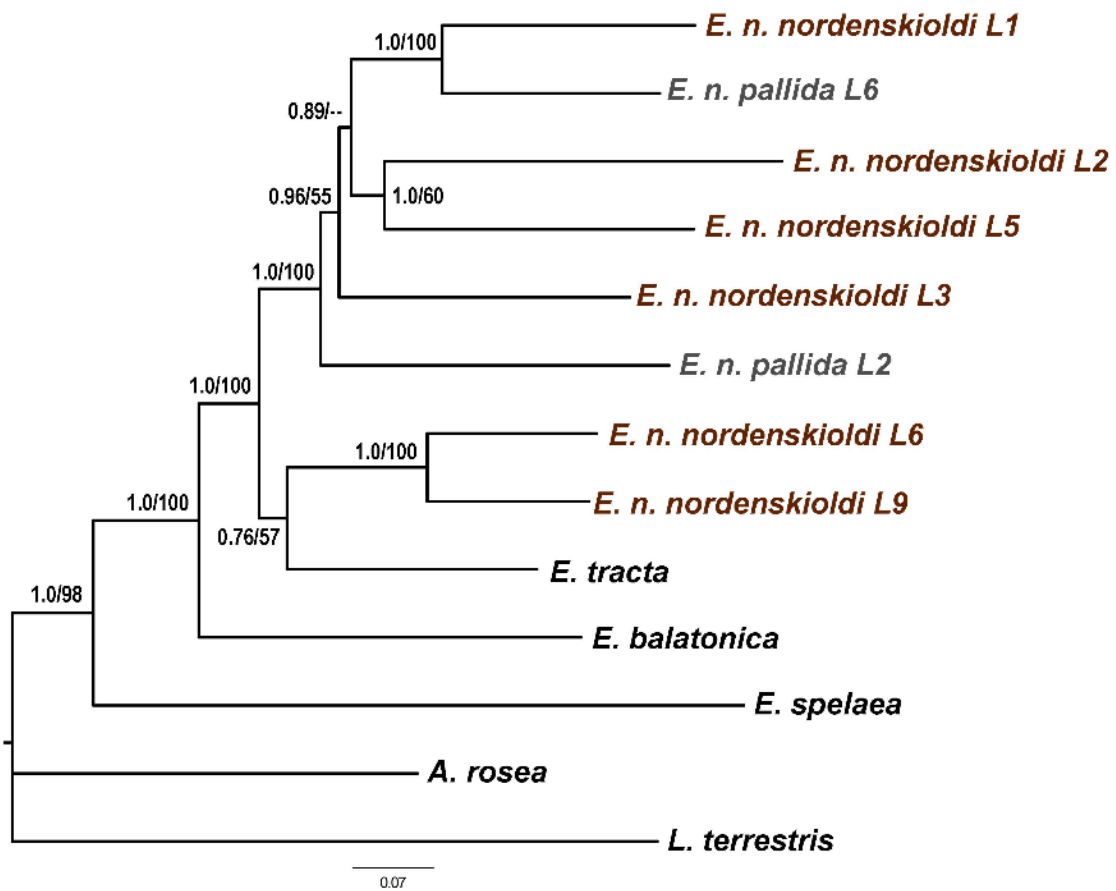
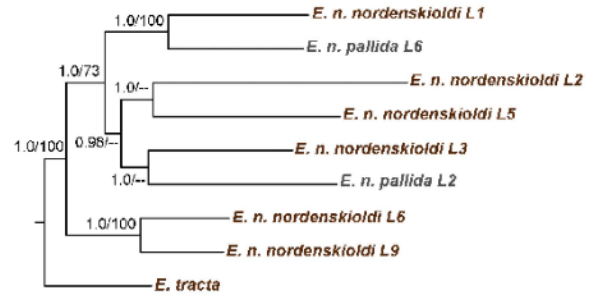
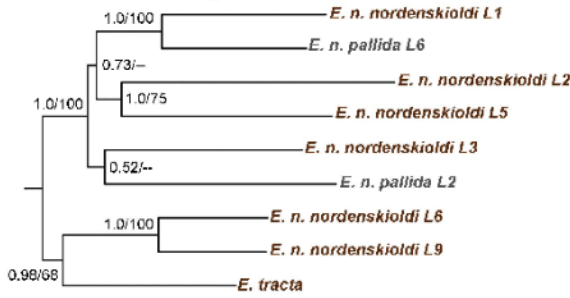
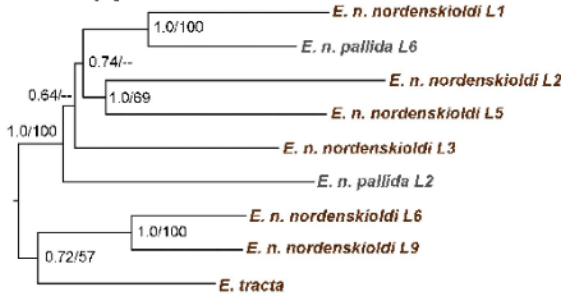


Рисунок 3.4.1.4 Филогенетическое дерево, построенное методом байесовского анализа для конкатенированных последовательностей белок-кодирующих генов и рРНК. Цифры возле ветвей обозначают байесовскую апостериорную вероятность/бутстрепную поддержку метода ML. Коричневым шрифтом выделены линии, объединяющие пигментированные популяции, серым — непигментированные.

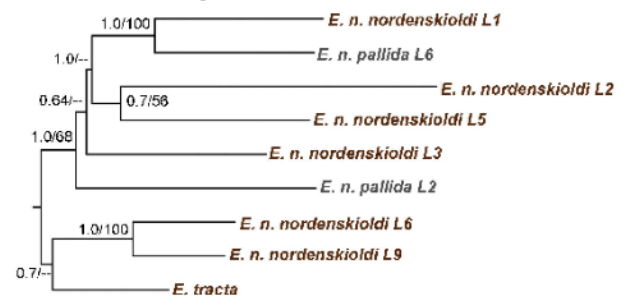
**Белок-кодирующие последовательности Белки**



**ВСЯ МТДНК**



**Белки, кроме ATP8 и ND2**



**рРНК**

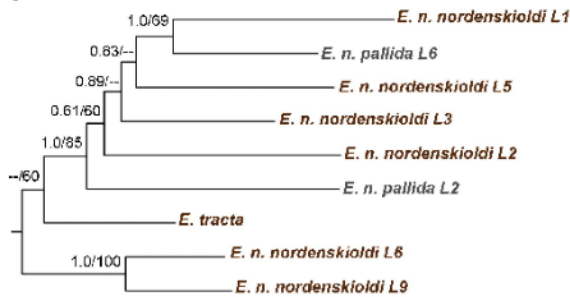


Рисунок 3.4.1.5 Филогенетические деревья, построенные методом байесовского анализа для различных наборов данных митохондриальных геномов. Отображены только линии *E. nordenskioldi* и *E. tracta*. Цифры возле ветвей обозначают байесовскую апостериорную вероятность/бутстрепную поддержку метода ML. Коричневым шрифтом выделены линии, объединяющие пигментированные популяции, серым – непигментированные.

Процент АТ-пар в митохондриальных геномах филогенетических линий *E. nordenskioldi* варьировал в довольно узких пределах (62,67–64,30%). У других видов он также был близок: 63,37% у *E. balatonica*, 65,69% у *E. tracta* и 59,88% у *E. spelaea*. Данные других авторов [Zhang et al., 2016] свидетельствуют о том, что в других семействах дождевых червей этот параметр может заметно отличаться. Так, у Megascolecidae АТ-состав варьирует в пределах 62,6–67,6%, у единственного вида из сем. Moniligastridae, *Drawida japonica*, для которого известна последовательность митохондриального генома, АТ-состав доходит до 69,7%. Следует отметить, что эти различия могут отчасти иметь место из-за разницы в составе контрольного региона.

Различные части генома практически не имели различий по длине. При этом были замечены большие различия между генами по частоте нуклеотидных и аминокислотных замен (Рисунок 3.4.1.3). Самым медленно эволюционирующим геном был *cox1*, в то время как ген *atp8* оказался самым вариабельным: на нуклеотидном уровне среднее количество замен между образцами составляло для этих генов 16,7% и 28,5%, соответственно; для аминокислотной последовательности – 1,2% и 33,9%. Аналогичные данные по скорости эволюции митохондриальных генов были получены [Zhang et al., 2016] для представителей рода *Amyntas*: в цитируемом исследовании гены *atp8*, *nd2* и *cox1* имели в среднем по 30%, 29% и 17% нуклеотидных замен, соответственно. Гены рибосомальной РНК также характеризовались высокой частотой замен: в среднем 21,2% между филогенетическими линиями *E. nordenskioldi*, 22,2% для всех изученных видов рода, и 23,2% для всей выборки люмбрицид.

Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень генетических различий между филогенетическими линиями *E. nordenskioldi* незначительно меньше такового между разными видами и даже родами люмбрицид. Единственным исключением была пара линий 6 и 9 *E. n. nordenskioldi*, различия между которыми были на порядок ниже.

Филогенетический анализ показал, что взятые наборы данных дают несколько различающиеся топологии деревьев, и что байесовский анализ



показывает гораздо большие уровни поддержки, чем алгоритм максимального правдоподобия. Род *Eisenia* оказался монофилетичным на всех деревьях, за исключением построенных по генам рРНК, на которых *E. spelaea* объединялась с *A. rosea*. *E. balatonica* во всех случаях оказывалась сестринской группой клады, объединяющей *E. nordenskioldi* и *E. tracta* (Рисунок 3.4.1.4).

Позиция последней была различной на деревьях, построенных по разным наборам данных: наборы данных для нуклеотидных последовательностей белок-кодирующих генов, они же плюс рРНК, и полные выравнивания мтДНК поддерживали объединение *E. tracta* с сестринской группой линий 6 и 9 *E. n. nordenskioldi*. По белковым последовательностям, *E. tracta* оказалась сестринской группой *E. nordenskioldi*; набор данных рРНК не был способен разрешить позицию этого вида по отношению к *E. nordenskioldi*.

Сам вид *E. nordenskioldi* на всех деревьях был разбит на две клады, каждая из которых имела высокую статистическую поддержку. Одна из клад включала в себя филогенетические линии 6 и 9 *E. n. nordenskioldi*; вторая – все прочие линии, включая и *E. n. pallida*. В пределах второй клады не наблюдалось постоянства топологии (Рисунки 3.4.1.4 и 3.4.1.5). Единственной группой, которая наблюдалась на всех полученных деревьях, были линия 1 *E. n. nordenskioldi* и линия 6 *E. n. pallida*. Линии 2 и 5 *E. n. nordenskioldi* объединялись на всех деревьях, за исключением построенного по рРНК, но с невысокой статистической поддержкой. Ещё одна группа, включающая в себя линию 3 *E. n. nordenskioldi* и линию 2 *E. n. pallida*, выявлялась на деревьях, построенных по белкам и белок-кодирующим генам.

Полученные филогенетические данные подтвердили точку зрения, высказанную выше (Раздел 3.2): оба подвида, *E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida*, оказались полифилетичными. Более того, часть полученных данных свидетельствовала о том, что полифилетичным мог оказаться и сам вид *E. nordenskioldi*.

### 3.4.2 Оценка работы метода секвенирования транскриптомов

Данные о филогении комплекса *E. nordenskioldi* и об отношениях между филогенетическими линиями, полученные на основе митохондриальных геномов, могут не отражать реальные отношения между ними из-за особого пути эволюции митохондриальной ДНК по сравнению с ядерным геномом [DeSalle et al., 2017]. В связи с этим мы получили более обширный набор данных при помощи секвенирования нового поколения. Вначале мы использовали платформу IonTorrent для секвенирования транскриптомов пяти образцов *E. n. nordenskioldi*. В выборку были включены особи линии 3 из Новосибирска, линии 7 с Урала и линии 9 из Магадана, и, кроме того, двух образцов с предгорий Горного Алтая (Тигирекский заповедник) (Рисунок 3.4.2.1). В качестве внешних групп были использованы *L. rubellus* и *E. andrei*.

Для создания набора данных для филогенетического анализа использовали два независимых алгоритма. Программа NaMStR производит поиск транскриптов в аннотированных геномных базах данных *Helobdella robusta* и *Capitella sp.* ProteinOrtho сравнивает последовательности транскриптов каждого из наших образцов друг с другом. Таким образом, NaMStR даёт меньший по объёму, но более надёжный набор данных. Полученные наборы генов переводили в аминокислотные последовательности, для которых строили выравнивания. Эти выравнивания триммировали, обрезая плохо выровненные участки, затем исключали те, которые оказывались короче 30 а.к. Кроме того, выяснилось, что для ряда генов получаются неустойчивые результаты, вызванные, по-видимому, неправильным подбором ортологов. Чтобы избавиться от подобных ошибок, удаляли гены с самой сильной дивергенцией, а именно выпадающие за 95й перцентиль по процентному количеству аминокислотных различий в выравнивании.

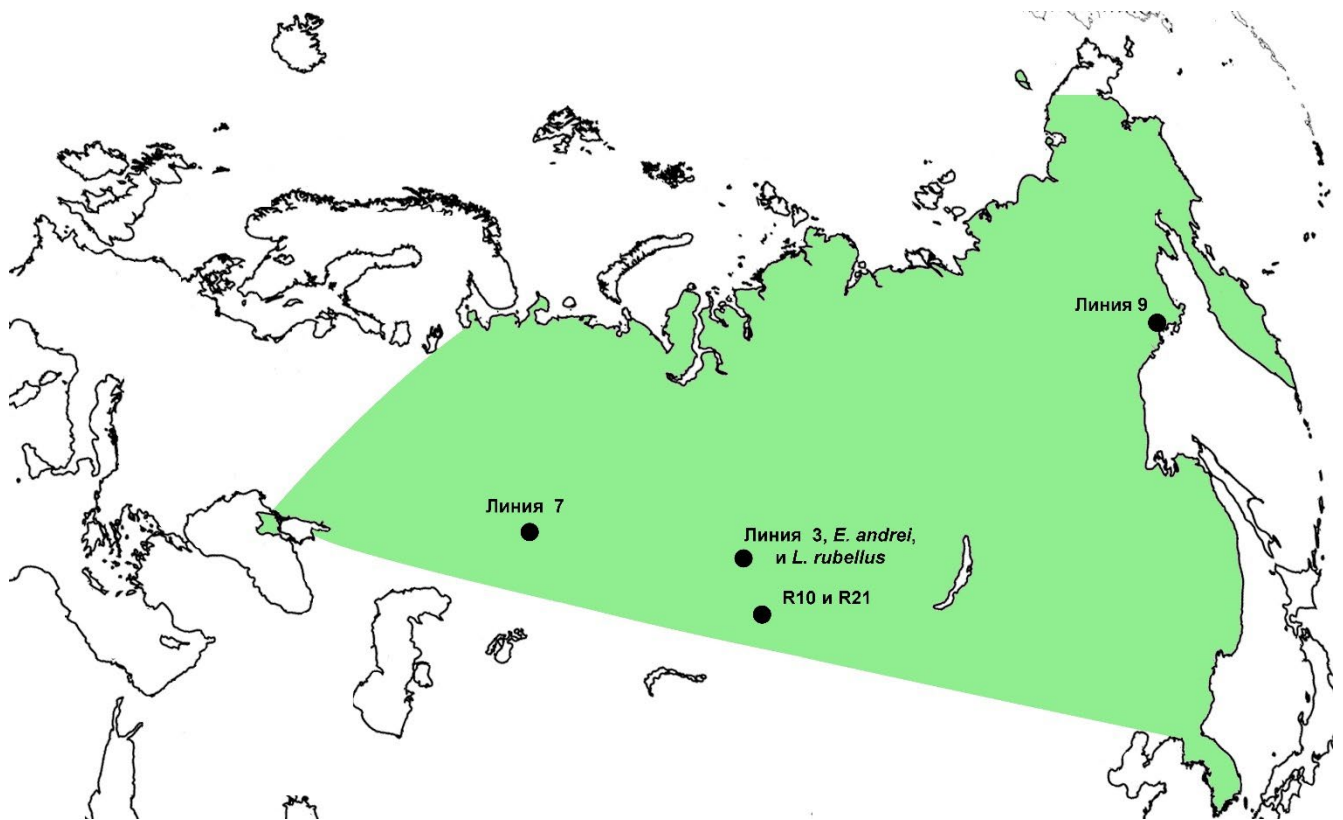


Рисунок 3.4.2.1. Точки сбора образцов для секвенирования транскриптомов методом IonTorrent. R10 и R21 – два образца, не отнесенные ни к одной линии (Таблица 3.4.2.1). Зеленым цветом отображен ареал *E. nordenskioldi*.

Полученные результаты просуммированы в таблице 3.4.2.1. Можно видеть, что для каждого образца получено 0,75–1 миллионов ридов и 26,230–41,886 транскриптов с средним N50 равным 767 п.н. Для исследованных образцов было предсказано 11937–18498 уникальных белков.

Несмотря на небольшую глубину прочтения, полученные гены показали соответствие с 65–82% групп ортологов, представленных в HaMStR. При помощи ProteinOrtho было получено приблизительно в 10 раз больше, однако, только 1,085 из получившихся ~10,000 присутствовали во всех исследованных образцах. При этом 544 из ортологических групп HaMStR присутствовало во всех образцах, что соответствует примерно половине от общего количества.

Так как известно, что *E. nordenskioldi* представлен набором рас различной ploidy [Viktorov, 1997; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008], мы провели оценку возможной полиплоидии у исследованных образцов. Известно, что *E. andrei*

– диплоид [Omodeo, 1952], мы вычислили количество паралогов для каждого гена *E. andrei* у разных линий *E. nordenskioldi*. Из рисунка 3.4.2.2 можно видеть, что распределение числа паралогов одинаково для всех образцов *E. nordenskioldi* и совпадает с таковым у *E. andrei*. Из этого можно заключить, что влияние возможной полиплоидии на выявляемый набор генов незаметен.

Финальный набор генов после всех фильтров составлял 203 гена для HaMStR и 809 для ProteinOrtho (28165 и 130935 а.к., соответственно). Большая часть (173) из набора HaMStR содержалась также в наборе ProteinOrtho. Скрининг этих генов в базе данных Gene Ontology показал, что большинство из них участвуют в центральных метаболических процессах или кодируют важные структурные белки (Рисунок 3.4.2.3). Таким образом, мы подтвердили, что полученный набор последовательностей содержит важные для организма гены, а не случайные последовательности, и, таким образом, получаемая информация отражает действительную филогению таксонов. При этом функциональное разнообразие было несколько выше в наборе генов ProteinOrtho.

Было проведено построение филогенетических деревьев методами максимального правдоподобия и байесовского анализа с двумя полученными конкатенированными наборами генов. Все четыре дерева, построенных на основе аминокислотных последовательностей, имели идентичную топологию, как и дерево, полученное для нуклеотидных последовательностей набора ProteinOrtho (общая длина 390590 п.н.) (Рисунок 3.4.2.4). Проведённое предварительное исследование показало, что *E. n. nordenskioldi* был монофилетичным по отношению к *E. andrei* и *L. rubellus*. Один из образцов из Тигирекского заповедника (R21) занимал базальное положение в ветви *E. n. nordenskioldi*; остальные образцы образовывали две пары: филогенетические линии 7 и 9, а также линия 3 + второй образец из Тигирекского заповедника (R10).

Таблица 3.4.2.1. Статистика по полученным последовательностям и их сборке. E. n. n. – *Eisenia n. nordenskioldi*; Ntr – число собранных транскриптов; nr – число неизбыточных белков; POrtho – число выявленных ортогрупп ProteinOrtho из 20603 возможных; HaMStR – число ортогрупп HaMStR из 1253 возможных.

<b>Образец</b>	<b>Ридов</b>	<b>Оснований</b>	<b>Ntr</b>	<b>N50</b>	<b>nr</b>	<b>POrtho</b>	<b>HaMStR</b>
E.n.n. линия 3	1,002,477	267,977,445	41,724	830	17,469	10,574	942
E.n.n. линия 7	901,691	233,570,944	26,230	787	12,617	8,567	851
E.n.n. линия 9	907,172	217,418,513	35,751	693	13,952	9,041	876
E.n.n. R10	762,294	183,220,380	29,961	684	11,937	8,056	814
E.n.n. R21	820,821	198,132,912	40,334	733	17,222	10,519	1,020
<i>E. andrei</i>	1,094,366	273,164,798	41,886	811	19,351	10,673	974
<i>L. rubellus</i>	737,035	195,074,949	36,539	829	18,498	9,405	1,018

Таблица 3.4.2.2 Парные р-дистанции (в %) между конкатенированными наборами данных для изученных образцов.  
 Над диагональю – данные для ProteinOrtho; под диагональю – для HaMStR. E.n.n. – *Eisenia n. nordenskioldi*.

	E.n.n.3	E.n.n.7	E.n.n.9	E.n.n. R10	E.n.n. R21	<i>E. andrei</i>	<i>L. rubellus</i>
E.n.n.3	-	2,81	2,80	1,93	3,01	4,73	6,83
E.n.n.7	1,87	-	0,85	2,72	3,08	4,76	6,87
E.n.n.9	1,94	0,55	-	2,68	3,08	4,78	6,91
E.n.n. R10	1,27	1,82	1,82	-	3,00	4,65	6,81
E.n.n. R21	1,93	2,01	2,03	2,01	-	4,83	6,94
<i>E. andrei</i>	3,04	2,99	3,07	3,04	3,17	-	6,84
<i>L. rubellus</i>	4,48	4,49	4,50	4,51	4,50	4,35	-

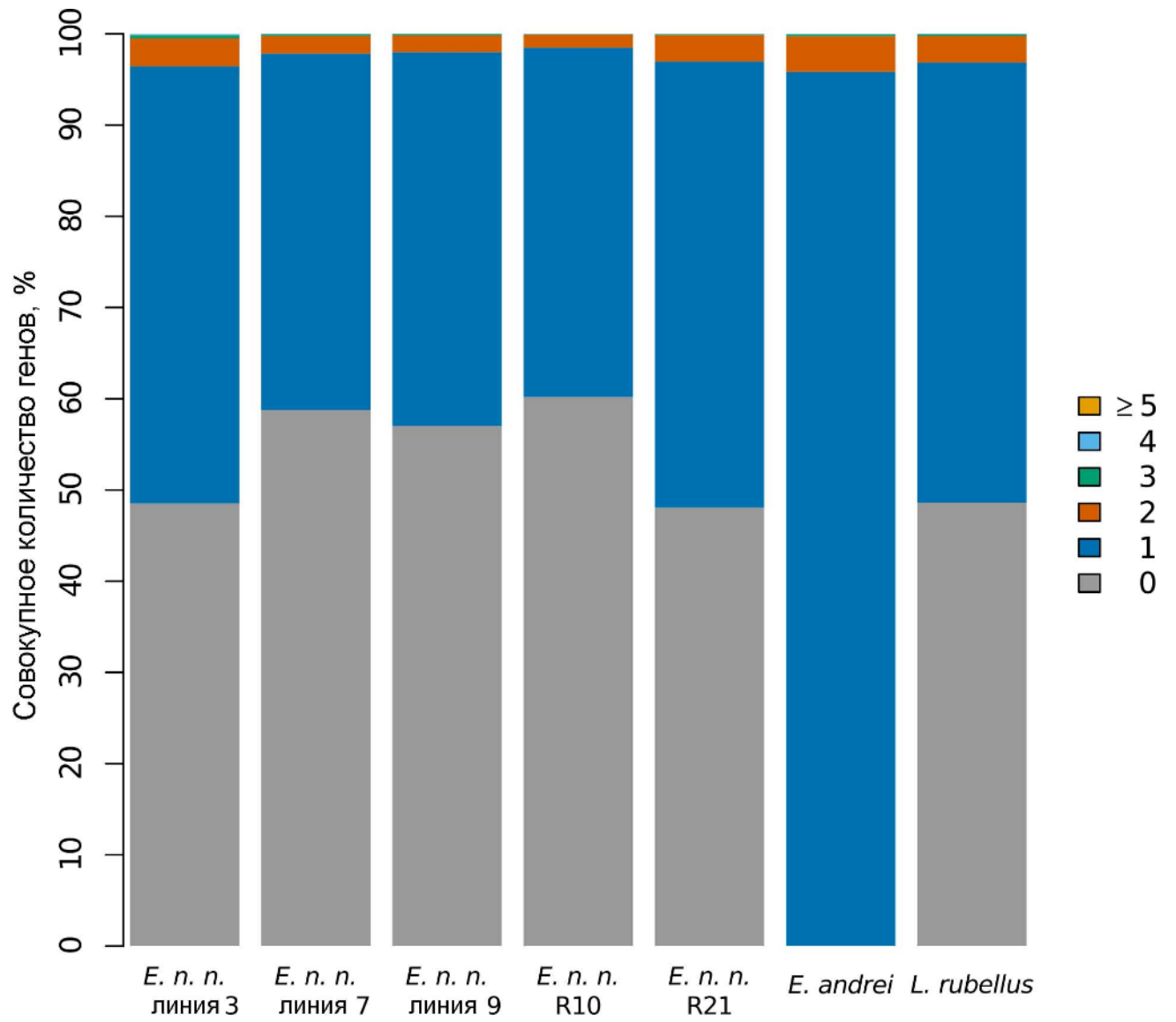


Рисунок 3.4.2.2 Распределение количества гомологов по отношению к *E. andrei* в анализируемых образцах

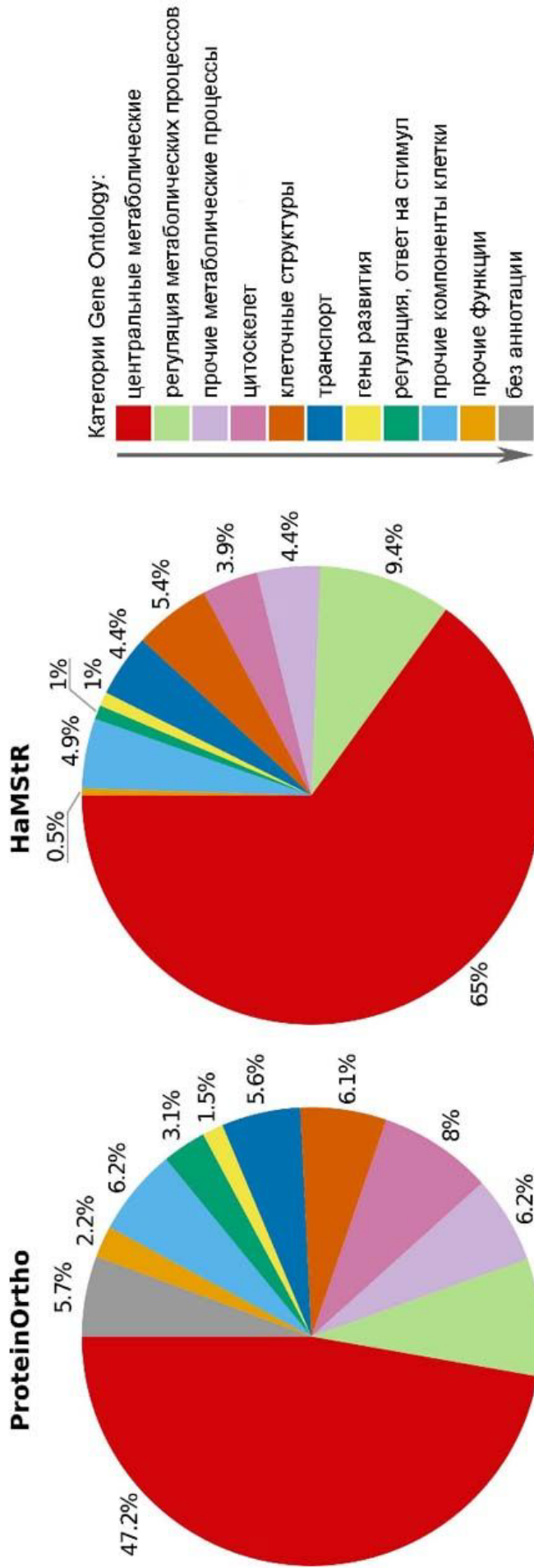


Рисунок 3.4.2.3 Функциональная классификация выявленных генов в наборах ProteinOrtho и HaMStR. Стрелка указывает приоритет присвоения категории гену



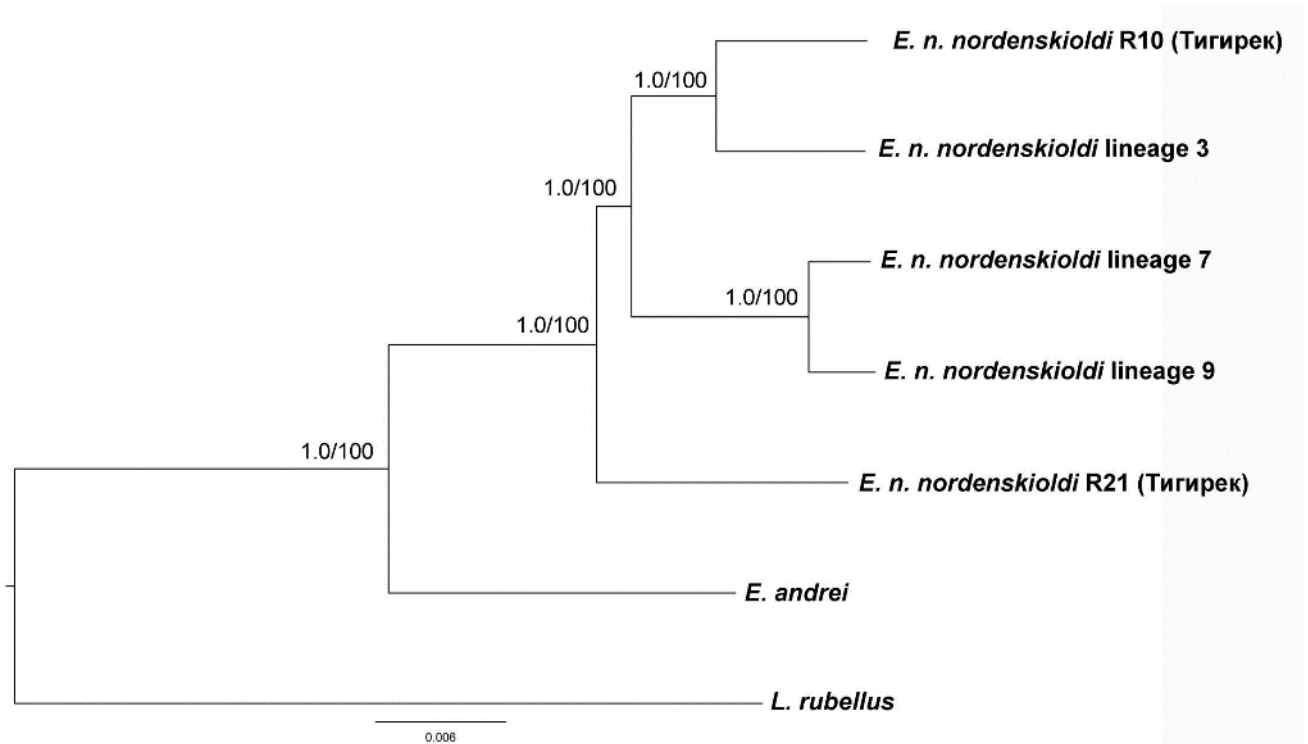


Рисунок 3.4.2.4 Филогенетическое дерево, полученное для набора данных HaMStR при помощи алгоритма максимального правдоподобия. Числа возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку / байесовскую апостериорную вероятность

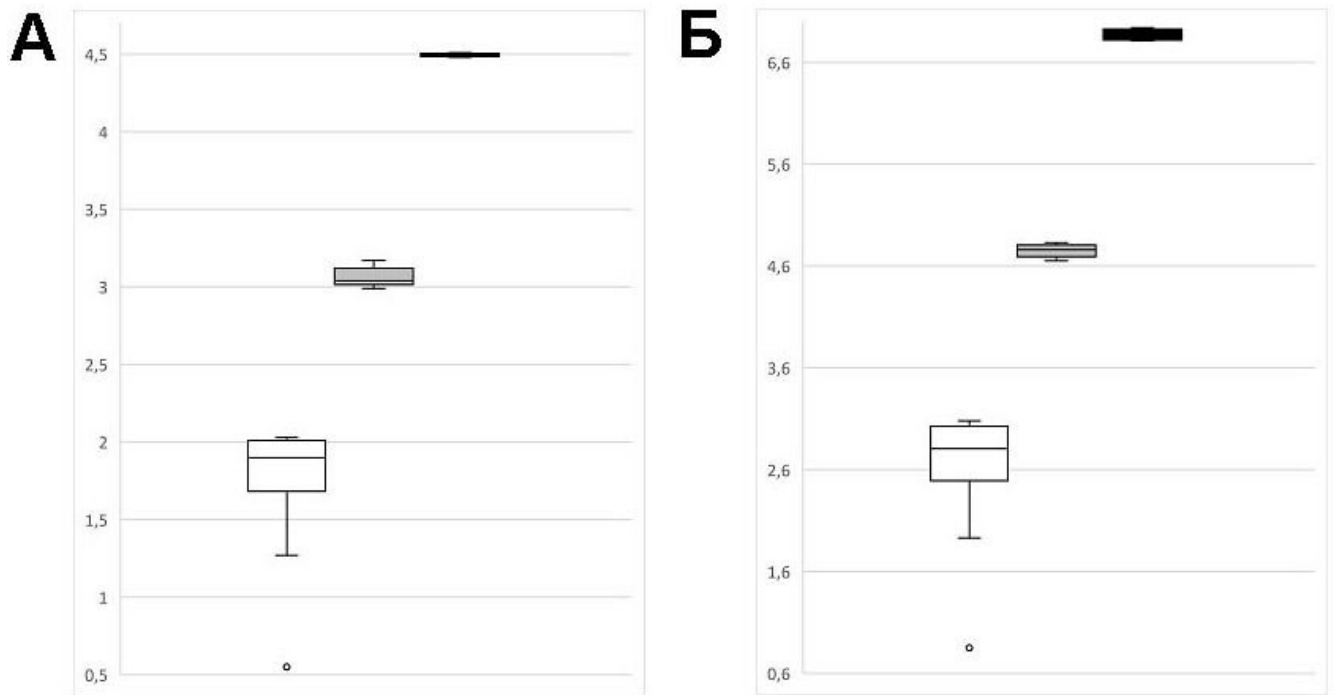


Рисунок 3.4.2.5 Р-дистанции между последовательностями *sox1* (А) и *ITS2* (Б) (верхняя панель). Белые прямоугольники – дистанции между линиями *E. n. nordenskioldi*; светло-серые – между *E. n. nordenskioldi* и *E. andrei*; темно-серые – между *E. n. nordenskioldi* и *L. rubellus* (см. таблицу 3.4.2.2). Черта внутри прямоугольников соответствует медианному значению, верхняя и нижняя границы – 25й и 75й перцентили, верхний и нижний усы – 1,5 интерквартильных расстояния, кружки – выбросы.

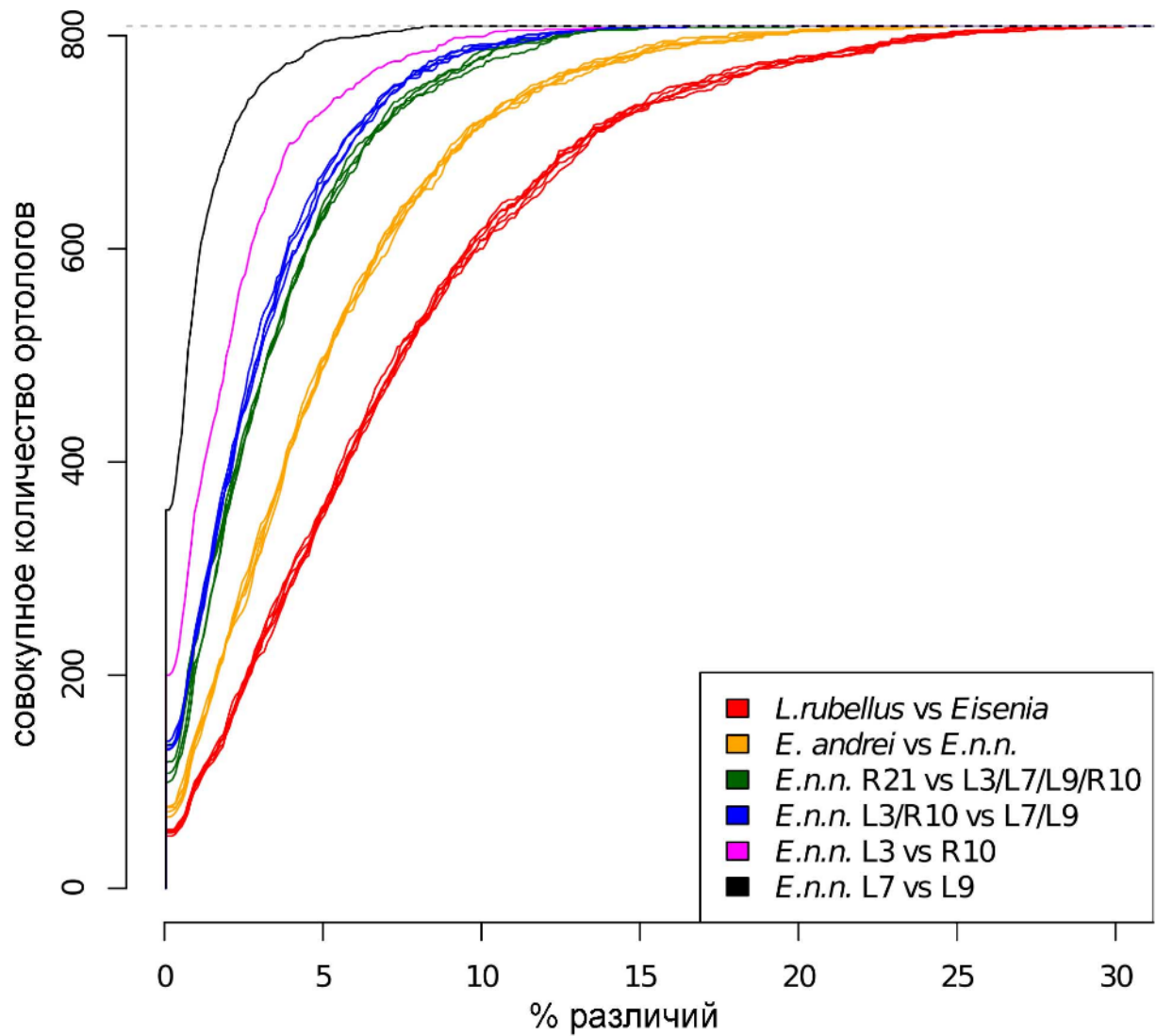


Рисунок 3.4.2.6 Накопительная диаграмма различий белковых последовательностей набора ProteinOrtho для каждой пары образцов. *E. n. n.* – *Eisenia n. nordenskioldi*

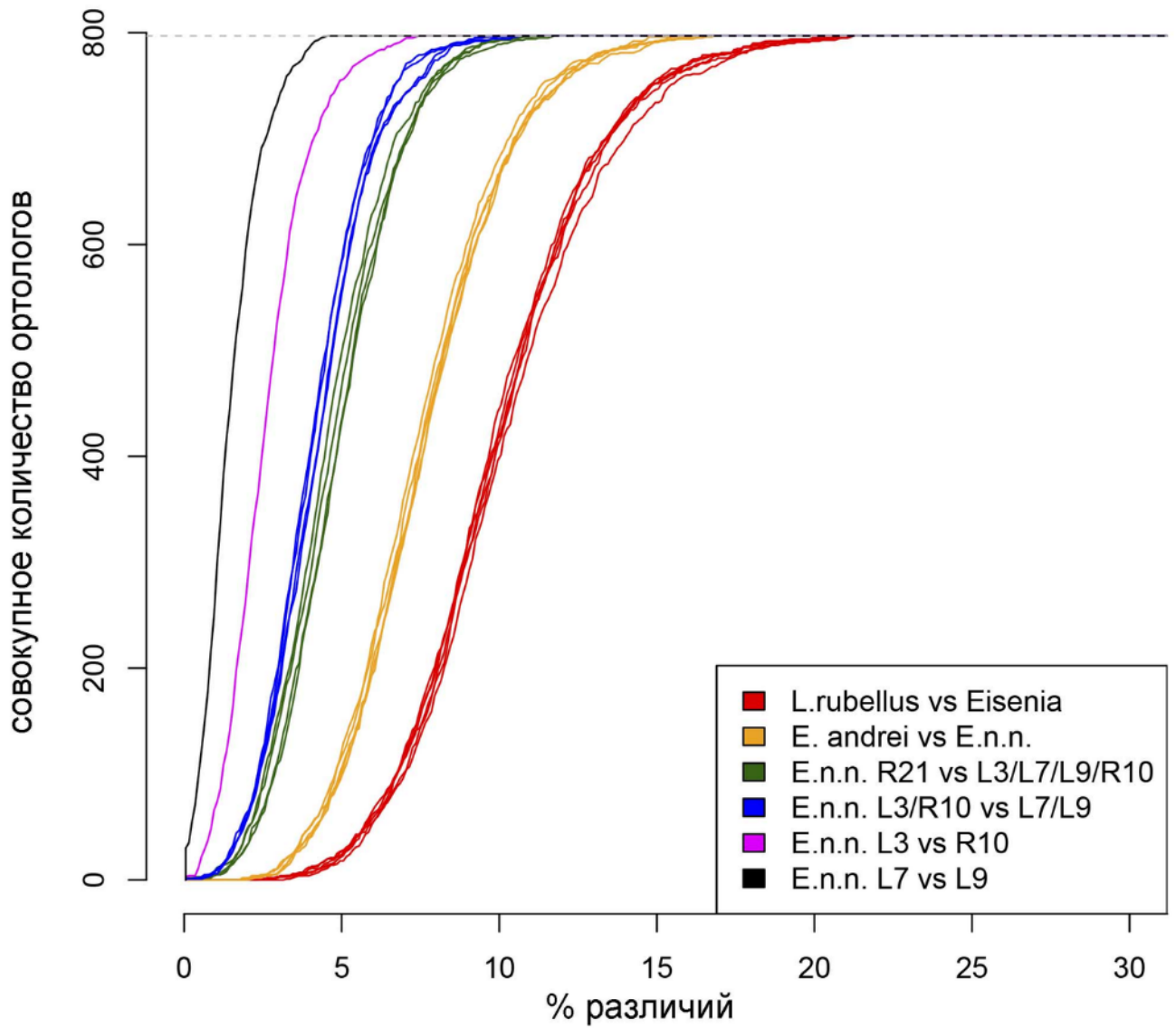


Рисунок 3.4.2.7 Накопительная диаграмма различий нуклеотидных последовательностей набора ProteinOrtho для каждой пары образцов. *E. n. n.* – *Eisenia n. nordenskioldi*

Среднее количество аминокислотных замен для конкатенированного набора данных HaMStR для образцов *E. n. nordenskioldi* составляло 1,73%; между *E. n. nordenskioldi* и *E. andrei* – 3,06%; *E. n. nordenskioldi* и *L. rubellus* – 4,50%. Для набора ProteinOrtho значения были несколько выше: 2,60%, 4,75% и 6,87%, соответственно. Полные данные по дистанциям представлены в таблице 3.4.2.2 и на рисунке 3.4.2.5. Различия по нуклеотидным последовательностям, как и ожидалось, были выше: для набора генов ProteinOrtho среднее количество нуклеотидных замен между филогенетическими линиями *E. n. nordenskioldi* составляло 4,02%; между *E. n. nordenskioldi* и *E. andrei* – 7,63%; *E. n. nordenskioldi* и *L. rubellus* – 9,96% (Таблица 3.4.2.2).

Так как средние значения могут не отражать картину для генов, для которых наблюдаемые различия более выражены, мы построили накопительную диаграмму попарных различий (Рисунки 3.4.2.6 и 3.4.2.7). На рисунках можно видеть, что распределение попарных замен между *L. rubellus*, *E. andrei* и филогенетическими линиями *E. n. nordenskioldi* не слишком отличается. Среди последних наиболее близкими были пара образцов, относящихся к линиям 7 и 9, которые различались всего лишь 0,55%/0,85% аминокислотных различий для наборов генов HaMStR и ProteinOrtho, соответственно, несмотря на то, что именно эта пара была разделена наибольшими географическими расстояниями (около 5300 км). Различия между линией 3 и образцом R10 из Тигирекского заповедника были в два с лишним раза выше, 1,27% / 1,93%, соответственно. Попарные различия между остальными филогенетическими линиями были сходными, 1,8–2% / 2,7–3% (Рисунки 3.4.2.5, 3.4.2.6, таблица 3.4.2.2).

Отсутствие соответствия между генетическими различиями и географией расселения исследуемых популяций свидетельствует в пользу давней дивергенции филогенетических линий *E. n. nordenskioldi*.

В данном исследовании мы получили ряд важных промежуточных результатов. Было показано, что секвенирование транскриптомов представляет собой более выгодный (в плане цена/количество филогенетической информации) путь получения мультигенных наборов данных по сравнению с традиционными

ПЦР и секвенированием по Сэнгеру: при использовании последних цена и трудозатраты становятся слишком велики при большом количестве используемых локусов; кроме того, оно предполагает вовлечение новых ядерных маркеров вдобавок к традиционно используемым, а это на практике часто оказывается проблематичным. Несмотря на возможные погрешности: невысокое покрытие, возможные различия из-за видо-, ткане- и стадийспецифичности, влияние различий в хранении и подготовке образцов, нам удалось получить более чем достаточный набор для надёжного установления филогенетических отношений между исследуемыми образцами (Таблица 3.4.2.1).

Одной из наших задач было оценить степень различий между аминокислотными последовательностями белков на уровне вида, рода и семейства дождевых червей. Оказалось, что большинство белковых последовательностей были идентичными или различались не более чем 1% замен во всех исследуемых образцах. Это может быть объяснено несколькими факторами (Таблица 3.4.2.2; рисунки 3.4.2.5 – 3.4.2.7). Во-первых, в данных, полученных при секвенировании РНК, относительный перевес имеют высокоэкспрессирующиеся транскрипты генов домашнего хозяйства, а они являются более консервативными. Во-вторых, обработка данных оставляет те гены, которые уже представлены в базах данных, и можно ожидать, что они также относительно более консервативны. В-третьих, при выравнивании транскриптов также отсеиваются наиболее переменные гены. Таким образом, мы получаем меньшие значения попарных различий по сравнению с полногеномными данными. Таким образом, эти последовательности характеризуются низкой скоростью молекулярной эволюции и потому дают совсем мало информации для решения филогенетических вопросов.

Для остальных генов мы можем чётко видеть тенденцию к увеличению количества замен с уровня вида до уровня семейства. Это звучит тривиально, однако на многих деревьях, построенных для сем. Lumbricidae по митохондриальным данным, это закономерности не наблюдаются [Pop et al., 2007; Domínguez et al., 2015; Pérez-Losada et al., 2015]. Однако, по нашему мнению, эти случаи могут быть объяснены насыщением заменами из-за высокой скорости

эволюции мтДНК, а не действительными филогенетическими отношениями. Таким образом, мультигенные наборы данных, полученные методами транскриптомики, являются более перспективными для решения вопросов, касающихся филогенетических отношений.

Было показано, что возможная полиплоидия не детектируется на уровне транскриптов. Только небольшая часть транскриптов имела два или более паралога в других образцах, и их доля была сходной во всей выборке. Это может иметь несколько объяснений. Во-первых, в случае недавней автополиплоидии гомеологи могут ещё оставаться идентичными. В случае же аллополиплоидии гомеологи обычно имеют разные уровни экспрессии, и в большинстве случаев экспрессия всех гомеологов, кроме одного, подавляется, в связи с чем мы получаем последовательность только одного транскрипта [Bottani et al., 2018]. Кроме того, на результаты может влиять и компьютерная обработка результатов: близкие последовательности могут быть объединены в один ген или представлены как несколько изоформ одного гена.

Таким образом, мы впервые показали, что филогенетические линии *E. n. nordenskioldi* имеют значительные различия по последовательностям ядерного генома, однако для получения более глубоких результатов необходима более обширная выборка.

### **3.4.3 Филогения *E. nordenskioldi*: сравнение картин, полученных на основе гена *cox1* и транскриптомных данных**

Так как предварительное изучение филогении комплекса *E. nordenskioldi* при помощи транскриптомных данных оказалось перспективным (Раздел 3.3.2), мы просеквенировали транскриптомы девяти образцов *E. n. nordenskioldi* и трёх образцов *E. n. pallida*, относящихся к разным филогенетическим линиям, а также пяти внешних групп – различных видов рода *Eisenia*. Мы также предприняли попытку подытожить накопленные к концу работы данные о распространении филогенетических линий *E. nordenskioldi* и собрали в единую выборку (927

образцов; в это число входят в том числе и все последовательности из Разделов 3.1, 3.2, 3.3.1, 3.3.2, а также новые, полученные нами на более поздних этапах работы) все обработанные нами образцы, для которых были точно известны места сбора и последовательности гена *cox1*. Эта информация подытожена на рисунках 3.4.3.1 – 3.4.3.3.

Работа с популяциями *E. nordenskioldi*, выбранными для анализа гена *cox1* (выделение тотальной ДНК, амплификация гена *cox1*, секвенирование и сборка последовательностей) проводилась стандартными методами как описано выше (Раздел 2.3.1). Филогенетическое дерево было построено при помощи алгоритма максимального правдоподобия (ML) в программе RAxML [Stamatakis, 2014]. Модель замен GTR+I+G была выбрана в соответствии с байесовским информационным критерием в программе MEGA X [Kumar et al., 2018]. Было выполнено 1000 бутстрепных реплик.

Мы предприняли попытку использовать методы автоматического разделения выборки на виды. Анализ ABGD [Puillandre et al., 2012] был проведен онлайн на сайте <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>. Для другого использованного метода, multi-rate Poisson Tree Process [Kapli et al., 2017; <http://mptp.h-its.org/#/tree>], в качестве входных данных было использовано полученное дерево максимального Правдоподобия. Попытка реконструкции предковых ареалов была сделана методом S-DIVA (Statistical dispersal-vicariance analysis) в программе RASP v. 4 [Yu et al., 2015, 2020].

Секвенирование РНК описано в Разделе 2.4.1. В данной работе мы объединили данные секвенирования, полученные при помощи методов, разработанных фирмами IonTorrent (раздел 3.4.1) и Illumina. Оказалось, что разные методы выдают сходные количества генов и вполне могут быть объединены без потери качества. Данные по полученным последовательностям представлены в Таблице 3.4.3.1. Количество ридов для разных библиотек варьировало от 0,5 до 22 миллионов ридов. Собранные de novo транскриптомы содержали от 21 до 144 тысяч транскриптов при N50 от 500 до 1000.



Набор, полученный при помощи ProteinOrtho, содержал 287 белков/генов, найденных во всех 17 образцах (после финальной фильтрации и отсеивания коротких последовательностей осталось 212). Финальный набор содержал 29097 а.к. и 107394 нуклеотидных позиций. Алгоритм NaMStR выявил 227 общих генов/белков, но в финальном наборе осталось только 91. Получившийся набор содержал 7309 а.к. и 35917 нуклеотидов.

Филогенетические деревья были построены алгоритмами максимального правдоподобия (при помощи программы RaXML) и байесовского анализа (MrBayes). Все получившиеся филогенетические деревья имели сходную топологию (Рисунок 3.4.3.4). Исследованные виды рода *Eisenia* разделились на две группы, в одну из которых входили европейские виды (*E. spelaea* и *E. andrei*), в другую – сибирские (*E. nordenskioldi*, *E. magnifica*, *E. tracta*, *E. balatonica*). *E. tracta* оказалась сестринским видом *E. nordenskioldi*, как и в анализе митохондриальных геномов (раздел 3.4.2). *E. nordenskioldi* разделялся на две группы. В одну из них входили филогенетические линии 6,7 и 9 *E. n. nordenskioldi* линий 6, 7, and 9, во вторую – все остальные линии *E. n. nordenskioldi* и все линии *E. n. pallida*.

Филогенетические отношения в пределах второй группы не были разрешены. Во всех случаях вместе объединялись линии 1 *E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida*. Другими группами, также обнаруженными на всех построенных деревьях, были линии 2 и 5 *E. n. nordenskioldi*, а также линия 3 *E. n. nordenskioldi* и линия 6 *E. n. pallida*. При этом отношения между этими группами были нестабильными; группа линий 1 *E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida* являлась сестринской группой ко всем остальным линиям, но статистическая поддержка её положения была невысокой (Рисунок 3.4.3.4).

Как сказано выше, в финальную выборку последовательностей *cox1 E. nordenskioldi* входило 927 последовательностей этого гена. В ней было выявлено 373 полноразмерных уникальных гаплотипа. Инсерций/делеций обнаружено не было. Из 658 нуклеотидных позиций 284 были вариабельными, 263 – информативными для парсимонии (parsimony-informative). Филогенетическое дерево для этого набора данных (Рисунок 3.4.3.5) подтвердило деление *E.*

*nordenskioldi* на две группы. На дереве, построенном по гену *cox1*, было выявлено большинство филогенетических линий, найденных нами ранее, а также и несколько новых. На других деревьях линии 7 и 9 *E. n. nordenskioldi* обычно выделялись как отдельные клады, однако на полученном дереве линия 7 входила в состав линии 9. Линия 1 *E. n. nordenskioldi* и линия 1 *E. n. pallida* также слилась в единую кладу.

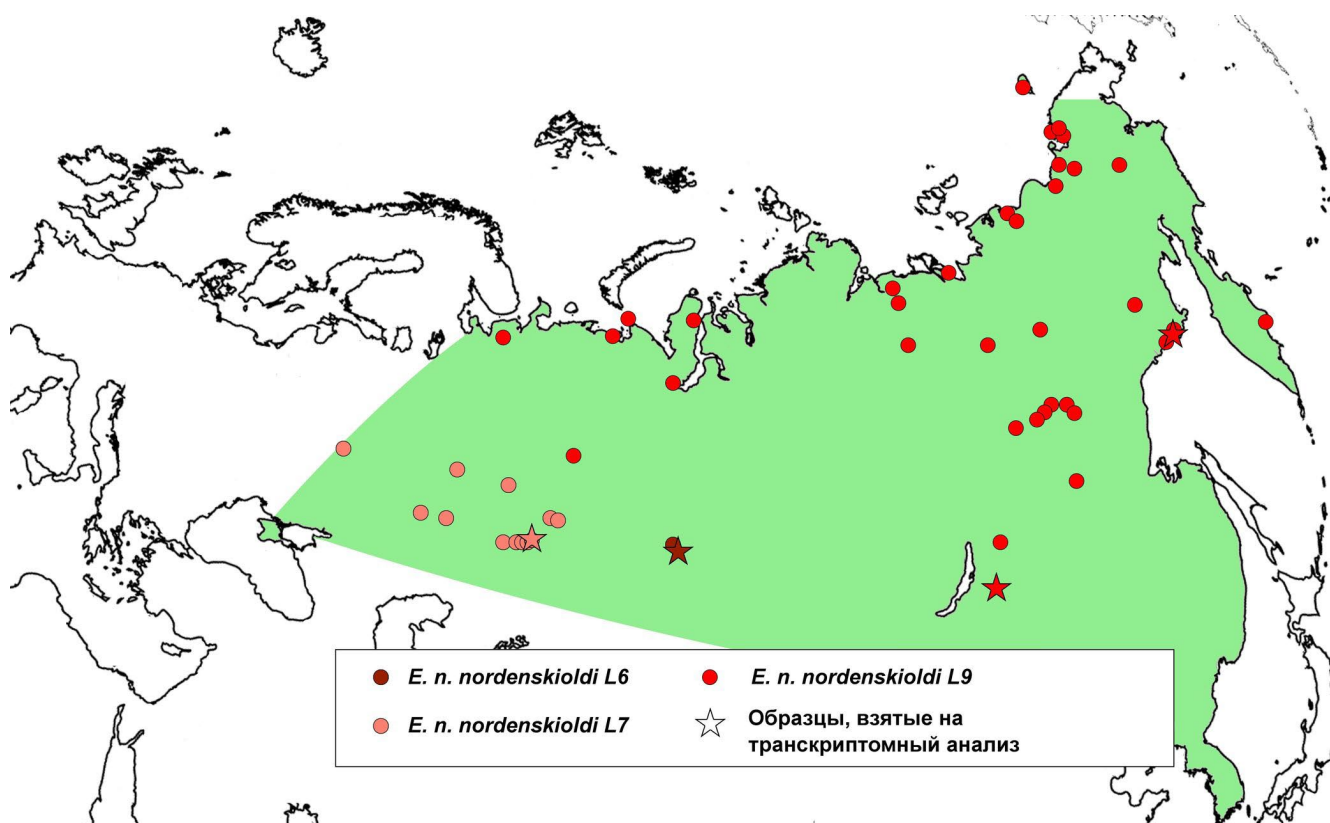


Рисунок 3.4.3.1 Точки, в которых обнаружен *E. n. nordenskioldi* линий 6, 7 и 9. На рисунке отражены данные, полученные на финальном этапе работы. Звездочками показаны образцы, взятые на транскриптомный анализ. Зеленым цветом закрашен ареал *E. n. nordenskioldi*.

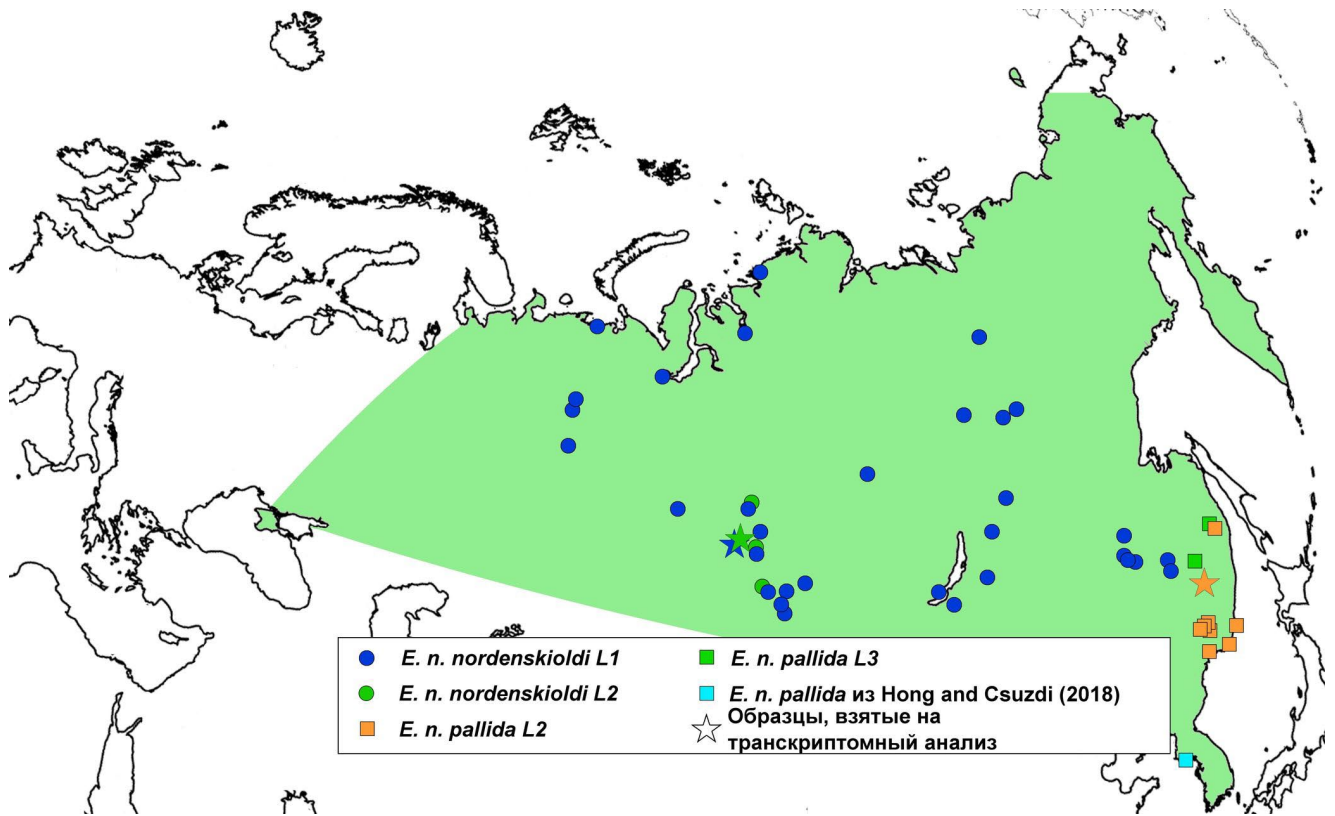


Рисунок 3.4.3.2 Точки, в которых обнаружен *E. n. nordenskioldi* линий 1 и 2, *E. n. pallida* линий 2 и 3, а также корейские образцы. На рисунке отражены данные, полученные на финальном этапе работы. Звездочками показаны образцы, взятые на транскриптомный анализ. Зеленым цветом закрашен ареал *E. nordenskioldi*.

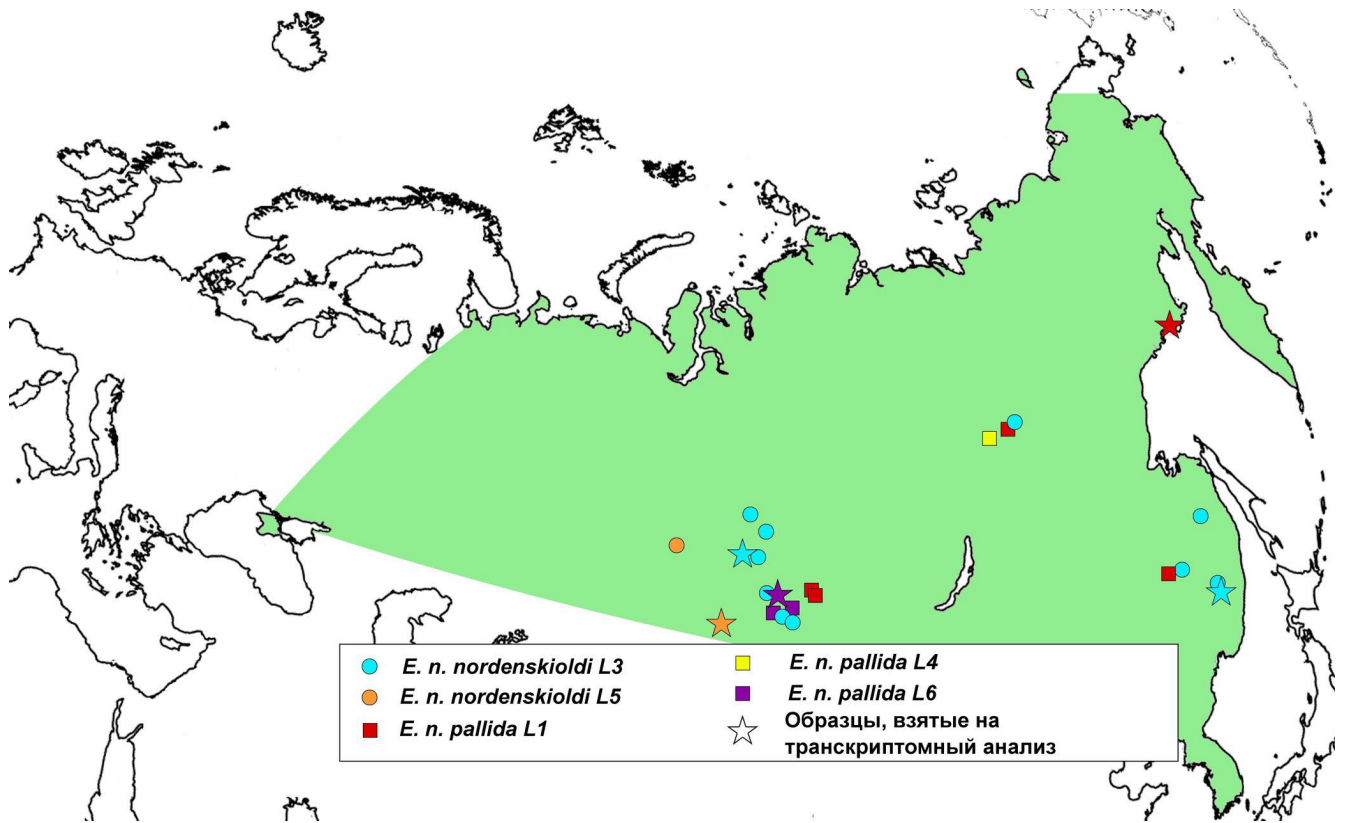


Рисунок 3.4.3.3 Точки, в которых обнаружен *E. n. nordenskioldi* линий 3 и 5, а также *E. n. pallida* линий 1, 4 и 6. На рисунке отражены данные, полученные на финальном этапе работы. Звездочками показаны образцы, взятые на транскриптомный анализ. Зеленым цветом закрашен ареал *E. nordenskioldi*.

Таблица 3.4.3.1 Статистика данных, полученных в ходе транскриптомного анализа. *E. n. n.* – *E. n. nordenskioldi*; L1 и т.д. – номер линии, Ntr – число собранных транскриптов, пг – число неизбыточных (non-redundant) белков, POrtho – число ортогрупп ProteinOrtho, HaMStR – число ортогрупп HaMStR.

Образец	Точка сбора	Кол-во ридов	Кол-во нуклеотидов	Ntr	N50	пг	POrtho	HaMStR
<i>E. n. n. L1</i>	Россия, Республика Бурятия, с. Укыр	6,829,313	893,561,003	66,734	796	19,584	16,092	1060
<i>E. n. n. L2</i>	Россия, Новосибирская область, Новосибирск	5,046,196	662,670,274	65,367	611	17,792	14,535	969
<i>E. n. n. L3</i>	--/--	1,002,477	273,164,798	41,724	830	17,469	13,195	941
<i>E. n. n. L3</i>	Россия, Хабаровский край, с. Лесошильное	22,060,622	2,984,499,927	144,485	1093	36,889	21,345	1146
<i>E. n. n. L5</i>	Казахстан, Восточно-Казахстанская область, Семипалатинск	8,065,857	1,069,397,358	92,936	729	27,110	19,577	1144
<i>E. n. n. L6</i>	Россия, Омская область, Омск	4,858,412	642,125,976	63,101	655	16,371	13,436	941
<i>E. n. n. L7</i>	Россия, Республика Башкортостан, с. Файзуллино	901,691	233,570,944	26,230	787	12,617	10,087	851
<i>E. n. n. L9</i>	Россия, Магаданская область, Магадан	907,172	267,977,445	35,751	693	13,952	10,946	876
<i>E. n. n. L9</i>	Россия, Республика Бурятия, с. Укыр	4,811,412	645,880,417	53,376	699	12,641	10,416	869
<i>E. n. pallida L1</i>	Россия, Магаданская область, Магадан	549,677	217,418,513	20,730	576	7013	5537	565

<i>E. n. pallida</i> L2	Россия, Хабаровский край, с. Лесопильное	8,398,708	1,115,244,684	84,739	867	24,763	19,265	1100
<i>E. n. pallida</i> L6	Россия, Алтайский край, с. Макарьевка	5,696,720	770,053,754	67,896	711	18,664	15,123	1016
<i>E. tracta</i>	Казахстан, Восточно- Казахстанская область, с. Горная Ульбинка	1,863,378	248,862,467	21,011	574	4650	3986	554
<i>E.</i> <i>magnifica</i>	--/--	3,542,634	471,425,980	35,149	604	7817	6469	662
<i>E.</i> <i>balatonica</i>	Казахстан, Восточно- Казахстанская область, Семипалатинск	3,326,331	442,401,654	37,999	651	9186	7821	761
<i>E. spelaea</i>	Венгрия, Kőszeg, Рогányок	2,676,755	348,105,082	31,509	501	6627	5340	638
<i>E. andrei</i>	Россия, Новосибирская область, Новосибирск	1,094,366	195,074,949	41,886	811	19,351	12,929	974

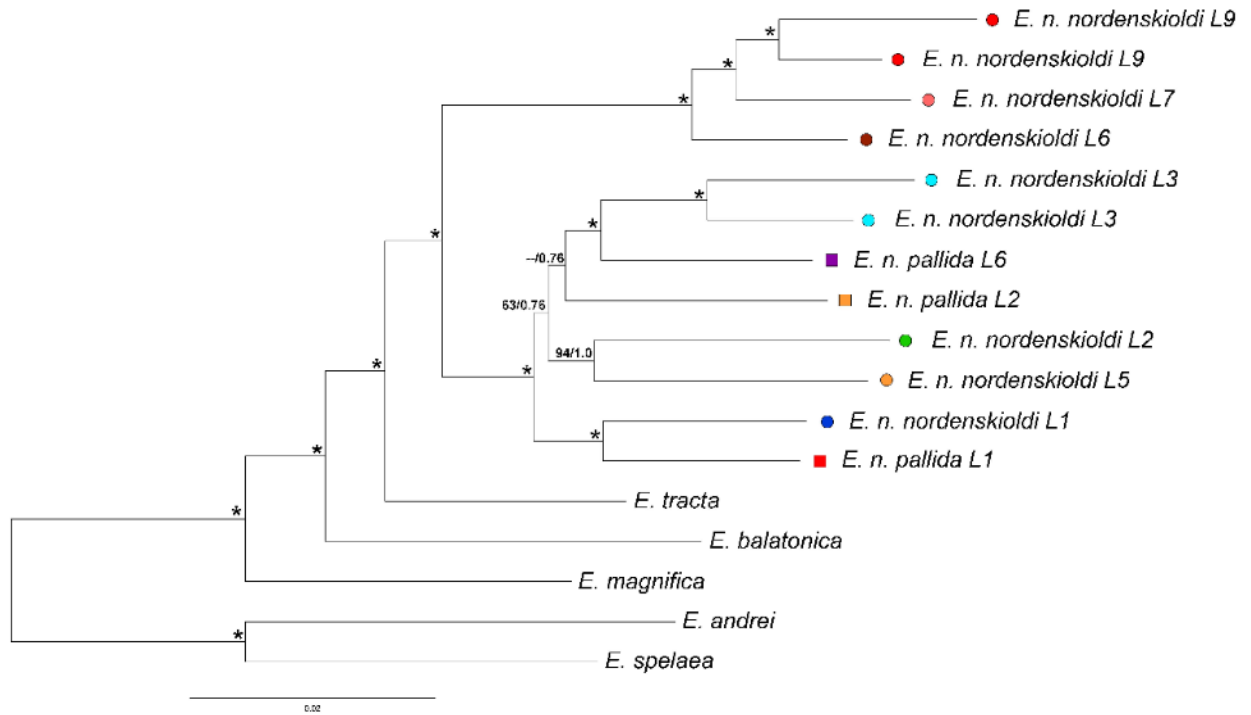


Рисунок 3.4.3.4 Филогенетическое дерево, построенное для набора данных ProteinOrtho при помощи алгоритма ML. Цифры возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку ML / байесовские апостериорные вероятности; \* – поддержка 100/1.0. Обозначения линий соответствуют рисункам 3.4.3.1 – 3.4.3.3.

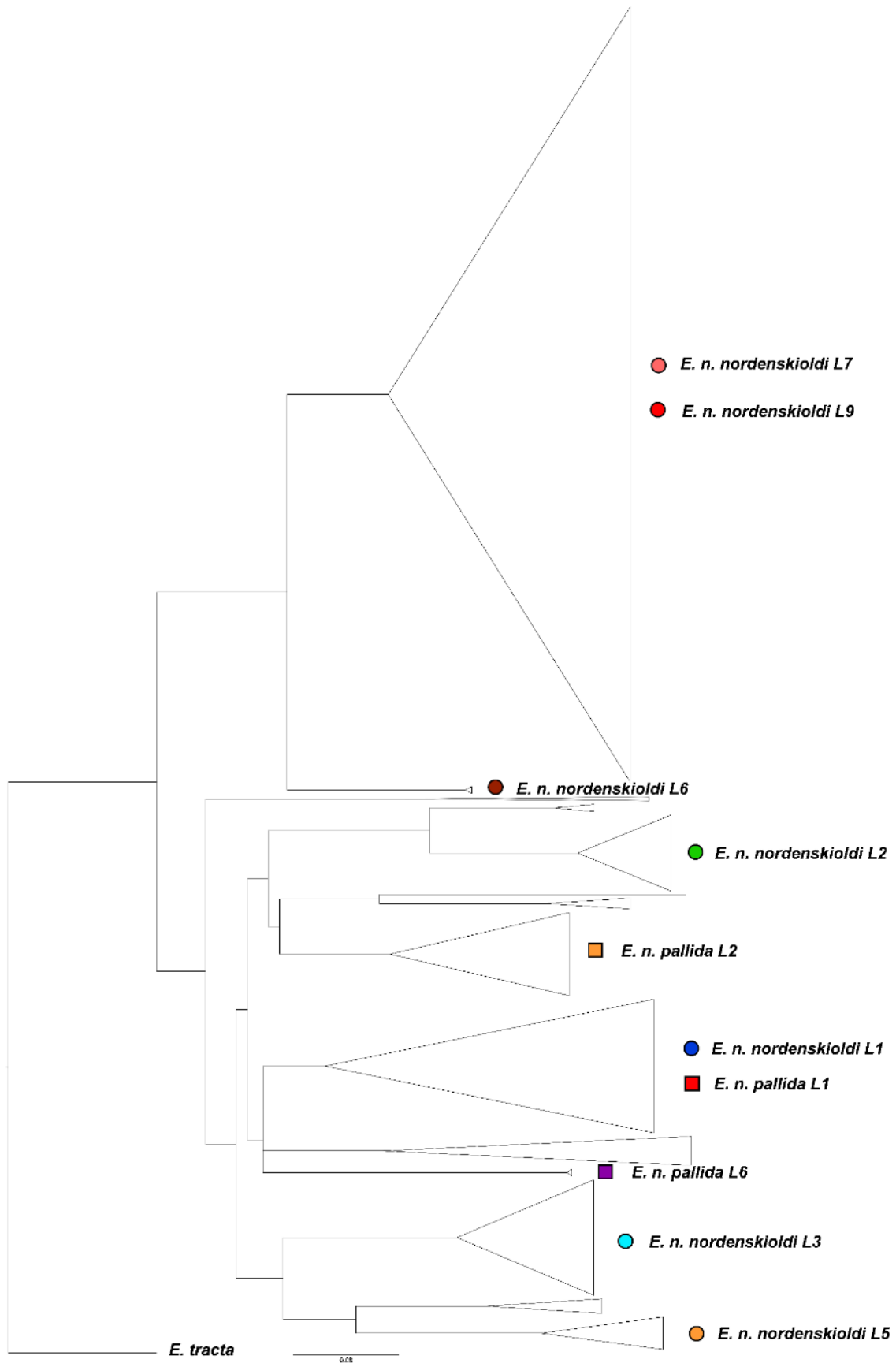


Рисунок 3.4.3.4 Филогенетическое дерево, построенное для гена *cox1* при помощи алгоритма ML. Обозначения линий соответствуют рисункам 3.4.3.1 – 3.4.3.3.



Полученные данные использовались для построения карт распространения филогенетических линий. При анализе короткие последовательности *cox1*, а также последовательности с низким качеством секвенирования были отнесены нами к соответствующим линиям *E. nordenskioldi*. Это, в том числе, было применено к данным, полученным в работах зарубежных исследователей [Blakemore, 2013; Hong, Csuzdi, 2016]. Последовательности *E. n. mongol* и *E. n. onon* [Blakemore, 2013] были отнесены к линии 1 *E. n. nordenskioldi* и оказались близки к некоторым гаплотипам из Республики Бурятия, а *E. n. pallida* из Кореи [Hong, Csuzdi, 2016] формировали отдельную ветвь в составе *Eisenia* sp. 1.

Мы попытались разделить *E. nordenskioldi* на предполагаемые виды путем автоматического разграничения видов с использованием различных алгоритмов. Многоуровневый анализ процессов дерева Пуассона [Kaplí et al., 2017] выявил 77 предполагаемых видов. Алгоритм ABGD [Puillandre et al., 2017] предложил от 29 до 46 видов с параметрами по умолчанию (относительная ширина промежутка = 1,5X) и от 8 до 12 видов с относительной шириной промежутка 4X. В последнем случае границы этих видов соответствовали границам, проведенным вручную между филогенетическими линиями *E. nordenskioldi*.

Полученные данные позволяют окончательно разрешить несколько важных вопросов. В то время как в некоторых предыдущих исследованиях *E. nordenskioldi* оказывался полифилетичным (раздел 3.4.2), филогеномные наборы данных однозначно указывают на монофилию комплекса. В то же время, ни *E. n. nordenskioldi*, ни *E. n. pallida* не являются монофилетичными.

### **3.5 Эволюция размера и хромосомной организации ядерного генома в комплексе *E. nordenskioldi***

#### **3.5.1 Размеры геномов филогенетических линий**

Живые дождевые черви были собраны в полевой сезон 2020 г. Размер генома дождевых червей оценивали по интенсивности свечения ядер единичных клеток,

окрашенных пропидий йодидом (Раздел 2.11). Филогенетические деревья, построенные методами максимального правдоподобия и байесовского анализа на основе филогеномных данных, были взяты из предыдущей работы (Раздел 3.4.3).

Полученная информация о размерах ядерного генома для нескольких филогенетических линий комплекса *E. nordenskioldi* (Таблица 3.5.1, рисунок 3.5.1) свидетельствуют о том, что в пределах комплекса наблюдается значительный разброс по размерам генома. Можно выделить две группы размеров: небольшие геномы (250 – 500 М.п.н.) наблюдались в трёх случаях, для двух линий непигментированной формы *Eisenia* sp. 1 aff. *E. nordenskioldi* и для линии 2 пигментированной формы того же вида. Крупные геномы (2350–3500 М.п.н.) были характерны для всех остальных филогенетических линий.

Более того, разные линии комплекса *E. nordenskioldi* имеют сильно различающиеся размеры генома, что может объясняться как тем, что они, на самом деле, отдельные виды (о чём свидетельствуют генетические данные – см. предыдущие разделы), или же о влиянии полиплоидии. Известно, что для *E. nordenskioldi* характерно существование нескольких рас различной плоидности:  $2n$ ,  $4n$ ,  $6n$ ,  $7n$ ,  $8n$ , с количеством хромосом от 36 до 142–152 [Viktorov et al., 1997]. Диплоидный набор хромосом характерен для представителей непигментированной формы *pallida* [Viktorov et al., 1997; Всеволодова-Перель, Лейрих, 2014]. Исходя из этого, можно было бы предполагать, что непигментированные формы *E. nordenskioldi* являются предковыми. Однако транскриптомные данные продемонстрировали (Рисунок 3.5.1), что такие формы вовсе не находятся в основании филогенетического дерева комплекса, и его предковые формы, скорее всего, были пигментированными. Кроме того, одна из линий *pallida* имела крупный геном, а одна из линий пигментированной формы – небольшой. Таким образом, нельзя утверждать, что все непигментированные популяции диплоидны, а пигментированные – исключительно полиплоидны. Это подтверждается и филогенетическими данными, согласно которым линии *pallida* возникали несколько раз независимо.

Для двух филогенетических линий (линии 1 и 3 *Eisenia* sp. 1) было взято несколько популяций из разных географических точек. Проведённый анализ показал, что существует и значительная изменчивость размеров генома внутри линий, около 13% и 27%, соответственно.

На рисунке 3.5.1 можно видеть, что генетические расстояния между двумя популяциями линии 3 довольно велики и сравнимы с расстояниями между линиями. Кроме того, известно [Viktorov et al., 1997; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008], что у октаплоидных популяций *E. nordenskioldi* число хромосом может варьировать в относительно широких пределах. В данном случае мы можем предполагать, что наблюдаемые популяции дивергировали довольно давно, и наблюдаемые различия в размерах геномов между ними могут быть обусловлены как накопившимися различиями по длине хромосом, так и изменчивостью их числа.

У многих животных увеличение пloidности приводит к увеличению размера тела [Orr-Weaver, 2015]. Для дождевых червей, однако, эта закономерность может не работать: Т. В. Малинина и Т. С. Перель [1984] не выявили различий в размере тела между расами *E. nordenskioldi* различной пloidности. Мы не имели возможность измерить размеры тела червей, так как особи были полностью или большей частью гомогенизированы в живом состоянии. Однако грубые оценки показывают, что филогенетические линии с небольшим геномом отличались малыми или средними размерами тела (4-7 см в длину). В то же время линии с большими геномами могли быть как крупными (*Eisenia* sp. 1 линии 3 – от 3 см до более чем 10 см в длину), так и среднего размера (5–10 см у остальных линий). Таким образом, хотя чёткой закономерности не наблюдалось, можно предположить, что размер ядерного генома в некоторой степени связан с размерами тела.

Таким образом, размеры ядерного генома у различных филогенетических линий комплекса *E. nordenskioldi* варьируют в широких пределах, что подтверждает глубину различий между ними, показанную с помощью

молекулярно-генетических методов. Кроме того, имеет место и изменчивость размеров генома внутри линий.

Таблица 3.5.1. Исследованные образцы. С – размер генома в М.п.н., с.о. – стандартная ошибка, повт. – число повторностей

Вид/линия	Точка	геном, М.п.н.	с.о.	повт.
<i>E. nordenskioldi</i>	Магаданская обл., г.			
линия 9	Магадан	3284	168	4
<i>Eisenia</i> sp. 1 линия	Новосибирская обл., с.			
1	Китерня	2351	124	4
	Свердловская обл., с.			
	Хомутовка	2664	128	4
<i>Eisenia</i> sp. 1 линия	Республика Алтай, база			
2	Бирюзовая Катунь	343	30	4
<i>Eisenia</i> sp. 1 линия	Кемеровская обл., с.			
3	Кузедеево	2746	126	3
	Кемеровская обл., с.			
	Золотой Китат	3499	227	4
	Алтайский край, с.			
	Макарьевка	2780	9	4

Новосибирская обл., с.

Китерня 3120 49 3

Хабаровский край, с.

Тигровое 3215 43 3

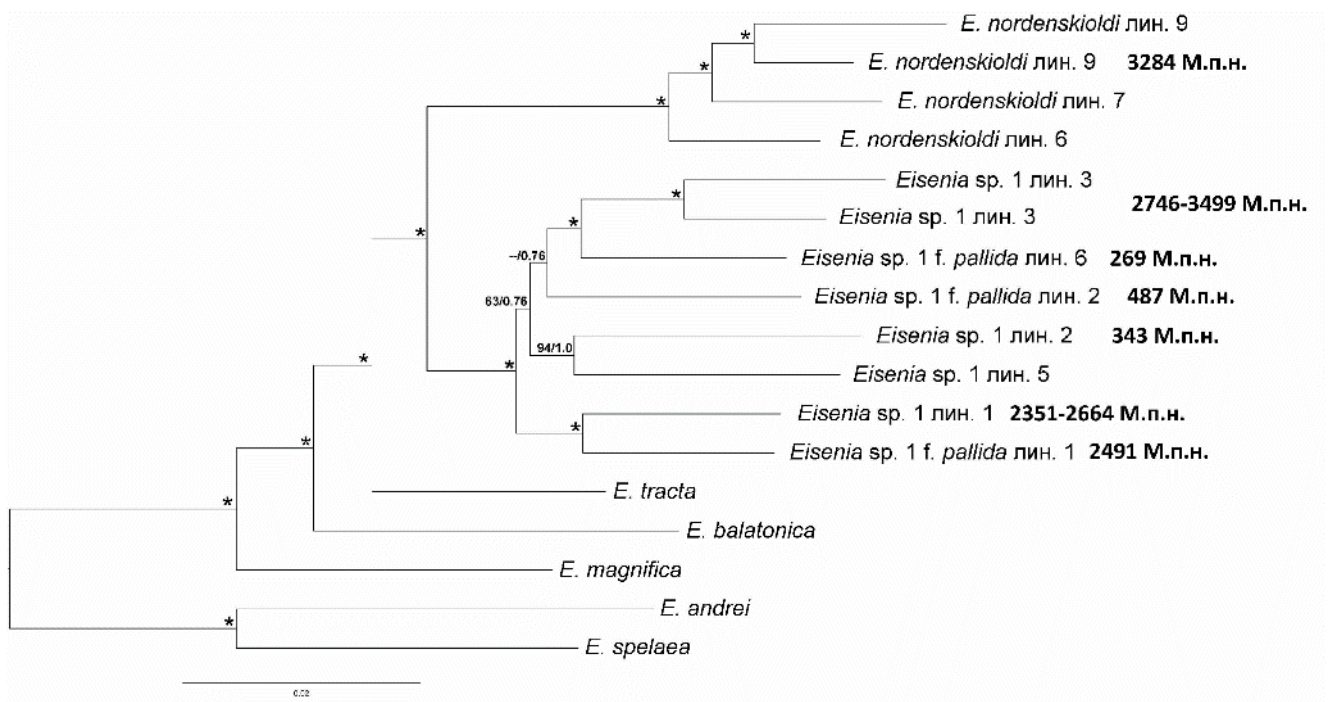
*Eisenia* sp. 1 f. Магаданская обл., г.*pallida* линия 1 Магадан 2494 18 4*Eisenia* sp. 1 f. Хабаровский край, с.*pallida* линия 2 Лесопильное 487 3 3*Eisenia* sp. 1 f. Алтайский край, с.*pallida* линия 6 Макарьевка 269 28 3

Рисунок 3.5.1. Филогенетическое дерево, построенное для комплекса *E. nordenskioldi* на основе транскриптомных данных; взято из Раздела 3.4.3 с изменениями. Цифры возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку метода максимального правдоподобия/байесовскую апостериорную вероятность; звёздочки означают поддержку 100/1.0.

### 3.5.2 Хромосомная изменчивость

Известно, что для комплекса *E. nordenskioldi* характерна большая кариотипическая изменчивость [Графодатский и др., 1982; Перель, Графодатский, 1983; Булатова и др., 1984; Малинина, Перель, 1984; Викторов, 1993, Viktorov, 1997; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008]. При этом непонятно, как плоидность соотносится с разделением на филогенетические линии и как она изменялась в ходе эволюции комплекса. Определение числа хромосом у изучаемых объектов не входило в задачи настоящей работы, однако подобное сопоставление можно провести по опубликованным данным для разных популяций *E. nordenskioldi*. Кроме того, в ряде случаев оказалось возможным соотнести генетическую принадлежность популяции и ее хромосомное число. Так, популяция из Магадана, имеющая 152 хромосомы (предположительно, октоплоидная) [Викторов, 1989] относится к линии 9: особи из одних и тех же мест были посланы Д.И. Берманом Викторову и автору данной работы в разные годы; кроме того, в названном регионе другие линии *E. n. nordenskioldi* неизвестны.

Поляков и Кашменская [Polyakov, Kashmenskaya, 2008] изучали хромосомный набор двух особей, определенных как *E. n. nordenskioldi* и *E. atlavyniteae*, из окрестностей Новосибирского Академгородка (с территории Центрально-Сибирского Ботанического сада). У обеих особей был выявлен диплоидный ( $2n = 36$ ) набор хромосом. Мы также проводили работы с этой популяцией и выявили, что в ней сосуществуют линии 1, 2 и 3 *E. n. nordenskioldi*. Уверенно сказать, к каким линиям относились взятые Поляковым и Кашменской образцы нельзя, но известно, что в данном районе не найдено представителей *E. nordenskioldi sensu stricto* (линии 6, 7 и 9), поэтому можно, по крайней мере, отнести это определение к одной из двух крупных ветвей на дереве (*Eisenia* sp. 1 aff. *E. nordenskioldi*).

В Таймырском АО были найдены тетраплоидные и октоплоидные представители комплекса [Булатова, 1984; Викторов, 1989; Всеволодова-Перель, Лейрих, 2014]. Там же мы нашли линии 1 и 9. При этом Т. В. Малининой и Т. С.

Перель [1984] была показана близость октоплоидной популяции с Таймыра к южносибирским, а не европейским (линия 7) популяциям, поэтому правильнее предположить, что эта популяция относится к линии 1.

Известно, что популяция из Джаныбекского стационара (Волгоградская обл.) Института Лесоведения РАН имеет 72 хромосомы [Малинина, Перель, 1984; Викторов, 1989]. Эта популяция была интродуцирована из поймы р. Еруслан (Саратовская обл.) [Всеволодова-Перель, Булатова, 2008], а по нашим данным, в этом районе обитает только линия 7 *E. nordenskioldi*. Популяция из Приокско-Террасного заповедника (Московская обл.) также находится в ареале линии 7. Кроме того, данные Т. В. Малининой и Т. С. Перель [1984] показывают значительную ее близость к джаныбекской популяции, поэтому мы можем предположительно обозначить ее как линию 7. То же можно сказать и о курской популяции, у представителей которой было обнаружено 102 хромосомы [Викторов, 1989].

По данным А. Г. Викторова [1989], *E. nana* из Восточно-Казахстанской области имеет 34 хромосомы. По мнению Е. В. Головановой [Golovanova et al., 2021], этот вид – синоним линии 5 *E. n. nordenskioldi*. Таким образом, черви для генетического и хромосомного анализов были собраны в одном регионе, что позволяет предварительно принять их тождество.

Форма *pallida* считается диплоидной [Всеволодова-Перель, Лейрих, 2014]. Эта оценка получена для популяции из окрестностей Новосибирского Академгородка [Малинина, Перель, 1984; Викторов, 1989], которая, по нашим данным, относится к линии 6. Эта линия имеет небольшой размер генома (Рисунок 3.5.1), тогда как линия 1 формы *pallida* – большой, что позволяет ожидать ее полиплоидность.

Мы просуммировали полученные данные на рисунке 3.5.2, наложив хромосомные числа на филогенетическое дерево, построенное по транскриптомным данным. Следует подчеркнуть, что эти данные касаются не линий в целом, а только отдельных их популяций: вышеприведенные данные

хромосомных исследований показывают, что в пределах комплекса *E. nordenskioldi* даже в одной популяции могут сосуществовать расы с разным числом хромосом.

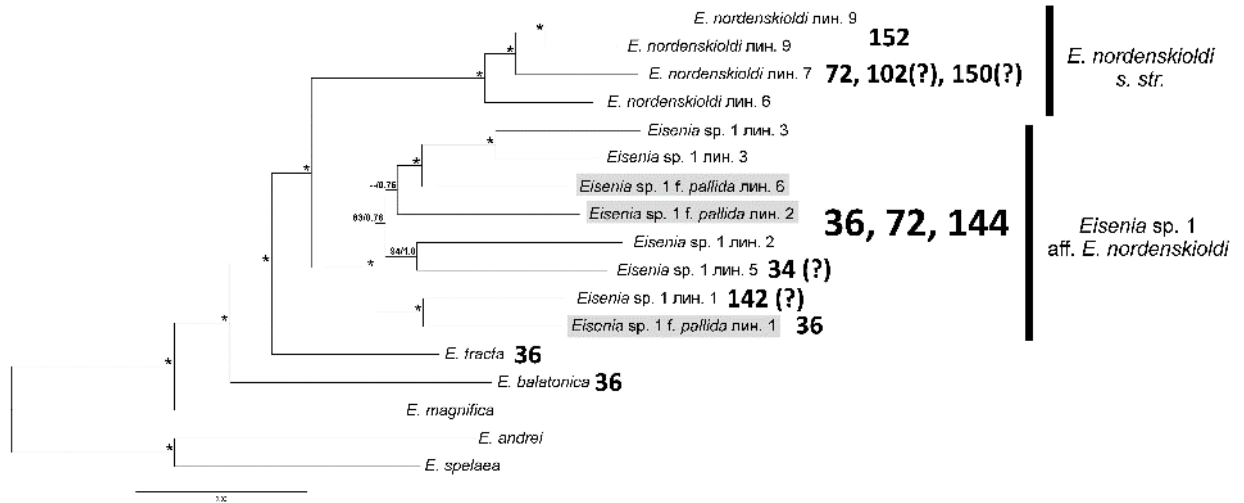


Рисунок 3.5.2. Положение хромосомных рас *E. nordenskioldi* различной пloidности на филогенетическом дереве по литературным данным.

Сестринский вид комплекса *E. nordenskioldi*, *E. tracta*, имеет 36 хромосом, как и родственный им обоим вид *E. balatonica* (Рис. 3.5.2). Соответственно, можно предположить, что предок обеих ветвей комплекса *E. nordenskioldi* имел тот же хромосомный набор, а в дальнейшем полиплоидия возникала в обеих ветвях независимо. Подобное предположение было высказано в работе Т. В. Малининой и Т. С. Перель [1984], проведенной с помощью изоферментного анализа; авторы пришли к заключению, что октоплоидные расы *E. nordenskioldi* возникали, как минимум, дважды независимо друг от друга. Наши данные подтверждают позицию: видно, что октоплоидность присутствует в обеих крупных ветвях комплекса.

Особо следует подчеркнуть, что по литературным [Викторов, 1989; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008] и нашим данным, у *E. nordenskioldi* хорошо развиты семенники и показан нормальный сперматогенез. А. Г. Викторov [Viktorov, 1997] отнес к партеногетикам только форму *acystis* из Средней Азии, которая была выделена в отдельный вид; все остальные популяции *E. nordenskioldi*, изученные Викторovым, отнесены им к амфимиктическим [Викторов, 1989; Viktorov, 1997]. Кроме того, известно, что черви линии 9 пигментированной формы



из Магадана, относящиеся к октоплоидной расе, копулируют [Д.И. Берман, личное сообщение]. Таким образом, можно считать, что в комплексе *E. nordenskioldi* полиплоидия не ведет к утрате амфимиксиса.

### 3.6 Морфологическая изменчивость у *E. nordenskioldi*

Как было изложено выше, в пределах комплекса *E. nordenskioldi* мы выявили высокую генетическую изменчивость, не сопровождающуюся в большинстве

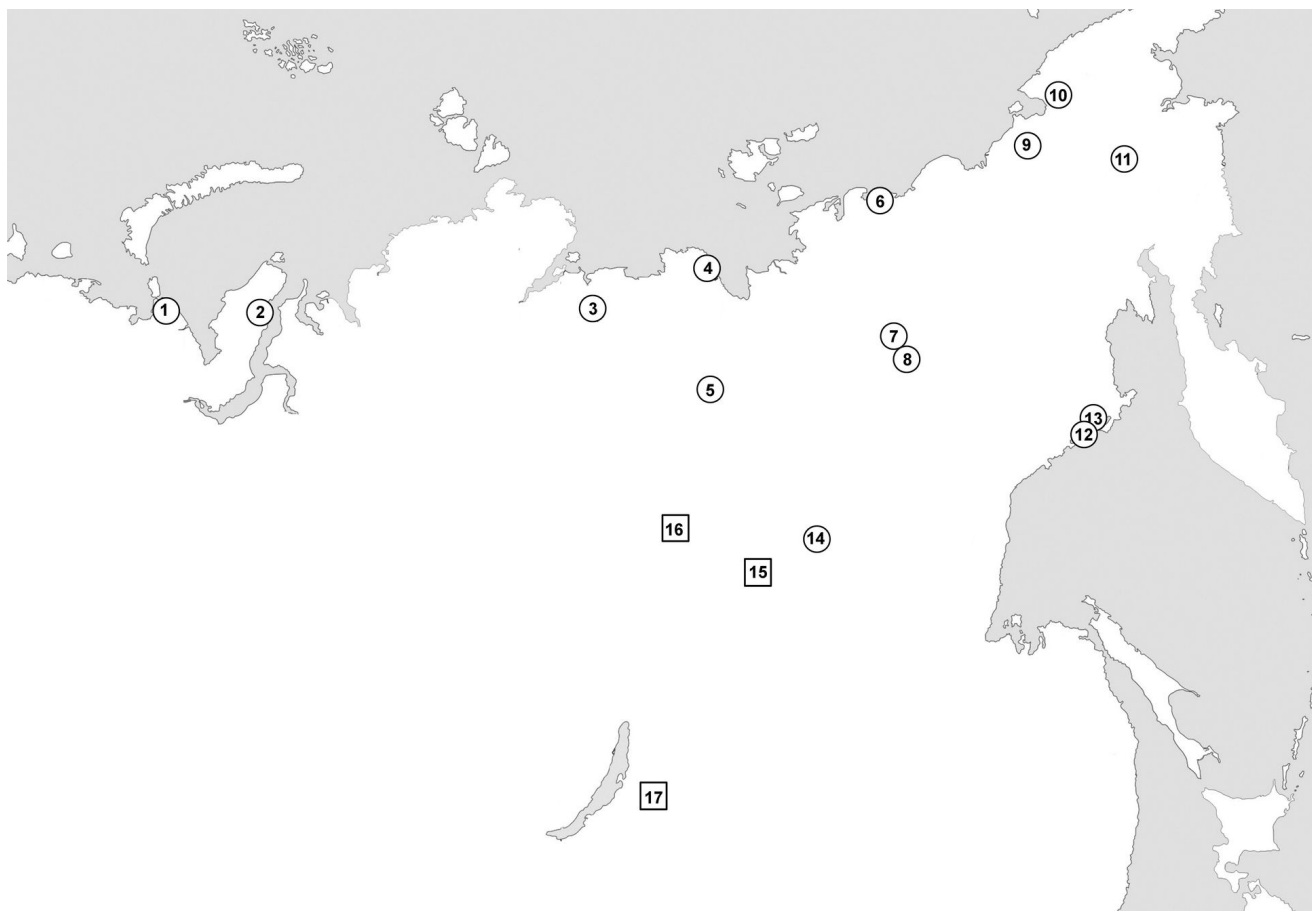


Рисунок 3.6.1. Точки сбора образцов *E. nordenskioldi* для изучения морфологической изменчивости. Номера популяций соответствуют номерам в Таблице 3.6.1.

случаев четкими морфологическими отличиями. В целом, в литературе такую изменчивость называют скрытой, или криптической, подразумевая, что представителей разных филогенетических линий/видов-двойников нельзя различить при помощи морфологического анализа [King et al., 2008; Martinsson,

Erséus, 2017b; Marchan et al., 2018]. При этом работ, в которых была бы сделана такая попытка, т.е. морфологический анализ сочетался бы с генетическим, очень мало. Мы провели исследование морфологической изменчивости ряда популяций *E. nordenskioldi*. Во-первых, была исследована изменчивость хорошо изученных нами в Разделе 3.3.2 образцов линии 9, характерной для высоких широт Сибири и Дальнего Востока. Наша цель состояла в подробном описании морфологической изменчивости и описании признаков, уклоняющихся от диагноза вида. Во-вторых, мы обнаружили несколько случаев, когда линия 9 была обнаружена симпатрично с другими линиями *E. nordenskioldi*. Эта выборка была использована для поиска возможных различий между линиями.

В ходе работы мы провели морфологический анализ 132 особей из 17 популяций (Рисунок 3.6.1, Таблица 3.6.1). Для этих образцов было проведено секвенирование гена *cox1*, как описано в Разделе 2.3.1. Часть описываемой выборки вошла также в Раздел 3.3.2. На основе последовательностей гена *cox1* проводили идентификацию принадлежности образцов к определенной филогенетической линии.

В соответствии с Кадастром и определителем дождевых червей России [Всеволодова-Перель, 1997], взрослые особи *E. nordenskioldi* имеют длину тела от 60 до 140 мм, ширину (диаметр) – 4–8 мм, и 80–130 сегментов. В нашей выборке самые маленькие особи с выраженным пояском имели длину 38-40 мм (точки 2 и 8 в Таблице 3.6.1); количество сегментов было в пределах диагноза. Поскольку изучаемые нами популяции были в основном из северных широт, особи в нашей выборке преимущественно имели размер от малого до среднего, крупных особей для линии 9 не наблюдалось.

Цвет животных также широко варьировал, от полностью пигментированного тела вплоть до пигидия, с пигментацией даже на вентральной стороне, до светло-коричневой пигментации на дорсальной стороне нескольких передних сегментов (Рисунок 3.6.2А).

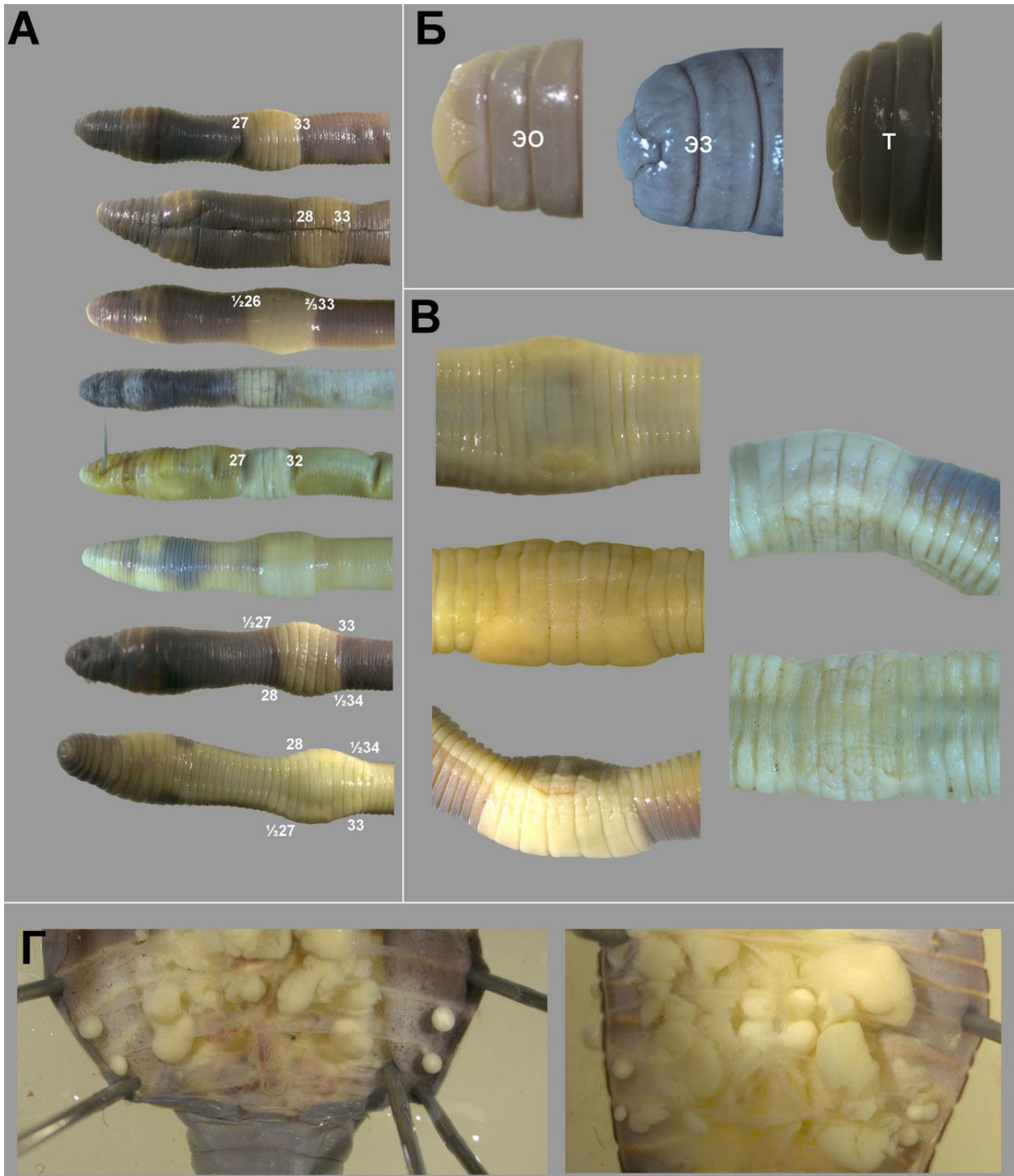


Рисунок 3.6.2. Морфологическая изменчивость у представителей разных популяций линии 9. А – изменчивость окраски и положения пояса. Б – изменчивость строения головной лопасти (эо – эпилобическая открытая, эз – эпилобическая закрытая, т – танилобическая. В – изменчивость формы пубертатных валиков. Г – вскрытие тела, показывающее две пары семенников. Справа – особь с отклонением во внутреннем строении, у которой один из семенников удвоен.

Таблица 3.6.1. Морфология изученных особей филогенетической линии 9 *E. nordenskioldi*. Номера точек соответствуют рисунку 3.6.1. Пигм – пигментация; Д – длина тела, мм; Ш – ширина тела, мм; ЧС – число сегментов; ГЛ – головная лопасть; ЭО – эпилобическая открытая, ЭЗ – эпилобическая закрытая, Т – танилобическая,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{3}$  и  $\frac{3}{4}$  обозначают глубину головной лопасти по отношению к перистоимуму; а, b – сегменты, в которых наблюдались щетинки а, b на папиллах; с, d – сегменты, в которых наблюдались щетинки с, d на папиллах; Поясок – положение пояска, отс. – отсутствует; ПВ – положение пубертатных валков; ФПВ – форма пубертатных валков; Н – неправильная, Тр – треугольная; СП – положение первой спинной поры. Значения, отмеченные серым, соответствуют выходу за пределы диагноза; звездочкой отмечен случай асимметрии в положении пояска.

Точка	Пигм	Д	Ш	ЧС	ГЛ	а, b	с, d	Поясок	ПВ	ФПВ	СП
1. Амдерма	100%	-	-	-	$\frac{1}{2}$ ЭО	12,15,26-34	10/-	??-33	29-31	Тр	5/6
	100%	57	5	115	$\frac{1}{2}$ ЭО	9-11,26-34	10	отс.	29-31	Тр	4/5
	100%	41	4	104	$\frac{1}{2}$ ЭО	28-32	10-11	27-33	29-31	Тр	4/5
2. Сабетта	70%	54	5	113	$\frac{1}{2}$ ЭО	8,12,14,15	9-11	27-32	29-31	Н	4/5
	70%	48	4	99	ЭО	8,9,11	8,9,11	27-33	29 - $\frac{1}{2}$ 31	Тр	4/5
	70%	49	5	94	ЭО	8,12,15,26,32	9-11	27-33	29-31	Тр	4/5
	75%	46	6	86	ЭЗ	8,12,14,26-34	-	27- $\frac{1}{4}$ 33	29-31	Тр	4/5
	80%	41	5	91	$\frac{1}{2}$ ЭО	8,11,14,26-33	10	27- $\frac{1}{2}$ 33	29-31	Тр	4/5
	100%	39	5	93	$\frac{1}{3}$ ЭЗ	11,26-32	9-10	27-33	отс.	-	3/4
	40%	49	5	93	ЭО	8,12,26-33	10-11	28-33	29-31	Тр	3/4
	100%	-	-	-	$\frac{1}{2}$ ЭО	12,25-32	9,11/9,11	27-33	29 - $\frac{1}{2}$ 31	Тр	3/4
	100%	-	-	-	$\frac{1}{2}$ ЭЗ	27-32	10,27-33	26-33	29 - $\frac{1}{2}$ 31	Тр	4/5
100%	-	-	-	$\frac{1}{2}$ ЭЗ	12,14,27-34	9-11/10	27-33	29 - $\frac{1}{2}$ 31	Тр	4/5	

	100%	-	-	-	ЭО	8,11-12,26-33	10	½ 27 - ½ 33	29 - ½ 31	Tr	4/5
<b>3. Сыскылах</b>	100%	-	-	-	¾ ЭО	7-9,11-13	9-11	27-33	29-31	Tr	4/5
	100%	-	-	-	¾ ЭО	8-9,11-12,27-32	9-11/8-11, 27-32	27-33	29 - ½ 31	Tr	4/5
	100%	-	-	-	½ ЭО	8-12,26-32	9-11	27-33	29-31	Tr	4/5
	100%	-	-	-	½ ЭЭ	26-32	9-11	27-33	29 - ½ 31	Tr	4/5
<b>4. Тикси</b>	30%	61	6.5	112	½ ЭЭ	8,15,25,27-34	9-11/10-11	27-33	½ 29 - ½ 31	Tr	4/5
	40%	61	5.5	95	ЭО	8,12,14-15,27-34	8-11	27-32	31	Tr	4/5
	30%	69	5.5	112	¾ ЭО	8,12,26-35	9-10/10-11	27-33	½ 29 - ½ 31	Tr	4/5
	25%	76	6	108	½ ЭО	-	9-11/8-11,27-32 9-11,27-33/8-11,27-33	27-33	29-31	Tr	3/4
	35%	45	6	93	ЭО	8,9,11-14,16,26-34	11,27-33	26-33	29 - ½ 31	Tr	4/5
	40%	75	6.5	108	ЭЭ	8-11,26-33	10	27-33	29-31	Tr	3/4
	30%	65	5.5	106	ЭО	8,12-13,15-16	9-11	27-33	¾ 29-½ 31	Tr	3/4
	35%	62	5	99	ЭЭ	9,12-14,16-32	9-11	27-33	29-31	H	3/4
	30%	54	5.5	104	ЭО	8,12,14,26-34	10	27-33	29-31	Tr	3/4
	25%	71	6	113	½ ЭЭ	8,12,26-34/8-14,26-34	9-10/9-11	27-33	29 - ½ 31	Tr	4/5
	30%	56	5.5	88	½ ЭЭ	8-14,24,26-33	9-11	27-33	29-31	Tr	4/5
<b>5. Аграфена</b>	60%	-	-	-	ЭЭ	27-34	27-33	27-33	28-31	Tr	4/5
	50%	-	-	-	ЭЭ	26-32	10,27-33	27-33	½ 28-31	Tr	4/5
<b>6. Русское устье</b>	50%	-	-	-	ЭЭ	27-34	-	27-33	29-31	Tr	4/5
	50%	-	-	-	ЭО	8,9,11,16,29-32	9,10,30,31	27-33	29-31	Tr	4/5
	60%	-	-	-	ЭЭ	7,7,26-32	10	27-33	28-31	H	4/5
	60%	-	-	-	?	8-12,24-31,34-39,41	10	29-31	½ 28-31	Tr	4/5
	60%	-	-	-	¾ ЭЭ	-	9,10	отс.	29-31	H	4/5
<b>7. Хонуу</b>	50%	48	5	95	ЭО	8,11-12,27-33	10/9-11	27-33	½ 29 - ½ 31	Tr	4/5

50%	49	5	101	Э3	8-9,11-12,24-33	10-11,27-33/9-11	27-33	29-31	Тр	4/5
50%	55	5,5	94	¾Э0	8-14,27-33	9-11	27-33	29-31	Тр	4/5
55%	48	6	109	¾Э0	8-14	9-10/10	27-33	29-31	Тр	4/5
8. Чумпу-Кытыл										
70%	54	6	110	Т	8,10,12,28-33	9-11	27-33	29-32	Н	6/7
100%	60	6	103	Э0	8-12,29	8-11	27-33	29-31	Тр	4/5
50%	52	6	102	½Э0	-	-	27-32	29-¾31 ½ 29 - ½	Тр	4/5
100%	39	4.5	105	½Э0	29-33	10,33	28-32	31	Н	4/5
80%	48	4.5	99	½Э0	29-31	-	27-33	29-31	Тр	4/5
100%	40	5	102	Э0	8,12,29-32	10	27-33	29-31	Тр	4/5
80%	38	4.5	108	Э0	29-31	9-11	27-33	29-31	Тр	4/5
100%	30	4	90	Э0	-	29-30	26-33	29-31	Н	4/5
100%	40	4.5	115	Э0	10	26-32	отс.	29-31	Тр	4/5
80%	49	5.5	118	Э0	10	8,11,26-32	27-33	29-31	Тр	4/5
9. Биллибно										
100%	-	-	-	½Э0	12-13,27-32	9-10/10	27-33	29 - ¼31	Тр	4/5
40%	-	-	-	½Э3	8,29-32	9/9,11 10-11,27-	27-33	29 - ½31	Тр	4/5
50%	-	-	-	½Э3	8,14-15,26-32	33/10,27-33	27-33	29 - ½31	Тр	4/5
40%	-	-	-	¼Э0	8-12,26-32	10/10-11	27-33	29 - ¼31 ½ 29 - ½	Тр	4/5
40%	-	-	-	½Э0	-	-	27-32	31	Тр	4/5
50%	-	-	-	½Э0	-	-	27-33	29 - ½31	Тр	4/5
100%	-	-	-	½Э0	-	-	27-33	29-31	Тр	4/5
100%	-	-	-	½Э0	-	-	27-33	29 - ½31	Тр	4/5
10.										
Айлопечан										
30%	-	-	-	¾Э3	12,27-32	10,11	27-33	29-31	Тр	4/5
30%	-	-	-	½Э3	28-31	10/-	?	½ 29 - 31	Тр	3/4

													$\frac{1}{2}$ 29 - $\frac{1}{2}$			
30%	-	-	-	$\frac{3}{4}$ ЭЗ	8-12,26-33	10/10	?						31	Tr	<b>3/4</b>	
60%	-	-	-	$\frac{3}{4}$ ЭО	27-33	10,27-32	27-33						29-31	Tr	4/5	
65%	-	-	-	$\frac{3}{4}$ ЭО	8-9,11-12,28-33	9-11	27-33						31	Tr	<b>5/6</b>	
70%	-	-	-	$\frac{3}{4}$ ЭО	12,14,26-33	9-10,27-32	27-33						29-31	Tr	4/5	
30%	-	-	-	$\frac{3}{4}$ ЭО	8-12,27-33	10,27-32	<b>28-33</b>						?	Tr	4/5	
50%	-	-	-	$\frac{1}{2}$ ЭО	8-12,14,26-34	9-11	27-33						?	Tr	<b>3/4</b>	
30%	-	-	-	$\frac{1}{2}$ ЭО	27-33	9-11	27-33						?	Tr	4/5	
25%	-	-	-	$\frac{1}{2}$ ЭО	8-12,15,27-35	10-11/9-11	27-33						$\frac{1}{4}$ 29 - $\frac{1}{4}$	Tr	4/5	
50%	-	-	-	$\frac{3}{4}$ ЭО	28-33	9-11	27-33						29-31	Tr	<b>3/4</b>	
<b>11. Марково</b>																
45%	56	6	102	ЭО	9,11,12,14,25-33	8-12/9-11	27- $\frac{1}{2}$ 33						31	Tr	4/5	
60%	62	7	86	ЭО	8-15,19,21,24,34/8-14,17-18,24,34-36	8-11,13,15,20,30-31/8-14,24,30-32	отс.						отс.	отс.	4/5	
70%	50	5	100	ЭО	25-33	10/8-10	27-33						29-31	Tr	4/5	
40%	50	5	103	ЭО	8-9,12,14,26-43	9-10/10-11	27- $\frac{1}{2}$ 33						29-31	Tr	4/5	
55%	62	6	104	ЭО	6-8,14,26-34	9-11/10-11	27- $\frac{1}{2}$ 33						29-31	Tr	4/5	
100%	50	5.5	103	ЭО	8,12-15,22-34	10/-	27-33						29-31	Tr	4/5	
100%	56	5.5	102	$\frac{3}{4}$ ЭО	8-12,26-34	9-11,29-33	27-33						29-31	Tr	4/5	
<b>12. о. Талан</b>																
50%	-	-	-	$\frac{1}{2}$ ЭО	7-12,27-36	10	<b>28-33</b>						29-32	Tr	4/5	
70%	-	-	-	$\frac{1}{2}$ ЭО	8-14,25-34	9-10,27-33	27-33						29- $\frac{1}{8}$ 32	Tr	<b>3/4</b>	
45%	-	-	-	$\frac{1}{2}$ ЭЗ	8-12,26-35	8-11,27-32	27-33						29-31	Tr	4/5	
50%	-	-	-	$\frac{3}{4}$ ЭО	9-12,14-15,28-34	8,12/9-10,27-32	27-33						29-31	Tr	<b>5/6</b>	
<b>13. Ойра</b>																
100%	65	7	101	ЭО	8-12,27-32	-	$\frac{1}{2}$ 27 - 33						29-31	Tr	4/5	
100%	74	6.5	97	ЭО	27-32	10/10,11	27-33						29 - $\frac{1}{2}$ 31	Tr	4/5	
100%	55	7	105	ЭО	27-32	11/9-11	27-33						29 - $\frac{1}{2}$ 31	Tr	4/5	

## 14. Улу

100%	-	-	-	¾ ӨО	8,12,26-35/27-36	11/-,28-33	28-½ 34 / ½ 27-33*	30-32 / 29- 31*	3/4	Тр
60%	-	-	-	¾ ӨО	8,14,26/34	10-11	27-½ 32	29 - ½ 31 ½ 29 - ½	3/4	Тр
50%	-	-	-	¾ ӨО	8,12,26-34	9-10/10-11,27-33	27-33	31	4/5	Тр
100%	-	-	-	½ ӨО	26-34	10	27-33	29-31	4/5	Тр
100%	-	-	-	½ ӨЗ	25-34	9-11,27-32	½ 26 - ⅔ 33	29-31	4/5	Тр
100%	-	-	-	¾ ӨЗ	26-34	10,27-32	27-½ 33	29-31	4/5	Тр
40%	-	-	-	½ ӨО	26-34	10/9-10,27-32	27-⅔ 33	29 - ½ 31	4/5	Тр
60%	-	-	-	¾ ӨО	26-33	10,27-33	27-33	29-31 ½ 29 - ½	4/5	Тр
60%	-	-	-	½ ӨО	9,12/10-12	10-11/10,27-33	27-33	31	3/4	Тр
100%	-	-	-	¾ ӨО	26-34	10,27-33	27-½ 33	29-31	4/5	Тр
100%	-	-	-	¾ ӨО	9,10,25-34	9-10,27-33	½ 26 - 33	29-31	4/5	Тр
60%	-	-	-	½ ӨО	26-33	10,27-32	27-32	29 - ½ 31	4/5	Тр
100%	-	-	-	½ ӨО	24-34	10-11,29-31	27-33	29 - ½ 31	4/5	Тр
60%	-	-	-	¾ ӨО	26-34	10,27-32	27-33	29 - ½ 31	4/5	Тр
100%	-	-	-	½ ӨО	9,11,27-33	10-11,27-32	27 - ¾ 33	29 - ½ 31	4/5	Тр
100%	-	-	-	¾ ӨО	-	10	27-32	29-31 ½ 29 - ½	4/5	Тр
100%	-	-	-	¾ ӨО	12,26-34	10,27-32	27-½ 33	31	4/5	Тр



Для головной лопасти мы также обнаружили значительную изменчивость. Согласно диагностическим ключам, головная лопасть *E. nordenskioldi* эпилобическая [Всеволодова-Перель, 1997]. Мы обнаружили, что он в равной степени представлен двумя вариантами: эпилобической открытой и эпилобической закрытой (Рисунок 3.6.2Б). При этом исследуемые особи широко варьировали по глубине головной лопасти: в то время как нормальная глубина ее составляет около 60% от длины первого сегмента (перистомиума), в исследованной выборке ее глубина колебалась от примерно одной четвертой до трех четвертей перистомиума. У одной особи наблюдалась танилобическая головная лопасть (Рисунок 3.6.2Б).

Наиболее обширная асимметрия и изменчивость была обнаружена для папилл: изменчивость у исследованных особей варьировала от их полного отсутствия до наличия множественных папилл (Таблица 3.6.1). Асимметрия расположения папилл между сторонами тела наблюдалась примерно у 30% особей, принадлежащих к линии 9.

В данной части работы мы изучили выборку особей *E. nordenskioldi*, принадлежащих к филогенетической линии 9 и, таким образом, представляющей собой лишь небольшую часть генетического разнообразия этого комплекса. Даже для этой ограниченной выборки мы зафиксировали большое морфологическое разнообразие. Особи с отклоняющимся фенотипом иногда встречаются в популяциях дождевых червей, поэтому считается, что необходимо просмотреть набор образцов из популяции, чтобы точно идентифицировать найденный вид. В нашей работе мы получили одну из первых оценок разброса состояний основных диагностических признаков. Оказалось, что в различных популяциях особи с отклонениями от типичного положения пояска и пубертатных валиков составляли приблизительно от 10 до 30%. Для пояска были выявлены следующие нетипичные варианты положения: 26–33, 27–32, 28–33. Пубертатные валики могли иметь как отклонения в расположении, так и отличаться друг от друга по форме.

Спинные поры располагаются на дорзальной стороне тела в межсегментных бороздках. Положение первой спинной поры – важный диагностический признак у дождевых червей; у *E. nordenskioldi* она обычно находится в бороздке 4/5 (бороздка

между 4-м и 5-м сегментами) [Всеволодова-Перель, 1997]. В нашей выборке у большого количества особей первая спинная пора обнаруживалась в бороздках 3/4, 5/6 или даже 6/7 (не показано, поскольку этот признак не удалось сфотографировать с достаточным для иллюстрации качеством).

Центральные диагностические признаки при идентификации *E. nordenskioldi* – положение пояска и пубертатных валиков [Всеволодова-Перель, 1997]. По диагнозу, поясок занимает с 27-го по 33-й сегмент, а пубертатные валики начинаются с 29-го и заканчиваются на 31-ом, занимая либо весь 31-й сегмент, либо его часть. В нашей выборке линии 9 *E. nordenskioldi* поясок начинался в диапазоне от 26-го до 28-го сегмента, а заканчивался на 32-ом либо 33-ом, а у особи с выраженной асимметрией – даже на половине 34-го (Рисунок 3.6.2А). Всего мы насчитали восемь случаев, когда поясок перекрывал сегменты 27-32, три случая, когда он занимал сегменты с 26-го по 33-й, а в одном случае – с 28-го по 32-ой. Отклоняющееся от диагноза положение пояска (сдвиг на 1/2 сегмента или более) было у 28% особей в общей выборке линии 9 *E. nordenskioldi*.

Разброс по положению пубертатных валиков был менее выраженным. Всего пять экземпляров линии 9 имели валики, начинающиеся на 28-ом сегменте, причем в двух случаях они занимали весь 28-ой сегмент. В трех случаях пубертатные валики заканчивались на 32-ом сегменте. Еще одним интересным признаком была изменчивость по форме пубертатных валиков: у одних особей они имели неправильную форму, в то время как у других они имели вид треугольников, ромбов или трапеций (Рисунок 3.6.2В).

Хотя дождевые черви обычно симметричны, в нашей выборке мы наблюдали ряд проявлений асимметрии. По положению основных диагностических признаков мы выявили один ярко выраженный случай у образца из точки 14, у которого наблюдался четкий сдвиг между двумя сторонами тела. Как видно на рисунке 3.6.2А, и поясок, и пубертатные валики смещены почти на целый сегмент.

Положение первой спинной поры считается постоянным признаком не только для *E. nordenskioldi*, но и для большинства видов *Eisenia* в России [Всеволодова-Перель, 1997]. Однако случаи нетипичного ее положения

встречались почти так же часто, как и типичные. Например, почти половина особей из Билибино (5 из 11) и Талана (2 из 4) и около 1/3 из Тикси и Сабетты имели сдвиги в положении первой дорсальной поры. Форма головной лопасти, размер и цвет тела также сильно варьировали в пределах исследуемой выборки. Положение щетинок, расположенных на папиллах, оказалось особенно изменчивым признаком, который варьировал не только у разных особей, но часто и между двумя сторонами тела у одного организма.

Есть два вида *Eisenia*, которые были выделены из *E. nordenskioldi* Т. С. Перель и А. С. Графодатским [1984], считаются ее непосредственными родственниками и очень морфологически к нему близки. *E. atlavyniteae* внешне практически не отличается от *E. nordenskioldi* за исключением небольшого смещения пояска к переднему концу: по диагнозу Т. С. Всеволодовой-Перель [1997] поясок начинается на 26-ом,  $\frac{1}{2}$  26-ого, реже на 27-ом сегменте и заканчивается на  $\frac{1}{2}$  33-го или на 33-ом сегменте. Этому диагнозу соответствовали около десяти из исследованных особей. Другой вид со сходной морфологией – *E. sibirica*, у которого поясок располагается с 27-го до 32-го –  $\frac{1}{2}$  33-го сегмента. Такие варианты также были обнаружены в нашей выборке. У этих отклоняющихся особей пубертатные валики также часто смещены на  $\frac{1}{2}$  сегмента, в соответствии с диагнозами указанных видов. Таким образом, степень внутривидовой изменчивости одной только линии 9 перекрывает диагнозы нескольких родственных видов. Это, в свою очередь, может поставить под сомнение результаты многих фаунистических исследований.

Существуют ли различия между разными филогенетическими линиями *E. nordenskioldi*? Сравнение особей, взятых из разных географических точек, не даст желаемого результата, так как внешние признаки дождевых червей могут сильно зависеть от условий их обитания. Один из способов получить на это ответ – проанализировать изменчивость в точках, в которых разные линии обитают симпатрично, в связи с чем эффект среды нивелируется. Мы провели исследование морфологической изменчивости особей линий 1 и 9 в трех точках, в которых они

Таблица 3.6.2. Морфология изученных особей разных линий *E. nordenskioldi*, обитающих симпатрично. Номера точек соответствуют рисунку 3.6.1. Пигм – пигментация; Д – длина тела, мм; Ш – ширина тела, мм; ЧС – число сегментов; ГЛ – головная лопасть; ЭО – эпиллобическая открытая, ЭЗ – эпиллобическая закрытая, Т – танилобическая, 1/2, 1/3 и 3/4 обозначают глубину головной лопасти по отношению к перистоимуму; а,b – сегменты, в которых наблюдались щетинки а,b на папиллах; с,d – сегменты, в которых наблюдались щетинки с,d на папиллах; Поясок – положение пояска, отс. – отсутствует; ПВ – положение пубертатных валков; ФПВ – форма пубертатных валков: Н – неправильная, Тр – треугольная/трапецевидная; СП – положение первой спинной поры.

Точка	Пигм	Д	Ш	ЧС	ГЛ	а,b	с,d	Поясок	ПВ	ФПВ	СП
<b>15. Хоринцы</b>											
линия 1	60%	-	-	-	ЭЗ	-	12, 25-33	26-33	28-31	Н	4/5
	80%	-	-	-	ЭЗ	10,11	12-15, 25-33	27-33	28-31	Тр	4/5
линия 9	70%	-	-	-	ЭЗ	27-32		27-32	29-31	Тр	4/5
	70%	-	-	-	ЭЗ	29-33	16,27-32	27-33	29-31	Н	4/5
	70%	-	-	-	ЭО	9,10,28-	7,8,10-12,29-	27-33	1/2 29- 1/2	Н	4/5
	70%	-	-	-	ЭЗ	32	32	27-33	31	Н	4/5
	70%	-	-	-	ЭЗ	9,11,28-		27-33	29-31	Тр	4/5
	70%	-	-	-	ЭЗ	32	8,9,12,26-31	27-33	29-31	Тр	4/5
	70%	-	-	-	ЭЗ	9,11,27-		27-33	29-31	Тр	4/5
<b>форма <i>pallida</i></b>											
линия 1	непигм.	-	-	-	ЭЗ	-	34	27-33	28-31	Н	4/5
	непигм.	-	-	-	ЭО	27-32	26-34	27-33	29-31	Тр	4/5
	непигм.	-	-	-	ЭО	27-32	7,8,26-33	26-33	28-31	Н	4/5
<b>16. Накын</b>											
линия 1	70%	79	6,5	130	ЭЗ	-	27-32	27-33	1/2 28-31	Н	4/5

70%	75	6,5	132	ЭЗ	10	26-32	27-1/2 33	1/4 28-31	Н	4/5
70%	76	6,5	135	ЭЗ		12-14,26-32	27-1/2 33	1/2 28-31	Н	4/5
70%	79	6,5	139	ЭЗ	10	12,26-32	27-1/2 33	1/4 28-31	Н	4/5
70%		6,5		ЭЗ	10	26-32	27-33	1/2 28-31	Н	4/5
70%	69	6,5	90	ЭЗ	10	10,26-32	27-1/2 33	1/2 28-31	Н	4/5
80%	70	6,5	104	ЭЗ	10,11	8,12,25-32	27-1/2 33	1/2 28-31	Н	4/5
60%	60	4,5	119	ЭО	10	25-34	27-33	29-31	Тр	4/5
55%	59	5	95	ЭЗ	9,10	27-33	1/2 26-33	29-31	Тр	4/5
60%	55	5	107	ЭО	8-11	12,25-33	27-33	29-31	Тр	4/5
60%		6,5		ЭЗ	10	26-32	27-33	1/2 28-31	Тр	4/5
17. Укыр										
70%	79	6,5	130	ЭЗ	27-32		27-33	1/2 28-31	Тр	4/5
70%	75	6,5	132	ЭЗ	26-32	10	27-1/2 33	1/4 28-31	Н	4/5
					12-					
70%	76	6,5	135	ЭЗ	14,26-32		27-1/2 33	1/2 28-31	Н	4/5
70%	79	6,5	139	ЭЗ	32		27-1/2 33	1/4 28-31	Н	4/5
70%	-	6,5	-	ЭЗ	12,26-32		27-33	1/2 28-31	Н	4/5
70%	69	6,5	90	ЭЗ	10,26-32		27-1/2 33	1/2 28-31	Н	4/5
80%	70	6,5	104	ЭЗ	32		27-1/2 33	1/2 28-31	Н	4/5
60%	60	4,5	119	ЭО	10	25-34	27-33	29-31	Тр	4/5
					8,12,25-		1/2 26 - 1/2			
55%	59	5	95	ЭЗ	9,10	27-33	33	29-31	Тр	4/5
60%	55	5	107	ЭО	8-11	12,25-33	27-33	1/2 28-31	Тр	4/5
60%	-	-	-	ЭЗ	10	26-32	27-33	29-31	Н	4/5
линия 9										

были обнаружены в симпатрии (Таблица 3.6.2). Абсолютных различий между этими линиями по внешним признакам выявлено не было. При этом у разных линий определенные состояния признаков наблюдались с разной частотой. Так, у линии 1 головная лопасть была исключительно закрытой, в то время как в линии 9 примерно с одинаковой частотой встречались варианты с закрытой и открытой лопастью. У линии 1 чаще встречалась неправильная форма пубертатных валиков, у линии 9 – треугольная. Начало пубертатных валиков у линии 1 зачастую было смещено на 28 сегмент, у линии 9 преимущественно начиналось с 29-го сегмента. Поясок у линии 9 также в среднем располагался чуть ближе к переднему концу тела. Наконец, особи линии 1 были несколько крупнее, чем линии 9.

Таким образом, можно утверждать, что разные филогенетические линии *E. nordenskioldi* могут иметь внешние различия. Они, однако, довольно малы и поэтому различение линий не может быть проведено исключительно при помощи морфологического анализа. Тем не менее, они могут указывать на определенные различия в биологии линий, которые еще предстоит установить.

### **3.7 Изучение возможной гибридизации между филогенетическими линиями *E. nordenskioldi* при помощи метода RADSeq**

Использованные молекулярно-генетические методы хороши для поиска различий между генетически различающимися группами и оценки степени их величины, однако слабо пригодны для ответа на вопрос, существует ли поток генов между этими группами и какова его интенсивность. Митохондриальные геномы наследуются только от одного из родителей. По ядерным генам в ряде случаев возможно выявить гибриды первого поколения, однако этому могут помешать проблемы с различиями в эффективности амплификации разных аллелей, эффективности интерпретации наложенных друг на друга пиков на секвенограммах, и, кроме того, различия в одном гене могут быть слишком малы, чтобы дать уверенный ответ. Анализ транскриптомов также мало пригоден, так как

программы сборки, скорее всего, соберут транскрипты разных аллельных вариантов в единый транскрипт.

В связи с этим, для ряда образцов мы применили метод RADSeq. В данном методе геномная ДНК образцов режется какой-либо рестриктазой, после чего проводится отбор последовательностей по длине, лигирование адаптеров, амплификация и секвенирование на платформе нового поколения (см. Раздел 1.5.4). В результате мы получаем набор последовательностей генома длиной от десятков до более сотни нуклеотидов в зависимости от выбранного метода секвенирования, причем каждая из них будет секвенирована с достаточным покрытием. Если мы берем для сравнения особей из разных популяций, филогенетических линий или даже близкородственных видов, мы можем ожидать, что большая часть сайтов рестрикции окажется консервативной, а степень различий между примыкающим к ним секвенированным последовательностям также будет различаться небольшим числом замен, что даст достаточно материала для изучения различий, но не создаст проблем при выравнивании. Таким образом, мы получаем от нескольких сотен до нескольких десятков тысяч локусов, которые будут гомологичными между геномами изучаемых образцов. Более того, поскольку секвенирование проводится с достаточным покрытием, мы можем различить два аллеля каждого локуса.

В результате, такой метод при относительно невысокой стоимости позволяет изучать ряд вопросов, от степени генетической изменчивости внутри одной популяции, до филогенетических отношений между близкородственными видами. При этом он особенно хорош для детекции гибридов и установления уровня потока генов. В связи с этим мы использовали его в нашей работе на нескольких видах, в частности, на *E. nordenskioldi*.

Мы взяли две популяции, в которых мы ранее обнаруживали две линии *E. n. nordenskioldi*, обитающие симпатрично: Жуя (Иркутская область, филогенетические линии 1 и 9) и Биробиджан (Еврейская Автономная область, линии 1 и 3). Для Жуи было взято восемь образцов, для Биробиджана шесть. Для них было проведен анализ RADSeq по методике, описанной в Разделе 2.5.

## Жуя



линия 9    линия 1

## Биробиджан



линия 1

линия 3

Рисунок 3.7.1. Результаты анализа изменчивости выборок симпатрично обитающих особей *E. nordenskioldi* разных линий при помощи метода RADSeq, визуализированные программой CLUMPAK. Каждый столбик представляет собой один образец; различные генетические группы показаны разными цветами.

Для обеих выборок  $K = 2$  оказалось статистически наиболее вероятным, т.е. внутри выборок присутствовало по две генетические группы. Неожиданным оказалось то, что в каждой из выборок наблюдалось по одному образцу, в котором доля аллелей каждой группы была идентичной (Рисунок 3.7.1).

Из этих результатов пока можно сделать только осторожные выводы, так как для окончательных потребуются данные для большого количества популяций и особей. Тем не менее, имеющиеся данные указывают на то, что между линиями возможна и относительно часта гибридизация. Это было весьма неожиданным результатом, принимая во внимание глубокие различия между линиями как по митохондриальным, так и по ядерным геномам. При этом линии остаются изолированными: если бы репродуктивных барьеров не было, у представителей одной линии была бы выявлена примесь аллелей от другой, чего мы не наблюдаем (Рисунок 3.7.1). Пока что можно предположить, что гибридизация между линиями



ограничивается главным образом появлением стерильных гибридов первого поколения.

### 3.8 Холодостойкость *E. nordenskioldi*

Выше показано, что комплекс *E. nordenskioldi* состоит из множества филогенетических линий, каждая из которых имеет свой ареал. Хотя ареал всего комплекса почти полностью расположен в пределах территорий с низкими зимними температурами, условия в почве существенно различаются в разных его частях. Соответственно, возникает предположение, что разные линии могут иметь разную холодостойкость (разные минимальные переносимые температуры), а

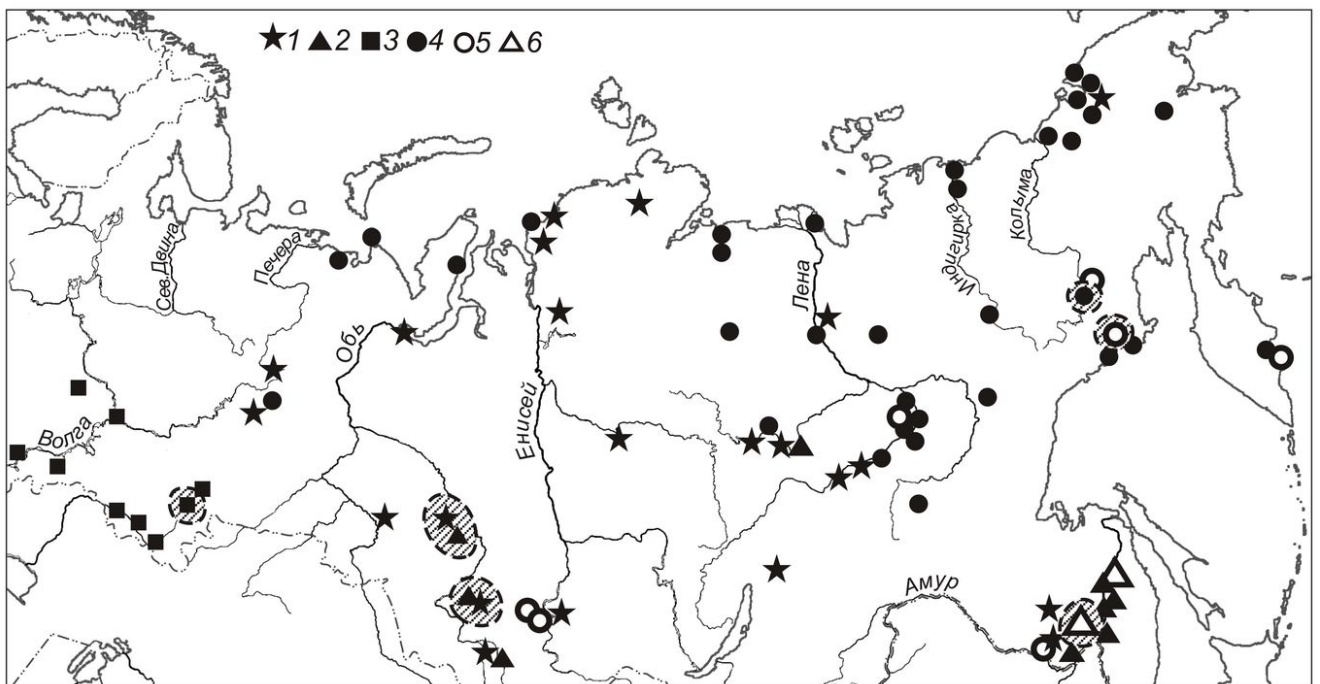


Рисунок 3.8.1 Распространение генетических линий дождевых червей двух подвидов *Eisenia nordenskioldi* (по данным 2017 г.). Линии *E. n. nordenskioldi*: 1 – 1-я, 2 – 3-я, 3 – 7-я, 4 – 9-я; линии *E. n. pallida*: 5 – 1-я, 6 – 3-я. Заштрихованные области – места сбора червей для экспериментов

Таблица 3.8.1 Температура максимального переохлаждения ( $T_p$ , °C) червей разных филогенетических линий *Eisenia nordenskioldi*. 1П и 3П С. Подгорное,

Томская обл.; 1<sub>н</sub> и 3<sub>н</sub> С. Китерня, Новосибирская обл.; n – размер выборки; SEM – стандартная ошибка измерения.

Форма	Линия	n	T <sub>п</sub> ± SEM
<i>Eisenia n. nordenskioldi</i>	1 <sub>п</sub>	10	-3.6 ± 0.1
	1 <sub>н</sub>	10	-3.5 ± 0.3
	3 <sub>п</sub>	10	-3.4 ± 0.1
	3 <sub>н</sub>	10	-3.1 ± 0.4
	7	10	-4.4 ± 0.4
	9	48	-3.5 ± 0.2
<i>Eisenia n. pallida</i>	1	11	-4.6 ± 0.3
	3	12	-3.6 ± 0.2

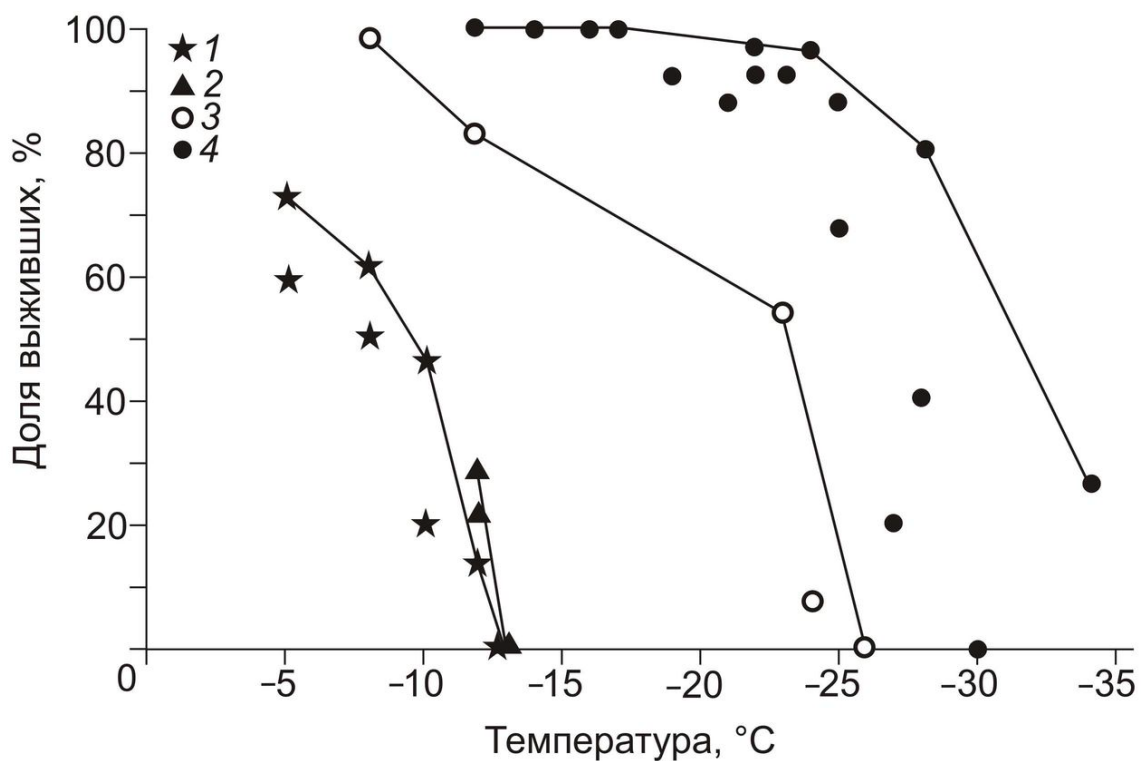


Рисунок 3.8.2 Выживание червей четырех генетических линий *Eisenia n. nordenskioldi* после трехсуточной экспозиции при разных температурах: 1–4 – 1-я, 3-я, 7-я, 9-я (Берман, Лейрих, 1985) линии, соответственно

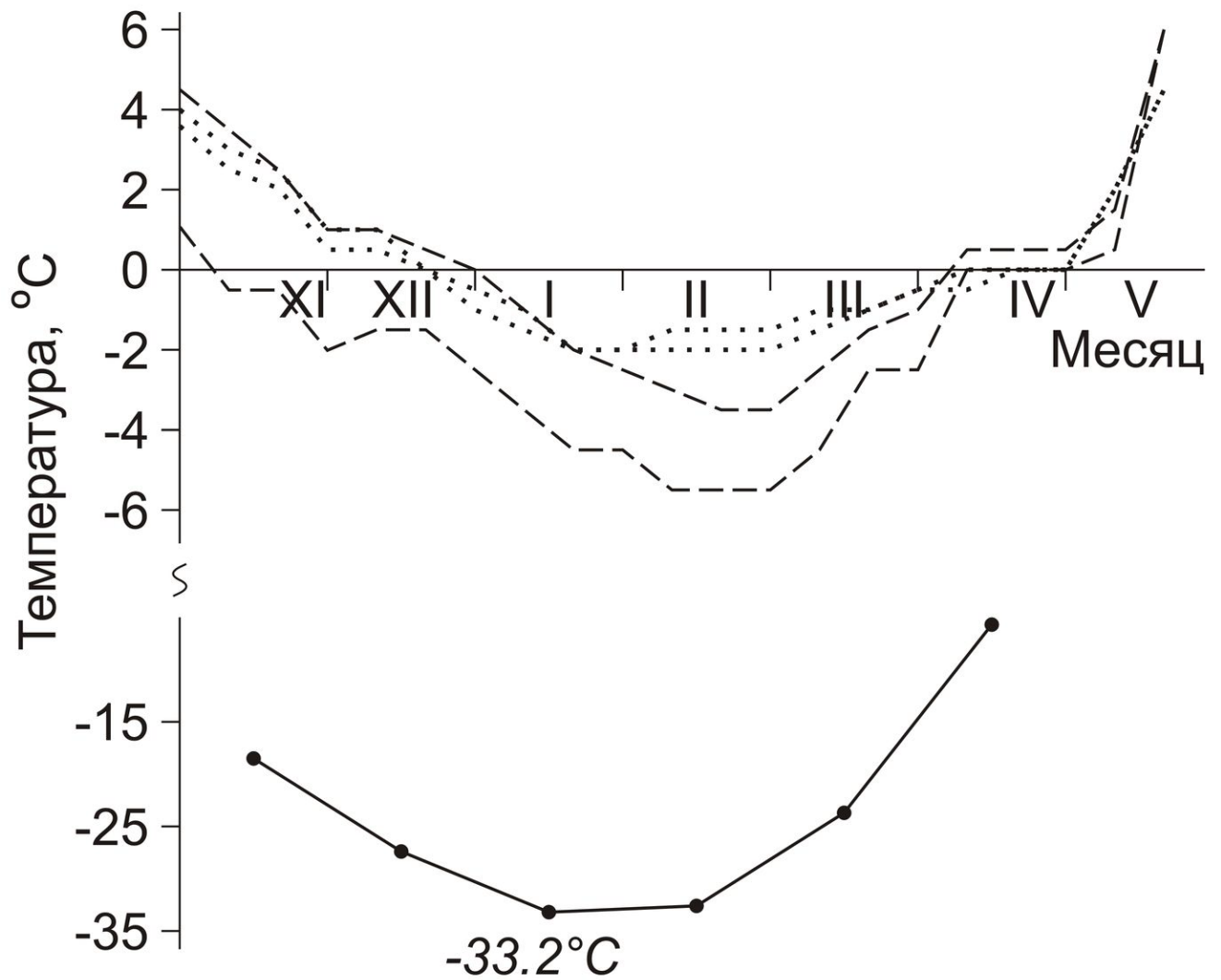


Рисунок 3.8.3 Ход средних месячных температур воздуха (сплошная кривая) и минимальных за декаду температур почвы на глубине 2 см (штриховые кривые) и 10 см (точечные кривые) с осени 2013 г. по весну 2014 г. в двух местообитаниях червей 3-й филогенетической линии *E. n. pallida* в Большехехцирском заповеднике. Температура воздуха приведена по данным метеостанции Хабаровск (удаление 27 км)

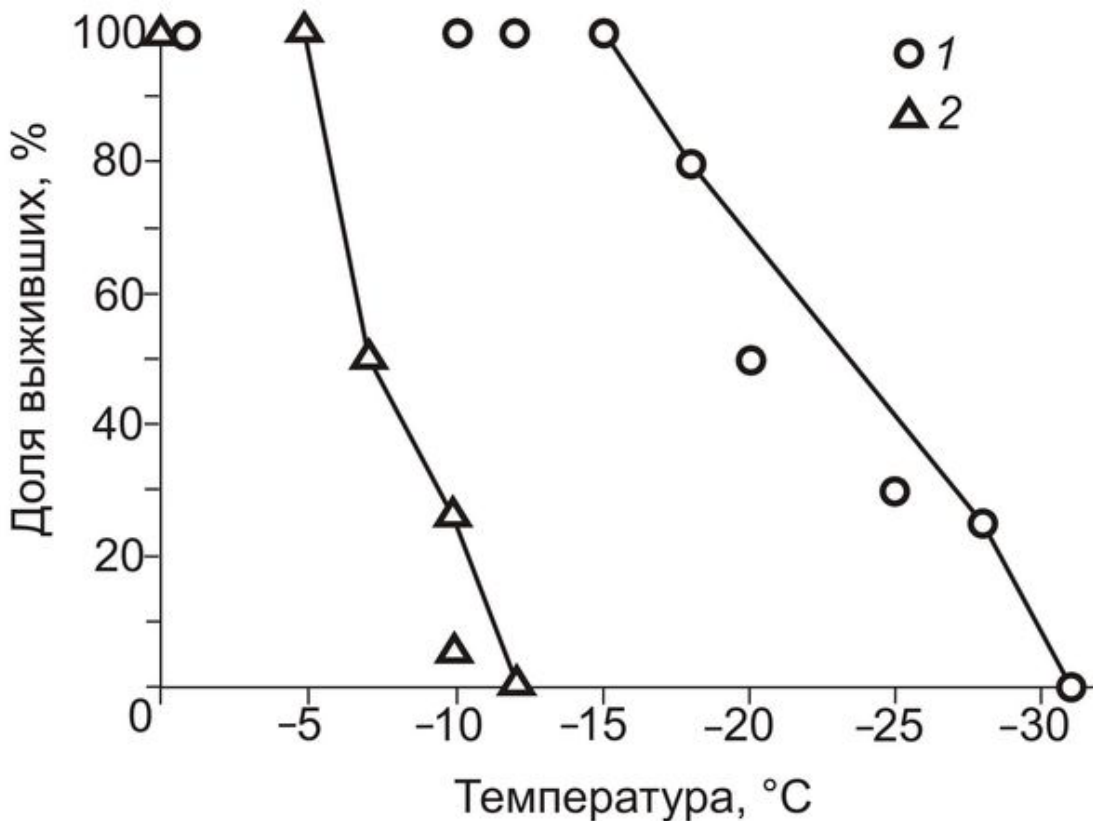


Рисунок 3.8.4 Выживание червей 1-й (1) [Berman, Meshcheryakova, 2013] и 3-й (2) (эта работа) филогенетических линий *E. n. pallida* после трехсуточной экспозиции при разных температурах.

холодостойкость наряду с палеогеографией влияет на их ареалы. Холодостойкость в данном случае рассматривается как экологический признак, изменчивость которого мы рассматриваем для проверки гипотезы о различиях между филогенетическими линиями *E. nordenskioldi*, чтобы подкрепить полученные выше данные по генетической и морфологической изменчивости.

Для проверки гипотезы о существовании различий в холодостойкости между филогенетическими линиями *E. nordenskioldi*, было проведено определение холодоустойчивости червей шести линий: четырех линий пигментированной формы (1, 3, 7 и 9-й) и двух линий формы *pallida* (1-й и 3-й).

Температуры максимального переохлаждения ( $T_p$ ) червей всех изученных линий оказались близки. Их средние значения составляли  $-4.6 - -3.1^{\circ}\text{C}$  (Таблица 3.8.1). Предельные переносимые температуры (ППТ), вопреки близости значений

Тп, находятся в диапазоне -34 – -10 °С, т.е. весьма существенно различаются у разных линий (Рисунок 3.8.2). Причины этих различий неизвестны, различия приходится принимать как факт. Имеющий большое значение для экологии вида, линии. Проведенный нами метаболомный анализ для одной из линий *E. nordenskioldi* формы *pallida* и *D. octaedra* показывает, что разные таксоны имеют отличающиеся криопротекторы и их концентрации, а также другие молекулы, обуславливающие холодостойкость. Судя по соотношению Тп и ППТ, черви всех рассмотренных нами линий обоих подвидов *E. nordenskioldi* могут длительно находиться при температурах, которые намного ниже точки переохлаждения, что свидетельствует о способности выдерживать замораживание.

Таблица 3.8.2 Ступени определения предельно переносимых температур (ППТ, °С) дождевыми червями разных генетических линий двух подвидов *E. nordenskioldi*. Примечание. 1<sub>п</sub> и 3<sub>п</sub> С. Подгорное, Томская обл. 1<sub>н</sub> и 3<sub>н</sub> С. Китерня, Новосибирская обл.; \* – по [Берман, Лейрих, 1985]; \*\* – [Berman, Meshcheryakova, 2013]; \*\*\* – в скобках указан размер выборок (экз.); для табл. 1 и 2.

Подвид	Линия	Температурные ступени***
<i>E. n. nordenskioldi</i>	1 <sub>п</sub>	-5 (30), -8 (42), -10 (13), -12 (28), -13 (15)
	1 <sub>н</sub>	-5 (30), -8 (45), -10 (15), -12 (67), -13 (16)
	3 <sub>п</sub>	-5 (8), -8 (16), -10 (6), -12 (18), -13 (21)
	3 <sub>н</sub>	-5 (0), -8 (0), -10 (0), -12 (19), -13 (15)
	7	-8 (12), -12 (12), -20 (14), -23 (22), -24 (40), -26 (45)
	9*	-12 (25), -14 (25), -16 (25), -17 (25), -19 (25), -21 (25), -22 (25), -23 (25), -25 (25), -28 (25), -30 (25), -34 (25)
<i>E. n. pallida</i>	1**	-10 (25), -12 (25), -15 (25), -18 (25), -20 (42), -25 (44), 28 (40), -30 (64)
	3	-5 (18), -7 (15), -10 (30), -12 (30)

9-ая линия пигментированной формы *E. nordenskioldi* оказалась наиболее устойчивой к отрицательным температурам среди исследованных линий: взрослые черви переносят до  $-34\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Как показано выше (Раздел 3.3.2), 9-ая линия занимает самую северную и самую суровую часть ареала комплекса с крайне жесткими зимними условиями: Чукотку, бассейны рек Колымы, Индигирки, Лены, Оленека, Анабара, п-ов Ямал и др. Судя по выявленной холодоустойчивости, даже в чрезвычайно холодном регионе, в верховьях р. Колымы, единственный тип непригодных местообитаний для зимовки этих червей – полностью бесснежные участки, на которых температура в слое 0 – 5 см может опускаться ниже  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  при температуре воздуха  $-58\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Алфимов, 1985]. За пределами континентальных регионов Северо-Востока и Якутии *E. nordenskioldi* могут зимовать и на бесснежных местах [Тихомиров, 1937].

При этом, обладая не только выдающейся криорезистентностью, но и устойчивостью к сухости и высокой кислотности почвы [Берман и др., 2002], черви 9-й линии пока не обнаружены ни в бассейне Амура, ни в Средней Сибири, ни на большей части Западной Сибири. Следует предположить, что их отсутствие в этих относительно хорошо обследованных регионах никак не может быть результатом недостаточной холодоустойчивости червей и их зимующих коконов.

7-ая филогенетическая линия пигментированной формы *E. nordenskioldi* была на втором месте по устойчивости к отрицательным температурам среди изученных линий: большая часть исследованной выборки выдержала охлаждение до  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Рисунок 3.8.2). 7-ая линия распространена на юго-востоке европейской части России и на Южном Урале (Раздел 3.3.1) и пока не известна в азиатской части России. Эта территория находится в области изотерм средних температур воздуха в январе  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  –  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Алисов, 1956]. Температура почвы на глубине 3 см под снежным покровом средней мощности не опускается в названных регионах ниже  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Алфимов, 2005], а средние месячные температуры даже в самый холодный месяц составляют на глубине 20 см  $-6.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , на глубине 40 см –  $-3.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Справочник..., 1955, 1965].

Таким образом, холодостойкость червей 7-й линии намного превышает зимний температурный фон почв региона. Имеющаяся криорезистентность могла бы позволить им распространиться как на запад и север, так и далеко на восток. Следует отметить, что 7-я и 9-ая линия родственны и, по нашему мнению, входят в состав *E. nordenskioldi sensu stricto* (Раздел 3.4.3). Их родство, по-видимому, и объясняет близкую холодостойкость.

1-ая линия и 3-я линии пигментированной формы *E. nordenskioldi* обладали заметно более низкой холодостойкостью по сравнению с линиями 7 и 9. От четверти до пятой части животных из окрестностей с. Подгорное и г. Новосибирска перенесли охлаждение до  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ , но  $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$  не выдержали. Таким образом,  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  следует считать ППТ (Таблица 3.8.2, рисунок 3.8.2).

Черви 1-й и 3-ей линий обнаружены в естественных местообитаниях во множестве точек на территории России, включая Заполярье (Рисунок 3.1.1). При этом северные популяции имеют те же гаплотипы, что и южные, что указывает, вероятно, на их недавнее расселение; изменчивость восточных групп не ясна, так как исследованных точек пока мало.

Эта картина сильно отличается от таковой для 7-й и 9-й линий, имеющих значительное “внутрилинейное” разнообразие (Разделы 3.3.1 и 3.3.2). 1-я и 3-я линии, по-видимому, расширили свой ареал до громадных размеров сравнительно недавно, в голоцене.

ППТ червей  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  достаточно для благополучной зимовки почти повсеместно на юго-востоке Западной Сибири и в лесных среднегорьях Алтая с учетом относительно высокого фона минимальных температур поверхностного горизонта почв [Алфимов и др., 2012; Берман и др., 2016]. Вблизи с. Подгорное и г. Томска в подавляющей части обследованных местообитаний, где были найдены черви, минимумы температуры в почве на глубине 10 см не опускались ниже  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , лишь в двух местообитаниях они составляли  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  –  $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Алфимов и др., 2012]. В окрестностях Хабаровска зимняя температура в первых 10 см почвы также была значительно выше  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Рисунок 3.8.3).

Следует отметить, что линия 2 формы *nordenskioldi*, холодостойкость которой изучалась в статье Д. И. Бермана и др. [2016] и была в ней синонимизирована с *E. sibirica*, близка к таковой у линий 1 и 3: -10 – -12 °С. Линия 2 распространена на юге Западной Сибири (Рисунок 3.1.1); в этом регионе она встречается симпатрично с линиями 1 и 3, но, в отличие от них, не выходит за его пределы. Вышеприведенные рассуждения, таким образом, относятся и к линии 2. Таксономическое положение *E. sibirica* и возможность ее синонимизации с какой-либо линией обсуждена нами в Разделе 3.6.

Черви 1-й и 3-й линий формы *nordenskioldi* номинативного подвида достигают крупных размеров, что обычно служит признаком норников. Весьма вероятно, что именно характерной для норных червей зимовкой в глубине почвы можно объяснить обитание червей 1-й линии в таких суровых местностях, как бассейн верхнего течения р. Бурея (окрестности пос. Ургал), где в январе средняя температура воздуха -31,1 °С при максимальной высоте снежного покрова лишь 29 см. Но вечной мерзлоты в этом регионе нет, что, вероятно, позволяет червям уходить на зиму в глубокие горизонты.

Обнаружение 1-й и 3-й линий номинативного подвида на территориях с холодной зимой и вечной мерзлотой, таких как Юго-Западная Якутия или Центральная Якутия, на первый взгляд, кажется странным. Действительно, в окрестностях г. Олекминск, например, средняя температура воздуха самого холодного месяца -33,5 °С. Но минимальные температуры почвы на этой территории, как и в междуречье Лены и Вилюя, могут быть существенно повышены в так называемых таликовых зонах [Геокриология..., 1989] – участках с незамерзающими и находящимися близко к поверхности подземными водами. В пределах таликовых зон отмечены наиболее высокие для данного региона зимние температуры почвы на глубине 20 см (-11 – -5,5 °С). Даже на глубине 2–3 см они были не ниже -12 °С [Berman et al., 2016], а средние многолетние на этой глубине не опускаются в регионе ниже -10,4 °С [Справочник..., 1966]. Таким образом, черви на исследованных территориях Юго-Западной Якутии могут зимовать в комфортных для них условиях.



Однако черви 1-й линии обнаружены также в низовьях Оби, в районе пос. Жиганск (на Лене), устья р. Марха (притока Вилюя), оз. Собачьего у Норильска, на п-ове Таймыр (Рисунок 3.8.1). Климат этих регионов крайне жесткий, мощность сезонно-талого слоя порой едва превышает первые десятки сантиметров. К примеру, на метеостанции Диксон в 2002–2010 гг. минимальная температура на глубине 20 см опускалась до  $-21,8$  °C (вытяжные термометры) при высоте снега в феврале – марте 20 – 25 см (сайт ВНИИГМИ-МЦД <http://meteo.ru/data>). Данные области непригодны для жизни линии 1 формы *nordenskioldi* при выявленной в нашей работе ППТ. Объяснить их присутствие можно изменчивостью холодоустойчивости внутри линии: в нашей работе мы изучали южные популяции, холодостойкость которых может быть ниже, чем у северных. Кроме того, возможно, что северные популяции приурочены к особо теплым зимой местам (микрорельеф, положение относительно направления преобладающих ветров и др.). В целом, стоит отметить, что изменчивость холодоустойчивости между разными популяциями одной линии нуждается в изучении.

Черви 1-й линии формы *pallida* из пригородов Магадана обладают поразительно высокой криорезистентностью –  $-28$  °C (Рисунок 3.8.4) [Berman, Meshcheryakova, 2013]. Они обнаружены здесь только на огородах и не расселяются в природные местообитания, тогда как черви 9-й линии формы *nordenskioldi* в антропогенных биотопах никогда не были встречены. На зимовку животные уходят в глубь обрабатываемой почвы до 60 см [Berman, Meshcheryakova, 2013], где температуры выше переносимых ими. Так, минимальные температуры почвы на глубинах 2, 20 и 40 см в трех точках огорода в окрестностях г. Магадана осенью 2011 – зимой 2012 г. составляли  $-10$  –  $-13,5$  °C,  $-8$  –  $-11,5$  °C и  $-6,5$  –  $-8,5$  °C, соответственно. Черви 1-й линии формы *pallida* заселяют также огороды в пос. Сеймчан, находящемся в континентальной части региона, где температуры января примерно на  $10$  °C ниже, чем в Магадане. Как показано выше (Раздел 3.2), удаленность мест находок этих червей при незначительной генетической изменчивости и приуроченность к антропогенным

местообитаниям (в отличие от 1-й линии *E. nordenskioldi*), скорее всего, свидетельствуют о недавнем расселении при участии человека.

Черви 3-й линии формы *pallida*, найденные пока только в Хабаровском крае, переносят температуру не ниже  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Следует отметить, что линии 2 и 3 формы *pallida*, по-видимому, отличаются только по митохондриальной ДНК при гораздо меньших различиях на уровне ядерных генов (Раздел 3.2). Соответственно, можно предположить, что и значения холодоустойчивости линии 2 близки. Известный ареал линии 2 формы *pallida* гораздо шире (Раздел 3.2, рисунок 3.2.1) и приводимые ниже рассуждения можно распространить и на эту территорию.

При температуре  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  в выборке из 12 особей линии 3 формы *pallida* выжило три (25%), в выборке из 18 особей только одна (<6%) (Рисунок 3.8.4). Таким образом, эти черви по значениям ППТ близки к животным 1-й и 3-й линий формы *nordenskioldi*. Под Хабаровском непосредственно в местах сбора животных температура за зиму в горизонте 0 – 2 см не опускалась ниже  $-5,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , на глубине 10 см – ниже  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , т.е. не достигала пределов их криорезистентности. Но температурные условия и вне пойменных пространств не хуже. Так, на междуречье Амура и его притока Тунгуски у пос. Николаевка минимумы за зиму 2007/2008 г. на глубине 2 см не были ниже  $-11,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а на глубине 25 см – ниже  $-8,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (наши неопубликованные данные). Таким образом, соотношение почвенных температур и холодоустойчивости червей свидетельствует о том, что на территории Приморского и юга Хабаровского краев условия зимовки линий 2 и 3 формы *pallida* вполне благоприятны.

Исходя из изложенного выше, казалось бы, прослеживается зависимость положения и величины ареалов от холодоустойчивости червей. Действительно, самая устойчивая 9-я линия ( $-34\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) чрезвычайно широко распространена в самых холодных регионах Севера и Якутии. Очень низкие значения ППТ имеют также 1-я линия формы *pallida* ( $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и 7-я линия формы *nordenskioldi* ( $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Первая из названных линий обитает на окультуренных землях под Магаданом, но могла бы с такой холодостойкостью быть повсеместной не только на побережье, но и в континентальных районах, чего не происходит. Удивительно, что 7-я линия,

обладая явно избыточной и не адаптивной по отношению к температурному режиму местообитаний на юго-востоке Восточной Европы холодостойкостью, в Азии не обнаружена. Криорезистентность этих червей настолько велика, что свидетельствует о полной независимости их географического распространения от температурных условий зимовки в пределах всей территории, заселенной *E. nordenskioldi*. Такое распространение свидетельствует о том, что ареал 7-й линии сформировался под влиянием факторов, не связанных с температурами зимовки.

Напротив, у червей 3-й линии формы *pallida* холодостойкость минимальная из исследованных ( $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Она лишь незначительно выше ( $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) у 1-й, 2-й и 3-й линий номинативного подвида. Казалось бы, распространение этих линий должно быть ограничено зимними почвенными температурами, однако полученная картина связи положения ареалов и холодоустойчивости червей значительно сложнее.

Отсутствие 9-й линии на юге, как и 7-й линии на севере Европы и где бы то ни было в Азии и, напротив, крайне широкое распространение 1-й линии формы *nordenskioldi* с ее незначительной холодостойкостью в Сибири, в том числе в Субарктике, – все это примеры несоответствия экофизиологических возможностей червей и занимаемых ими ареалов. Таким образом, характер ареала линий не может быть объяснен исключительно их резистентностью к отрицательным температурам.

### **3.9 История расселения *E. nordenskioldi* по равнинной части России**

Современная фауна умеренных и высоких широт сложилась, главным образом, под влиянием плейстоценовых циклов оледенения-межледниковья. Во время оледенений происходило переселение или вымирание относительно теплолюбивых животных, а в межледниковья – холодолюбивых [Bennett, Provan, 2008; Fedorov et al., 2020]. Таким образом, можно ожидать, что фауна этих широт будет сильно обеднена относительно более южных областей, а на её формирование

будут влиять, главным образом, скорость расселения видов и наличие подходящих рефугиумов.

Современные палеогеографические данные показывают, что в ходе климатического оптимума голоцена (3–10 тыс. л. н.) северная граница лесов проходила гораздо севернее, чем в настоящее время, местами достигая побережья Северного Ледовитого Океана [Bigelow et al., 2003; Callaghan et al., 2004; MacDonald et al., 2007]. При этом во время максимума последнего оледенения (19–26,5 тыс. л.н.) практически вся территория северной Евразии, не покрытая ледниками, была занята тундростепью, в то время как хвойные леса отсутствовали [Tarasov et al., 2000; Величко и др., 2002; Bigelow et al., 2003; Willerslev et al., 2014; Wang et al., 2021]. Во время прошлого межледниковья (115–130 тыс. л.н.) среднегодовые температуры были заметно выше, чем во время нынешнего. В некоторых регионах Арктики они превышали нынешние на 5 °С [CAPE Last Interglacial Project Members, 2006]. Все это предполагает крайне выраженные изменения и в фауне данных областей.

На основе палеонтологической летописи возможно проследить происходившие изменения почти всегда только на уровне видов и выше, и только для тех таксонов, которые оставляют в этой летописи следы. Получить данные для внутривидового уровня позволило развитие молекулярно-генетических методов, которые дали возможность оценить уровень генетических различий между популяциями одного вида из разных регионов и проследить историю их расселения. По этим данным можно уже реконструировать палеогеографическую историю отдельных регионов. На сегодняшний день подавляющее большинство работ было проведено в Западной Европе и Северной Америке, в то время как Сибирь и Европейская часть России исследованы сравнительно мало [Brunsfeld et al., 2001; Hewitt, 2001, 2004, 2011; Shafer et al., 2010]. При этом большая часть работ посвящена позвоночным и насекомым, обладающим большой способностью к расселению. В связи с этим встает вопрос выбора подходящей группы организмов, способной стать маркером для филогеографических исследований.

На роль такой группы хорошо подходят дождевые черви. Если ранее проблемой могла стать трудность их определения, то использование молекулярно-генетических методов позволяет различать виды с большими генетическими отличиями друг от друга и отсутствием «перемешивания» генофондов (виды-двойники) и выявлять степень родства между популяциями из разных регионов. Большое преимущество дождевых червей как модельной группы – низкая способность к расселению у большинства видов. Исключением являются перепутанные виды, однако они составляют небольшую часть от общего их числа [Hendrix et al., 2008], и их можно выявить генетическим анализом, что мы показали на примере *D. octaedra*.

Проведенный филогеографический анализ фауны северной и центральной России показал, что на равнинах как европейской, так и азиатской частей можно выделить лишь одну группу, которая представляет собой нативную фауну дождевых червей. Это комплекс, ранее считавшийся одним видом *E. nordenskioldi* с очень широким ареалом и ещё несколько близкородственных видов (*E. atlavinyteae*, *E. sibirica*).

При помощи большого набора методов в данной работе нами показано, что в комплексе *E. nordenskioldi* существует множество филогенетических линий, многие из которых следовало бы назвать видами, учитывая большие генетические и геномные различия между ними. Внесение изменений в систематику не входило в цель данной работы, поэтому мы не будем здесь давать какие-либо названия отдельным линиям и видам и рассмотрим историю данного комплекса в общих чертах.

На основании полученных данных можно выдвинуть следующие предположения о комплексе *E. nordenskioldi* и истории его расселения. Центр генетического и морфологического разнообразия вида (а также близкородственных видов, которые пока изучены слабо) находится на Алтае. Расселение таксонов комплекса *E. nordenskioldi* на равнины проходило в два основных этапа. Первую волну (Рисунок 3.9.1) составляли линии, которые выше (Раздел 3.4.3) предложено обозначать как *E. nordenskioldi sensu stricto* (см Раздел 3.8). Точные датировки

событий дивергенции при помощи молекулярных часов для дождевых червей на изучаемой территории пока невозможны, однако можно предполагать, что данное событие имело место в середине или начале плейстоцена (по новой хронологической шкале – в Гелазском ярусе, 1,8–2,58 млн. лет назад [Gibbard et al., 2009, 2010]).

По всей видимости, климатические изменения, происходившие в это время, привели к постепенному вымиранию ранее существовавшей фауны дождевых червей севера Евразии и замены её на *E. nordenskioldi* – вид с большой устойчивостью к низким температурам, замораживанию и засухе, которую он приобрёл в ходе эволюции в горах. К настоящему времени *E. nordenskioldi s. str.* – единственный вид дождевых червей на большей части северной Азии (Раздел 3.3.2). В горах Урала и на прилегающих территориях он существует совместно с местной эндемичной фауной, представленной родами *Eisenia* и *Perelia*. По-видимому, из всего комплекса *E. nordenskioldi* только *E. nordenskioldi s. str.* вышел на Восточно-Европейскую равнину. В настоящее время здесь он отличается очень малой численностью, однако совсем недавно, в ходе последнего оледенения, когда на данной территории доминировали тундровые биотопы, его место в фауне могло быть гораздо более заметным.

Следующим этапом был выход прочих линий комплекса на равнину (Рисунок 3.9.2). Судя по филогенетическим деревьям, дивергенция множества этих линий произошла крайне быстро. Некоторые из них приобрели способность к собственно почвенному образу жизни; при этом произошла и потеря пигментации. Разные линии имели различный успех при расселении. Некоторые из них имеют не слишком большой ареал на юге Западной Сибири (линии 2, 4 и 5), а также некоторые линии непигментированной формы с Салаира. Другие же сумели заселить и юг Восточной Сибири, а также продолжают расселение на север, где во многих случаях встречаются совместно с *E. nordenskioldi s. str.* В частности, есть основания полагать, что ряд линий (линии 1 и 3 пигментированной формы и линия 1 непигментированной) активно расселяются в настоящее время при помощи человека.

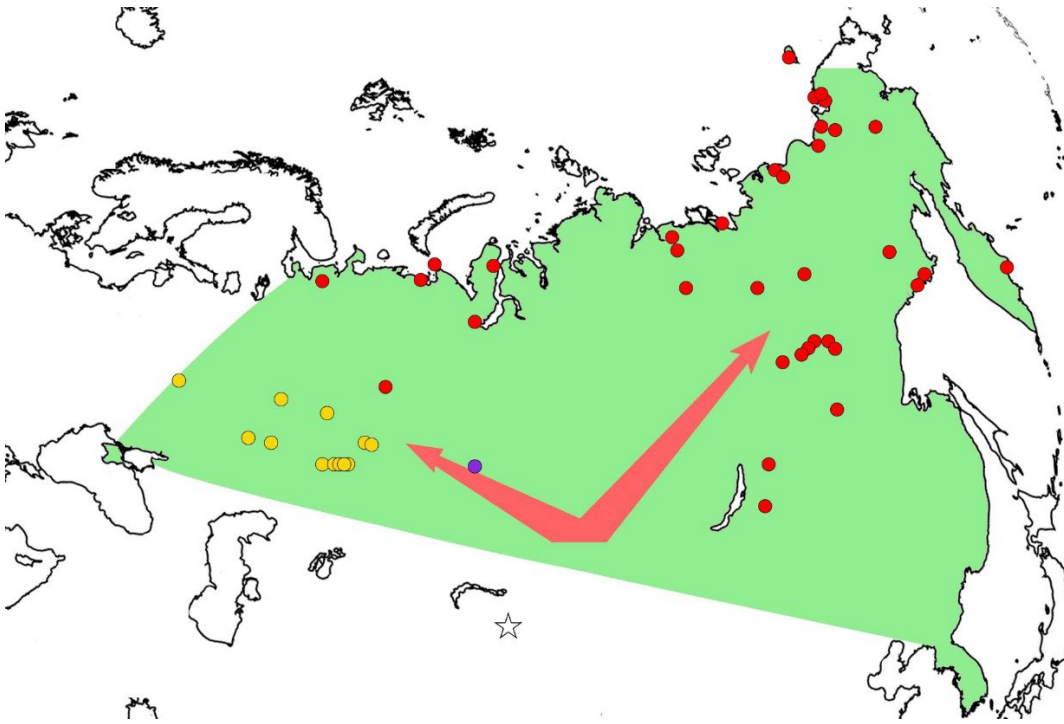


Рисунок 3.9.1. Предполагаемые пути расселения *E. nordenskioldi s. str.* Стрелки обозначают направления расселения из исходного ареала. Зеленым цветом показан ареал всего комплекса, точки разных цветов – разные линии

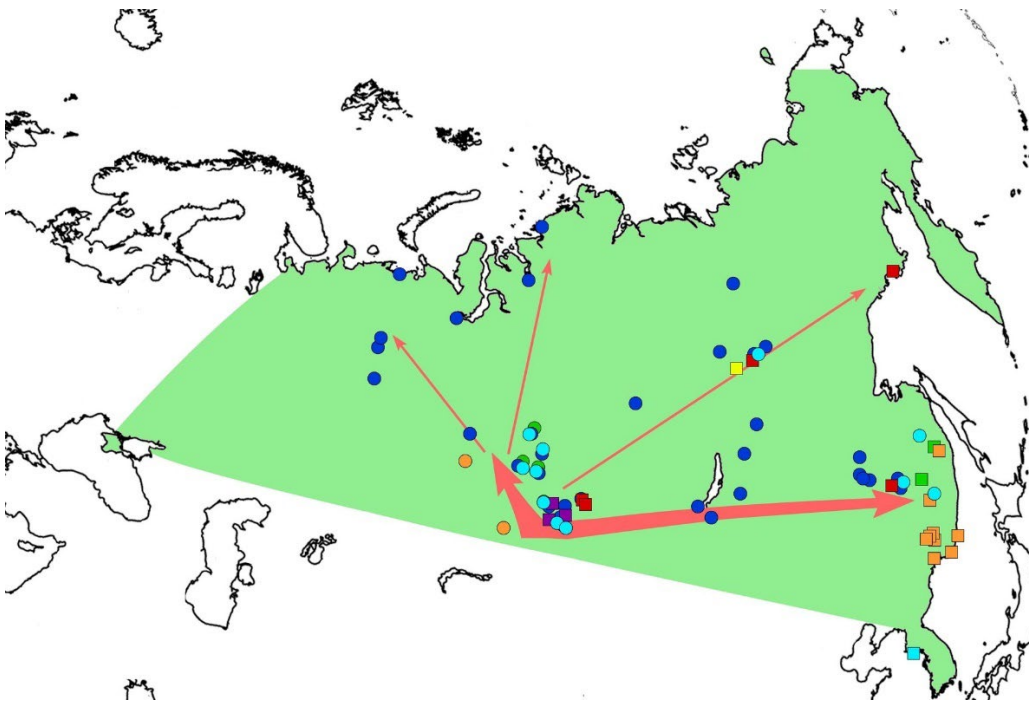


Рисунок 3.9.3. Предполагаемые пути расселения *Eisenia sp. 1* (aff. *E. nordenskioldi*). Толстые стрелки обозначают направления расселения из исходного ареала в плейстоцене, тонкие – недавнее голоценовое расселение. Зеленым цветом показан ареал всего комплекса, точки разных цветов – разные линии

Из полученных данных можно сделать некоторые осторожные обобщения для всей фауны изученной территории.

Север европейской части России отличается гораздо меньшим генетическим своеобразием популяций. Причина этого, по всей видимости, состоит во влиянии европейских ледниковых щитов и образованных в результате их формирования водоемов. Считается, что в ходе последних оледенений на севере Европы образовался Скандинавский ледяной щит, который заходил и на территорию Сибири [Grosswald, 1998; Svendsen et al., 1999, 2004; Astakhov, 2011]. Сформировавшийся щит предотвращал сток сибирских рек в Северный Ледовитый океан, что привело к возникновению огромного Мансийского озера, занимавшего большую часть севера Западной Сибири [Astakhov, 2006; Komatsu et al., 2016; Baker, 2020].

Степень влияния этих географических изменений на фауну дождевых червей, однако, не очевидна. Во-первых, среди геологов нет консенсусного мнения относительно степени развития ледникового щита: в то время как одни авторы полагают, что он распространялся практически до 60-ой параллели на юге и заходил за 110 меридиан на востоке (или же распространялся на все северное побережье Евразии) [Grosswald, 1998; Svendsen et al., 1999; Astakhov, 2011; Смутьский, Иванова, 2016]; в других работах даны более умеренные оценки, в которых ледниковый щит занимал лишь самый север побережья материка [Svenden et al., 2004; Lambeck et al., 2006; Niessen et al., 2013; Patton et al., 2016]. Некоторые авторы приводят геологические свидетельства в пользу того, что Сибирские Увалы не являются терминальной мореной и, следовательно, степень оледенения севера Западной Сибири была незначительной [Кузин, 2006; Бобков, 2016; Sheinkman, 2016; Шейнкман и др., 2017]. Во-вторых, локальные популяции могли сохраняться в рефугиумах: нунатаках среди ледников либо на островах среди озер [Schneeweiss, Schoenswetter, 2011; Westergaard et al., 2011].

Сложно оценить убедительность аргументов геологов, однако можно проверить, соответствуют ли наблюдаемые паттерны генетического разнообразия дождевых червей гипотезам об их раннем или же позднем возникновении.



Полученные нами данные указывают на то, что популяции различных видов дождевых червей с севера Европейской части России и Западной Сибири следует считать недавними вселенцами. Хотя для линии 9 *E. n. nordenskioldi* было показано, что западносибирская группа ее популяций заметно отличается генетически, различия в пределах этой группы были малы и разумно предположить, что северные популяции на о. Вайгач и побережье являются результатом сравнительно недавнего расселения с Северного Урала.

На севере Восточной Сибири по нынешним представлениям были лишь локальные горно-долинные оледенения [Stauch, Gualtieri, 2008; Глушкова, Смирнов, 2021]. Тем не менее, данная территория подвергалась сильнейшим климатическим и экологическим изменениям, в связи с чем встает вопрос о преемственности фаун ледниковых периодов и современности. Наша работа однозначно показала, что местные популяции имеют значительный возраст (сотни тысяч лет со времени дивергенции между популяциями из бассейнов разных рек). В то же время имело место и расселение популяций по этой территории, но на сравнительно небольшие расстояния.

Таким образом, проведенная работа показала, что на большей части Сибири, за исключением севера Западной Сибири, сохраняется преемственность популяций комплекса *E. nordenskioldi*. Это говорит о том, что климатические изменения в ходе циклов оледенения плейстоцена не привели к полному вымиранию почвенных фаун. Можно предполагать, что сходная картина будет наблюдаться и для других почвенных видов.

### 3.10 Заключение

В результате проведённой работы мы показали, что в пределах комплекса *E. nordenskioldi* существует очень большая генетическая изменчивость. Полученные для множества образцов и популяций последовательности, как по единичным генам, так и данные NGS для транскриптомов, а также оценки размера геномов разных линий свидетельствуют в пользу того, что данный вид следует считать

комплексом из множества видов. Оказалось (Раздел 3.7), что могут образовываться гибриды первого поколения между этими линиями, однако дальнейшей интрогрессии генов от одной линии к другой не происходит. Это не противоречит видовому статусу обсуждаемых таксонов.

В отечественной литературе *E. nordenskioldi* делят на два подвида, *E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida* (иностранные учёные такого деления строго не придерживаются [Blakemore, 2013; Hong, Csuzdi, 2016]). Указанные подвиды были описаны как формы [Малевич, 1956], впоследствии Т. С. Всеволодова-Перель [1997] изменила их статус на подвидовой. Подобное решение, по-видимому, было продиктовано тем, что формы не имеют никакого таксономического статуса согласно Международному Кодексу Зоологической Номенклатуры, хотя ранее широко использовались. Но предложенное изменение вступало в конфликт с общепринятым пониманием подвида [Mayr, 1982], согласно которому подвиды, наряду с морфологическим различиями, должны иметь и различные ареалы. В то же время, ареал *E. n. pallida* полностью перекрывается с *E. n. nordenskioldi* [Всеволодова-Перель, Булатова, 2008].

Т. С. Перель и А. С. Графодатский [1984] описали два вида, *E. atlavinyteae* и *E. sibirica*, каждый из которых имел небольшое отклонение от диагноза *E. nordenskioldi*. *E. atlavinyteae* отличался тем, что поясок начинался на 20ом сегмента, а пубертатные валики всегда присутствовали на 20ом сегменте. При этом сами авторы отмечали, что в пределах типовой популяции наблюдался заметный полиморфизм, при котором значительная часть популяции имела типичный для *E. nordenskioldi* вид. То же авторы отметили и для *E. sibirica*, другого нового вида, у которого поясок занимал сегменты с 27го по 30ой.

Эти два описанных вида непросто отличить от *E. nordenskioldi*. В ходе данной работы мы собрали, а также получили от других исследователей, множество образцов, определённых как *E. atlavinyteae* и *E. sibirica*. По результатам анализа ДНК оказалось, что все особи с морфотипами *E. atlavinyteae* и *E. sibirica* имеют гаплотипы, характерные для различных линий *E. nordenskioldi* (Раздел 3.6). Можно ли синонимизировать обсуждаемые два вида с какой-либо линией *E. nordenskioldi*?

Теоретически, вопрос можно было бы разрешить исследованием ДНК типовых образцов, однако они, по-видимому, утеряны. Тем не менее, мы можем утверждать, что среди сотен исследованных образцов, собранных с ареала этих видов, мы не обнаружили ни одного, схожего с *E. atlavinyteae* или *E. sibirica* по морфологии, но отличного от какой-либо из линий *E. nordenskioldi* по последовательностям ДНК. Таким образом, мы можем заключить, что существование отдельных видов *E. atlavinyteae* и *E. sibirica* крайне маловероятно, и они представляют собой лишь морфологические отклонения.

По современным воззрениям, валидные виды должны быть монофилетичными. По нашим данным, ни *E. n. nordenskioldi*, ни *E. n. pallida* монофилетичными не являются. В пределах же самого *E. nordenskioldi* различия между филогенетическими линиями настолько велики, что рассматривать его как один вид нельзя. Встаёт вопрос о возможных путях разделения вида. Теоретически, можно было бы выделить каждую филогенетическую линию в отдельный вид. Это было бы вполне обосновано, учитывая глубокие различия между ними на уровне геномов и симпатрию. Однако, выделение настолько большого количества видов было бы крайне неудобно практически. Мы предлагаем разделить вид на два, соответствующие кладам на филогенетических деревьях (Рисунок 3.4.3.3). Клада, включающая в себя филогенетические линии 6, 7 и 9, соответствует виду *E. nordenskioldi sensu stricto*: G. Eisen [1879] описал вид по ряду точек с о. Вайгач и берегов нижнего течения Енисея. Неизвестно, сохранились ли типовые образцы из этой работы. Однако по нашим данным известно, что на о. Вайгач обитает только линия 9 *E. n. nordenskioldi*.

Вторая клада на филогенетических деревьях (Рисунок 3.4.3.3) состоит из множества линий, представленных пигментированными и непигментированными формами. Мы предлагаем дать обсуждаемой группе временное название *Eisenia* sp. 1 (aff. *E. nordenskioldi*).

## Глава 4. Эндемики различных регионов России

### 4.1 *Dendrobaena schmidtii*

Для генетического анализа образцы *Dendrobaena schmidtii* были собраны в семи точках на Западном Кавказе (Рисунок 4.1.1, Таблица 4.1.1). Морфологическое определение проводили по ключу Т. С. Всеволодовой-Перель [1997]. Для исследуемой выборки были проведены амплификация и секвенирование локусов *cox1* и ITS2 (Раздел 2.3.2).

В результате проведенной работы мы получили нуклеотидные последовательности *cox1* и ITS2 для 24 половозрелых особей *D. schmidtii*. Все последовательности *cox1* имели идентичную длину (658 п.н.). На филогенетическом дереве, построенном по гену *cox1* с использованием внешних групп, взятых из базы данных GenBank (Рисунок 4.1.2) видно, что все образцы разбивались на две клады, названные нами группой I и группой II. Обе клады характеризовались высокими значениями апостериорных вероятностей (Рисунок 4.1.2). Каждая из ветвей *D. schmidtii*, в свою очередь, подразделяется на ряд более мелких групп.

Длина последовательностей ITS2 варьировала в широких пределах (549-621 п.н.). Необходимо отметить, что как гены рибосомальной РНК, так и разделяющие их транскрибируемые спейсеры обладают сложной вторичной структурой. Из-за этого их амплификация проблематична и не проходит без добавления денатурирующих агентов, например, ДМСО. Но даже с добавлением последнего в последовательностях группы II образовывалась шпилька, из-за которой часть последовательностей при синтезе их секвеназой были укорочены и содержали внутреннюю делецию длиной около 78 нуклеотидов. В связи с этим данный участок не мог быть прочитан качественно, и в полученных последовательностях был нами пропущен и также исключен из выравнивания.

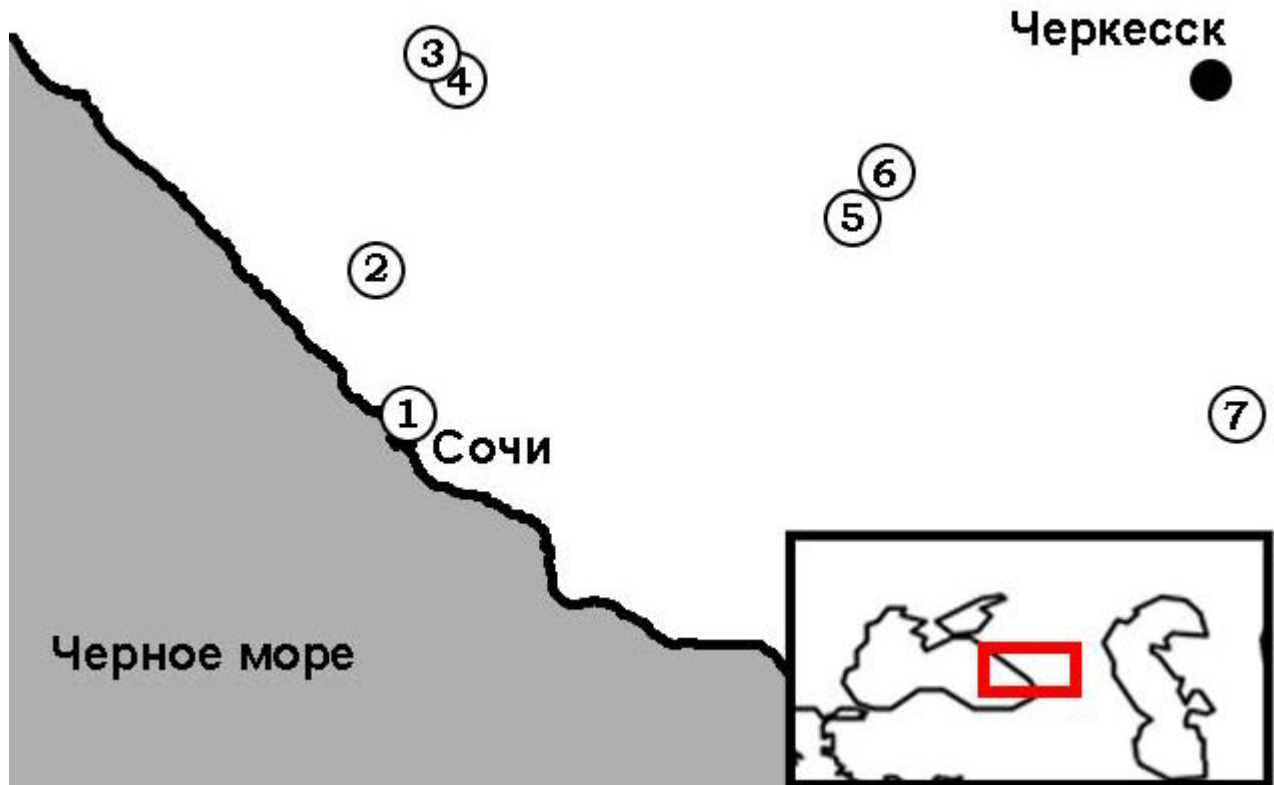


Рисунок 4.1.1. Точки сбора образцов *D. schmidtii*. Номера точек соответствуют номерам точек в Таблице 4.1.1.

По последовательностям ITS2 исследованные образцы разделялись на те же две группы, что и на дереве, построенном по фрагменту гена *cox1* (Рисунок 4.1.3). Представители обеих групп были найдены только в точке 1 (Рисунок 4.1.1).

По диагностическим признакам все изученные особи были одинаковы и характеризовались диагнозом, типичным для *D. schmidtii*. Из Таблицы 4.1.1 видно, что представители выявленных групп I и II имеют некоторые морфологические отличия. Группа I включает в себя большей частью непигментированных и слабопигментированных червей; в случае наличия бурой (пурпурной) окраски она доходит только до пояса, в то время как черви группы II пигментированы полностью или почти полностью, а сама окраска выражена заметно сильнее. Наблюдаются и некоторые различия в размерах тела; как видно из рисунка 4.1.4, большая часть особей, относящихся к группе I, длиннее пяти см, а относящихся к группе II – короче трех см. Значения критериев

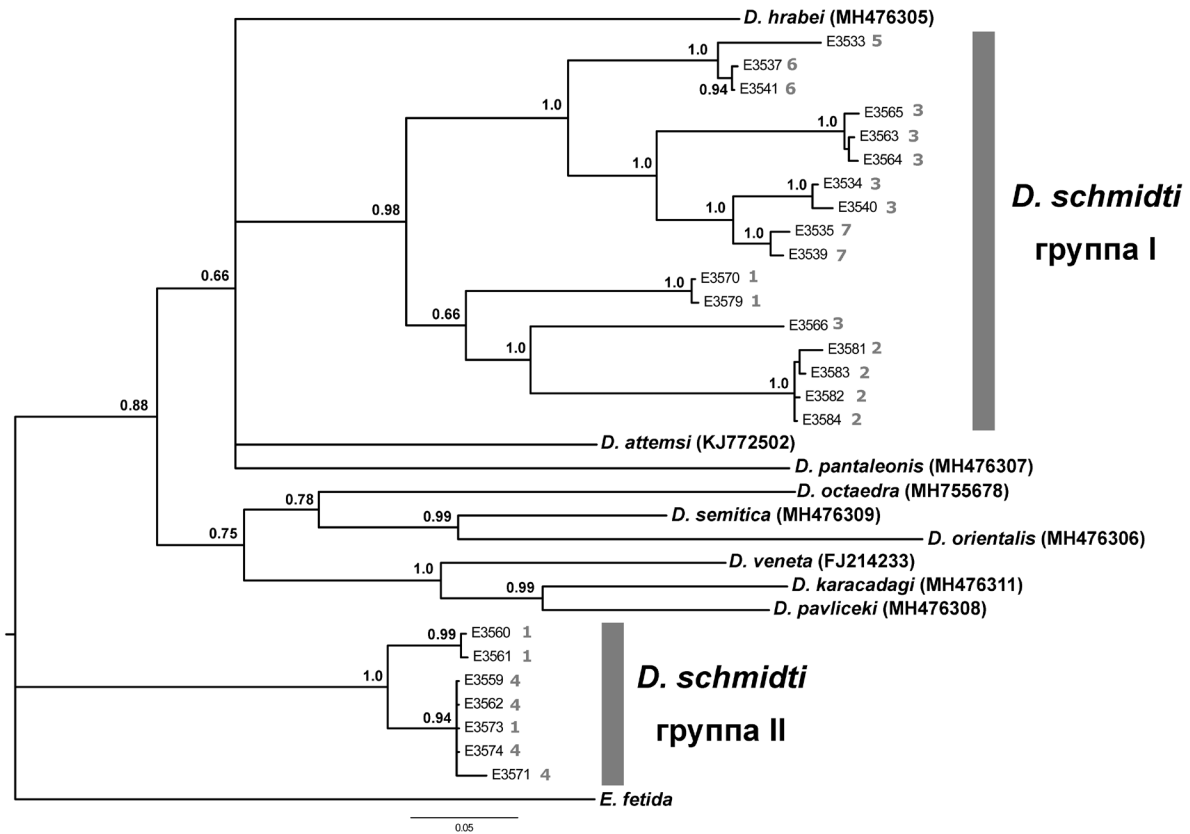


Рисунок 4.1.2. Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям *cox1*, байесовским методом. В узлах дерева приведены значения апостериорных вероятностей  $>0.5$ ; цифры возле каждого номера образца обозначают номера популяций, указанные в Таблице 4.1.1 и на рисунке 4.1.1

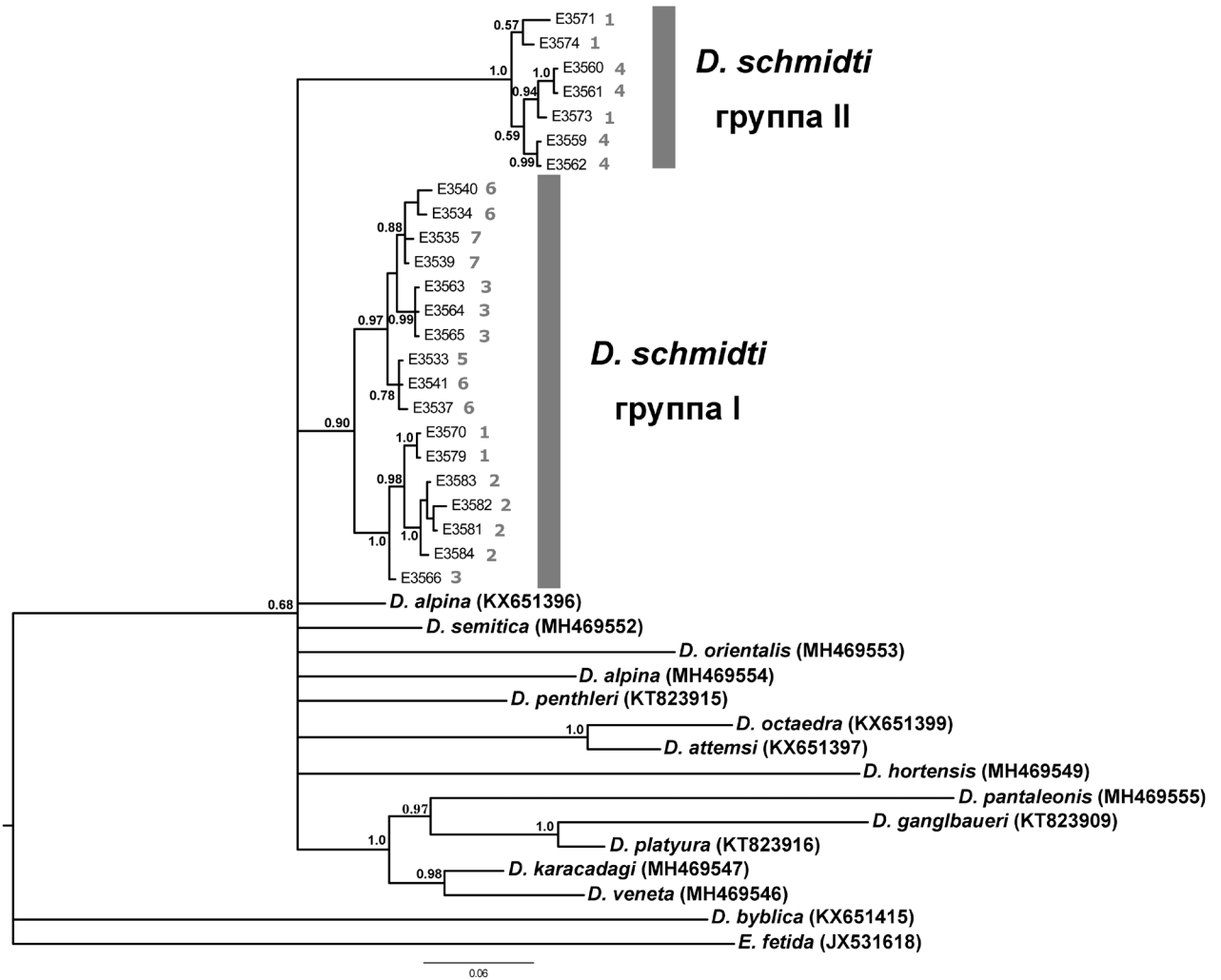


Рисунок 4.1.3. Филогенетическое дерево *D. schmidti*, построенное по последовательностям ITS2, байесовским методом. В узлах дерева приведены значения апостериорных вероятностей  $>0.5$ ; цифры обозначают номера популяций, указанные в Таблице 4.1.1 и на рисунке 4.1.1.

Таблица 4.1.1. Исследованная выборка *D. schmidtii*. Номера точек сбора соответствуют номерам на рисунке 4.1.1. N – число особей

Точка	Место сбора	N	Длина x ширина (см)	Окраска
Группа I				
1	Хоста	2	5,1x0,5, 6,4x0,8	непигментированы
2	Солохаул	3	7,5x0,8, 7,0x0,7, -*	буроватая пигментация на дорзальной части передней половины тела
		1	-*	непигментированы
3	Гуамское ущелье	3	5,1x0,5, 5,1x0,5, 5,3x0,5	буроватая пигментация на дорзальной части передней половины тела
		1	5,1x0,5	непигментирован
5	Уруп	1	2,9x0,6	непигментирован
6	Преградная	4	7,0x0,6, 4,8x0,5, 5,3x0,5, 3,6x0,5	слабопигментированы до пояска  непигментированы
7	Эльбрусский	2	5,4x0,7, 5,5x0,7	пурпурная пигментация до пояска
Группа II				
1	Хоста	2	2,9x0,2.5, 2,1x0,2.5	выраженная пурпурная пигментация на передней половине тела, заходит и на вентральную часть



	Хоста	1	2,5x0,2	полностью пурпурная пигментация до хвоста
4	Мезмай	4	1,7x0,2; 3,5x0,2, 2,6x0,2, 2,2x2	полностью пурпурная пигментация до хвоста

\* Червь был оборван, поэтому длина не указана

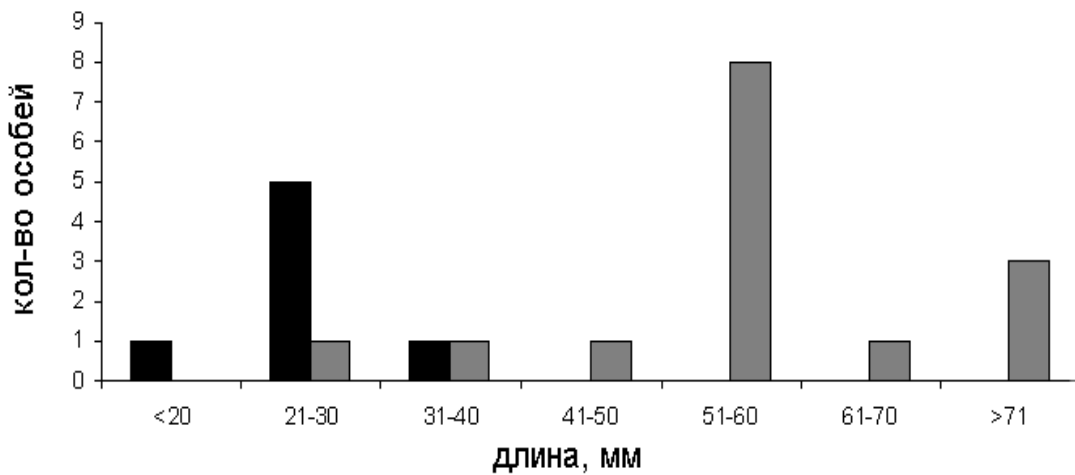


Рисунок 4.1.4. Гистограмма распределения длин исследованных особей *D. schmidtii*. Серыми столбиками обозначены представители группы I, черными – группы II



Рисунок 4.1.5. Результаты анализа RADSeq, визуализированные программой CLUMPAK. Каждый столбик представляет собой один образец; различные генетические группы показаны разными цветами.

Стьюдента и Крамера-Уэлча для имеющихся выборок показало, что различия между ними по длине тела достоверны при  $p < 0,01$ .

Систематика и морфологическая идентификация дождевых червей бывают проблематичными в тех случаях, когда в группе близкородственных видов внутривидовая изменчивость перекрывает межвидовую. Применение молекулярно-генетических методов позволило повысить надежность идентификации, однако вновь подняло проблему применения концепции вида к данной группе: внутривидовая нуклеотидная изменчивость часто бывает весьма велика, что и было отмечено нами для *D. schmidti*. Это влечет за собой вопрос, где же проводить границу между потенциальными видами-двойниками. По нашему мнению, на данном этапе молекулярно-генетические данные могут быть основой для дробления вида лишь в случае его полифилии. В связи с этим мы можем констатировать, что в изученной нами выборке с Западного Кавказа можно выделить две группы, которые следовало бы считать отдельными видами; тем не менее, мы пока воздержимся от их формального описания. При этом нуклеотидная изменчивость внутри этих групп также велика, особенно в случае группы I, нуклеотидные дистанции между образцами которой по гену *cox1* выше, чем, например, между видами *D. karacadagi* и *D. pavlicei* (Рисунок 4.1.2), так что внутри *D. schmidti* можно было бы выделить даже большее количество потенциальных видов.

В пользу последнего говорит и тот факт, что в данной выборке все особи имели типичное состояние диагностических признаков, характерное для *D. s. schmidti*; почти все описанные подвиды, упомянутые во Введении, несколько отличаются от типового диагноза и распространены в южной части ареала, главным образом, в Грузии, а, следовательно, более обширная по географическому охвату выборка наверняка выявит еще более глубокое генетическое разнообразие этого комплекса.

Несмотря на отсутствие изменчивости по диагностическим признакам между группами I и II, они характеризуются различиями по размеру и окраске тела. Эти различия несомненны и статистически достоверны на уровне выборок, но

отдельные особи могут иметь фенотип, «пограничный» между двумя группами. Таким образом, мы можем отнести какую-либо популяцию к группе I или II только по внешнему виду на основании выборки особей, но не единичных экземпляров, в отличие от молекулярно-генетического анализа.

Для того, чтобы оценить глубину различий и возможную гибридизацию между группами, мы провели анализ RADSeq, как описано выше (Раздел 2.5). Было взято три популяции, Мезмай, Каштан и Хоста, в каждой из которых наблюдаются и крупные, и мелкие формы. Анализ показал, что наиболее вероятным является подразделение выборки на 4 группы (K=4). Разделение на группы показано на Рис. 4.1.5. Видно, что во всех трех популяциях мелкие образцы генетически отличаются от крупных. При этом и крупные, и мелкие образцы не всегда объединяются в одну группу (вспомним значительные расстояния между ветвями на Рис. 4.1.2). Неожиданным образом, мелкий образец из Каштанов по результатам анализа оказался гибридом между крупной и мелкой линиями. Таким образом, и в этом случае мы выявили предполагаемую гибридизацию между филогенетическими линиями.

## 4.2 *Drawida ghilarovi*

В 2019 году мы собрали живых дождевых червей вида *D. ghilarovi* в районе г. Бикин и пос. Лесопильное в Хабаровском крае, расположенных на расстоянии около 20 км друг от друга, а также в заповеднике Кедровая Падь (Рисунок 4.2.1). Для собранных образцов была проведена экстракция ДНК и секвенирование гена *cox1* (Раздел 2.3.3). Для построения филогенетических деревьев и карты распространения филогенетических линий мы извлекли доступный набор данных *D. ghilarovi cox1* из GenBank. Были взяты лишь те последовательности, которым соответствовали географические координаты. В качестве внешней группы мы взяли *D. hattamimizu* (GenBank № AB592436).

Всего на момент исследования в GenBank было 60 последовательностей гена *cox1 D. ghilarovi*, но для некоторых из них не было информации о географических

координатах, поэтому они были удалены из выборки. Окончательное выравнивание содержало 48 уникальных гаплотипов, включая 3 последовательности, полученные в данном исследовании. Методами ML и байесовского анализа были получены сходные деревья (Рисунок 4.2.2). Филогенетический анализ показал, что комплекс *D. ghilarovi* можно разделить на несколько клад. Два гаплотипа (R108 и KY711515), которые мы назвали Кладой I, представляли сестринскую группу по отношению к остальным *D. ghilarovi*. Это два серых экземпляра из заповедника Кедровая Падь (обозначены желтой точкой на карте): один из работы [Atopkin and Ganin, 2018], а другой найден нами.

Остальная часть дерева распалась на две большие клады. Одна из них (Клада II; красные точки на карте) включала преимущественно серые морфы, но также и коричневые, преимущественно с юга Приморского края. Другой (Клада III, зеленые и синие точки) был найден намного севернее. Клада III включала в себя коричневую, серую и черную морфы. Черные морфы на этом дереве представлены двумя ветвями (показаны черным цветом на рисунке 4.2.1). Базальные ветви в Кладе III были представлены коричневыми морфами, однако поддержка их положения была крайне слабой.

Для того, чтобы выяснить, существуют ли различия между тремя кладами *D. ghilarovi* на уровне ядерных геномов, были секвенированы библиотеки поли-А мРНК трех образцов, относящихся к трем вышеописанным кладам (Раздел 2.4.2). Всего было получено 17,5–19,5 М.п.н. single-end прочтений (Таблица 4.2.1). В качестве внешней группы был взят вид *D. calebi* из Индии, штат Одиша. Это довольно далекий родственник *D. ghilarovi*, но это был единственный вид рода *Drawida*, для которого были доступны транскриптомные данные. Данные для *D. calebi* содержали 48 М.п.н. paired-end ридов (24 М.п.н. + 24 М.п.н.). При помощи программы ProteinOrtho мы выявили 9174 ортогрупп (транскриптов), которые присутствовали во всех четырех образцах. Окончательный отфильтрованный набор данных включал 8990 ортогрупп. Как видно на рисунке 4.2.3,

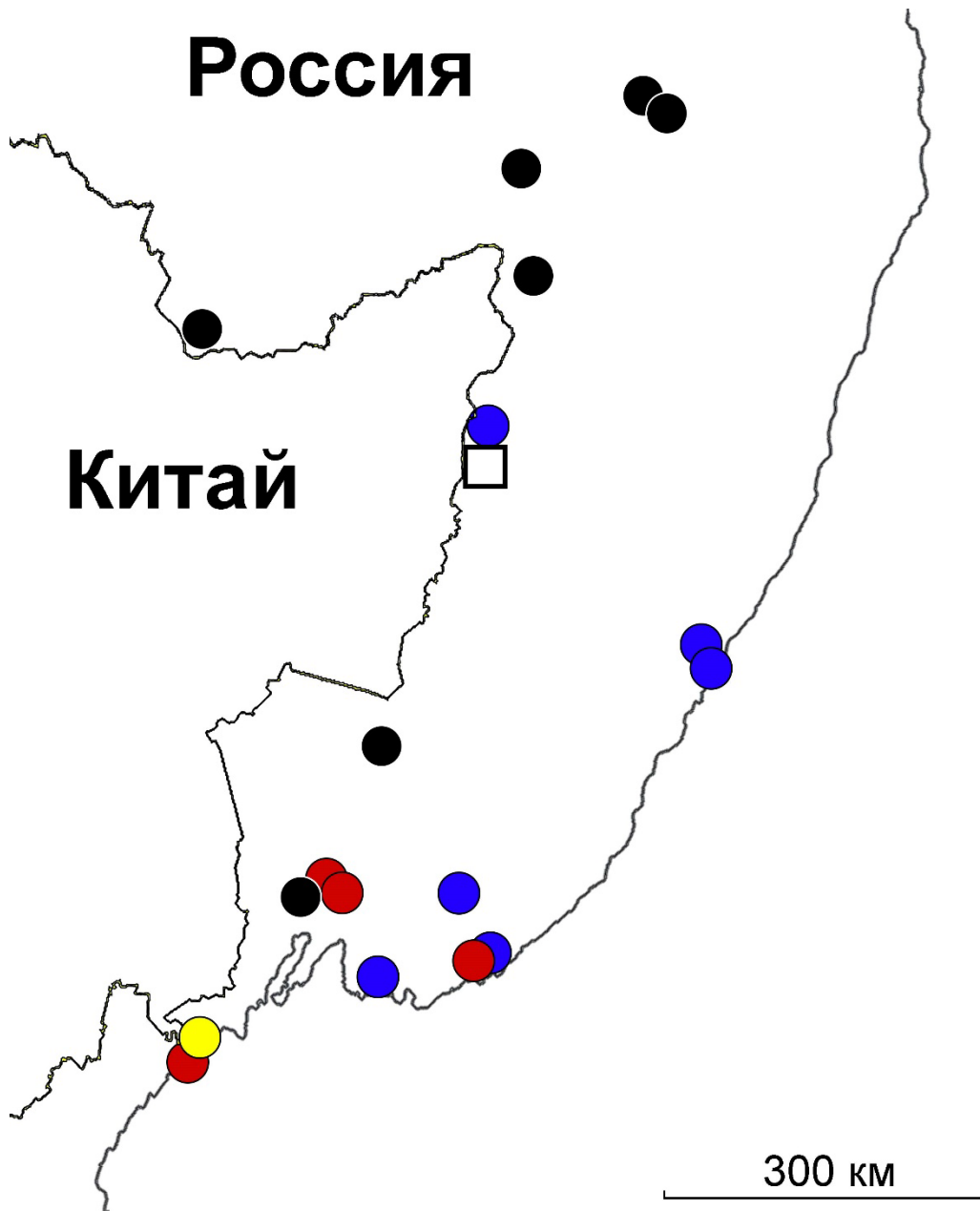


Рисунок 4.2.1. Распространение различных клад комплекса *D. giliarovi*. Различные кланды показаны точками разного цвета в соответствии с рисунком 4.2.2. Белым прямоугольником обозначен участок отбора проб в Хабаровском крае, желтой точкой - заповедник «Кедровая падь».

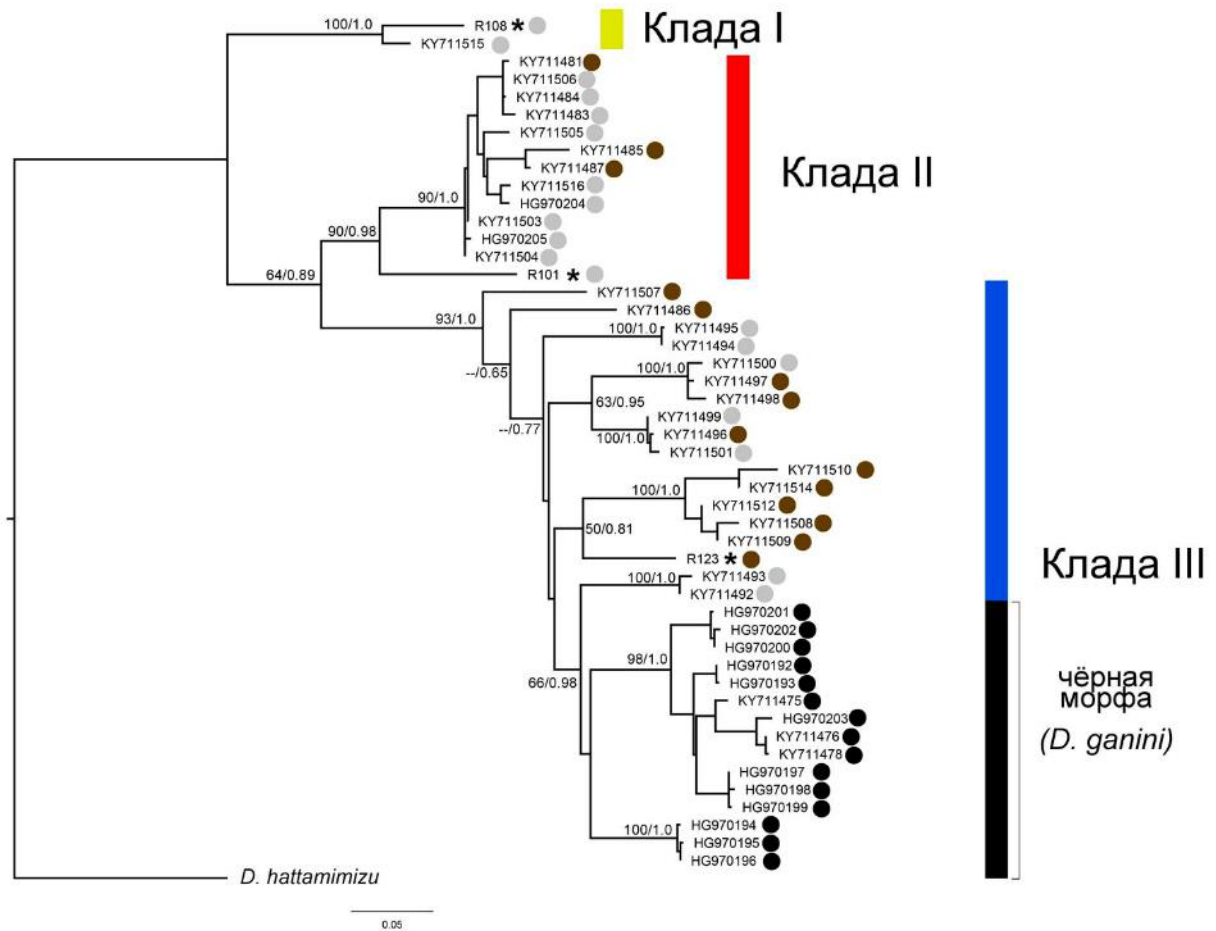


Рисунок 4.2.2. Филогенетическое дерево, построенное с использованием алгоритма ML для гена *cox1*. Цифры указывают бутстрепную поддержку ML / байесовские апостериорные вероятности. Цвета соответствуют точке на рисунке 4.2.1; две ветви Клады III, содержащие черные морфы (*D. ganini*), показаны черным. Серые, коричневые и черные точки обозначают цвет образца; звездочками указаны особи, взятые для транскриптомного анализа.

полученные транскрипты в основном присутствуют как у *D. ghilarovi*, так и у *D. calebi*, несмотря на их отдаленное родство. Суммарная длина выравнивания белков составляла 2 606 498 аминокислот, а выравнивания нуклеотидов - 11 164 195 п.н. (Таблица 4.2.1).

Количество нуклеотидных различий между кладами *D. ghilarovi* было довольно высоким (Таблица 4.3.2), что является свидетельством в пользу их давней дивергенции и возможности рассматривать их как отдельные виды. Из Таблицы видно, что между тремя изученными линиями наблюдается сходный уровень генетических расстояний.

В отличие от данных, полученных на основании митохондриального гена *cox1*, базальное положение на дереве занимала Клада III, в то время как Клада II была сестринской по отношению к Кладе I. Такая топология была поддержана как методом ML, так и байесовским анализом. Таким образом, филогенетические деревья, построенные при помощи *cox1*, не согласуются с транскриптомными данными.

Таким образом, согласно филогенетическому анализу, проведенному в этом исследовании, комплекс *D. ghilarovi* можно было бы разделить на три отдельных вида, соответствующих трем кладам, обнаруженным в этом исследовании. Однако мы считаем, что более глубокое изучение комплекса с участием большего количества экземпляров из разных мест необходимо для выяснения количества генетических клад и взаимосвязей между ними. Выделение цветковых морф в отдельные виды не соответствовало бы филогении вида и привело бы к полифилетическим или парафилетическим видам.

В недавней работе Y. F. Zhang et al. [2020] выделили часть комплекса *D. ghilarovi* в отдельный вид – *D. ganini*. Следует отметить, что существует некоторая путаница в отношении последовательностей, которые были указаны как принадлежащие *D. ganini* в работе Y. F. Zhang et al. [2020], но по-прежнему приведены под названием *D. ghilarovi* в базе данных GenBank. Согласно Y. F. Zhang et al. [2020], *D. ganini* включает только черные морфы, а *D. ghilarovi* – серые и коричневые. Таким образом, согласно филогенетическому анализу (Рисунок

4.2.1B), *D. ghilarovi* является парафилетичным по отношению к *D. ganini*. Более того, согласно нашему дереву, *D. ganini* полифилетичен (хотя эти результаты могут измениться на деревьях, построенных на основе большей выборки). Таким образом, выделение черных форм *D. ghilarovi* в отдельный вид *D. ganini* необоснован с филогенетической точки зрения. Мы предложили бы расширить этот вид, включив в него серые и коричневые морфы Клады III, обнаруженной в данной исследовании.

Поскольку морфы *D. ghilarovi* различаются по пигментации, мы предположили, что могут существовать различия в присутствии транскриптов, принадлежащих к пути биосинтеза порфиринов. Был проведен поиск генов пути биосинтеза порфиринов в транскриптомах четырех образцов *Drawida*, и во всех из них был обнаружен один и тот же набор генов этого пути.

Пигментация обычно не считается важным признаком в систематике дождевых червей. Однако в некоторых случаях она используется для различения близкородственных таксонов, например, *A. caliginosa* и *A. trapezoides* или *E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida* [Всеволодова-Перель, 1997; Csuzdi, Zicsi, 2003]. Хотя разные морфы *D. ghilarovi* также различаются по своим экологическим характеристикам [Ганин, 2013; и др., 2014], ни одна из трех морф не образовала отдельную филогенетическую ветвь (Рисунок 4.2.1).

Поскольку филогенетический анализ продемонстрировал несоответствие между митохондриальной и ядерной филогениями, было бы преждевременно делать выводы об исходной пигментации предков комплекса *D. ghilarovi* до тех пор, пока не будут изучены другие образцы. Предковое состояние Клады II было серым, в то время как текущие данные предполагают коричневую пигментацию предковых популяций для Клады III. Мы видим, что пигментация *D. ghilarovi* очень пластична с быстрым переключением между различными состояниями. Как показано в данной работе, сходная лабильность пигментации наблюдается у *A. caliginosa*, *D. schmidtii* и комплекса *E. nordenskioldi*.



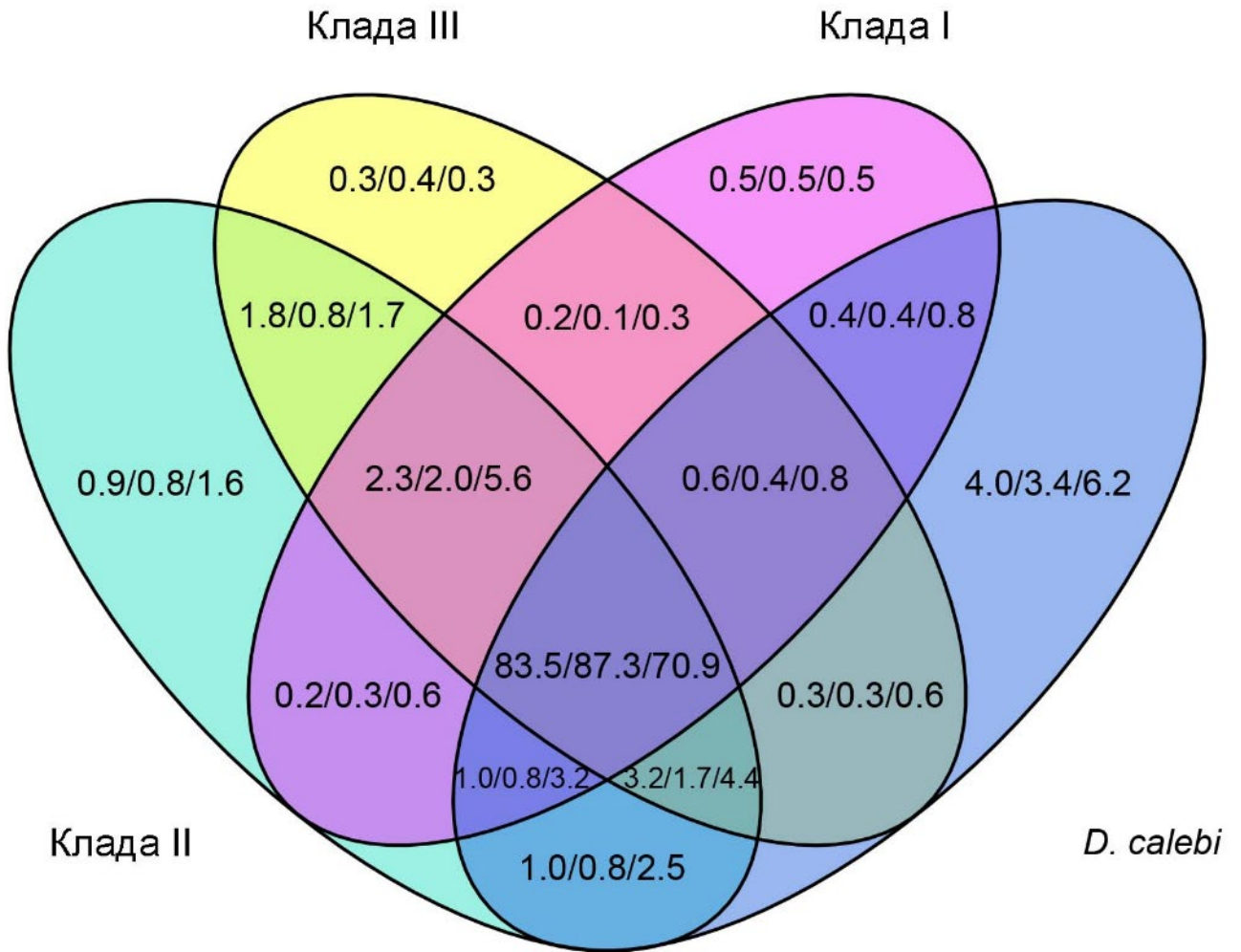


Рисунок 4.2.3. Перекрытие между идентифицированными белками из транскриптомов *D. ghilarovi* клад I, II и III и *D. calebi*, оцененное с помощью InterProscan. Числа указывают проценты согласно базе данных консервативных доменов (CDD) / pfam / Gene3D.

Таблица 4.2.1. Статистика собранных транскриптомов образцов рода *Drawida*. Совпадения с базами данных Gene3D, Pfam и CDD – количество транскриптов, которым была назначена функция в соответствующей базе данных.

	<b>R108</b>	<b>R101</b>	<b>R123</b>	<b><i>D. calebi</i></b>
	<b>(Клада I)</b>	<b>(Клада II)</b>	<b>(Клада III)</b>	
Кол-во ридов	18 510 637	19 593 579	17 506 499	24 113 689 *2
Кол-во 'генов' trinity	60 767	74 184	63 985	130 005
Кол-во транскриптов	76 313	104 735	84 871	305 835
N50	1 685	2 070	1 652	1 660
Всего оснований в сборке	72 395 864	108 844 408	79 044 558	299 531 977
Ортогрупп ProteinOrtho	17 754	18 481	18 538	15 067
Совпадений с Gene3D	22072	17939	19225	52421
Совпадений с Pfam	23310	19017	20051	52086
Совпадений с CDD	9124	7400	7645	19494

Таблица 4.2.2. Различия между выровненными наборами транскриптов *D. ghilarovi*. Над диагональю – р-дистанции для белкового выравнивания (в %), под диагональю – для нуклеотидного.

	Клада I	Клада II	Клада III	<i>D. calebi</i>
Клада I	-	1.9	2.1	18.5
Клада II	4.9	-	2.0	18.5
Клада III	5.1	5.1	-	18.6
<i>D. calebi</i>	35.2	35.2	35.2	-

При этом отличие *D. ghilarovi* от вышеупомянутых таксонов состоит в том, что различия в пигментации, по-видимому, обусловлены использованием разных пигментов, а не только изменением степени интенсивности одного из них. Считается, что пигменты, придающие дождевым червям коричневую или пурпурную окраску, принадлежат к порфиринам [Laverack, 1960; 1963]. Мы наблюдали, что у коричневых образцов *D. ghilarovi* пигмент мигрирует в хлороформную фазу во время экстракции, однако у серых он остается в водной фазе, поэтому, вероятно, он имеет совершенно другую химическую структуру. Мы обнаружили, что все гены, связанные с метаболизмом порфиринов, экспрессируются во всех морфах *D. ghilarovi* независимо от наличия коричневой окраски. Это говорит о том, что они могут быть использованы для других процессов, не связанных с пигментацией. Связь состояния пигментации с экологическими характеристиками пока неизвестна, но, по-видимому, существует на основе экологических различий [Ганин, 2013; Ганин и др., 2014].

Дальний Восток России является самой северной границей распространения Moniligastridae, и это видно из филогеографических закономерностей (Рисунок 4.2.1). Популяции, принадлежащие к Кладам I и II, встречаются только на самом юге региона (показаны желтыми и красными точками на рисунке 4.2.1). Только Клада III смогла расселиться на север, причем в Хабаровском крае и Еврейской автономной области встречаются большей частью черная морфа. Таким образом, генетическое разнообразие комплекса намного выше на юге по сравнению с севером, что указывает на относительно недавнее распространение на север. *D. ghilarovi* – единственный вид рода *Drawida*, приуроченного к Восточной и Южной Азии, который присутствует в России. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что российские популяции *D. ghilarovi* являются результатом относительно недавнего расселения на север, а ареал его представляет собой северную границу как для рода *Drawida*, так и для семейства Moniligastridae на Дальнем Востоке.

### 4.3 Заключение

Мы изучили генетическое разнообразие двух видов дождевых червей, эндемичных для разных регионов России, кавказского вида *Dendrobaena schmidtii* и дальневосточного *Drawida ghilarovi*. Мы показали (в случае *D. ghilarovi* – подтвердили данные Ганина и Атопкина [Atopkin, Ganin, 2015; Ganin, Atopkin, 2018] при помощи транскриптомных данных), что каждый из этих видов состоит из множества генетически различных групп. Для обоих видов была известна и большая морфологическая изменчивость, которая ранее рассматривалась как формы. Таким образом, мы получили картину, сходную с таковой у *E. nordenskioldi*, но в меньшем масштабе. Наблюдаемые глубокие генетические расстояния между обнаруженными филогенетическими линиями изучаемых видов и значительные генетические различия между популяциями в этих линиях подчеркивают древность эндемичных видов дождевых червей, обитающих на территории России.

Таким образом, работа, проведенная нами на дождевых червях России показала, что для этой группы характерно присутствие скрытой генетической изменчивости, представленной в виде так называемых филогенетических линий, которые во многих случаях представляют собой виды-двойники. Сходные результаты получены многими зарубежными исследователями (Раздел 1.4.1). Подобные феномены встречаются и среди других групп почвенной фауны. Так, анализ опубликованных данных показал, что среди энхитреид такие случаи весьма часты [De Wit, Erséus, 2010; Martinsson, Erséus, 2014, 2018b; Martinsson et al., 2015; Klinth et al., 2017; Schmelz et al., 2017; Erséus et al., 2019; Nagy et al., 2020]. Скрытая генетическая изменчивость также считается правилом у различных представителей Myriapoda [Joshi, Karanth, 2012; Joshi, Edgecombe, 2013, 2018; Oeyen et al., 2014; Del Latte, 2015; Wesener et al., 2015, 2016; Voigtländer et al., 2017; Garrick et al., 2018; Edgecombe, Giribet, 2019]. Следует отметить, что многоножки имеют много большее, чем у дождевых червей, количество морфологических признаков, в связи с чем эту изменчивость часто называют «псевдокриптической», имея в виду, что

найденные линии могут быть разделены детальным морфологическим анализом [Voigtländer et al., 2017; Edgcombe, Giribet, 2019]. Нередко скрытая изменчивость встречается также у коллембол [Porco et al., 2012; Cicconardi et al., 2013; Katz et al., 2015; von Saltzwedel et al., 2017; Zhang et al., 2018; Striuchkova et al., 2022].

По прочим группам почвенной фауны работ относительно немного, однако есть сообщения о криптических видах почвенных нематод [Olson, 2015; Clavero-Camacho et al., 2022; Hosseinvand et al., 2022], орибатидных клещей [Schäffer et al., 2010; Young et al., 2019; Yin et al., 2022], изопод [Hutchins, Drukker, 2016; Yoshino, Kubota, 2022], стафилинид [Pérez-Delgado et al., 2022].

В целом, можно сказать, что скрытая генетическая изменчивость, выраженность филогенетических линий и распространенность видов-двойников имеет место во многих группах почвенной фауны, но в разной степени. С одной стороны, многие таксоны изучены довольно слабо, особенно с точки зрения анализа разнообразия внутри популяций и видов, поэтому можно предполагать, что эту изменчивость пока еще просто не нашли. С другой стороны, ситуация, характерная именно для дождевых червей, когда в одной популяции находят сразу несколько симпатрично обитающих филогенетических линий (как это было обнаружено в первой же работе подобного рода на дождевых червях [King et al., 2008]), встречается среди других групп не слишком часто [Porco et al., 2012; Wesener et al., 2015; Striuchkova et al., 2022]. По нашему мнению, в случае кольчатых червей (дождевых червей и энхитреид) можно говорить о закономерностях генетической изменчивости, характерных именно для этой группы.

## Глава 5. Перегринные виды

### 5.1 *Aporrectodea caliginosa*

#### 5.1.1 Филогеография *A. caliginosa* в России

*A. caliginosa* – один из основных (в отношении распространённости, ареала и численности) перегринных видов дождевых червей в России. В связи с этим, мы изучили его филогеографию на основе изменчивости митохондриального гена *cox1*. Авторы, работавшие с этим видом, отмечали его высокую генетическую изменчивость (Раздел 1.5.5). Здесь мы пользуемся обозначениями, принятыми D. Porco et al. [2013], разделившим *A. caliginosa* на три филогенетические линии.

Для анализа распределения филогенетических линий *A. caliginosa* на территории России и сопредельных государств было взято 559 образцов из 49 популяций (Рисунок 5.1.1.1). Для всех образцов получены последовательности митохондриального гена *cox1*. Мы провели идентификацию филогенетических линий в соответствии с работой D. Porco et al. [2013]. В изученной выборке 460 особей принадлежали к филогенетической линии 2, а 90 – к линии 3 этого вида. Оставшиеся 9 образцов, как оказалось, относились к *A. trapezoides*. Так как M. Pérez-Losada et al. [2009] и R. Fernández et al. [2012] отнесли *A. longa* к комплексу *A. caliginosa*, мы также прогенотипировали два образца этого червя из окрестностей Омска и Краснокамска (Рисунок 5.1.1.2).

Показано, что две филогенетические линии *A. caliginosa* были распределены по изученной территории неравномерно. Линия 2 составляет большинство (83,6%) образцов вида. Она распространена по всей изучаемой территории (на Камчатке нами была найдена только линия 3, однако делать заключение по единственной точке, очевидно нельзя). Генетическое разнообразие линии 2 высоко на протяжении всего ареала (Рисунок 5.1.1.3).

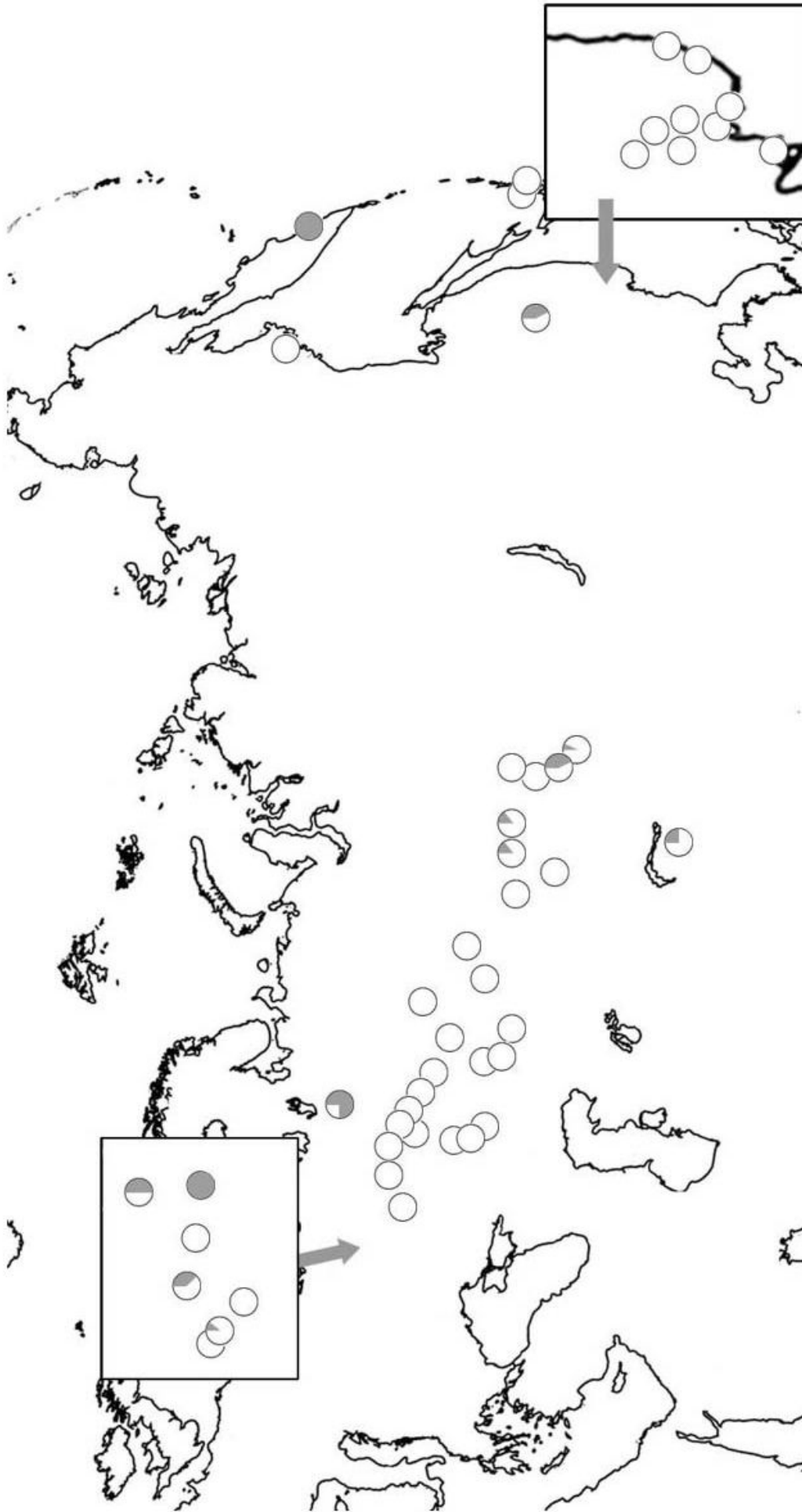


Рисунок 5.1.1.1. Точки сбора образцов *A. caliginosa*. Белым цветом показана филогенетическая линия 2, серым – линия

3. Площади секторов пропорциональны соотношению числа образцов

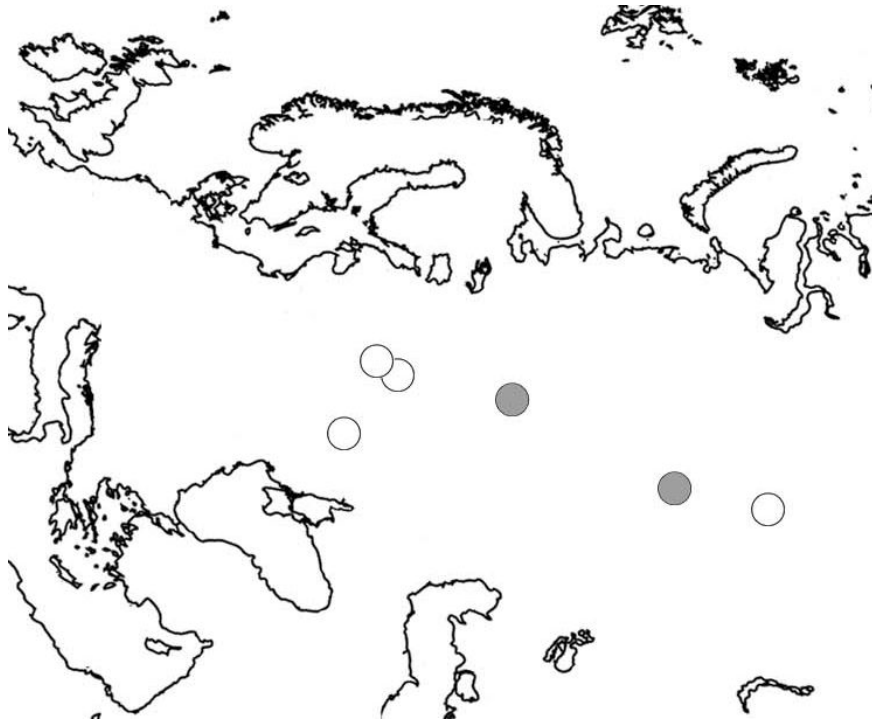


Рисунок 5.1.1.2. Точки сбора *A. trapezoides* (белые кружки) и *A. longa* (серые кружки)

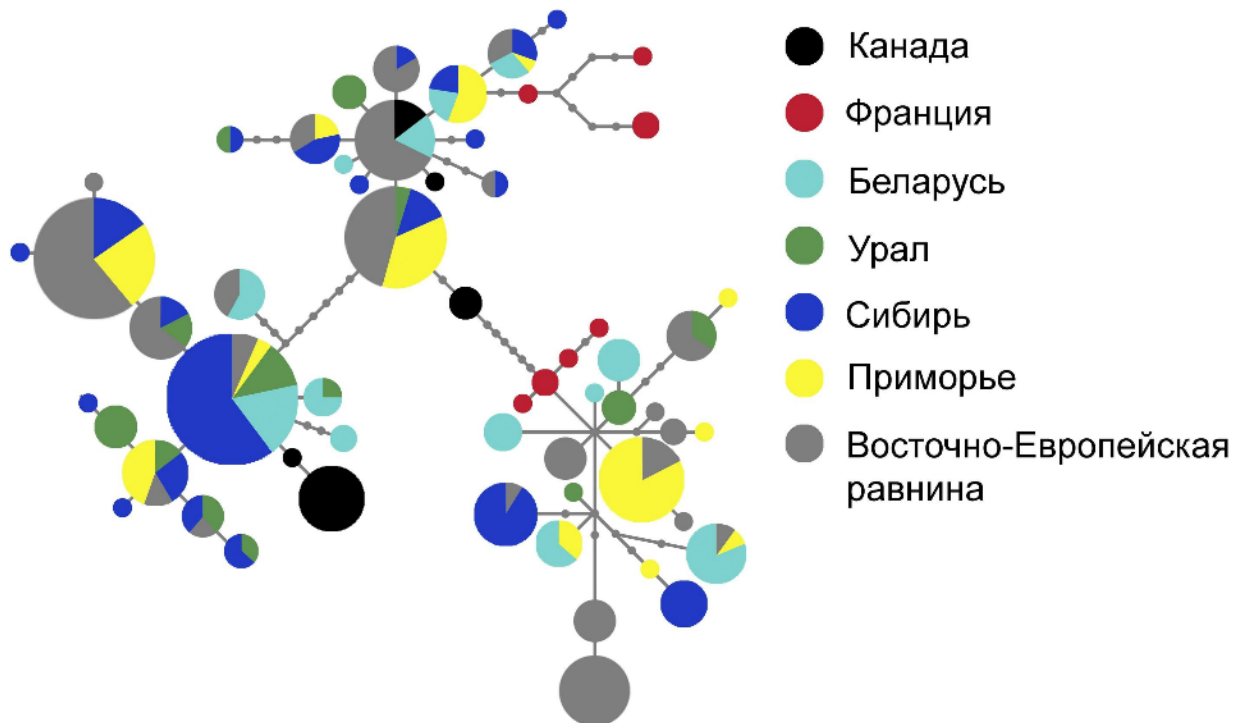


Рисунок 5.1.1.3. Сеть гаплотипов линии 2 *A. caliginosa*. Гаплотипы из различных регионов отмечены цветом; размер кружка пропорционален количеству образцов, имеющих данный гаплотип; точки обозначают отсутствующие гаплотипы



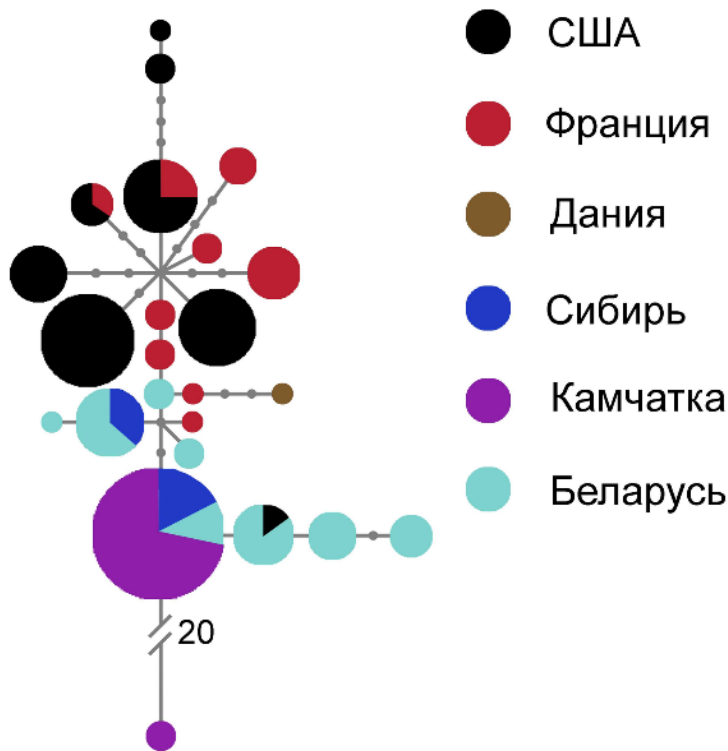


Рисунок 5.1.1.4. Сеть гаплотипов линии 3 *A. caliginosa*. Гаплотипы из различных регионов отмечены цветом; размер кружка пропорционален количеству образцов, имеющих данный гаплотип; точки обозначают отсутствующие гаплотипы

Таблица 5.1.1.1. Генетическое разнообразие выборок представителей комплекса *A. caliginosa*. N – число образцов, n – число гаплотипов, s – число полиморфных сайтов, h (SD) – гаплотипическое разнообразие (стандартное отклонение), pi (SD) – нуклеотидное разнообразие (стандартное отклонение).

	N	n	s	h (SD)	pi (SD)
<i>A. caliginosa</i> L2	460	50	57	0,940 (0,005)	0,01267 (0,0065)
<i>A. caliginosa</i> L3	90	10	30	0,755 (0,033)	0,0036 (0,0022)
<i>A. trapezoides</i> L1	9	1	-	-	-
<i>A. longa</i>	2	1	-	-	-

В отличие от линии 2, линия 3 встречалась значительно реже и составляла лишь 16,4% от общей численности. Ареал ее также заметно меньше, чем линии 2: видно (Рисунок 5.1.1.1), что линия 3 собрана большей частью на периферии ареала. Более того, в пределах каждой из проанализированных точек сбора (за исключением Петропавловска-Камчатского) линия 3 встречалась совместно с линией 2. Показатели генетической изменчивости линии 3 заметно ниже (Рисунок 5.1.1.4, Таблица 5.1.1.1) и притом заметно снижаются с запада на восток. Так, в Беларуси выявлено в общей сложности восемь гаплотипов, тогда как во всей азиатской части России – всего три.

Отчасти эти различия можно объяснить тем, что большая часть образцов собрана в восточных районах, где филогенетическая линия 3 редка, и большой численной разницей между проанализированными образцами двух линий. Чтобы сделать поправку на этот факт, мы также проанализировали выборку, включающую в себя наряду полученными нами последовательностями еще и материалы зарубежных исследователей. Эта выборка включала в себя 496 последовательностей филогенетической линии 2 и 180 последовательностей филогенетической линии 3 (отнесение к линиям было проведено нами на прошлом этапе на основе секвенирования гена *cox1*). Включение в выборки последовательностей из зарубежных популяций существенно не изменило соотношение генетической изменчивости линий.

Так, параметр  $\tau$ , получаемый при анализе попарных замен и оценивающий время дивергенции между выборками, для полной выборки линии 2, включавшей в себя и все доступные зарубежные образцы, составлял 11,889 (интервал 95% вероятности, 5,990 – 15,543), а для линии 3 – 3,988 (1,750 – 5,352). Значения этого параметра пропорциональны возрасту линий. Если принять оценку скорости молекулярных часов равной 2,4% на нуклеотид на миллион лет [Fernández et al., 2012], а срок жизни поколения – 2 годам [Шашков, 2016], то время дивергенции разных популяций линии 2 можно оценить как 753 тыс. лет (379 – 984 тыс. лет), линии 3 – 253 тыс. лет (111 – 339 тыс. лет).

Полученные результаты можно объяснить следующим образом. *A. caliginosa*, как и другие перелетные виды, расселялась по территории Палеарктики из предполагаемого рефугиума на юге Западной Европы [Hendrix et al., 2008]. При этом обе линии расширяли свой ареал примерно в равной степени, однако по неизвестным причинам (случайные отклонения в численности основателей или экологические различия между линиями) линия 3 претерпела более сильное уменьшение численности расселяемых особей и, как следствие, сокращение генетического разнообразия.

По мере удаления от исходного ареала эффект основателя становится всё более выраженным, и на Восточно-Европейскую равнину сумела проникнуть только линия 2. Вклад человека в распространение *A. caliginosa* на данном этапе невозможно отличить от естественной реколонизации, так как оно шло с небольшой скоростью. Изменения путей расселения червей произошло, видимо, лишь в конце XIX века с распространением механизированного транспорта и возможностью быстрого переноса дождевых червей на дальние расстояния. Появление в Западной Сибири линии 3, отсутствующей на Восточно-Европейской равнине, очевиднее всего объясняется её привнесением из отдалённых регионов вместе с переселенцами с запада Российской империи на ранее не заселённые этим видом земли. На территории Восточно-Европейской равнины *A. caliginosa* уже присутствовала, и, хотя перенос на дальние расстояния также происходил, занесённые особи заметно не меняли генетический пул уже обитающих там популяций.

Последовательности *cox1* девяти образцов из четырех точек (Рисунок 5.4.1.2) оказались идентичны одному из гаплотипов *A. trapezoides* из работы R. Fernández et al. [2011a], а именно клону 8, относящемуся к филогенетической линии 1, группе С. Линия 1, в отличие от линии 2 этого подвида, по мнению авторов [Fernández et al., 2011a] имеет евросибирский ареал, а группа С была обнаружена на юге Франции и в Польше. Для этой линии характерно высокое генетическое разнообразие, в то время как в нашей выборке, несмотря на заметное расстояние между географическими точками, был обнаружен лишь один вариант

последовательности *cox1*. Сказанное может свидетельствовать о том, что при расселении *A. trapezoides* на восток происходило заметное уменьшение генетического разнообразия, аналогично выявленному нами для линии 3 *A. caliginosa*.

У всех червей, отнесенных нами к *A. trapezoides* на основании последовательностей гена *cox1*, отсутствовала пигментация. Более того, во всех случаях особи обоих подвидов были обнаружены симпатрично и никаких морфологических различий между собой не имели. Присутствие гаплотипов *A. trapezoides* могло означать как действительную симпатрию двух видов (*A. caliginosa* / *A. trapezoides*), так и интрогрессию мтДНК от одного подвида к другому (случай предполагаемой гибридизации между видами и отсутствия различий между ядерными геномами при сильно различающихся мтДНК встречаются нередко [Giska et al., 2015; Martinsson et al., 2017b]). Заметим, что *A. trapezoides* является партеногенетичным, в отличие от *A. caliginosa* [Omodeo, 1952; Гарбар и др., 2007], но между различными его популяциями степень развития половой системы может варьировать от практически полноценной до полностью дегенерировавшей [Fernández et al., 2011b]. Таким образом, вероятность хотя бы редкого обмена генами в прошлом исключить нельзя. Интрогрессия могла бы также объяснить полное сходство их морфологии.

Для проверки этой гипотезы мы просеквенировали ядерные последовательности гена гистона H3 у некоторых образцов и обнаружили, что идентификация по мтДНК совпадает с таковой по ядерным генам. Таким образом, непигментированный *A. trapezoides* действительно встречается симпатрично с линией 2 *A. caliginosa*. Кроме того, найденные нами на площадке возле теплиц ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск) представители этого вида – первая его находка в Сибири.

Оба прогенотипированных образца *A. longa* имели идентичные последовательности *cox1*, которые относились к линии 1 этого вида, известной из Европы. Известно, что эта линия имеет значительно более ограниченное распространение по сравнению с линией 2, и была до сих пор обнаружена лишь

в Великобритании, Норвегии, Швеции и Канаде. Таким образом, наши данные заметно расширяют ее ареал.

Наиболее актуальной на данный момент сводкой по дождевым червям России можно, безусловно, назвать монографию «Дождевые черви фауны России: кадастр и определитель» [Всеволодова-Перель, 1997]. В ней *A. caliginosa* в Западной Сибири отнесена к синантропным видам, который встречен лишь в немногих точках. Прочие члены комплекса не отмечены ни в Западной Сибири, ни на Урале. В настоящее время *A. caliginosa* на юге Западной Сибири – один из самых распространенных дождевых червей вблизи больших городов, где обычен не только на полях и в огородах, но и во многих естественных биотопах. Сказанное позволяет предполагать существенное расширение ареалов всех представителей комплекса на восток. Представить себе, что эти банальные и, как правило, массовые виды ранее были пропущены исследователями, весьма трудно, однако исключать эту возможность не следует, поскольку число исследователей (и, соответственно, число публикаций) по Сибири в целом невелико.

Таким образом, известный ранее ареал представителей комплекса *A. caliginosa* заметно расширен. В ряду «*A. caliginosa* линия 2 – *A. caliginosa* линия 3 – *A. trapezoides*» наблюдается уменьшение и генетического разнообразия, и частоты их встречаемости. Конечно, малый объем выборки обуславливает сокращение генетического разнообразия. Тем не менее, можно предполагать, что именно различие в числе успешных событий интродукции привело к наблюдаемой разнице во встречаемости представителей комплекса и в их генетическом разнообразии.

### **5.1.2 Морфологические различия между филогенетическими линиями *A. caliginosa***

Известно, что многие перелетные виды, хорошо всем известные и изученные, в том числе из-за своего практического значения, оказались комплексами из нескольких филогенетических линий [King et al., 2008; Marchán et

al., 2018]. Это верно и для *A. caliginosa*, у которого известно три линии [Porco et al., 2016]. В проведённой работе мы исследовали морфологические различия между выборками из трёх линий *A. caliginosa*, собранных на территории Республики Беларусь (Рисунок 5.1.2.1). Образцы из Беларуси были выбраны потому, что в этой стране генетическое разнообразие этого вида гораздо выше, чем в России (см. выше).

Определение проводили по ключу Т. С. Всеволодовой-Перель [1997]. Особей с отклонениями от типичного диагноза (Таблица 5.1.2.1) брали для дальнейшего анализа. Для этих образцов проводилось измерение длины и ширины тела, длины и ширины пояска, числа сегментов, оценивалась окраска. Размеры измеряли с точностью до 0,5 мм; положение пояска – до  $\frac{1}{4}$  сегмента.

Вся взятая выборка из Беларуси включала 251 взрослую особь с полностью развитым пояском. Морфометрия и секвенирование гена *cox1* проводилось для выборки из 59 особей (Таблица 5.1.2.1).

Опубликованные диагнозы различных видов дождевых червей обычно дают чёткие границы признаков и опускают «выпадающие» варианты, которые у этой группы могут составлять значительную часть популяции. Кроме того, диагнозы видов различаются у разных авторов. Так, в наиболее авторитетном отечественном источнике, определителе Т. С. Всеволодовой-Перель [1997], указано, что поясок находится на сегментах 27 – 34/35. У других авторов указан более широкий диагноз, например, 25/26/(29) – 34/35 у С. Csuzdi и А. Zicsi [2003]. В нашей выборке были найдены особи, у которых поясок начинался на 27ом, 28ом и 29ом сегментах; конец пояска был зарегистрирован на сегментах 33 и 34. В российской выборке *A. caliginosa* мы также находили особей, у которых поясок занимал сегменты 26–32 (раздел 5.1.1).

Таким образом, можно утверждать, что положение пояска варьирует в пределах 25/26/27/28/29 – 32/33/34/35. Отчасти эту изменчивость можно объяснить тем, что размах пояска зависит от репродуктивного цикла: во время максимального развития пояска он может напозать на прилегающие сегменты.

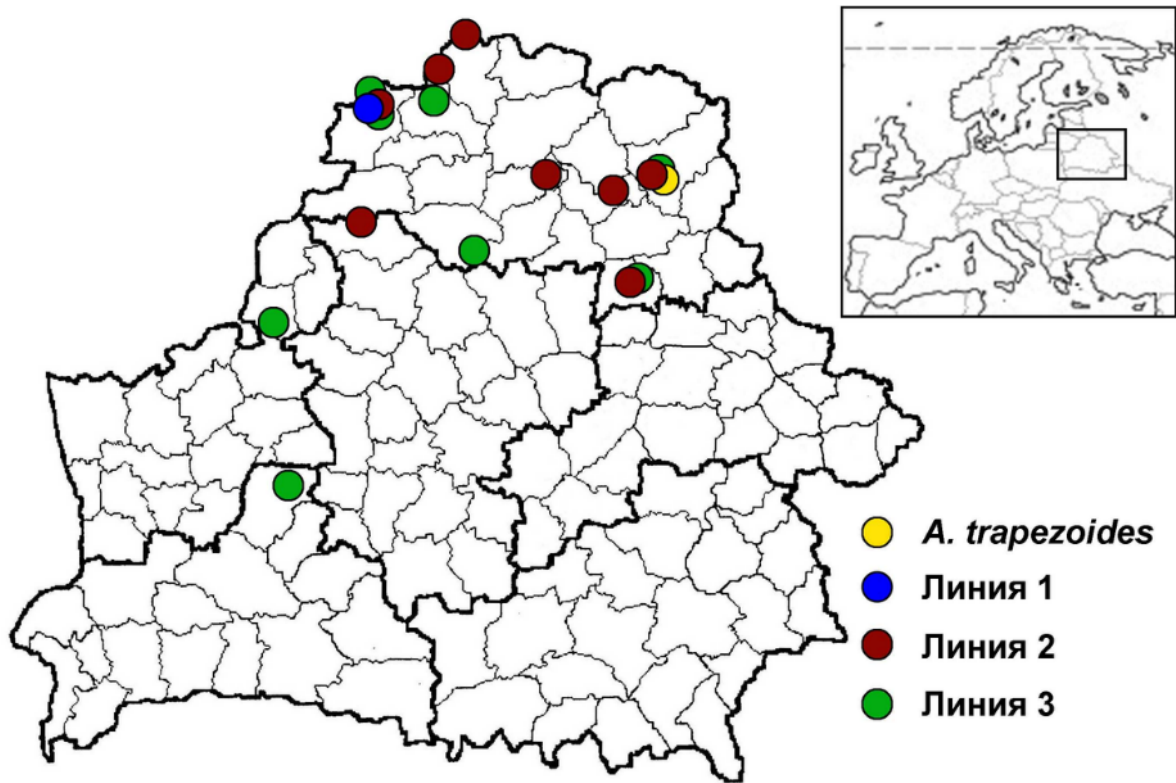


Рисунок 5.1.2.1 Точки сбора образцов *A. caliginosa*



Рисунок 5.1.2.2. Изменчивость окраски *A. caliginosa*

Таблица 5.1.2.1. Морфометрия выборки *A. caliginosa*. Nseg – число сегментов, L – длина тела, W – диаметр тела, CS – начало пояска, SE – конец пояска, CL – длина пояска, CW – ширина пояска, ПВ – пубертатные валики.

Пигментация	Nseg	L	W	CS	SE	CL	CW	ПВ
<b>Линия 1</b>								
отсутствует	92	41	2	28	34,25	3	3	
-//-	111	55	2,5	28	34	3,5	3	
-//-	108	46	2	28	34,25	3,5	3	
-//-	106	52	2	28,5	34,25	3,5	3	
-//-	121	74	2,5	28,75	34,25	4	3,5	
-//-	114	51	2	28,75	34,25	3,5	3	
желтовато-бурая, заходит за поясок	120	36	2	28,75	34,25	3,5	3	
среднее:	110,3	50,7	2,1	28,4	34,2	3,5	3,1	
<b>Линия 2</b>								
отсутствует	157	62	4	27	35	4,5	4,5	
-//-	158	68	4	27	35	5	5	
-//-	150	81	4	27,5	35	5,5	5	
красно-оранжевая, не заходит за поясок	144	59	3	29	34,25	4	3,5	



-//-	111	47	3	27,75	34,25	4	4
-//-	177	69	4	27,75	34	4	5
-//-	130	78	3,5	28	34	5	4
-//-	161	71	4	28	34,25	5	4,5
-//-	141	67	3,5	28	34,25	5	4
-//-	149	67	3,5	28	34,25	5	4
-//-	170	61	3,5	27,75	34	4	4
-//-	155	73	3,5	27,75	34	5	4
-//-	167	71	3,5	27,5	34	5,5	4
-//-	139	56	3,5	28	35	4	4
красно-оранжевая, заходит за поясok	173	83	5	27	34,25	5	5,5
бурая, не заходит за поясок	155	61	3	28	34,25	4	4
-//-	167	69	3	28	35	4	4
бурая, заходит за поясok	164	73	4	28	34,25	5	5
-//-	151	62	4	27	34	4	5
-//-	128	59	5	28	34	4	5
-//-	160	58	4	28	34,25	4	4,5
среднее:	152,7	66,4	3,7	27,8	34,3	4,5	4,4

**Линия 3**

отсутствует	133	51	2,5	28	34	4	3	
-/-	114	69	3	28,75	34	4,5	4	ПВ в виде ВАЛИКОВ
-/-	126	66	3	28,75	34,25	5	4	
-/-	131	71	3	28,75	34,25	4,5	4	
-/-	123	65	3	28,75	34,25	4	3,5	
-/-	130	46	2,5	29	35	3	3	ПВ 32-34
-/-	133	55	3	27,75	34	4	4	
-/-	138	54	3	29	34,25	4	3,5	
-/-	125	55	3	28	34	4,5	3,5	
-/-	130	50	2,5	28	34	4	3	
-/-	158	58	3	27,5	34,5	4	3,5	
-/-	156	77	3	28,5	34,5	5	4	ПВ в виде ВАЛИКОВ
-/-	130	42	2	29	34	3	3	
-/-	134	39	2,5	29	34	3	3	
-/-	132	38	3	27	37	3,5	3,5	ПВ 30-32
красно-оранжевая, не заходит за поясок	163	53	3	28,75	34,25	3,5	4	

-//-	147	47	2,5	28,75	34	4	3
-//-	150	49	3	28,75	34	4	4
-//-	147	46	3	28,75	34	4	4
желтовато-бурая, не заходит за пояс	131	71	3,5	28,5	34,5	4	4
-//-	137	52	3	28,75	34,25	4	3,5
-//-	139	52	3	28,5	35	4,5	4
-//-	118	51	3	28	34,25	4	4
-//-	166	56	3	28,5	34,5	4	4
-//-	144	55	3	28,5	34,5	4,5	4
-//-	143	47	3	28,75	34	3,5	4
-//-	136	46	3	28,75	34	3	4
желтовато-бурая, заходит за пояс	131	78	3	28,5	34,5	5	4
серо-коричневая, заходит за пояс	142	68	3,5	28	34,25	4	4
бурая, заходит за пояс	124	46	2	28	35	3,5	3
среднее:	137,0	55,1	2,9	28,5	34,4	4,0	3,7
<i>A. trapezoides</i>							
бурая, заходит за пояс	165	80	4	27	35	5,5	5

Таблица 5.2.1.2 Значения статистической достоверности t-теста Уэлча при попарном сравнении выборок разных линий *A. caliginosa*. L1 – линия 1; L2 – линия 2; L3 – линия 3.

	L1 – L2	L1 – L3	L2 – L3
Длина тела	<0,05	-	<0,001
Диаметр тела	<0,001	<0,001	<0,001
Число сегментов	<0,001	<0,001	<0,001
Начало пояска	<0,01	-	<0,001
Конец пояска	-	-	-
Длина пояска	<0,001	<0,01	<0,01
Ширина пояска	<0,001	<0,001	<0,001

Положение пубертатных валиков оказалось более постоянным признаком. Сдвиг их положения был обнаружен только у двух образцов, у которых вместо их расположения на сегментах 31–33 были найдены варианты 30–32 и 32–34. Форма пубертатных валиков – также важный признак, отличающий *A. caliginosa* от близкородственного *A. trapezoides* (наряду с пигментацией). У подавляющей части выборки пубертатные валики были представлены в виде бугорков, типичных для *A. caliginosa*. В то же время у двух особей они имели вид валиков, как у *A. trapezoides*.

Окраска тела – также важный признак для комплекса: *A. caliginosa* отличается от *A. trapezoides* отсутствием пигментации. Хотя большая часть выборки была непигментированной, были также обнаружены особи с буроватой, желтоватой или красноватой окраской (Рисунок 5.1.2.2). Некоторые особи были похожи по окраске на *A. trapezoides* или *A. nocturna*. При этом сравнение последовательностей гена *cox1* с имеющимися данными определило большинство из них как *A. caliginosa*. Однако одна особь оказалась представителем *A. trapezoides*. Таким образом, это первый случай нахождения этого вида в республике Беларусь [Максимова, Гурина, 2014].

Как видно из вышеприведённых данных, морфологическая изменчивость у *A. caliginosa* высокая, и многие из особей изученной выборки могли быть определены как *A. trapezoides* или *A. nocturna* на основании только внешних признаков. Как уже было сказано, *A. trapezoides* отличается от *A. caliginosa* бурой окраской и формой пубертатных валиков (валики вместо бугорков [Всеволодова-Перель, 1997]). *A. nocturna* – червь, относящийся к собственно почвенной группе, отличается от *A. caliginosa* крупными размерами и тёмно-бурой (пурпурной) пигментацией [Sims, Gerard, 1985]. Размер червей, однако, варьирует в значительных пределах, и некоторые образцы в нашей выборке были близки к нижнему пределу размеров *A. nocturna*. Более того, особь с пубертатными валиками, располагающимися на сегментах 30–32 могла быть определена как уральский эндемик *Eisenia uralensis* [Всеволодова-Перель, 1997]. Можно заключить, что на точность определения и количество видов при фаунистическом

учёте может сильно влиять внутривидовой полиморфизм. Таким образом, для разрешения спорных вопросов требуется анализ ДНК.

Проведенное нами секвенирование гена *cox1* показало, что в изученной выборке присутствовали представители всех трёх филогенетических линий *A. caliginosa*. Сравнив выборки этих линий при помощи теста Уэлча, мы обнаружили, что различные линии имеют тенденции к морфологическим отклонениям в разных направлениях. Так, особи линии 1 были значительно меньше, чем линий 2 и 3, имели меньшее число сегментов и более короткий поясок (Таблица 5.1.2.2). Только одна особь, относящаяся к линии 1, имела пигментацию. Особи филогенетической линии 2 были самыми крупными из всех трёх линий, а поясок у них начинался раньше, по сравнению с линией 3 – на  $\frac{3}{4}$  сегмента. Интересно, что начало пояска является варибельным признаком, различающим линии, а его конец – нет.

Следует отметить, что наша выборка была собрана из множества точек, а такие признаки, как размер и окраска, как считается, в большой степени зависят от факторов среды, так что для строгой верификации этих выводов требуются лабораторные эксперименты в контролируемых условиях. С другой стороны, именно генетические различия между линиями могут обуславливать их приуроченность к разным местообитаниям.

*A. caliginosa* – один из видов дождевых червей, которые наиболее часто используются в экологических и экотоксикологических работах [Brown et al., 2014; Bart et al., 2018]. При этом практически никогда не указывают, какая именно линия используется в работе. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что генетические различия между филогенетическими линиями проявляются и на морфологическом уровне, однако ни один из признаков не может быть использован для чёткого морфологического различения линий. Таким образом, работы, проведённые на разных филогенетических линиях, могут быть несравнимы напрямую, и для последующих исследований следует рекомендовать выявлять генетическую принадлежность тестируемых популяций.

## 5.2 *Aporrectodea rosea*

В работе был использован 191 образец *A. rosea* из различных точек России, Беларуси и Казахстана (Рисунок 5.2.1). Было обнаружено 19 гаплотипов *cox1*, 210 полиморфных сайтов с 274 наблюдаемыми заменами. Большинство из выявленных гаплотипов уже известны по образцам из Западной Европы. Для систематизации гаплотипов была принята следующая номенклатура: в соответствии с R. Fernández et al. [2015], выделяли евросибирскую и средиземноморскую филогенетические линии *A. rosea*. Линии 1, 2, 3, 4 евросибирской линии, описанные в статье D. Porco et al. [2013], были обозначены как E1-E4. В нашей выборке присутствовали все линии, кроме E3, а также еще две, обозначенные нами как E5 и E6. Каждый гаплотип обозначался как номер линии-номер гаплотипа, например, E2-1 - евросибирская группа, линия 2, гаплотип 1. Мы не обнаружили гаплотипов средиземноморской линии в нашей выборке, однако часть образцов из Беларуси (точки 2 и 4) были лишь отдаленными родственниками евросибирской группы. Чтобы подчеркнуть их значение, они обозначены здесь как N-1 – N-5.

Мы также просеквенировали фрагмент гена гистона H3 для 160 образцов из выборки. Было найдено 13 генотипов H3, 31 полиморфный сайт с 34 различными заменами. Во многих позициях секвенограмм оказались вырожденные нуклеотиды, которые, по-видимому, отражают соотношения различных нуклеотидов в кластере генов гистонов. Каждому генотипу H3 было присвоено то же название, что и соответствующему гаплотипу *cox1* (Таблица 5.2.1). В случае, если одному гаплотипу *cox1* соответствовало несколько генотипов H3, к названию были добавлены буквы (a, b, c).

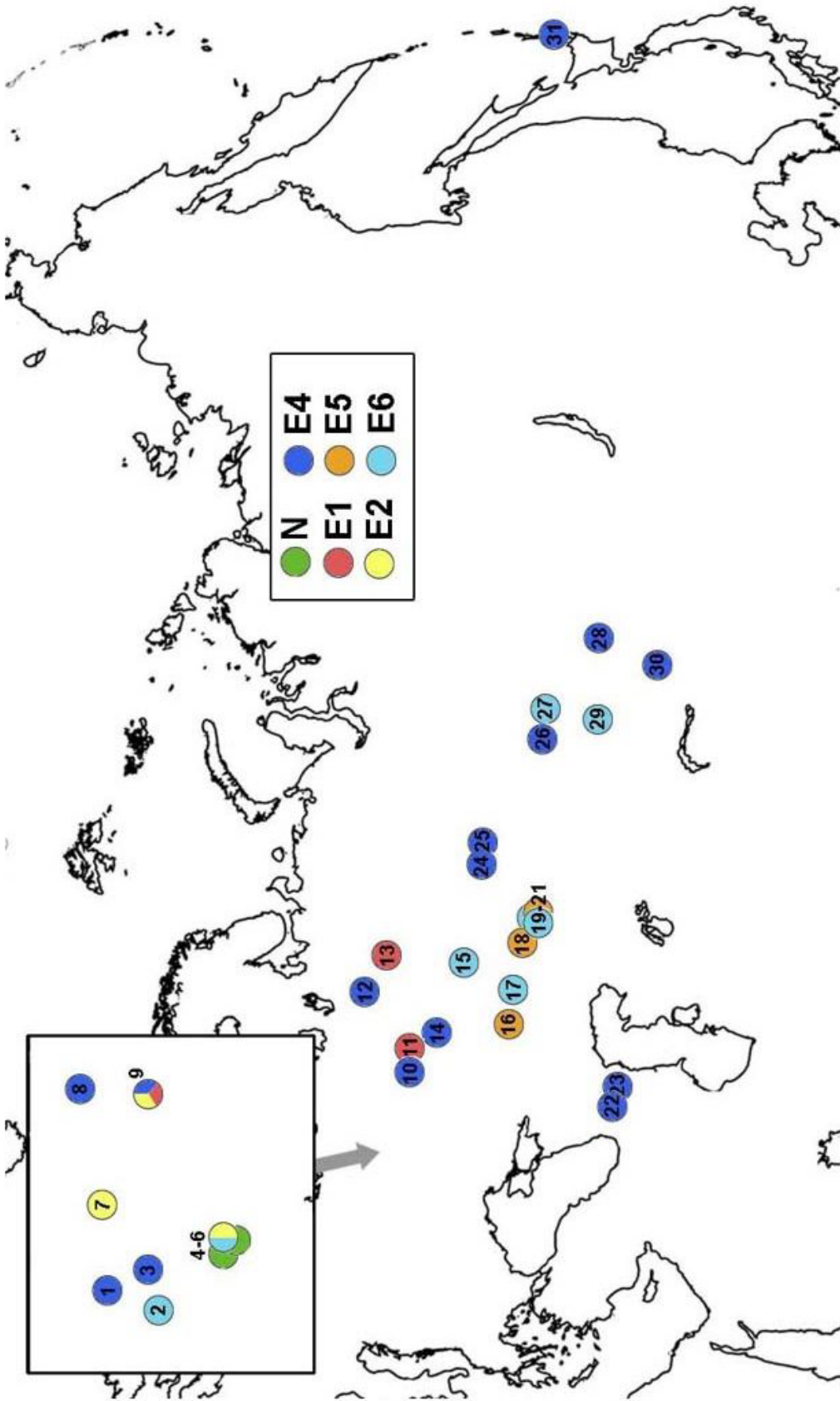


Рисунок 5.2.1 Точки сбора образцов *A. rosea*. Цветом отмечены различные филогенетические линии; цифрами обозначены номера популяций (Таблица 5.2.1)



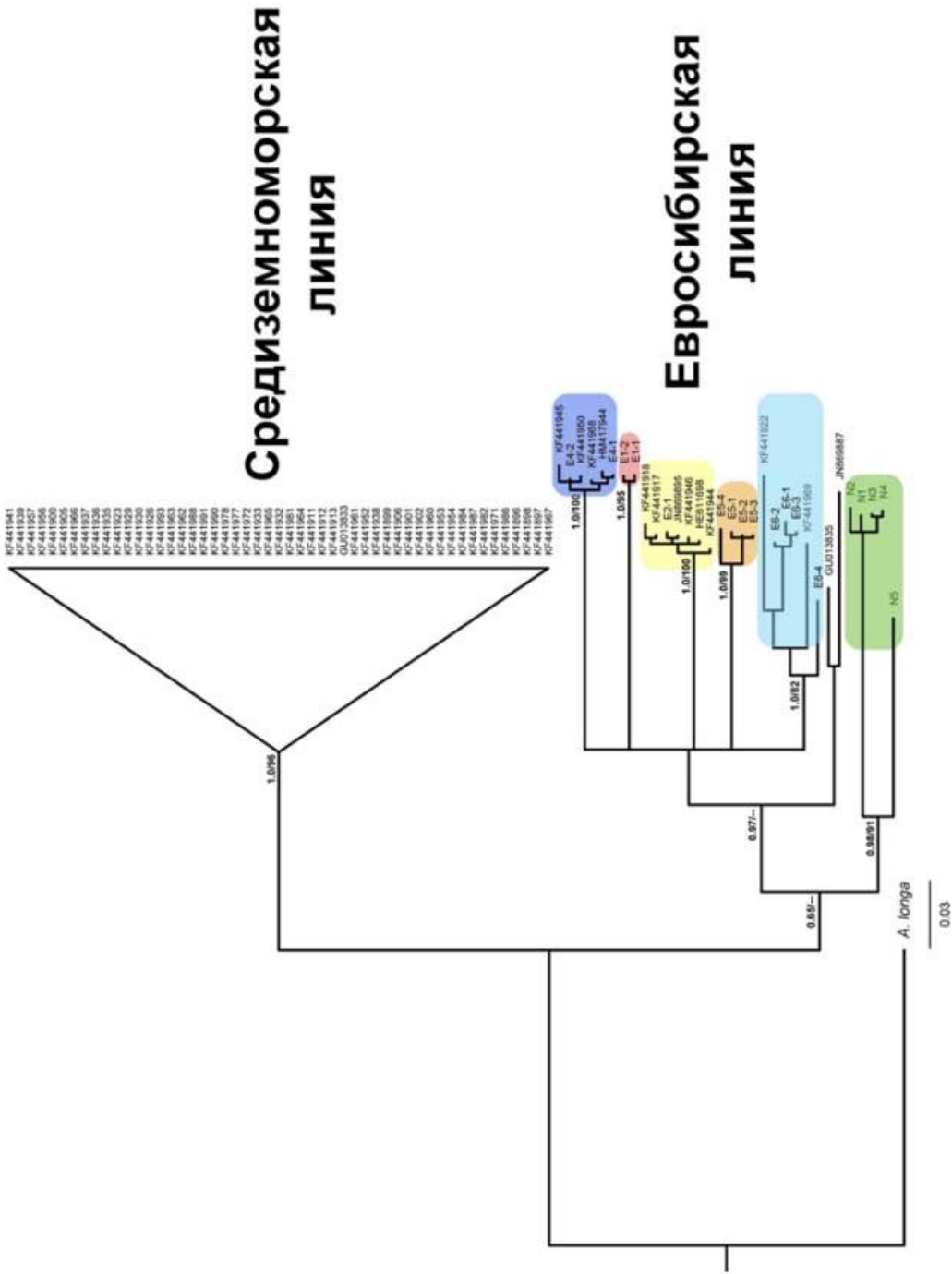


Рисунок 5.2.2 Филогенетическое дерево, построенное методом байесовского анализа для последовательностей *cox1* *A. rosea*. Цифры возле ветвей обозначают байесовскую апостериорную вероятность / бутстрепную поддержку метода максимального правдоподобия. Цветовые обозначения соответствуют рисунку 5.2.1

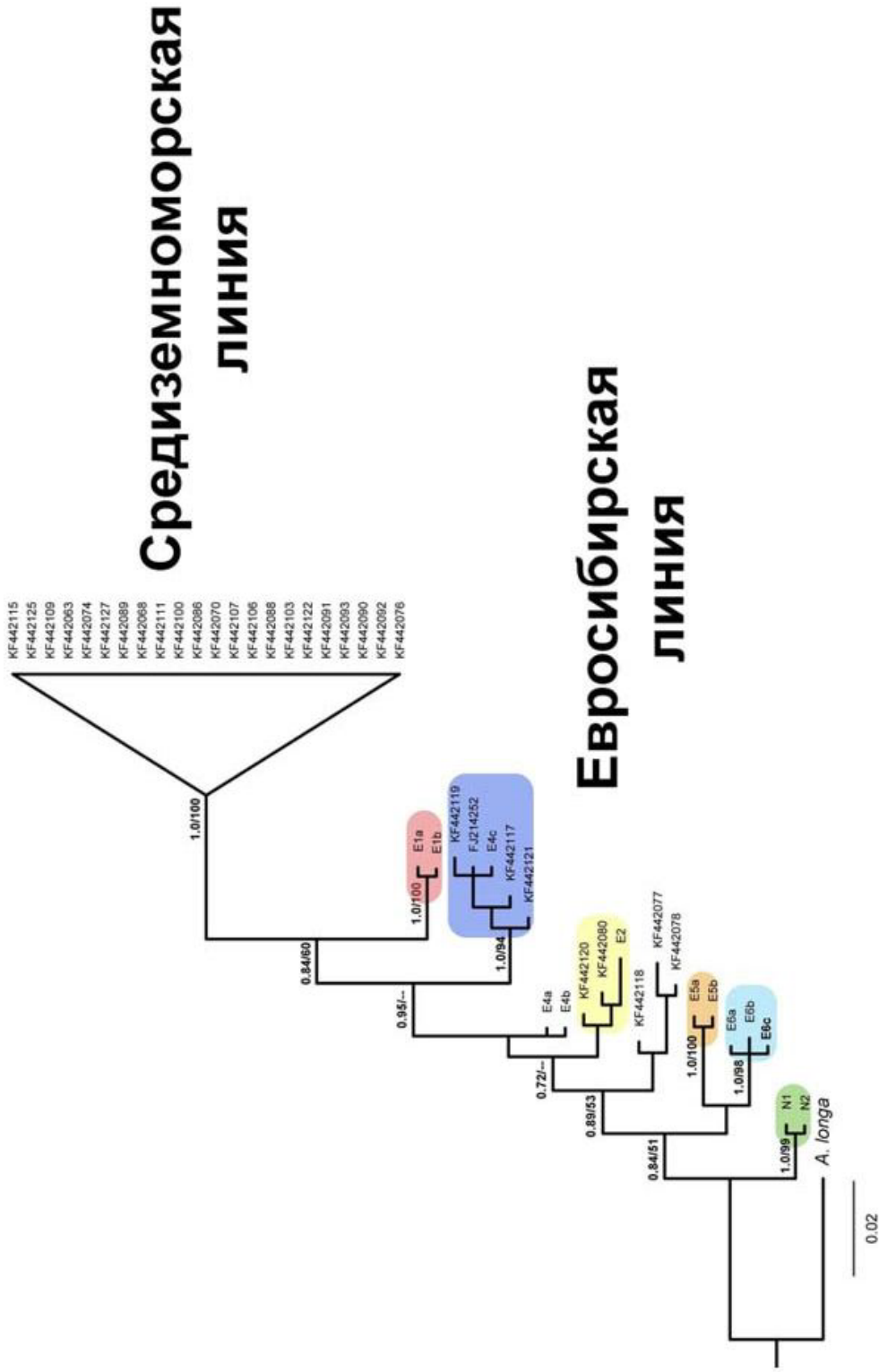


Рисунок 5.2.3 Филогенетическое дерево, построенное методом байесовского анализа для нуклеотидных последовательностей гена *N3 A. rosea*. Цифры возле ветвей обозначают байесовскую апостериорную вероятность / бутстрепную поддержку метода максимального правдоподобия. Цветовые обозначения соответствуют рисунку 5.2.1

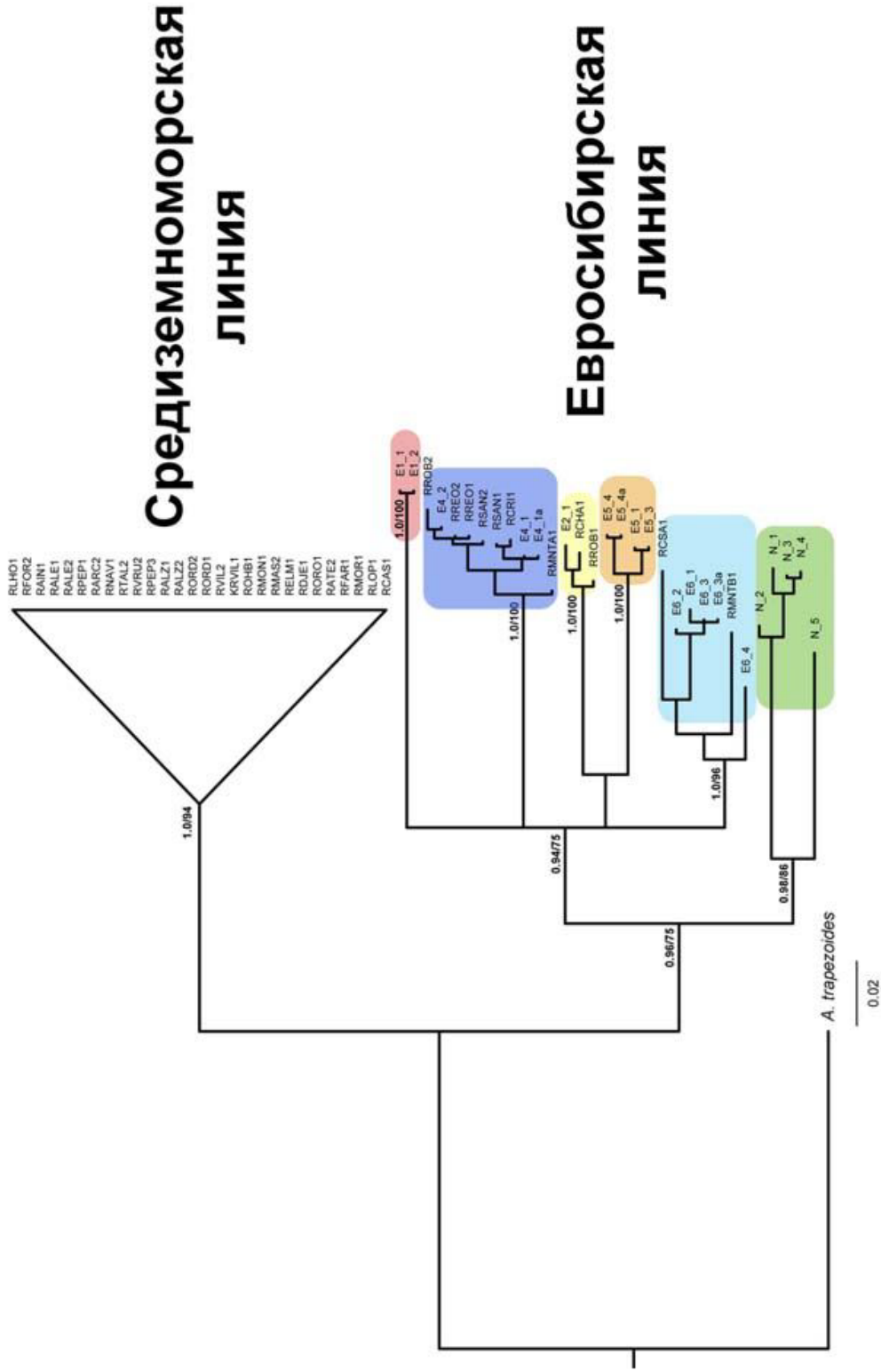


Рисунок 5.2.4 Филогенетическое дерево, построенное методом байесовского анализа для конкатенированных последовательностей *coxI* и *Hz A. rosea*. Цифры возле ветвей обозначают байесовскую апостериорную вероятность / бутстрепную поддержку метода максимального правдоподобия. Цветовые обозначения соответствуют рисунку 5.2.1

На филогенетическом дереве, построенном при помощи конкатенированных последовательностей (Рисунок 5.2.4), видны средиземноморская и евросибирская группы, найденные R. Fernández et al. [2016]. В пределах евросибирской группы группа образцов из Беларуси (N-1–N-5) занимала обособленное положение и являлась сестринской к остальным образцам группы. Отношения между остальными группами *A. rosea* (E1–E6) не были разрешены. Деревья, построенные по *cox1* имели сходную топологию с деревьями, построенными по конкатенированным данным (Рисунок 5.2.2). На дереве, построенном для нуклеотидных последовательностей фрагмента гена гистона H3 (Рисунок 5.2.3), большинство групп, показанных на рисунок 5.2.4, были поддержаны, но отношения между ними не были разрешены.

Положение на деревьях новых гаплотипов *A. rosea* из Беларуси свидетельствуют о том, что история вида не ограничивалась только дивергенцией вида на две ветви в средиземноморском регионе, как предполагали R. Fernández et al. [2016]. Это обусловлено тем, что несмотря на то, что R. Fernández et al. [2016] тщательно собрали образцы *A. rosea* из Средиземноморья, они не обнаружили ту базальную ветвь евросибирской линии, которую мы выявили в Беларуси. Исходя из этого, правильнее было бы предполагать, что евросибирская группа прошла дивергенцию, по-видимому, на территории Восточной Европы, а затем расселилась и на запад, и на восток. Более точные предположения о географии этого события сделать пока нельзя, так как информация по генетической изменчивости *A. rosea* в Восточной Европе ограничивается лишь единичными образцами.

Расселение *A. rosea* по Палеарктике после окончания последнего оледенения происходило сначала путём естественного расселения, и позже – при помощи человека. Различить следы этих процессов непросто, а вероятно, и невозможно. В любом случае, можно заключить, что генетическое разнообразие *A. rosea* снижается с запада на восток. В Беларуси было найдено пять филогенетических линий и 11 гаплотипов *cox1*; там же была найдена единственная точка, в которой две линии были найдены вместе. В Европейской России генетическая

Таблица 5.2.1. Точки сбора образцов с указанием генотипов изученных маркеров. Номера точек сбора соответствуют рисунку 5.2.1; N – число образцов

№	Точка сбора	<i>cox1</i>		H3	
		N	гаплотип	N	генотип
1	Беларусь, Гродненская область, с. Неверовичи, N53.26275, E24.57094	2	E4-1	2	E4b
2	Беларусь, Брестская область, заказник Званецкий, N52.06734, E24.94294	10	E6-3	10	E6a
3	Беларусь, Брестская область, с. Чемелы, N52.80462 E25.53932	10	E4-2	10	E4c
4	Беларусь, Гомельская область, с. Бечанская Буда, N52.02561, E27.93114	6	N1, N5	6	N1
5	Беларусь, Гомельская область, с. Хлупин, N52.07894 E28.18234	6	E6-1, E2-1	6	E6a, E6b, E2
6	Беларусь, Гомельская область, с. Случ, N52.22102, E27.55179	2	N2-N4	2	N1, N2
7	Беларусь, Гродненская область, с. Загорцы, N54.12623, E25.91676	7	E2-1	7	E2
8	Беларусь, Витебская область, заказник Освейский, N56.13649, E28.13779	3	E4-2	3	E4c
9	Беларусь, Витебская область, с. Шевинка, N55.18015, E29.92186	6	E4-2, E2-1, E1-2	6	E1b, E2, E4c
10	Россия, Москва, Ботанический сад, N55.83096 E37.60447	2	E4-1, E4-2	2	E4b
11	Россия, Владимирская область, N56.2067 E40.6965	8	E1-1	8	E1a
12	Россия, Вологодская область, с. Данилово, N59.0742, E39.7559	1	E4-2	1	E4b

13	Россия, Вологодская область, с. Семеново, N59.5843, E41.4045	12	E1-1	12	E1b
14	Россия, Рязанская область, с. Листвянка, N54.4948 E39.9577	14	E4-1, E4-2	14	E4a, E4c
15	Россия, Татарстан, берег р. Волга, N55.7220 E48.6258	5	E7-1	5	E7
16	Россия, Саратовская область, р. Большой Караман, N51.5924 E46.5074	13	E5-1, E5-3	13	E5b
17	Россия, Саратовская область, г. Пугачев, N51.9871 E48.7019	9	E6-2	9	E6a, E6b
18	Россия, Оренбургская область, с. Покровка, N51.9912 E53.7229	1	E5-4	1	E5a
19	Россия, Оренбургская область, N51.5275 E55.3368	3	E6-3	3	E6a
20	Россия, Оренбургская область, N51.4767, E55.3576	3	E6-3	3	E6a
21	Россия, Оренбургская область, N51.4763 E55.3529	12	E5-2	-	-
22	Россия, Кабардино-Балкария, ок. г. Нальчик	2	E4-2	2	E4c
23	Россия, Ингушетия, с. Алхаст, N43.1389, E44.9281	6	E4-2	6	E4c
24	Россия, Свердловская область, г. Ревда, N56.84951 E59.77464	16	E4-2	-	-
25	Россия, Свердловская область, с. Хомутовка, N56.85671 E59.80322	3	E4-2	-	-
26	Россия, Омская область, г. Омск, N55.04529 E73.38156	11	E4-2	11	E4c
27	Россия, Новосибирская область, с. Татарск, ок. N55.15, E76.00	1	E6-3	1	E6b

28	Россия, Алтайский край, с. Солтон, N52.32015 E76.87342	1	E4-2	1	E4c
29	Казахстан, Павлодар, N52.32015 E76.87342	8	E6-3	8	E6a
30	Казахстан, Новая Бухтарма, N49.62098 E83.52732	5	E4-2	5	E4c
31	Россия, Сахалинская область, о-в Шикотан, N43.74, E146.72	3	E4-2	3	E4c
	Всего	191		160	

Таблица 5.2.2 Показатели генетического разнообразия для *A. rosea* and *A. caliginosa* для гена *cox1*.

	<i>A. rosea</i>	<i>A. caliginosa</i>
Число особей	169	564
Число уникальных гаплотипов гена <i>cox1</i>	19	51
Число полиморфных сайтов	210	101
Число нуклеотидных замен	274	118
Среднее число нуклеотидных замен между образцами	62,634 (27,160)	26,493 (11,629)
Нуклеотидное разнообразие	0,0952 (0,0457)	0,0403 (0,0196)
Гаплотипическое разнообразие	0,774 (0,030)	0,949 (0,003)

изменчивость сходная (четыре линии и десять гаплотипов); в этом регионе выделяется юго-восток, отличающийся по составу гаплотипов от остальных точек.

К востоку от Урала было найдено только два гаплотипа *cox1*, что указывает на значительное снижение генетического разнообразия. Мы можем только утверждать, что *A. rosea* занесена в Сибирь человеком, так как там она встречается как синантропный вид. Кроме того, по данным Т. С. Всеволодовой-Перель [1997], двадцать лет назад *A. rosea* в Сибири отсутствовал. Хотя к тому моменту он мог уже быть занесён, но пока не обнаружен, скорее всего, он как минимум значительно увеличил там свою численность.

Мы также провели сравнение генетических параметров *A. rosea* с родственным и экологически близким *A. caliginosa* (Таблица 5.2.2). Выборка *A. caliginosa* включала в себя 564 уникальных последовательности, полученных нами. Из Таблицы 5.2.2 видно, что, несмотря на экологическое сходство, параметры этих видов значительно различаются: выборка *A. rosea* содержала гораздо меньше гаплотипов (что отчасти может быть объяснено меньшим размером выборки), однако её нуклеотидно разнообразие и количество полиморфных сайтов были приблизительно в два раза выше.

История расселения этих видов по северу Палеарктики также различна. По сравнению с всего двумя филогенетическими линиями *A. caliginosa*, известным из данного региона, *A. rosea* представлена как минимум семью. При этом одна из линий *A. caliginosa* имеет одинаково высокое генетическое разнообразие как на западе, так и на востоке региона, в то время как вторая характеризуется значительным уменьшением генетического разнообразия с запада на восток. У *A. rosea* же каждая из семи филогенетических линий имеет низкое генетическое разнообразие. Таким образом, история расселения *A. rosea*, в отличие от *A. caliginosa*, характеризовалась более высоким генетическим разнообразием исходного региона при заметно меньшем числе особей-основателей новых популяций.



### 5.3 *Octolasion tyrtaeum*

#### 5.3.1 Филогеография *O. tyrtaeum*

Известно, что *O. tyrtaeum* представлен «мелкими» (длиной 4–8 см) и «крупными» (10–14 см) формами [Heethoff et al. 2004], которые иногда встречаются симпатрично. Генетические различия между этими формами были впервые продемонстрированы в экспериментах по скрещиванию [Meinhardt, 1974] и позднее подтверждены анализом митохондриальной ДНК [Heethoff et al., 2004]. М. Heethoff и др. [2004] разделили *O. tyrtaeum* на две филогенетические линии, S и L, т.е., «small» и «large», «мелкую» и «крупную», как мы и называем их далее, соответствующие размерным формам. С другой стороны, анализ, выполненный при помощи аллозимных маркеров не выявил корреляции между размером тела и генотипом больших и малых особей *O. tyrtaeum* [Межжерин и др., 2010]. Кроме того, существование различий между филогенетическими линиями не было подтверждено с использованием ядерных последовательностей.

В проведенной работе мы ставили целью ответить на следующие вопросы:

- 1) Сколько всего существует филогенетических линий *O. tyrtaeum* и связано ли разделение на линии ли они с размером?
- 2) Поддерживают ли ядерные последовательности разделение между филогенетическими линиями *O. tyrtaeum*, проведенное по митохондриальным маркерам [Heethoff et al., 2008]?

Кроме того, были предприняты попытки проверить монофилию *O. tyrtaeum* с использованием последовательностей близкородственного вида *O. cyaneum* (Rosa, 1884), доступных в Genbank.

Образцы *O. tyrtaeum* были собраны в 2011–2014 гг. в Беларуси, европейской части России, Западной Сибири, Казахстане и на Дальнем Востоке (Рисунок 5.3.1.1, таблица 5.3.1.1, всего 110 особей. Для данных образцов были просеквенированы

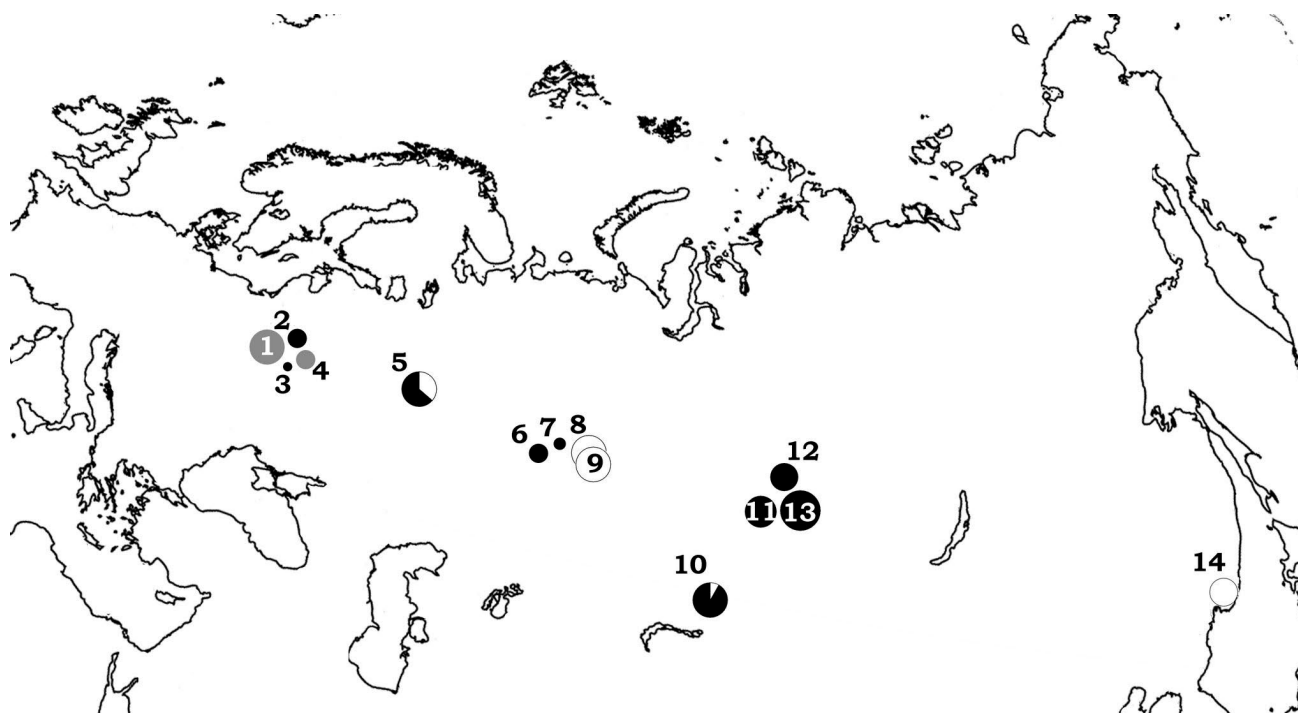


Рисунок 5.3.1.1. Точки сбора *O. tyrtaeum*. Гаплотипы «мелкой» митохондриальной линии (линии S) представлены черным цветом; «крупной» линии L – белым; "новой" линии N – серым. Размеры кружков пропорциональны размеру выборки.

локусы *cox1*, *cox2* и ITS2 (Раздел 2.3.6). В дополнение к нашим последовательностям мы также включили последовательности *cox1* и *cox2* *O. tyrtaeum* и *O. cyaneum* из GenBank; большинство из них взято из исследований М. Heethoff et al. [2004] и J. Klarica et al. [2012]. Были включены только полноразмерные последовательности без пропусков; если несколько последовательностей были идентичны, в выравнивание включалась только одна из них. В качестве внешних групп мы использовали *Eisenia fetida* и *Dendrodrilus rubidus*.

В результате мы получили последовательности *cox1*, *cox2* и ITS2 для выборки из 110 особей *O. tyrtaeum*. Набор данных последовательностей *cox2* включал образцы GenBank из исследований М. Heethoff et al. [2004] (длина 501 п.н.) и J. Klarica et al. [2012] (длина 572 п.н.); инсерций/делеций найдено не было. Поскольку было важно сравнить наши последовательности с данными из основополагающей

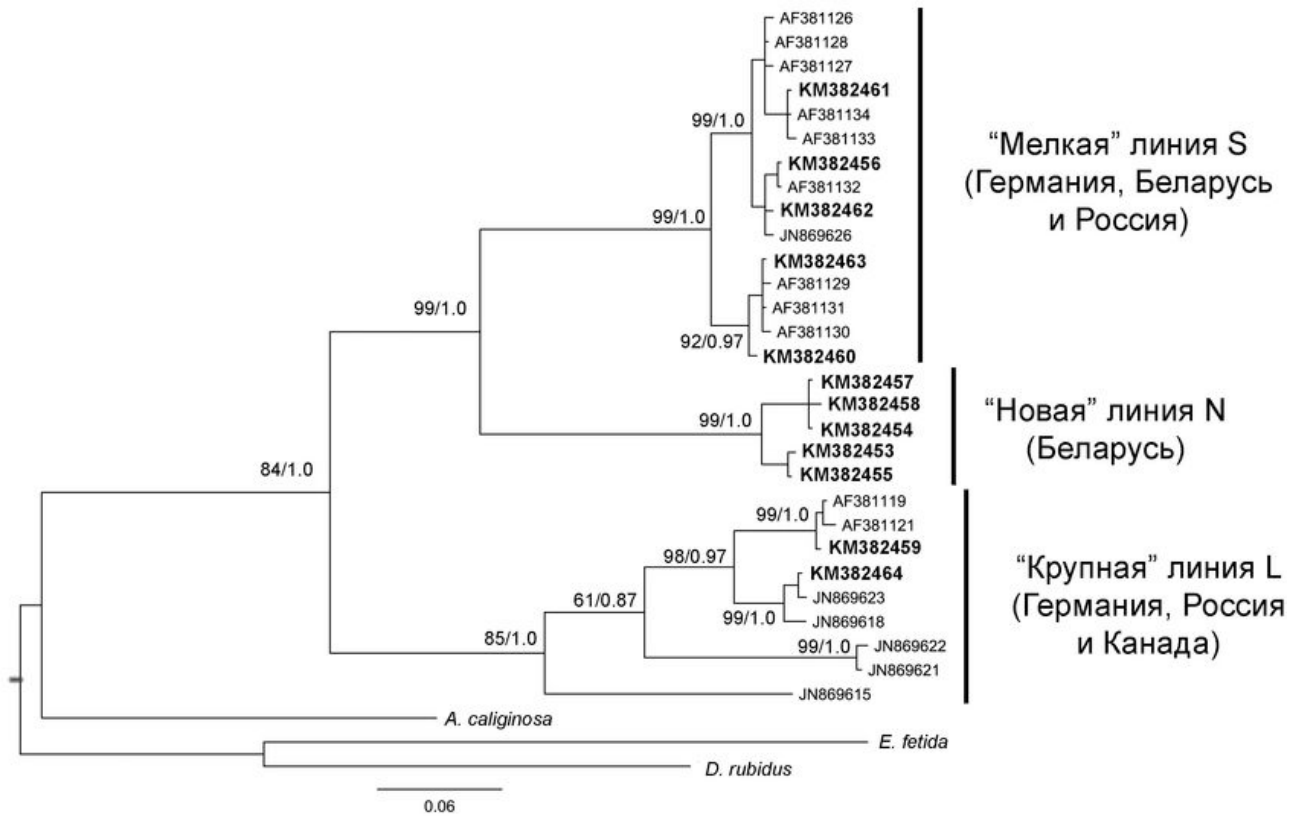


Рисунок 5.3.1.1. Филогенетическое дерево, построенное с использованием байесовского анализа нуклеотидных последовательностей *cox2* (показаны только уникальные гаплотипы). Образцы, полученные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом. Цифры над ветвями указывают бутстрепную поддержку метода максимальной парсимонии / байесовские апостериорные вероятности.

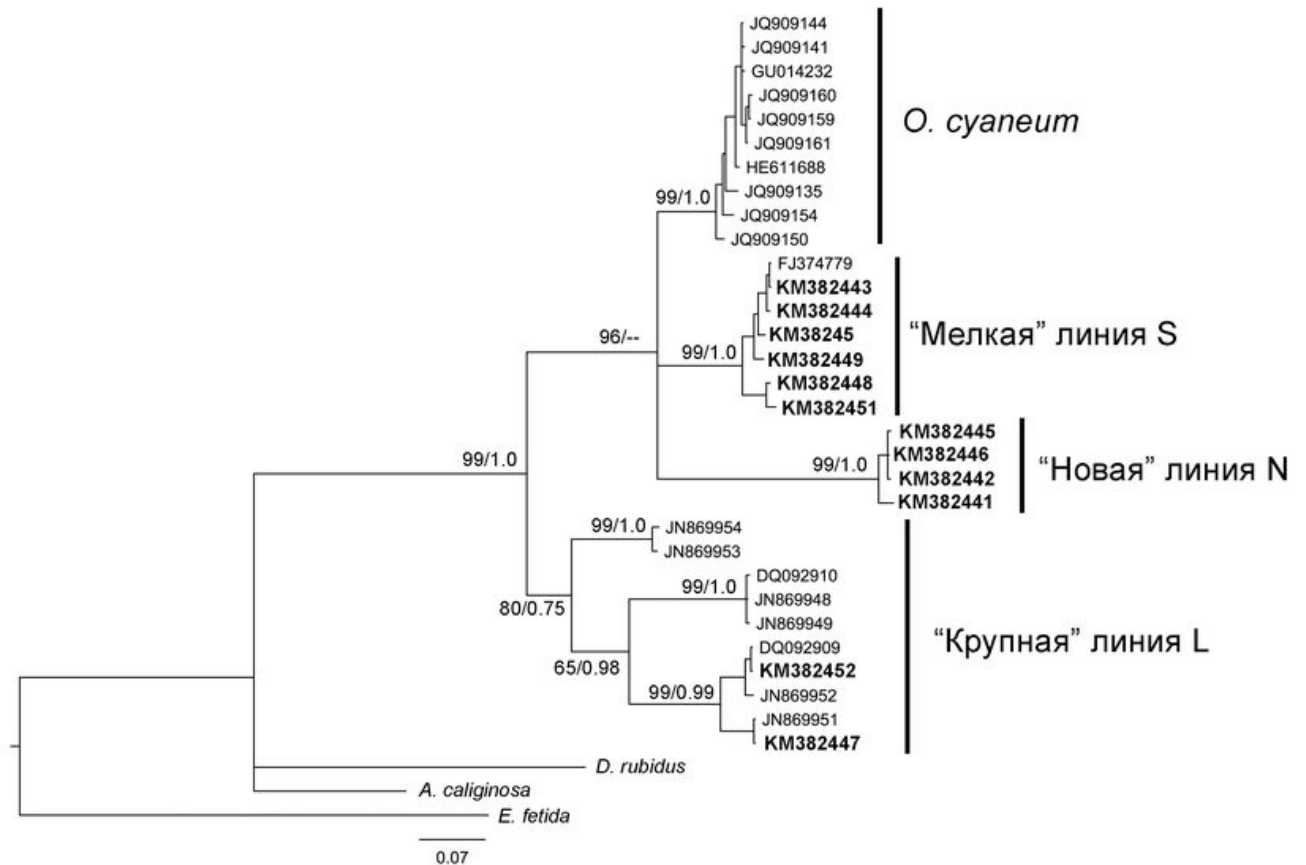


Рисунок 5.3.1.3. Филогенетическое дерево, построенное с использованием байесовского анализа нуклеотидных последовательностей *cox1* (показаны только уникальные гаплотипы). Образцы, полученные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом. Цифры над ветвями указывают бутстрепную поддержку метода максимальной парсимонии / байесовские апостериорные вероятности.

работы М. Neethoff et al. [2004], выравнивание было усечено до длины последовательностей, полученных в этой работе. Всего было найдено 12 гаплотипов. На филогенетическом дереве, построенном с использованием последовательностей *cox2*, можно увидеть две линии, обнаруженные М. Neethoff et al. [2004], а также ряд других ветвей (Рисунок 5.3.1.2). Последовательности *cox1* *O. tyrtaeum* из двух точек из Беларуси сформировали отдельную ветвь на дереве. Все эти линии монофилетичны и хорошо поддержаны статистически.

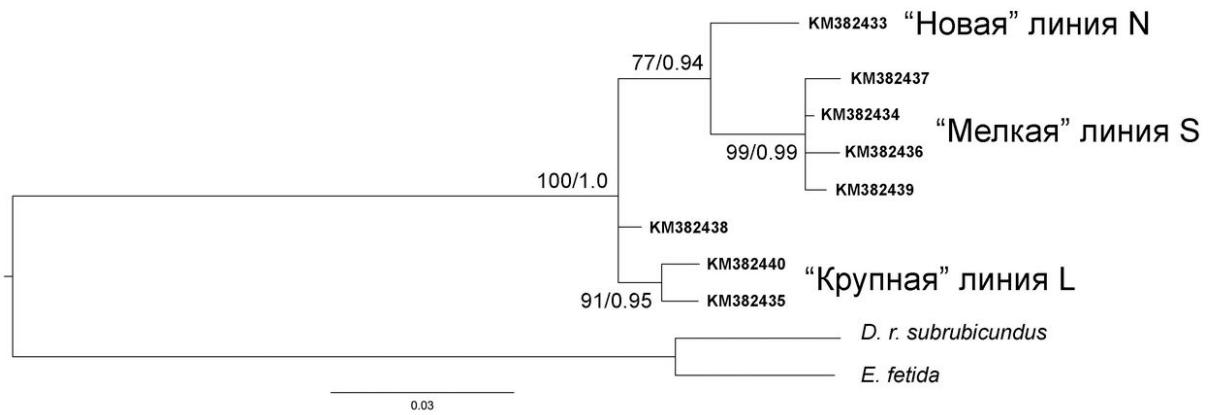


Рисунок 5.3.1.4. Филогенетическое дерево, построенное с использованием байесовского анализа нуклеотидных последовательностей ITS2 (показаны только уникальные гаплотипы). Цифры над ветвями указывают бутстрепную поддержку метода максимальной парсимонии / байесовские апостериорные вероятности.

Хотя M. Heethoff et al. [2004] обнаружили, что размер червей связан с принадлежностью к определенной филогенетической линии, все наши экземпляры были небольшими, но около четверти из них попали в линию L, к которой ранее (в работе M. Heethoff et al. [2004]) были включены только крупные образцы. Линия, включающая в себя мелких особей, была названа линией S; новые образцы из Беларуси – линией N.

Все последовательности *cox1* имели длину 658 п.н., полиморфизма по длине найдено не было. В нашей выборке обнаружено двенадцать уникальных гаплотипов. Топология деревьев, построенных по *cox1* (Рисунок 5.3.1.3), совпадала с таковой на дереве, построенном по *cox2*: выделялись ветви, соответствующие линиям S и L, а также новой линии N из Беларуси. Неожиданным образом, когда были добавлены последовательности *cox1* *O. cyaneum* из GenBank, *O. tyrtaeum* оказался парафиетическим по отношению к нему: линия S объединялась с *O. cyaneum* с высокой статистической поддержкой (Рисунок 5.3.1.3). К сожалению, последовательности этого вида для *cox2* или ITS2 не были доступны в базах данных.

Таблица 5.3.1.1 Проанализированные популяции *O. turgaitis*. Номера популяций соответствуют рисунку 5.3.1.1 S – «мелкая» линия; L – «крупная»; N – «новая» (из Р. Беларусь). Гаплогипы указаны как номера GenBank.

№	Точка сбора	N	Линия	cox1	cox2	Последовательности	ITS2
1	Беларусь, Брестская обл., с. Конюхи, берег реки	9	N	KM382441-42	KM382453-55	KM382433	KM382433
2	Беларусь, Могилевская обл., с. Дуброва, дубовый лес	3	S	KM382443	KM382456	KM382434	KM382434
3	Беларусь, Гомельская обл., с. Стрельск, дубовый лес	1	S	KM382444	KM382456	KM382434	KM382434
4	Беларусь, Гомельская обл., с. Прибор, берег реки	4	N	KM382442, 45, 46	KM382454, 57, 58	KM382433	KM382433
5	Россия, Рязанская обл., N54.4948						
	E39.9577, дубовый лес	11	L,S	KM382447-48	KM382459-60	KM382435-36	KM382435-36
6	Россия, Р. Башкирия, N54.8122						
	E56.6696, берег реки	4	S	KM382449-50	KM382461-62	KM382437-38	KM382437-38
7	Россия, Челябинская обл., N54.9848 E57.5396, березовый лес	2	S	KM382451	KM382463	KM382439	KM382439
8	Россия, Челябинская обл., N55.0577 E59.6300, берег озера	11	L	KM382447	KM382459	KM382435	KM382435

9	Россия, Челябинская обл., N54.9851 E59.8471, березовый лес	11	L	KM382447	KM382459	KM382435
	Россия, Новосибирская обл., г. Новосибирск, N54.8477 E83.1062,					
10	поле	11	S	KM382449	KM382461	KM382437
	Россия, Новосибирская обл., с. Дубровка, N54.4486 E84.6656,					
11	берег ручья	16	S	KM382449	KM382461	KM382437
	Россия, Новосибирская обл., с. Усть-Тула, N55.7819 E83.7794,					
12	поле	8	S	KM382449	KM382461	KM382437
	Казахстан, Восточно- Казахстанская обл., с. Асу-Булак,					
13	N49.55 E83.05, поле	12	L,S	KM382448, 52	KM382460, 64	KM382436, 40
	Россия, Приморский край, с. Ракушка, N43.9333 E135.4333,					
14	поле	7	L	KM382447	KM382459	KM382435
	Всего	11				
		0				

Для ITS2 генетическое разнообразие было ниже, чем для митохондриальных последовательностей: было найдено только девять уникальных генотипов. Было обнаружено несколько инсерций/делеций. Длина последовательности составляла от 610 до 616 п.н. В целом, филогенетическое дерево, построенное по последовательностям ITS2, подтверждает разделение между тремя ветвями, выявленное деревьями *cox1* и *cox2* (Рисунок 5.3.1.4). При этом мы обнаружили случаи несоответствия для двух особей из точки 6, которые имели митохондриальные гаплотипы, характерные «мелкой» линии (KM382450, KM382462), но их последовательности ITS2 образовывали отдельную ветвь на филогенетическом дереве, построенном методом байесовского анализа, а на дереве максимальной парсимонии этот гаплотип (KM382438) объединялся с линией L с поддержкой бутстрепа 77.

Известно, что *O. tyrtaeum*, как и некоторые другие виды дождевых червей, представляет собой комплексный вид, включающий в себя несколько хромосомных рас и морф разного размера от 3 до 18 см [Omodeo 1955; Meinhardt, 1974; Jaenike and Selander, 1979; Перель, 1979]. М. Neethoff et al. [2004] показали, что этот вид также обладает высоким генетическим разнообразием: «мелкие» (4-8 см) и «крупные» (10-14 см) формы *O. tyrtaeum* имеют значительные различия в последовательностях мтДНК. Наша работа продемонстрировала, что картина несколько сложнее. Во-первых, принадлежность к генетической линии у *O. tyrtaeum* не всегда соответствует принадлежности особи к определенному размерному классу. Все черви в нашей выборке были морфологически отнесены к малой форме, но некоторые из них принадлежали к «крупной» генетической линии (линии L). В двух случаях обе линии были обнаружены симпатрически (точки 5 и 13) у особей, не имевших морфологических различий.

Во-вторых, существует более двух филогенетических линий. Мы обнаружили третью линию в Беларуси, митохондриальные и ядерные последовательности которой значительно отличались от таковых у «мелких» и «крупных» линий, выявленных М. Neethoff et al. [2004]. Кроме того, в пределах линии L можно наблюдать три клады, отличающиеся довольно большим



количеством замен (Рисунок 5.3.1.3), так что фактическое количество линий могло бы быть даже больше. К сожалению, работа, из которой были взяты эти последовательности [Klarica et al. 2012], не включала в себя информацию о происхождении или размерах этих червей.

В-третьих, анализ филогенетических отношений при помощи гена *cox1* продемонстрировал, что вид *O. cyaneum* объединяется с линией S *O. tyrtaeum* с высокой статистической поддержкой. Эти два вида морфологически схожи (поясок *O. cyaneum* сдвинут на один сегмент по сравнению с *O. tyrtaeum*). Однако они имеют разные хромосомные числа: для *O. tyrtaeum* известны диплоидные ( $2n = 38$ , иногда называемые субтриплоидами), триплоидные ( $3n = 54$ ) и тетраплоидные ( $4n = 72$ ) расы [Omodeo 1952; Jaenike and Selander 1979], тогда как для *O. cyaneum* сообщалось о расах с 40, 126, 162 и 190 хромосомами [Mezhzherin et al., 2010]. Таким образом, в комплексе *O. tyrtaeum* – *O. cyaneum* существует действительно высокое геномное разнообразие, и дальнейшие исследования могут привести к пересмотру его систематики.

Мы также нашли один случай (точка б), когда у индивидов была мтДНК линии S, но ядерный рибосомный спейсер, образующий отдельную ветвь, близкую к линии L на деревьях, построенных методом максимальной парсимонии. Это может быть результатом, например, т.н. неполной сортировки линий (incomplete lineage sorting). Но, учитывая высокие генетические различия между линиями, мы также можем предположить, что это может представлять собой случай гибридизации между линиями S и L. *O. tyrtaeum* считается строго партеногенетическим видом [Jaenike, Selander, 1979]. Ряд данных указывает на то, что способы размножения у дождевых червей могут быть весьма пластичными. Например, хотя *A. trapezoides* также часто называют строго партеногенетическим видом, он охватывает как строго партеногенетические популяции, так и популяции с половым размножением, а также с промежуточными характеристиками, когда происходит копуляция, но сперматозоиды разрушаются [Fernández et al., 2011]. Считается, что все расы четной ploидности ( $4n, 6n, 8n$ ) *E. nordenskioldi* вернулись к амфимиксису, хотя это строго не доказано [Viktorov, 1997]. Для *O. tyrtaeum*

предположение о случаях полового размножения было выдвинуто Межжериным и др. [Mezhzherin et al., 2010] на основе частот аллелей аллозимов в некоторых популяциях.

Мы обнаружили довольно низкое генетическое разнообразие в отдельных популяциях и в выборке в целом. Например, гаплотипическое разнообразие, оцененное с использованием гена *cox1*, примерно в два раза ниже по сравнению с другими перигринными видами: амфимиктичными *L. rubellus* [Donnelly et al., 2014] и *A. caliginosa* (наши данные) и партеногенетиками *A. trapezoides* [Fernández et al., 2011] и *D. octaedra* [Knott and Haimi, 2010]. Эти различия выглядят еще более значительным на фоне того, что образцы линии N представляют собой около 10% нашей выборки и примерно одну треть от общего числа гаплотипов (четыре из двенадцати для *cox1*). Разные паттерны генетического разнообразия у разных перигринных видов говорят о различиях в их истории расселения и времени дивергенции между разными популяциями/линиями.

Хотя в нашей выборке не обнаружено явных морфологических различий между червями, принадлежащими к разным линиям, они могут иметь разные экологические признаки. Тот факт, что морфологически неразличимые линии дождевых червей имеют разные экологические предпочтения, был продемонстрирован Р. Lentzsch и J. Gollmack [2006]. В нашем исследовании мы не наблюдали четкой ассоциации генетических линий с конкретными средами обитания (культивируемые почвы, леса или луга).

В результате проделанной работы мы можем заключить, что, как и многие другие виды дождевых червей, *O. tyrtaeum* представляет собой сложную смесь морфологических форм, филогенетических линий, рас с различной ploidy и, возможно, с разными способами размножения.

### 5.3.2 Морфологические различия между филогенетическими линиями *O. tyrtaeum*

В работе Heethoff и др. [Heethoff et al., 2004] и в нашей работе, описанной в Разделе 5.3.1, было показано, что у *O. tyrtaeum* существует соответствие между морфологическими (размером тела) и генетическими (принадлежностью к филогенетической линии) признаками. При этом морфологическое описание ограничивалось выделением «крупной» и «мелкой» морф. С одной стороны, в эти различия, очевидно, свой вклад вносит генетическая компонента. С другой стороны, считается, что размеры тела у дождевых червей определяются условиями обитания. В продолжение нашей работы мы попытались оценить зависимость морфометрических параметров от принадлежности к определенной филогенетической линии. Для этого мы провели детальную морфометрию и ДНК-штрихкодирование образцов *O. tyrtaeum* из двух точек из Республики Беларусь и трех – из Новосибирской области. Ранее мы полагали (Раздел 5.3.1), что в Сибири обитает только «мелкая» филогенетическая линия *O. tyrtaeum*, однако в 2019 г. С.А. Ермолов обнаружил в Новосибирской области и «крупную» линию. На основе этого материала мы предприняли попытку связать принадлежность к разным филогенетическим линиям с морфометрическим анализом.

Образцы *O. tyrtaeum* были собраны в 2019 г. на территории Новосибирской области РФ и Брестской области Республики Беларусь. Морфометрия была проведена для следующих признаков: длина тела, наибольший диаметр тела (диаметр тела в месте с наибольшей шириной, исключая поясок), длина и диаметр пояска, число сегментов. Размеры тела определяли для червей, фиксированных в этаноле. Достоверность различий между выборками была оценена при помощи теста Стьюдента. Выделение ДНК и амплификацию фрагмента гена цитохромоксидазы 1 (*cox1*) проводили как описано в Разделе 2.3.6.

Таблица 5.3.2.1. Морфометрия выборки исследованных популяций *O. turgaeus* (приведены средние размеры в мм). Дл – длина тела; Ш – ширина тела в самом широком месте, за исключением пояска; Чсег – число сегментов; ДлП – длина пояска; ШП – ширина пояска;  $\sigma$  – среднеквадратическое отклонение

№	Точка сбора образцов	N	линия	галлотип	фенотип	Дл( $\sigma$ )	Ш( $\sigma$ )	Чсег( $\sigma$ )	ДлП( $\sigma$ )	ШП( $\sigma$ )
1	Россия, НСО, Искитимский р-н, Солдатское озеро, 54°39'25"N, 083°06'03"E	10	L	E3770	крупные	125,1(15,9)	4,4(0,5)	163,7(3,3)	6,3(0,9)	4,7(0,6)
2	Россия, НСО, Новосибирский р-н, пойма р. Иня, 54°57'22"N, 83°09'35"E	10	L	E3770	-/-	80,9(5,5)	3,7(0,3)	152,2(14,3)	5,2(0,8)	4,1(0,4)
3	Россия, НСО, Новосибирский р-н, сосновый лес, 54°57'31"N, 83°09'46"E	10	S	E3764	мелкие	56,9(2,8)	2,3(0,2)	125,2(7,3)	4,0(0,3)	2,7(0,3)
4	Беларусь, Брестская область, Барановичский р-н, 53°12'30"N, 26°06'36"E	14	N	E3816, E3818, E3822	-/-	51,3(5,5)	4,0(0)	121,2(14,6)	3,6(0,9)	4,2(0,3)
5	Беларусь, Брестская область, Кобринский р-н, 52°14'05"N, 24°24'47"E	6	N	E3818, E3822, E3823, E3837	-/-	58,8(4,8)	4,0(0)	124,7(5,2)	4,8(0,3)	4,2(0,4)

Таблица 5.3.2.2. Статистические достоверные различия между популяциями при  $p < 0,01$ . № – номер популяции; Дл – длина тела; Ш – ширина тела в самом широком месте, за исключением пояска; Чсег – число сегментов; ДлП – длина пояска; ШП – ширина пояска

№	2	3	4	5
	Дл,Ш, ДлП,	Дл,Ш,Чсег,	Дл, Ш, Чсег,	Дл, Чсег, ДлП,
1	ШП	ДлП, ШП	ДлП, ШП	ШП
			Дл, Ш, Чсег,	
2	-	Дл,Ш,ДлП,ШП	ДлП	Дл, Чсег, ДлП
3		-	Дл, Ш, ШП	Ш, ШП
4			-	Дл, ДлП

Все исследованные особи (Таблица 5.3.2.1) имели типичный для *O. tyrtaeum* набор диагностических признаков (положение пояска и пубертатных валиков, форма головной лопасти и т.д.). При этом наблюдались заметные различия в размерах тела: особи в популяции 1 (см. таблицу 5.3.2.1) имели длину 10,5–15,5 см, из популяции 2 – 7–9 см, из популяций 3, 4, 5 – 4–6 см. Различия по длине были статистически достоверными для большинства пар популяций; также во многих случаях были достоверными различия и по другим морфометрическим признакам (Таблица 5.3.2.2). Следует отметить, что, хотя особи из популяций 3, 4 и 5 имели сходную длину тела, их пропорции различались: диаметр тела и пояска у особей популяций 4 и 5 был почти вдвое больше, чем у популяции 3 и почти равнялся таковому у крупных *O. tyrtaeum* (Таблица 5.3.2.1).

По последовательностям гена *cox1* образцы из популяций 1 и 2 относились к филогенетической линии L; все особи представлены единственным гаплотипом. Популяция 3 была представлена линией S, генетическая изменчивость в пределах популяции также отсутствует. *O. tyrtaeum* из Беларуси относились к линии N, представленной пятью различными гаплотипами. Из них в популяции 4 были обнаружены три, в популяции 5 – четыре.

Хотя в литературе обсуждают «крупные» и «мелкие» формы *O. tyrtaeum* [Heethoff et al., 2004], изученную выборку на основании морфологических данных следовало бы скорее разделить на три размерные группы (т.е., популяция 1, популяция 2 и популяции 3-5). Детальных данных о изменчивости размеров тела в популяциях *O. tyrtaeum* в литературе нет, в связи с чем сложно сказать, можно ли считать естественную изменчивость непрерывной или дискретной.

Тем не менее, размеры тела до определенной степени коррелируют с гаплотипом: крупные особи нашей выборки (популяции 1 и 2) относились к линии L, мелкие – к S и N. Эти данные соответствуют литературным [Heethoff et al., 2004]. Тем не менее, сравнение популяций 1 и 2 очевидно показывает, что не существует однозначного соответствия между гаплотипом *cox1* образца и его размером. Этому можно дать два объяснения. Во-первых, вклад в морфотип вносит и экологическая составляющая (условия в месте обитания червей). Во-вторых, нельзя исключать, что, несмотря на близкое генетическое родство популяций 1 и 2, между ними существуют и различия, определяющие размеры тела. Следует отметить, что *O. tyrtaeum* – перекочующий вид, заселивший Западную Сибирь недавно, скорее всего, в последние десятилетия [Всеволодова-Перель, 1997]. В связи с этим генетические различия между местными популяциями должны быть незначительными, и первое объяснение можно считать предпочтительным.

Кроме того, мы отметили определенные различия по форме тела между особями, относящимися к гаплогруппам N и S. При сходной длине тела особи с гаплогруппой N имеют почти вдвое больший диаметр. Вполне возможно, что эти различия обусловлены генетически, хотя это предположение, очевидно, следует подтвердить на большей выборке, так как нельзя исключать влияния среды.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что соответствие морфологической и генетической изменчивости у *O. tyrtaeum* не так однозначно, как считалось ранее. В изменчивость размеров тела определенно вносят свой вклад и генетические, и экологические различия. Относительный вклад этих компонент еще предстоит выяснить.

### 5.4 *Dendrobaena octaedra*

Для анализа генетической изменчивости *D. octaedra* была собрана выборка из 24 точек (Рисунок 5.4.1) и прогенотипирована по гену *cox1* (Раздел 2.4). Среди полученных нами 99 последовательностей было обнаружено 40 уникальных гаплотипов. В наборе из 157 полноразмерных фрагментов длиной 658 п.н., взятой из GenBank, был выявлен 41 гаплотип. На основании этих двух выборок, содержащих уникальные гаплотипы (до некоторой степени они перекрывались) были построены филогенетические деревья (Раздел 2.14). В качестве внешней группы был взят вид *D. attemsi* (Рисунок 5.4.2).

Оказалось, что генетическая изменчивость *D. octaedra* очень мала. Подавляющее большинство гаплотипов относились к одной группе (названа нами линией 1) (Рисунок 5.4.2). Изменчивость внутри нее была невелика, средние р-дистанции составляли 2,3%. В пределах этой линии не выделялось какой-либо приуроченности отдельных гаплотипов к какому-то региону.

Два гаплотипа, взятых из GenBank (MF121744 и MF121754) отличались от всех остальных значительно, 19% замен по p-distance. Эти гаплотипы обозначены авторами как *Dendrobaena octaedra* complex sp. L2. Образцы происходят из леса Eawy в Нормандии, недалеко от пролива Ла-Манш. Данная территория была затронута последним оледенением, т.е. возраст местных популяций относительно небольшой, и выдвинуть какие-либо предположения об исходном ареале этой линии нельзя. Из-за недостатка сведений сложно сказать, действительно ли эти образцы относятся к виду *D. octaedra*, или же к какому-то иному неизвестному виду: поскольку они были получены в ходе работы по ДНК-штрихкодированию, есть вероятность, что морфологическое определение было проведено не слишком аккуратно.

*D. octaedra* – холодоустойчивый вид, распространенный во многих труднодоступных районах Севера, из-за чего расселение в данные районы при участии человека кажется маловероятным. В связи с этим логично было бы предположить, что многие из этих популяций пережили оледенения *in situ*,

подобно популяциям *E. nordenskioldi* (Раздел 3.3.2). Однако генетические данные не подтверждают это предположение: в отличие от *E. nordenskioldi* с уникальными гаплотипами почти у каждой северной популяции линии 9. Как у северных, так и у южных популяций *D. octaedra* отсутствуют какие-либо географические отличия по генетическим признакам. Таким образом, более вероятной следует считать гипотезу о недавнем (последледниковом) расселении вида по всей северной Голарктике. Представляется интересным вопрос, каковы были предковые популяции этого расселения, однако имеющиеся данные не могут пока дать ответа на этот вопрос.

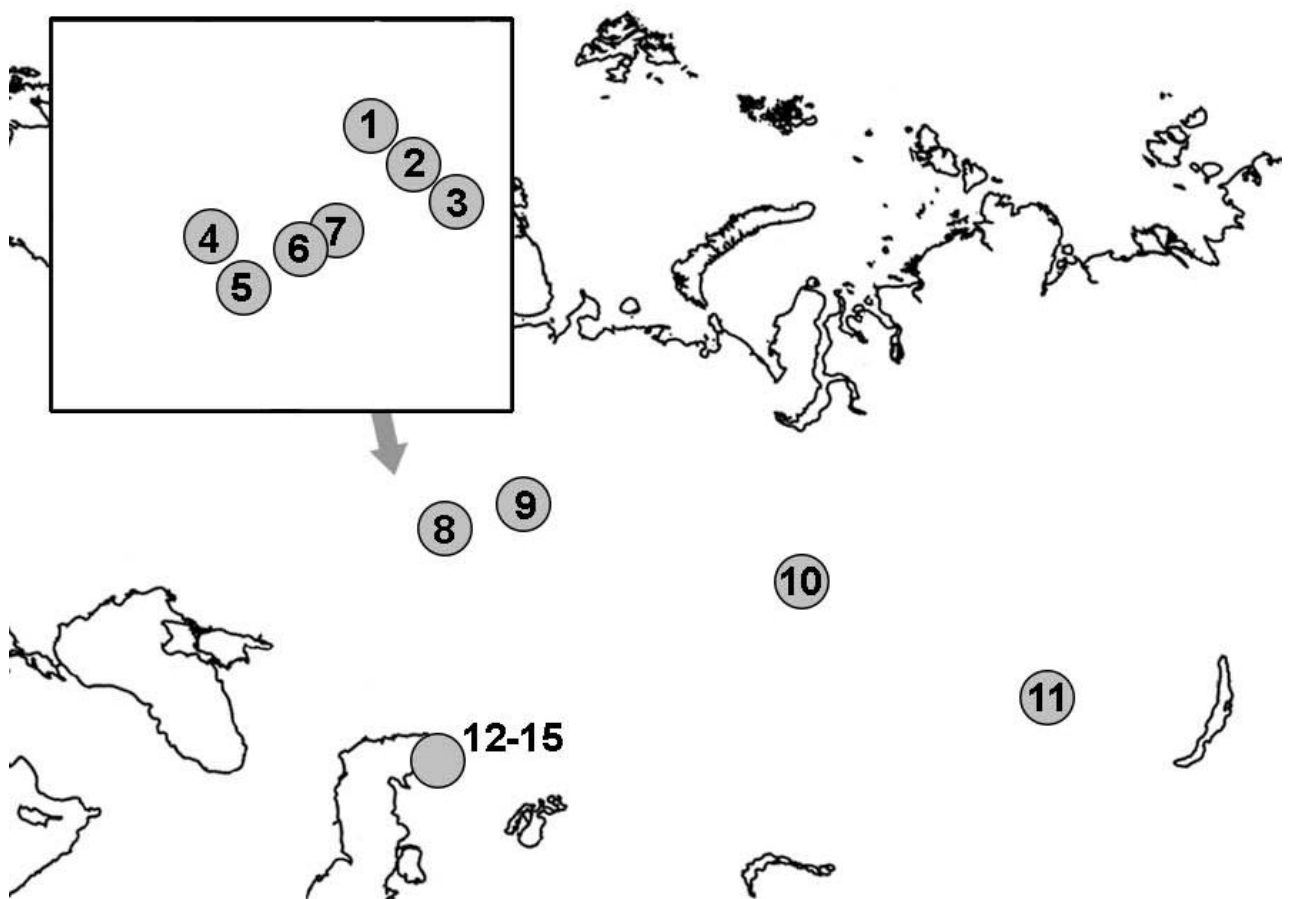


Рисунок 5.4.1. Точки сбора *D. octaedra*. Номера точек соответствуют таблице 5.4.1





## 5.5 *Lumbricus rubellus*

Коллекция образцов *L. rubellus* (175 образцов из 23 точек) была собрана в 2011–2019 гг. (Рисунок 5.5.1, таблица 5.5.1). Секвенирование последовательностей митохондриального гена *cox1* проводили, используя универсальные праймеры LCOm и HCO (Раздел 2.3.7). Из 260 последовательностей *cox1*, имевшихся в базе данных GenBank, было взято 95 уникальных гаплотипов. Среди полученных нами последовательностей было обнаружено 34 гаплотипа. Эти два набора данных были объединены (некоторые гаплотипы в них совпадали), в качестве внешней группы был взят *L. castaneus*. На основе данной выборки были построены филогенетические деревья, как описано в Разделе 2.13 (Рисунок 5.5.2).

Известно, что у *L. rubellus* было найдено множество филогенетических линий [King et al., 2008; James et al., 2010; Klarica et al., 2012; Porco et al., 2013; Martinsson, Erséus, 2017b]. S. W. James et al. [2010] выделили 2 линии в пределах этого вида, названные линиями 1 и 2. Впоследствии S. Martinsson и C. Erséus [2017b] просуммировали данные по *L. rubellus*, самые распространенные линии (1 и 2 по S. W. James et al. [2010]) они назвали линиями B и A, соответственно. Кроме того, они дали названия целому ряду новых линий: G, H1, H2 и т.д.

На построенном нами филогенетическом дереве (Рисунок 5.5.2) видно, что внутри вида действительно выделяется множество линий. Среди них центральное место занимает линия A/2 (обозначения даны по S. Martinsson и C. Erséus [2017b] и S. W. James et al. [2010], соответственно). К ней относится подавляющее большинство последовательностей, взятых из GenBank. Это находит свое отражение и в числе выявленных гаплотипов: хотя уровень генетической изменчивости (количество нуклеотидных замен, разделяющих гаплотипы) в пределах линий находится примерно на одном уровне, видно, что для линии A/2 выявлено гораздо больше гаплотипов, чем для всех остальных линий, вместе взятых.

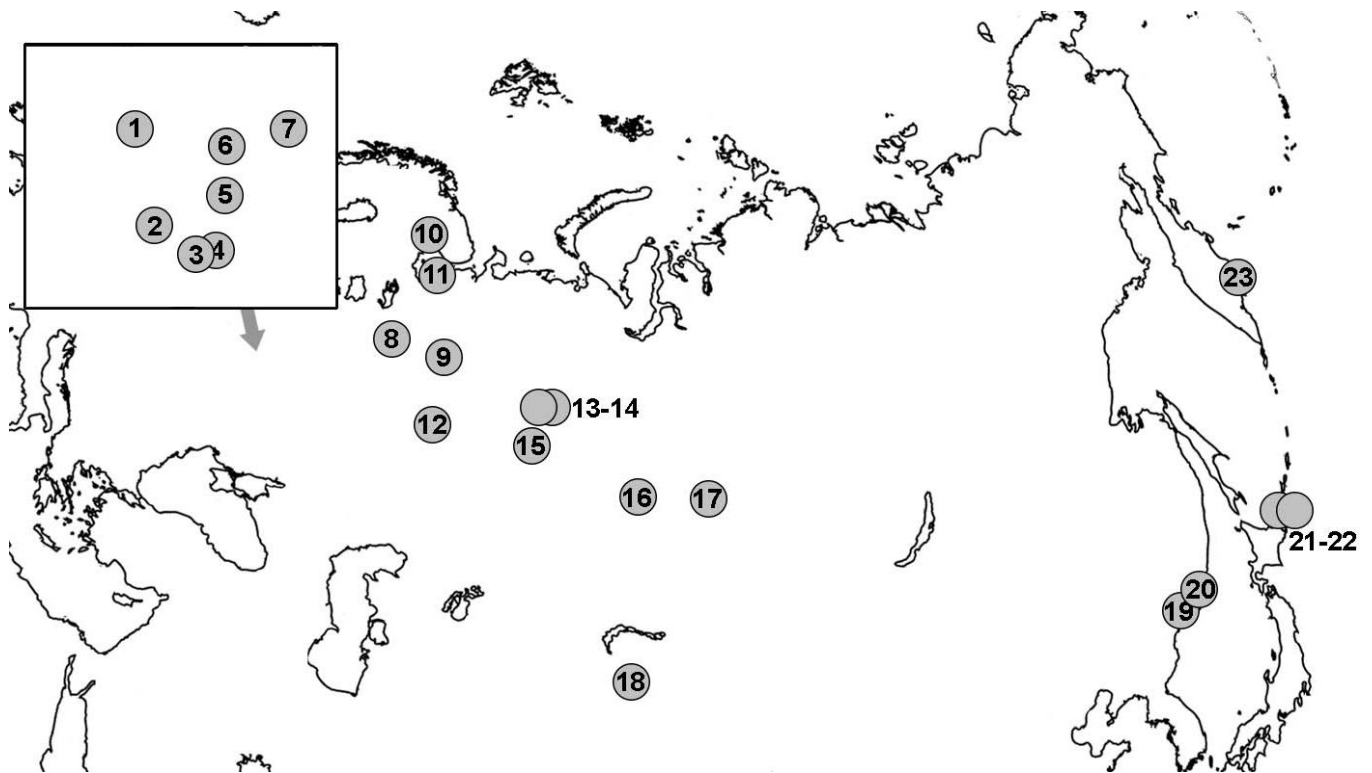


Рисунок 5.5.1 Точки сбора образцов *L. rubellus*. Номера популяций соответствуют таблице 5.5.1.

Прочие линии: 1/В, G, H1, H2, J, K, M, представлены небольшим числом гаплотипов. На дереве можно также видеть несколько ветвей, не относящихся к каким-либо описанным линиям, которые также можно было бы считать отдельными новыми линиями.

Вся наша выборка, включавшая в себя образцы из России и сопредельных государств, содержала последовательности, относящиеся исключительно к линии A/2 (на рисунке 5.5.2 отмечены серым). Мы не выявили каких-либо специфических для отдельных регионов гаплотипов или групп гаплотипов.

Таким образом, при высоком генетическом разнообразии *L. rubellus*, большая часть особей даже в Западной Европе представлена линией A/2, и эта же линия заселила огромные пространства Северной Евразии. Причиной наблюдаемых паттернов мог быть как эффект основателя (из-за большей численности линии A/2 в исходном ареале более вероятно, что именно она будет представлена в интродуцированных популяциях), так и какие-либо биологические ее особенности,

обуславливающие ее предпочтительное расселение. Данное предположение вполне вероятно в свете имеющихся экологических работ [Donnelly et al., 2013; Kille et al., 2013; Jones et al., 2016; Anderson et al., 2017].

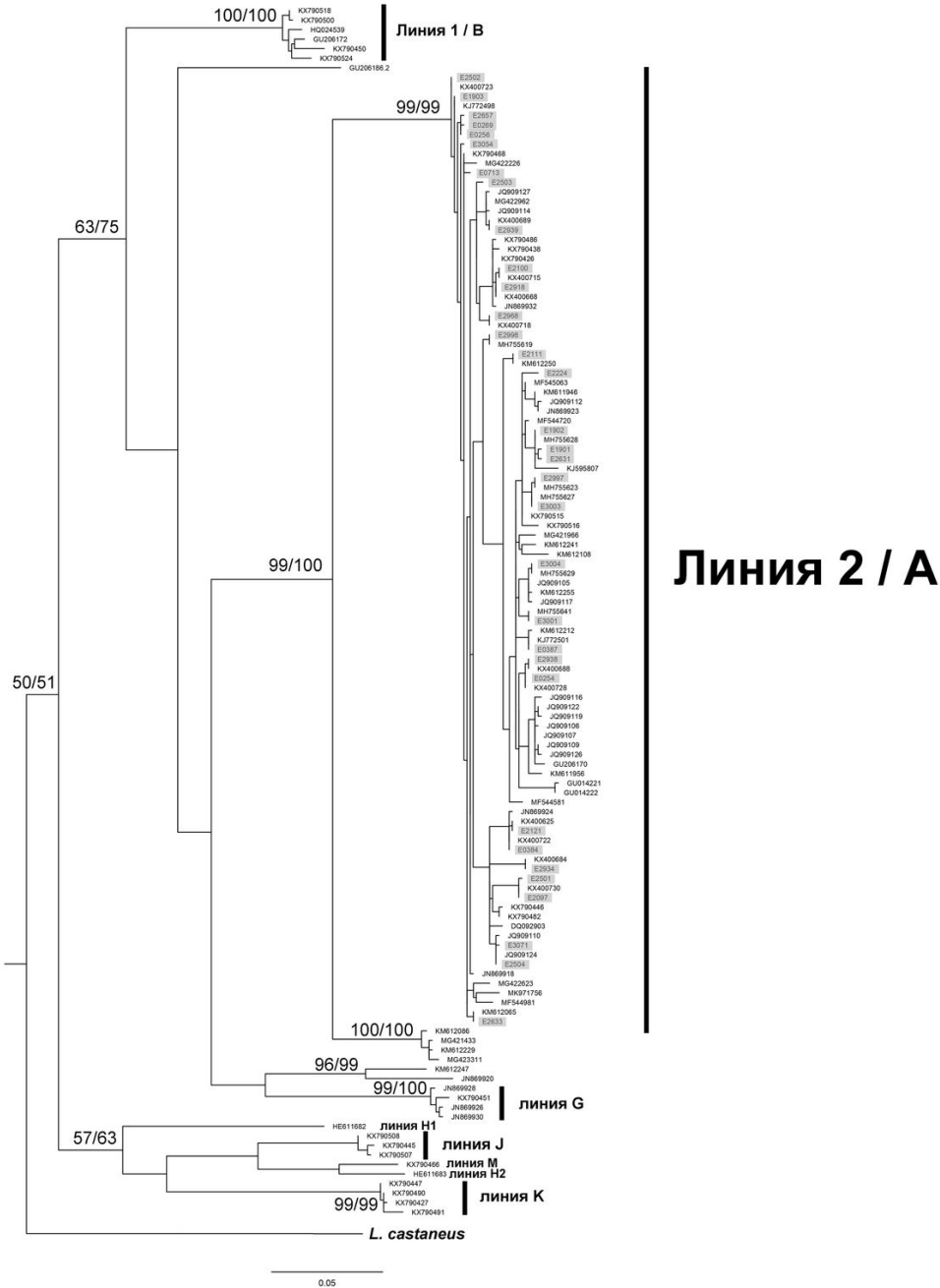


Рисунок 5.5.1 Филогенетическое дерево, построенное максимального правдоподобия на основе последовательностей гена *cox1* *L. rubellus*. Цифры над ветвями указывают бутстрепную поддержку метода максимального правдоподобия / байесовские апостериорные вероятности. Серым цветом выделены гаплотипы, найденные в нашей выборке; не выделенные – взяты из GenBank.

Таблица 5.5.1 Точки сбора образцов *L. rubellus*. Номера точке соответствуют рисунку 5.5.1.

№	Точки сбора	N
	Р. Беларусь, Гродненская обл, Щучинский р-н, д. Большое	
1	Можейково	5
2	Р. Беларусь, Гомельская обл, д. Случь	7
3	Р. Беларусь, Гомельская обл, Калиновичский р-н, д. Козловичи	6
4	Р. Беларусь, Гомельская обл, д. Дуброва	6
5	Р. Беларусь, Минская обл, Пуховичский р-н, пойма р. Свислочь	2
6	Р. Беларусь, Витебская обл, Докшицкий р-н, д. Замосточье	3
7	Р. Беларусь, Витебская обл, Полоцкий р-н, д. Полота	4
8	Россия, Вологодская обл., д. Данилово	4
9	Россия, Вологодская обл., д. Семеново	10
10	Россия, р. Карелия, Лоухский р-н, оз. Заборное	12
11	Россия, Архангельская обл., д. Бабонегово	12
12	Россия, р. Татарстан, Лаишевский р-н, д. Емельяново	1
13	Россия, Свердловская обл., г. Карпинск	4
14	Россия, Свердловская обл., р. Турья, водохранилище	3
15	Россия, Свердловская обл., д. Хомутовка	13
16	Россия, Омская обл., г. Омск	2
17	Россия, Новосибирская обл., д. Усть-Тула	1
18	Казахстан, г. Алма-Ата	2
19	Россия, Приморский край, Арсеньев	5
20	Россия, Приморский край, Владивосток	1
21	Россия, Сахалинская обл., о-в Кунашир	60
22	Россия, Сахалинская обл., о-в Шикотан	9
23	Россия, Камчатский край, с. Крутоберегово	3
	Всего	175

## 5.6 *Dendrodrilus rubidus*

В данной работе была собрана выборка из 48 особей трех форм *D. rubidus* (Таблица 5.6.1): 28 особи, отнесенные нами к форме *tenuis*, 13 – к форме *subrubicundus* и 7 – к *rubidus*. Ранее считалось, что на территории России и Беларуси встречаются только две формы: *tenuis* и *subrubicundus* [Перель, 1979; Максимова, Мухин, 2015, 2016], однако в ходе нашей работы удалось обнаружить и особей, которых следует отнести к форме *rubidus*. При этом, поскольку у этой формы присутствие семеприемников (как правило, пустых) отмечается крайне редко, то червей с развитыми заполненными семеприемниками мы обозначили как *subrubicundus*, даже если пубертатные валики у них отсутствовали или занимали сегменты 29–30. Наиболее однозначно по существующим диагнозам можно идентифицировать форму *tenuis*, ключевой признак которой – полное отсутствие и пубертатных валиков и семеприемников [Csuzdi et. al., 2017].

Для полученной выборки было проведено секвенирование фрагмента гена *cox1*. Все полученные последовательности имели длину 658 п.н. Следует отметить, что в большом числе случаев были отмечены вырожденные позиции: наложение пиков, соответствующих разным нуклеотидам, на хроматограммах. Соответственно, полученные последовательности правильнее называть не гаплотипами, а вариантами. Мы обнаружили 27 уникальных варианта для формы *tenuis*, 10 для *subrubicundus* и 7 для *rubidus*.

Мы построили филогенетическое дерево, включив в него полученные нами варианты *cox1*, а также 22 уникальных последовательности, взятых из GenBank (Рисунок 5.6.1). На дереве можно видеть, что все последовательности *D. rubidus* независимо от формы объединились в одну ветвь без какого-либо подразделения внутри нее. Ни одна из форм не образовывала обособленные группы. Среднее значение генетических расстояний внутри *D. rubidus* (p-distance) по сравнению с другими видами дождевых червей было невелико и составляло 1,7%.

Основываясь на полученных данных, можно утверждать, что разделение *D. rubidus* на подвиды [Всеволодова-Перель, 1997] не является обоснованным, так как

между ними отсутствуют генетические различия, а также нельзя говорить о каком-либо разделении их ареалов. Появление партеногенетических форм у *D. rubidus* следует считать недавним, причем переход к партеногенезу, по-видимому, независимо происходил много раз у отдельных популяций вида. Похожие процессы, но с меньшей частотой, наблюдаются у *A. trapezoides* [Fernandez et al., 2010]. Таким образом, *D. rubidus* представляет собой исключение среди изученных видов дождевых червей: для него до сих пор не было выявлено ни существования нескольких филогенетических линий, ни заметной генетической изменчивости между географически удаленными популяциями.

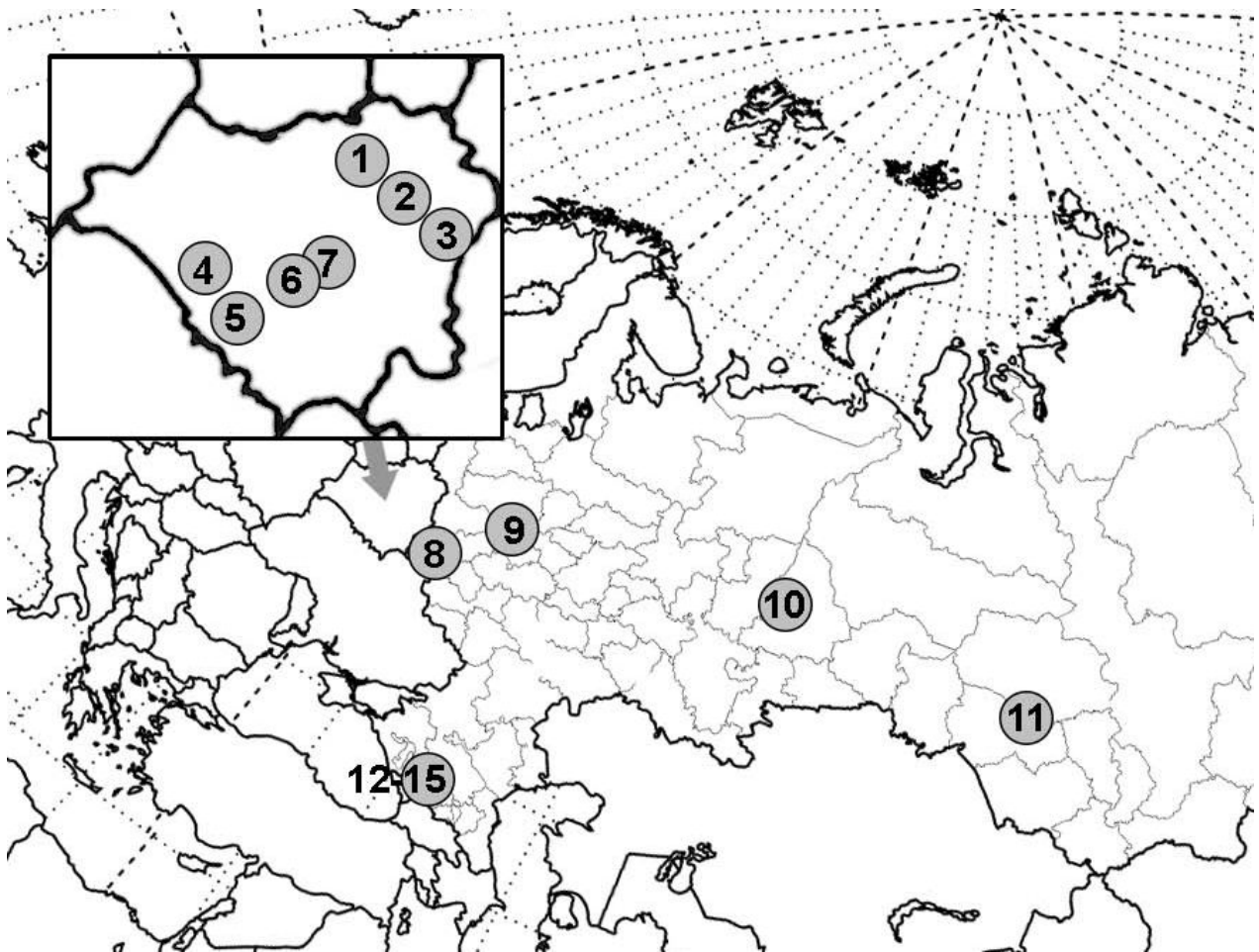


Рисунок 5.6.1 Точки сбора образцов *D. rubidus*. Номера популяций соответствуют Таблице 5.6.1.

Таблица 5.6.1. Точки сбора образцов *D. rubidus*. Номера популяций соответствуют точкам на рисунке 5.6.1.

№	Точка сбора	N	форма
1	Р. Беларусь, Витебская обл., Лепельский р-н, ок д. Домжерицы, N54.7515 E28.3041	1	<i>subrubicundus</i>
2	Р. Беларусь, Витебская обл., Чашникский р-н, ок. оз. Новолукомльское, N54.6495 E29.1085	4	<i>tenuis</i> , <i>subrubicundus</i>
3	Р. Беларусь, Витебская обл., Сенненский р-н, д. Погребёнка, N54.83796 E30.3989	1	<i>subrubicundus</i>
4	Р. Беларусь, Брестская обл., Столинский р-н, д. Тербличи, N51.8572 E27.4006	2	<i>tenuis</i>
5	Р. Беларусь, Гомельская обл., Житковичский р-н, ок д. Хлупин, N52.0703 E28.1555	6	<i>tenuis</i> , <i>subrubicundus</i>
6	Р. Беларусь, Минская обл., Стародорожский р-н, ок д. Солон, N53.0425 E28.1514	2	<i>tenuis</i>
7	Р. Беларусь, Могилевская обл., Осиповичский р-н, пойма р. Свислочь, N53.4125 E28.4869	2	<i>subrubicundus</i>
8	Россия, Брянская обл., заповедник Брянский Лес, N52.5488 E34.0497	8	<i>tenuis</i> , <i>rubidus</i>
9	Россия, г. Москва, п. Валуево, N55.5777 E37.3163	1	<i>rubidus</i>
10	Россия, Свердловская обл., Висимский заповедник, N57.3733 E59.7737	1	<i>subrubicundus</i>



11	Россия, Новосибирская обл.. с. Барышево, N55.5777 E37.3163	12	<i>tenuis</i> , <i>subrubicundus</i> , <i>rubidus</i>
12	Россия, Р. Карачаево-Черкесия, р. Зеленчук, N43.5284 E41.2182	4	<i>tenuis</i>
13	Россия, Р. Карачаево-Черкесия, ст. Хуса- Кардоникская, N43.7660 E41.5434	1	-//-
14	Россия, Р. Карачаево-Черкесия, р. Кяфар. хутор Лесо-Кяфар, N43.7558 E41.3981	1	-//-
15	Россия, Р. Карачаево-Черкесия, заповедник ТГБЗ, N43.5824 E41.3777	2	-//-
	Всего	48	

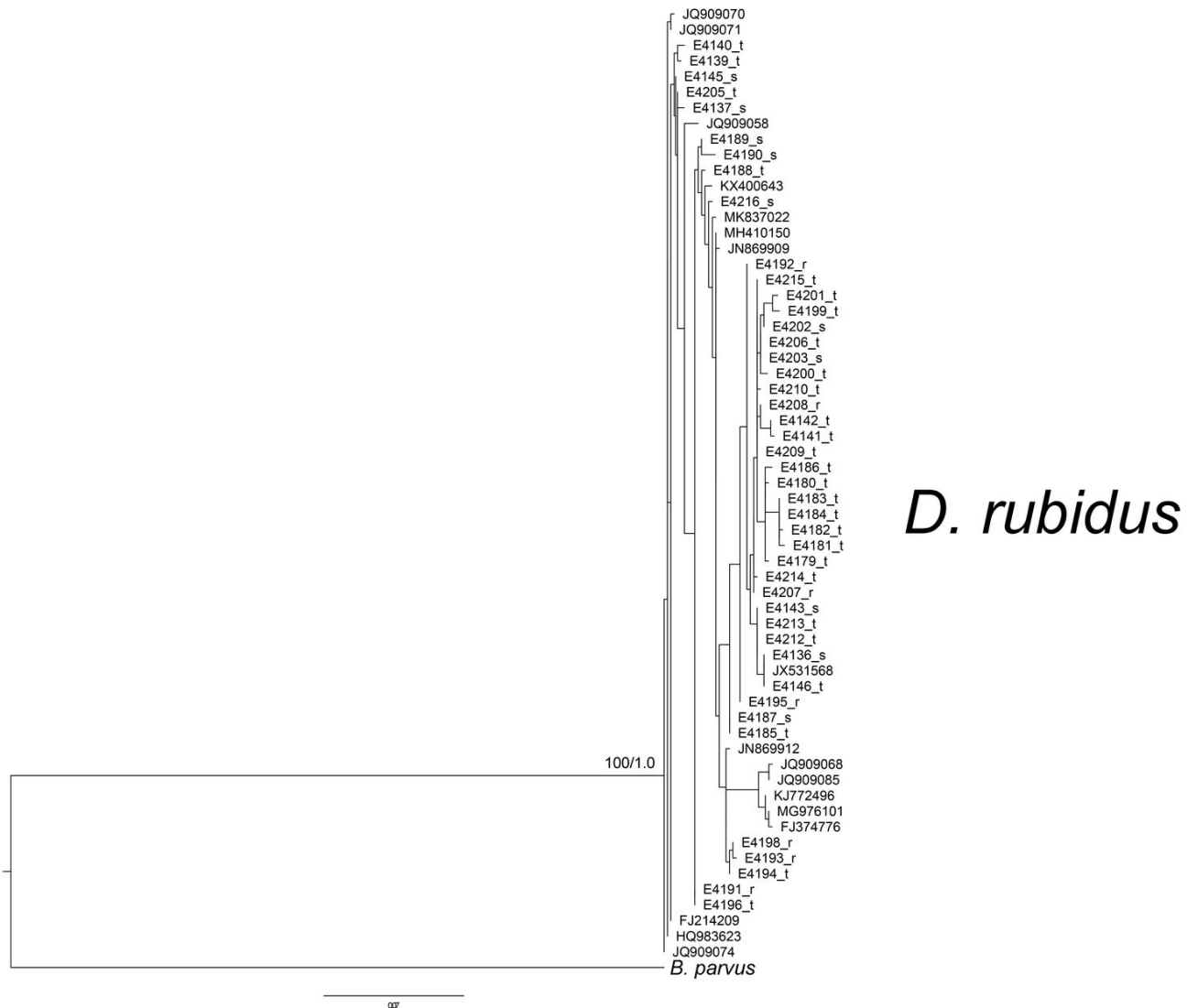


Рисунок 5.6.2 Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям *cox1* *D. rubidus* методом максимального правдоподобия. Обозначения: E#### – полученные нами последовательности; \_r – форма *rubidus*, \_t – форма *tenuis*; \_s – форма *subrubicundus*. Цифры над ветвями указывают бутстрепную поддержку метода максимального правдоподобия / байесовские апостериорные вероятности.

## 5.7 Сравнение pereгринных видов

### 5.7.1 Паттерны генетической изменчивости pereгринных видов

Выше мы изложили полученные результаты для каждого изученного pereгринного вида в отдельности, и встает вопрос, насколько схожи картины их генетической изменчивости. Хотя есть некоторые методологические проблемы, возникающие из-за различий в размерах и географическом охвате выборок, мы тем не менее можем попытаться сделать некоторые выводы.

В таблице 5.7.1.1 просуммировано количество филогенетических линий у изученных нами pereгринных видов. Видно, что в Беларуси и Европейской части России по сравнению с Западной Европой можно отметить значительное падение суммарного числа филогенетических линий, но это падение обусловлено двумя видами, *A. rosea* и *L. rubellus*. Для остальных четырех видов известно 1–3 линии, при этом снижение их числа по мере продвижения с запада на восток Евразии незначительно.

Мы также вычислили значения нуклеотидной и гаплотипической изменчивости (отражающие, соответственно, количество нуклеотидных замен и количество разных гаплотипов) вне зависимости от принадлежности к филогенетическим линиям (Таблица 5.7.1.2). К полученным результатам следует относиться очень осторожно, так как взятые выборки могут сильно варьировать по числу образцов и точек, из которых они взяты. Тем не менее, можно сказать, что генетическая изменчивость у разных pereгринных видов может сильно (на порядок) различаться. Как отмечено в предыдущих разделах (5.4, 5.6), *D. octaedra* и *D. rubidus* имеют заметно меньшую генетическую изменчивость по сравнению с остальными видами.

Сильное падение нуклеотидного разнообразия ( $\rho_i$ ) в белорусской и российских выборках по сравнению с Западной Европой наблюдается для *L. rubellus*, *O. tyrtaeum* и *D. octaedra*. У *A. caliginosa* и *A. rosea* нуклеотидное

Таблица 5.7.1.1 Число известных филогенетических линий перигринных видов в различных географических регионах.

	Западная Европа	Беларусь	Европейская Россия	Западная Сибирь	Дальний Восток
<i>A. caliginosa</i>	3	3	2	2	2
<i>A. rosea</i>	11	5	4	2	1
<i>L. rubellus</i>	8	1	1	1	1
<i>O. tyrtaeum</i>	2	3	2	2	1
<i>D. octaedra</i>	2	1	1	1	1
<i>D. rubidus</i>	1	1	1	1	1
Всего	27	14	11	9	7

Таблица 5.7.1.2 Показатели генетического разнообразия для изученных перигринных видов в различных географических регионах. Pi – нуклеотидное разнообразие, h – гаплотипическое разнообразие.

	Западная Европа		Беларусь		Европейская Россия		Западная Сибирь		Дальний Восток	
	pi	h	pi	h	pi	h	pi	h	pi	h
<i>A. caliginosa</i>	0,0690	0,898	0,0776	0,905	0,0131	0,934	0,0258	0,891	0,0514	0,585
<i>A. rosea</i>	0,1144	0,970	0,1169	0,813	0,0951	0,817	0,0649	0,514	-	-
<i>L. rubellus</i>	0,0953	0,985	0,0430	0,955	0,0232	0,951	-	-	0,0237	0,945
<i>O. tyrtaeum</i>	0,1207	0,933	0,0558	0,836	0,0693	0,463	0,0466	0,274	-	-
<i>D. octaedra</i>	0,0454	0,879	0,0113	0,938	0,0158	0,833	0,0050	0,911	0,0248	0,800
<i>D. rubidus</i>	0,0139	0,695	0,0161	0,941	0,0090	0,970	0,0094	0,970	-	-

разнообразие белорусской и западноевропейской выборок сходно, при этом в выборках из европейской части России и Западной Сибири видим сильное его уменьшение. Для *D. rubidus* заметного снижения нуклеотидного разнообразия не отмечено, но здесь следует учесть его невысокое генетическое разнообразие в принципе. Для всех шести изученных видов различия в нуклеотидной изменчивости выборок из европейской части России, Западной Сибири и Дальнего Востока разнонаправлены, что, скорее всего, является следствием неравномерности в количестве образцов и географических точек.

При этом для большинства видов и регионов гаплотипическая изменчивость велика ( $>0,8$ ), что отражает большое число гаплотипов. Заметное снижение гаплотипической изменчивости для российских выборок по отношению к западноевропейским и белорусским мы видим только у *O. tyrtaeum*, для которого в принципе выявлено сравнительно мало гаплотипов (Раздел 5.3).

Таким образом, мы видим, что при заселении России перекрестные виды утратили большую или меньшую часть своей генетической изменчивости. При этом они сохраняют значительную ее часть, что выражено, прежде всего, в большом числе гаплотипов в российских выборках перекрестных видов.

### 5.7.2 История расселения перекрестных видов

Из примерно 300 видов сем. Lumbricidae около полутора десятков относятся к перекрестным [Hendrix et al., 2008]. Источником их расселения считают юг Европы; это предположение представляется наиболее вероятным, но не доказанным. Кроме того, до недавнего времени мало что можно было сказать о путях и скорости их расселения, а также об изменениях генетического разнообразия по сравнению с исходными популяциями.

При этом не было известно, каков возраст популяций данных видов в России, и не являются ли они, по крайней мере, на некоторой её части, нативными (доголоценовыми). В целом, на вопрос может быть три варианта ответа: популяция могла бы существовать на данной территории до последнего оледенения,

распространиться естественным путём после окончания последнего ледникового периода, или же быть занесённой человеком недавно. Всеволодова-Перель, по всей видимости, придерживалась второй точки зрения [Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997]. До развития молекулярно-генетических методов не было возможности оценить возраст популяций, поэтому можно было только строить предположения на эту тему.

В работе была предпринята попытка ответить на поставленные выше вопросы. К сожалению, доступа к материалу предполагаемых предковых популяций peregrinных видов, распространённых на территории России, получить не удалось. Тем не менее, наши данные однозначно указывают на то, что российские популяции peregrinных видов генетически обеднены по сравнению с западноевропейскими и не содержат каких-либо филогенетических линий или гаплотипов, автохтонных для данной территории. Можно заключить, что обсуждаемые виды пришли сюда недавно. Это неудивительно, принимая во внимание кардинальные изменения климата и характера растительности [Tarasov et al., 2000; Величко и др., 2002; Wang et al., 2021]. Нельзя, однако, точно определить время их расселения; западносибирские популяции peregrinных видов однозначно занесены человеком, но история популяций с Восточно-Европейской равнины остаётся не ясной.

Нами были подробно изучены выборки дождевых червей с запада Восточной Европы (из Республики Беларусь), наряду с российскими популяциями. Для ряда видов (*A. rosea*, *A. caliginosa*, *O. tyrtaeum*) были найдены генетические линии или группы гаплотипов, которые не были пока обнаружены на территории Западной Европы или же встречаются там крайне редко (Разделы 5.1–5.3). Из этого можно сделать вывод о существовании в Центральной Европе центра генетического разнообразия обсуждаемых видов, пока не исследованного, и о том, что их популяции на данной территории являются оседлыми. Более того, на основании результатов, полученных для *A. rosea* можно предполагать, что в истории этого вида имело место расселение не только с запада на восток, но и в обратном направлении (Раздел 5.2).

Теоретически, любое расселение представляет собой «бутылочное горлышко» и, как следствие, приводит к снижению генетической изменчивости. У дождевых червей этот эффект должен усугубляться практически полным отсутствием потока генов на сколь-либо заметных расстояниях. Тем не менее, у многих перекрестных видов генетическое разнообразие при расселении не снижается [Saltonstall, 2011]. Результаты, указывающие на отсутствие снижения генетического разнообразия при расселении были получены и для дождевых червей [Porco et al., 2013]. По-видимому, данные выводы отчасти объясняются слабой изученностью генетической изменчивости, в особенности, в изначальных ареалах изучаемых видов, а также тем, что те популяции, которые считали автохтонными, на самом деле ими не являлись. Тем не менее, генетическая изменчивость перекрестных видов дождевых червей действительно оказывается высока.

В нашей работе было показано, что у разных видов дождевых червей генетическая изменчивость при расселении снижается в различной степени. По сравнению с западноевропейскими популяциями, генетическая изменчивость сильно ниже у *L. rubellus*: этот вид в Европе представлен множеством филогенетических линий, в то время как в России на данный момент найдена только одна. Стоит отметить, что в различных популяциях России, от западных границ до Дальнего Востока генетическая изменчивость этой линии примерно одинакова, то есть дальнейшего снижения генетического разнообразия не наблюдается.

В меньшей степени эти процессы выражены у *A. caliginosa*, *A. rosea*, *O. tyrtaeum* и *D. octaedra*: в российских популяциях наблюдается умеренное снижение как количества филогенетических линий, так и генетической изменчивости внутри них. Особое положение занимает вид *D. rubidus*: пока что известна лишь одна филогенетическая линия этого вида, что среди дождевых червей встречается редко, и генетическая изменчивость популяций в разных частях ареала приблизительно одинакова.

Таким образом, можно заключить, что российские популяции переносных видов дождевых червей представляют собой результат позднего заселения в большой степени при участии человека. Расселение сопровождается снижением генетического разнообразия с запада на восток, которое для разных видов выражено в разной степени.

### 5.7.3 Соотношение генетической и хромосомной изменчивости

Для ряда видов нам удалось соотнести известные из литературы хромосомные числа и полученные нами данные о числе филогенетических линий. *D. octaedra* почти везде представлена одной линией (Раздел 5.4), при этом известно три расы, тетра-, пента- и гексаплоидная [Casellato, 1987 – цит. по Межжерин и др., 2018; Межжерин и др., 2018]. Та же закономерность характерна и для *D. rubidus* – одна линия (Раздел 5.6), шесть известных хромосомных рас [Vedovini, 1973; Casellato, 1987 – цит. по Межжерин и др., 2018; Межжерин и др., 2018]. У *A. rosea* показано наличие множества филогенетических линий (Раздел 5.2), но симпатричное их обитание отмечается не слишком часто. С. В. Межжерин и др. [2018] описывают совместное обитание в Национальном ботаническом саду им. академика А.В. Фомина (г. Киев) четырех хромосомных рас *A. rosea*: ди-, три-, гекса- и октоплоидной. Мы ни разу не обнаруживали четырех филогенетических линий этого вида одновременно в одной точке, поэтому можем предположить, что одной линии здесь также соответствует несколько хромосомных рас.

Таким образом, для переносных видов, как для *E. nordenskioldi* (Раздел 3.5.2), так и для переносных видов, характерна закономерность «одна линия – несколько хромосомных рас». Хорошее разграничение линий и плоидности можно наблюдать только у *O. tyrtaeum*, у которого «мелкая» линия – диплоид, а «крупная» – триплоид, что легко проследить по их размерам [Межжерин и др., 2018]. При этом плоидность третьей филогенетической линии вида, линии «N» (Раздел 5.3) пока неизвестна.



## Глава 6. Молекулярные основы холодоустойчивости дождевых червей

Метаболомный анализ позволяет быстро получить количественные данные для десятков малых молекул; его перспективность для почвенных организмов была показана в ряде исследований [Jones, Dias, 2014]. В результате проведенной нами на выборках *D. octaedra* и *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1 работы были получены  $^1\text{H}$  ЯМР спектры для наборов метаболитов. Список идентифицированных метаболитов включал в себя 45 веществ (Таблица 6.1). Кроме того, был выявлен ряд пиков, соответствующие которым вещества идентифицировать не удалось. Из этого набора у *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1 для 22 веществ наблюдалось статистически значимое изменение концентраций в выборке замороженных червей по сравнению с контрольными: для 18 – увеличение, для четырех – уменьшение. У *D. octaedra* было отмечено увеличение концентраций для десяти веществ, при этом для большинства из них относительные изменения были меньше, чем для *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1.

По результатам анализа можно заключить, что глюкоза – единственный низкомолекулярный криопротектор у обоих видов. Средняя концентрация глюкозы у *D. octaedra* составляла 110 ммоль/г; у *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1 – 177 ммоль/г. Принципиально это согласуется с данными, полученным другими исследователями [Берман, Лейрих, 1985; Holmstrup et al., 1999]. В работе J. G. Bundy et al. [2003] средняя концентрация глюкозы у замороженных *D. octaedra* составила около 110 ммоль/г (после приблизительного пересчета с предполагаемым содержанием воды 70%); у замороженных *E. nordenskioldi* в работе M. Holmstrup et al. [1999] – 5–28 ммоль/г (также после пересчета), у Д. И. Бермана и др. [1985] – около 22 ммоль/г.

Выявленный разброс может объясняться рядом факторов. Нельзя исключать методические погрешности, так как все перечисленные работы выполнены принципиально разными методами. При этом важную роль могут играть и различия между популяциями, и разница в протоколе замораживания. Так, в работе L.

Rasmussen и М. Holmstrup [2002] на *D. octaedra*: авторы показали, что замороженные черви из Финляндии содержат около 22 ммоль/г глюкозы, а датские и гренландские – только около 5,500 ммоль/г. Протокол замораживания также играет роль: в природе происходят многократные колебания температуры, в отличие от лабораторных условий с постепенным понижением температуры с постоянной скоростью.

Прочих веществ, могущих быть криопротекторами, в достаточных для этой роли концентрациях обнаружено не было. Отдельного обсуждения заслуживает роль глицерина. Это вещество является криопротектором у многих организмов [Storey, Storey, 1985, 1992, 1996; Block, 1991; Hochachka, Somero, 2002]. У *D. octaedra* глицерин не был обнаружен ни в предыдущих работах [Rasmussen, Holmstrup, 2002; Bundy et al., 2003], ни в нашем исследовании. У *E. nordenskioldi* в работе М. Holmstrup et al. [1999] выявлено около 4000 ммоль/г глицерина в замороженных червях и примерно столько же в контроле. Д. И. Берман и А. Н. Лейрих [1985] выявили примерно 33 ммоль/г глицерина в замороженных червях и около 11 ммоль/г – в контрольных.

Наблюдаемые различия можно объяснить, во-первых, факторами, описанными выше для *D. octaedra*. Однако основные различия, скорее всего, обусловлены тем, что взятые в обсуждаемых работах популяции *E. nordenskioldi* относятся к разным филогенетическим линиям вида, а точнее – к разным видам, что показано в нашей работе (Глава 3). Так, взятая нами популяция относится к форме *pallida* линии 1. Популяция из работы Д. И. Бермана и А. Н. Лейрих [2015] собрана в бассейне Колымы (хребет Черского), а, следовательно, относится к линии 9 формы *nordenskioldi*. В работе М. Holmstrup et al. [1999] были исследованы черви с Таймыра, где обитают линии 1 и 9 формы *nordenskioldi*. Между этими линиями существуют очень глубокие генетические различия, а время их дивергенции составляет несколько миллионов лет (Раздел 3.1). Показано, что предельной переносимой

Таблица 6.1. Список веществ, идентифицированных в метаболических спектрах контрольных и замороженных дождевых червей, среднее (нмоль/г  $\pm$  стандартная ошибка). Конт. – контрольная выборка; \* – значимость различий между опытной и контрольной выборками в соответствии с критерием Манна-Уитни  $<0.05$ ; \*\* –  $<0.01$ ; \*\*\* –  $<0.005$ ; §, §§, §§§ – то же для сравнения контрольных значений *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* и *D. octaedra*.

Вещество	<i>Eisenia</i> sp. aff. <i>nordenskioldi</i> f. <i>pallida</i>		<i>D. octaedra</i>	
	КОНТ.	ОПЫТ	КОНТ.	ОПЫТ
Глюкоза		110000 $\pm$		177000 $\pm$
	2400 $\pm$ 400	6000***	2000 $\pm$ 400	27000***
Сцилло-инозитол		1830 $\pm$	2100 $\pm$	
	1070 $\pm$ 70	270***	400§	2500 $\pm$ 200
Лактат		8700 $\pm$		
	520 $\pm$ 100	500***	630 $\pm$ 170	1300 $\pm$ 300
Сукцинат		5200 $\pm$		
	380 $\pm$ 30	900***	260 $\pm$ 40§	830 $\pm$ 100***
Малат		1930 $\pm$	930 $\pm$	
	3400 $\pm$ 270	200***	100§§§	1470 $\pm$ 200
Фумарат	137 $\pm$ 20	123 $\pm$ 17	110 $\pm$ 10	100 $\pm$ 10
Аланин		34300 $\pm$	8300 $\pm$	24000 $\pm$
	14700 $\pm$ 2000	2300***	2300	900***
Аспарагин	1400 $\pm$ 230	1830 $\pm$ 90	730 $\pm$ 130	930 $\pm$ 170
Аспартат	2000 $\pm$ 300	530 $\pm$ 170***	860 $\pm$ 100	1120 $\pm$ 100
Глутамин	3700 $\pm$ 600	2900 $\pm$ 400	1130 $\pm$ 130	750 $\pm$ 70
Глутамат	5200 $\pm$ 400	5000 $\pm$ 700	4430 $\pm$ 170	5000 $\pm$ 400
Глицин		1170 $\pm$		
	237 $\pm$ 27	200***	240 $\pm$ 50	480 $\pm$ 50*
Гистидин	980 $\pm$ 80	1160 $\pm$ 70	930 $\pm$ 100	960 $\pm$ 80

Лейцин		1600 ±		
	290 ± 40	500***	133 ± 23 <sup>§</sup>	250 ± 50*
Изолейцин	93 ± 10	730 ± 200***	60 ± 10	100 ± 8*
Лизин	610 ± 80	1600 ± 500	250 ± 40 <sup>§§</sup>	270 ± 50
Метионин	360 ± 40	290 ± 50	190 ± 13 <sup>§§§</sup>	157 ± 10
Фенилаланин	200 ± 30	770 ± 230*	103 ± 17 <sup>§</sup>	163 ± 17*
Треонин		2900 ±		
	800 ± 130	270***	1600 ± 400	2500 ± 500
Тирозин	113 ± 13	570 ± 170***	100 ± 10	142 ± 8*
Валин		1030 ±		
	123 ± 17	270***	75 ± 8	160 ± 17***
Метионина				
сульфоксид	2170 ± 170	2270 ± 130	1900 ± 200	1930 ± 170
3-метилгистидин	37 ± 10	49 ± 6	670 ± 130 <sup>§</sup>	970 ± 170
Ансерин	83 ± 13	57 ± 13	180 ± 30 <sup>§</sup>	167 ± 20
Бетаин	1240 ± 30	1270 ± 130	800 ± 100 <sup>§§</sup>	870 ± 130
Путресцин	290 ± 40	280 ± 30	500 ± 90	420 ± 30
Инозинат	37 ± 10	500 ± 200*	127 ± 27 <sup>§§</sup>	100 ± 13
Инозин	180 ± 40	900 ± 170***	100 ± 40	60 ± 13
АТФ	23 ± 13	17 ± 10	12.3 ± 2.7	16.7 ± 2.7
АДФ	100 ± 40	120 ± 60	163 ± 20	160 ± 20
АМФ	600 ± 100	430 ± 130	850 ± 50	880 ± 50
Муравьиная				
кислота	103 ± 20	190 ± 30*	260 ± 40 <sup>§§§</sup>	303 ± 20
NAD	71 ± 6	20 ± 4***	70 ± 10	75 ± 8
Никотинамид	76 ± 7	170 ± 13***	84 ± 7	73 ± 10
UDP-N-				
ацетилглюкозами				
н	77 ± 3	37 ± 10**	85 ± 6	77 ± 6
Холин	64 ± 8	380 ± 70***	81 ± 7	113 ± 10*

Фосфохолин	100 ± 10	100 ± 17	320 ± 50 <sup>§§§</sup>	250 ± 40
Глицерофосфохолин	320 ± 23	290 ± 40	2200 ± 500	3000 ± 130
3-гидроксиизобутират	70 ± 13	170 ± 40	100 ± 20	127 ± 20
2-оксобутират	15000 ± 4000	19000 ± 9000	8800 ± 900	10500 ± 1100
Ацетат	187 ± 10	670 ± 130 <sup>***</sup>	190 ± 30	280 ± 17
Диметилмалонат	34 ± 4	49 ± 3 <sup>*</sup>	93 ± 23	127 ± 10
2-аминоизобутират	120 ± 50	130 ± 23	107 ± 23	200 ± 30
Малеиновая кислота	6300 ± 1700	8000 ± 4000	4100 ± 500	4900 ± 500
Гидроксиоктаноат	18000 ± 4000	22000 ± 9000	10200 ± 600	12700 ± 1000

температурой для линии 9 *nordenskioldi* является -34 °С, линии 1 формы *pallida* – 28 °С, а линии 1 формы *nordenskioldi* – -12 °С [Meshcheryakova, Berman, 2014; Berman et al., 2019]. Исходя из этого, естественно ожидать и значительные различия в биохимической адаптации к замораживанию.

Замораживание приводит к гипоксии в связи с невозможностью кровеносной системы доставлять кислород к клеткам. Это активирует анаэробный гликолиз и накопление метаболитов, связанных с гипоксией. Лактат – основной продукт гликолиза у большинства животных [Rogatzki et al., 2015]. При этом J. G. Bundy et al. [2003] не обнаружили лактата у замороженных особей *D. octaedra*, в отличие от неустойчивых к замораживанию видов дождевых червей. Наши данные подтверждают наблюдения J. G. Bundy et al. [2003]. При этом достоверное увеличение количества лактата было отмечено у *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1. Альтернативным продуктом гликолиза является также аланин, достоверное уменьшение концентрации которого при замораживании было показано у обоих видов. Следует отметить, что у замороженных особей *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1 концентрации аланина вчетверо выше, чем лактата. Можно предположить, что данная аминокислота нарабатывается в ходе гликолиза в большем количестве, чем лактат.

Следует отметить также достоверное увеличение концентраций сукцината у обоих видов: у *D. octaedra* примерно в три раза, у *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1 – в 10 раз. Известно, что у позвоночных гипоксия/ишемия ведет к остановке цикла Кребса с накоплением сукцината, что отмечено у многих организмов [Chouchani et al., 2014; Chinopulos, 2019; Bundgaard et al., 2019]. Очевидно, сходные процессы наблюдаются и у дождевых червей.

У *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1 происходит статистически достоверное изменение концентраций девяти из 15 протеиногенных аминокислот (Таблица 6.1): концентрация аспартата уменьшается, остальных восьми аминокислот – увеличивается. У *D. octaedra* выявлено увеличение концентраций семи аминокислот из 15, при этом различия между опытом и контролем выражены слабее, чем у *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1.

Из прочих веществ следует отметить значительные увеличения концентраций инозина и инозината – продуктов деградации пуринов – у *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1. У обоих видов значительно увеличивается концентрация холина – прекурсора ацетилхолина и фосфолипидов. У замороженных особей *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1 примерно на 70% больше сцилло-инозитола, чем у контрольных. Данное вещество может играть роль криопротектора, однако наблюдаемые значения слишком малы для этого.

В целом, при сравнении метаболических профилей двух видов можно отметить, что замораживание приводит к гораздо более заметным сдвигам метаболомных профилей у *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1 по сравнению с *D. octaedra*: очевидно, что у первого гораздо более выражены изменения концентраций веществ, связанных с гипоксией. Более того, присутствие у *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1 инозина и инозината, возможно, указывает на деградацию азотистых оснований. Можно предположить, что это связано с гораздо большим размером тела *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida* 1: поскольку дыхание у дождевых червей происходит путем диффузии, у этого вида гораздо больше последствия замерзания системы капилляров. В пользу этого предположения говорят наблюдения М. Holmstrup et al. [2007a], установивших, что более мелкие *D. octaedra* лучше переносят замораживание, чем крупные особи.

Известно, что ряд животных способен выдерживать охлаждение тела до отрицательных температур. Выделяют три стратегии адаптации к этому состоянию: витрификацию, избегание замораживания (поддержание воды в теле в переохлажденном состоянии) и устойчивость к замораживанию (способность переносить формирование кристаллов льда в межклеточной жидкости и у некоторых организмов даже внутри клеток без летальных повреждений) [Storey, Storey, 1992, 1996, 2017].

Проводимые ранее исследования [Берман и Лейрих, 1985; Holmstrup, 1999; Rassumussen, Holmstrup, 2002; Bundy et al., 2003; Overgaard et al., 2007; Calderon et al., 2009] показали, что главным криопротектором у дождевых червей является глюкоза. Особняком стоит работа Д. И. Бермана и А. Н. Лейрих [1985], в которой

показано, что у популяций *E. nordenskioldi* из бассейна Колымы также увеличивается концентрация глицерина. При этом подавляющее большинство работ используют анализ целевых веществ, то есть могут выявить только те немногие криопротекторы, для которых проводился анализ, поэтому вопрос о существовании других низкомолекулярных криопротекторов остается открытым. Единственной работой, использующей методы метаболомики, является статья J. G. Bundy и др. [Bundy et al., 2003], в которой лишь глюкоза оказалась веществом, нарабатываемым в больших количествах у замороженной *D. octaedra*.

В проведенной нами работе было идентифицировано больше метаболитов, чем в статье Bundy и др. [Bundy et al., 2003]. Полученные данные показали, что холодостойкость дождевых червей к замораживанию действительно основана на использовании глюкозы как криопротектора. Иных веществ, таких, как другие сахара, глицерин, различные стереоизомеры инозитола в достаточных для криопротекторной функции количествах выявлено не было. Мочевина также является криопротектором, однако это вещество нельзя детектировать при помощи  $^1\text{H}$  ЯМР, поэтому вопрос об использовании мочевины дождевыми червями остается открытым. При этом мочевина не является главным криопротектором среди прочих у тех животных, у которых она обнаружена [Larson et al., 2014; Costanzo, 2019], и разумно то же предположить для дождевых червей.

Таким образом, дождевые черви, в отличие от, например, насекомых, у которых выявлено множество редких криопротекторов [Toxoraecus, Sinclair, 2018], оказались ограничены базовыми веществами, которые выполняют ту же функцию у позвоночных [Storey, Storey, 2017; Costanzo, 2019]. Глюкоза играет важнейшую роль у всех животных, поэтому понятно, почему именно эта молекула была использована ими и в качестве криопротектора.

С одной стороны, замораживание приводит к остановке систем транспорта жидкости (кровеносной, лимфатической и т.д.) и, соответственно, ведет к дефициту кислорода в тканях. С другой, метаболизм пойкилотермных животных снижается при понижении температуры сам по себе, а при дефиците кислорода происходит дополнительное его подавление. Таким образом, вынужденный переход к



анаэробному гликолизу создает сильный энергетический стресс, а снижение уровня метаболизма его компенсирует, но лишь отчасти, о чем говорят высокие уровни продуктов гликолиза и прочих связанных с ишемией/гипоксией метаболитов, обнаруженных у устойчивых к замораживанию животных как в нашей работе, так и другими авторами.

При этом можно предполагать, что организмы в замороженном состоянии частично способны дышать. Так, Voituron и др. [Voituron et al., 2009b] показали, что остромордая лягушка *Rana arvalis* в замороженном состоянии все еще способна поглощать кислород, хотя интенсивность его поглощения снижается на порядок. В то время как для лягушек дыхание кожей составляет лишь часть от общего дыхания, дождевые черви дышат только через кожу. Поэтому можно ожидать, что степень остаточного дыхания у замороженных дождевых червей будет выше, и тем выше, чем мельче животное. Это, возможно, находит отражение в наблюдаемых нами различиях между метаболомами *E. nordenskioldi* и *D. octaedra*.

## ВЫВОДЫ

1. Распространенные на территории России дождевые черви (*Eisenia nordenskioldi*, *Drawida ghilarovi*, *Dendrobaena octaedra*, *D. schmidtii*, *Aporrectodea caliginosa*, *A. rosea*, *Octolasion tyrtaeum*, *Lumbricus rubellus*) представляют собой комплексы из нескольких (от 2 до 15) филогенетических линий, которые можно рассматривать как отдельные виды. Таким образом, биоразнообразие дождевых червей на территории России гораздо выше, чем считалось ранее.

2. Некоторые из выявленных филогенетических линий ряда изученных видов (*E. nordenskioldi*, *D. schmidtii*, *A. caliginosa*, *O. tyrtaeum*) достоверно различаются по отдельным морфологическим признакам, экофизиологическим характеристикам в отношении факторов среды, плоидности, по генетическим данным могут быть частично репродуктивно изолированы.

3. Наибольшее число филогенетических линий (не менее 15 на данный момент) и наиболее сложная структура выявлены в пределах *Eisenia nordenskioldi* – автохтонного североевразийского вида дождевых червей. Выделяемые ранее на основе морфологических и экологических признаков подвиды *E. nordenskioldi* (*E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida*) не монофилетичны.

4. Российские популяции перекочующих видов дождевых червей характеризуются меньшим в различной степени, но, тем не менее, достаточно высоким генетическим разнообразием по сравнению с конспецифичными западноевропейскими популяциями из нативных ареалов.

5. Некоторые филогенетические линии *Eisenia nordenskioldi* имеют филогеографическую структуру, характерную для перекочующих видов – малое число гаплотипов, выявленных на большой территории, что свидетельствует об их быстром расселении, по-видимому, при участии человека.

6. Виды, обитающие на арктических и субарктических территориях, обладают высокой холодостойкостью – *D. octaedra* и различные линии *E. nordenskioldi* переносят от -12 до -34°C, используя глюкозу как криопротектор и активацию анаэробного гликолиза. При этом между ними наблюдаются заметные

различия в выраженности метаболических изменений при замораживании (накоплении лактата и продуктов деградации нуклеотидов).

7. Высокая холодостойкость единственного представителя автохтонной фауны Северной Евразии *Eisenia nordenskioldi* обусловила выживание его популяций во время климатических колебаний, по крайней мере, со среднего плейстоцена. Популяции 9-ой линии *E. nordenskioldi* различных регионов севера Сибири характеризуются уникальными наборами гаплотипов вследствие их давней изоляции в данных регионах. Однако, современные ареалы филогенетических линий этого комплекса определяются не столько их холодостойкостью, сколько историей расселения.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абуkenова В.С. Люмбрициды Казахского мелкосопочника: эколого-физиологические особенности представителей различных жизненных форм: автореф. дис. канд. биолог. наук. Карагандинский гос. универ. им. Е.А. Букетова МОН РК. Алматы. 2008.
2. Акулова Л.И., Долгин М.М., Колесникова А.А. Распространение и численность дождевых червей (Lumbricidae) в подзоне средней тайги Республики Коми // Вестник Института Биологии Коми НЦ УрО РАН. – 2017. №. 1 (199). С. 4-16.
3. Алейникова М.М. Почвенная фауна различных ландшафтов Среднего Поволжья // Почвенная фауна Среднего Поволжья. М.: Наука, 1964. С. 5–51.
4. Алейникова М.М. Почвообитающие беспозвоночные различных типов леса в Среднем Поволжье // Материалы по фауне и экологии почвообитающих беспозвоночных. Казань: Издательство Казанского университета, 1968. С. 3–97.
5. Алейникова М.М. Фауна и ландшафтное распределение дождевых червей в Среднем Поволжье // Pedobiologia. 1969. Т. 9. С. 46-54.
6. Алейникова М.М. Почвенная фауна лесов Волжско-Камского заповедника (Раифа) // Труды Волжско-Камского Государственного Заповедника. Казань: КГУ. 1972. №. 2. С. 133.
7. Алисов Б.П. Климат СССР. М.: Изд-во МГУ, 1956.
8. Алфимов А.В. Термический режим верхних слоев почвы в основных экосистемах пояса редколесий бассейна Верхней Колымы / В: Пояс редколесий верховий Колымы (район строительства Колымской ГЭС). Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1985. С. 9–29.
9. Алфимов А.В. Распределение минимальных температур в поверхностном слое почвы под снегом в Северной Евразии // Почвоведение. 2005. № 4. С. 438–445.

10. Алфимов А.В., Берман Д.И., Булахова Н.А. Зимние температурные условия в корнеобитаемом слое почв в Сибири и на северо-востоке Азии // Вестник СВНЦ ДВО РАН. 2012. № 3. С. 10–18.
11. Атлавините О.П. Экология дождевых червей и их влияние на плодородие почвы в Литовской ССР. Вильнюс: Мокслас, 1975.
12. Атлавините О.П. Влияние дождевых червей на агроценозы: Монография. Вильнюс: Мокслас, 1990.
13. Баскина В.П., Фридман Г.М. Статистическое исследование животного населения двух сообществ Камской поймы // Труды Биологического Научно-Исследовательского Института и Биологической станции при Пермском Государственном университете. 1928. Т. 1. №. 2/3. С. 183–295.
14. Берман Д.И., Булахова Н.А., Мещерякова Е.Н. Холодоустойчивость и ареал дождевого червя *Eisenia sibirica* (Oligochaeta, Lumbricidae) // Сибирский Экологический Журнал. 2016. № 1. С. 56–64.
15. Берман Д.И., Лейрих А.Н. О способности дождевого червя *Eisenia nordenskioldi* (Eisen) (Lumbricidae, Oligochaeta) переносить отрицательные температуры // Доклады АН СССР. 1985. Т. 285, № 5. С. 1258.
16. Берман Д.И., Лейрих А.Н., Алфимов А.В. Об устойчивости дождевого червя, *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae), к экстремально низкой влажности почвы на северо-востоке Азии // Зоологический Журнал. 2002. Т. 81. № 11. С. 1308–1318.
17. Берман Д.И., Лейрих А.Н. Холодоустойчивость массовых почвообитающих беспозвоночных животных северо-востока Азии. 2. Холодоустойчивость как адаптация к климату // Зоологический Журнал. 2017. Т. 96, № 10. М. 1119–1131.
18. Берман Д.И., Мещерякова Е.Н., Лейрих А.Н. Яйцевые коконы дождевого червя *Dendrodrilus rubidus tenuis* (Lumbricidae, Oligochaeta) переносят пребывание в жидком азоте // Доклады академии наук. 2010. Т. 434, № 6. С. 834–837.

19. Бессолицына Е.П. Структура и динамика почвенных зооценозов в ландшафтах юга Сибири. Институт географии Российской академии наук, 2003.
20. Бессолицына Е.П. Структура и функционирование почвенных зооценозов таежных геосистем Лено-Ангарского плато // География и природные ресурсы. Фонд " Центр поддержки науки и культуры", 2008. № 4. С. 84–89.
21. Бессолицына Е.П. Эколого-географические закономерности распределения дождевых червей (*Oligocheta*, *Lumbricidae*) в ландшафтах юга Средней Сибири // Экология. 2012. № 1. С. 70.
22. Бессолицына Е.П. Ландшафтно-экологические закономерности распределения дождевых червей (*Oligocheta*, *Lumbricidae*) в почвах юга Средней Сибири // Сибирский экологический журнал. 2013. Т. 20, № 1. С. 27–36.
23. Бобков Р.А. Четвертичное оледенение в Западной Сибири. Реальность или вымысел? // Научная и производственная деятельность – средство формирования среды обитания человечества. 2016. С. 69–74.
24. Булатова Н.Ш., Графодатский А.С., Перель Т.С. О постоянстве хромосомного набора у полиплоидных дождевых червей (на примере *Eisenia nordenskioldi*) // Генетика. 1987. Т. 23, № 3. С. 571–574.
25. Бызова Ю.Б., Чадаева З.В. Сравнительная характеристика почвенной фауны различных ассоциаций пихтового леса (Кемеровская область) // Зоологический журнал. 1965. Т. 44, № 3. С. 331–339.
26. Бызова Ю.Б. Влияние авиахимической обработки на фауну почвенных беспозвоночных темнохвойных лесов // Зоологический журнал. 1964. Т. 43, № 4. М. 488–502.
27. Бызова Ю.Б. Зависимость потребления кислорода от образа жизни и размера тела на примере дождевых червей (*Lumbricidae*, *Oligochaeta*) // Журнал Общей Биологии. 1965. Т. 26. С. 555–561.

28. Бызова Ю.Б. О влиянии напряжения кислорода на интенсивность дыхания дождевых червей (*Lumbricidae*, *Oligochaeta*) // Журнал Эволюционной Биохимии и Физиологии. 1967. Т. 3, № 1. С. 74–75.
29. Бызова Ю.Б. Суммарное содержание гемоглобина у различающихся по хромосомным наборам форм дождевого червя *Eisenia nordenskioldi* (Eisen, 1879) (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) // Доклады АН СССР. 1982. Vol. 264, № 4. P. 1014–1015.
30. Всеволодова-Перель Т.С. Дождевые черви фауны России: Кадастр и определитель. М.: Наука. 1997.
31. Всеволодова-Перель Т.С., Булатова Н.Ш. Полиплоидные расы дождевых червей (*Lumbricidae*, *Oligochaeta*), распространенные в пределах Восточно-Европейской равнины и в Сибири // Известия Российской Академии Наук. Серия биологическая. 2008. №. 4. С. 448–452.
32. Всеволодова-Перель Т.С., Лейрих А.Н. Распространение и экология дождевого червя *Eisenia nordenskioldi pallida* (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*), массового на юге Сибири и Дальнего Востока // Зоологический Журнал. 2014. Т. 93, № 1. С. 45–52.
33. Величко А.А., Фаустова М.А., Кононов Ю.М. Динамика ландшафтных компонентов и внутренних морских бассейнов Северной Евразии за последние 130 000 лет Атлас-монография. М.: ГЕОС. 2002.
34. Викторов А.Г. Экология, кариология и радиочувствительность разноплоидных рас дождевых червей: автореферат дис. канд. биолог. наук. М: Институт эволюционной морфологии и экологии животных им. А. Н. Северцова. 1989.
35. Викторов А.Г. Разнообразие полиплоидных рас в семействе дождевых червей *Lumbricidae* // Успехи современной биологии. 1993. Т. 113, № 3. С. 304–312.
36. Власенко Р. П., Гарбар О. В. Клональная структура, кариологический и морфологический анализ изолированного поселения гипервариабельного

- вида дождевых червей *Aporrectodea rosea* (Oligochaeta: Lumbricidae) // Науковий Вісник Ужгородського Університету. 2007. №. 29. С. 187–191.
37. Воробейчик Е.Л. Население дождевых червей (Lumbricidae) лесов Среднего Урала в условиях загрязнения выбросами медеплавильных комбинатов // Экология. 1998. № 2. С. 102–108.
38. Воробейчик Е.Л., Ермаков А.И., Тунева Т.К., Золотарёв М.П. Изменение разнообразия почвенной мезофауны в градиенте промышленного загрязнения // Российский Энтомологический Журнал. 2012. Т. 21, № 2. С. 203–218.
39. Воробейчик Е.Л., Ермаков А.И., Гребенников М.Е. Начальные этапы восстановления сообществ почвенной мезофауны после сокращения выбросов медеплавильного завода // Экология. 2019. № 2. С. 133–148.
40. Воробейчик Е. Л., Ермаков А. И., Нестеркова Д. В., Гребенников М. Е. Крупные древесные остатки как микростации обитания почвенной мезофауны на загрязненных территориях // Известия РАН. Серия биологическая. 2020. № 1. С. 85–95.
41. Воронова Л. Д. Почвенная фауна южной тайги Пермской области и ее изменение под влиянием пестицидов: автореф. дис. канд. биолог. наук. М: Институт эволюционной морфологии и экологии животных. 1971.
42. Ганин Г.Н. Почвенные животные Уссурийского края. Хабаровск: Дальнаука, 1997.
43. Ганин Г.Н. Земляные черви *Drawida ghilarovi* Gates, 1969 (Moniligastridae, Oligochaeta): 1. Полиморфизм, распространение, особенности экологии // Амурский Зоологический Журнал. 2013. Т. 5, № 4. С. 401–404.
44. Ганин Г.Н. Почему на Сахалине и Кунашире отсутствуют тропические земляные черви *Drawida* // Природа. 2017. № 2. С. 49–53.
45. Ганин Г.Н. Новые данные о земляных червях тропического рода *Drawida* (Moniligastridae) на северном пределе распространения // Вестник Дальневосточного Отделения Российской Академии Наук. 2018. № 4 (200). Р. 49–56.



46. Ганин Г.Н., Анисимов А.П., Атопкин Д.М., Рослик Г.В., Березкин Е.Х. Распространение и генетические исследования земляных червей *Drawida ghilarovi* Gates, 1969 (Moniligastridae, Oligochaeta) – эндемика Дальнего Востока России / В: Животные: экология, биология и охрана: материалы Всероссийской научной конференции с международным участием. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та. 2012. С. 82–85.
47. Ганин Г.Н., Анисимов А.П., Рослик Г.В., Атопкин Д.М., Соколова Е.Н. Дальневосточный эндемик *Drawida ghilarovi* (Moniligastridae, Oligochaeta): полиморфизм, особенности экологии и кариотип // Зоологический Журнал. 2014. Vol. 93, № 9. С. 1070–1079.
48. Гарбар А.В., Власенко Р.П., Межжерин С.В. Сравнительный морфологический анализ диплоидного *Aporrectodea caliginosa* и триплоидного *A. trapezoides* видов дождевых червей (Oligochaeta, Lumbricidae) с территории Украины // Вестник Зоологии. 2007. Т. 41. № 5. С. 423–432.
49. Гейтс Г.Э. Новый вид дождевого червя семейства Moniligastridae из рода *Drawida* Michaelsen, 1900 // Зоологический журнал. 1969. Т. 48, № 5. С. 674–676.
50. Гельцер Ю.Г. О почвенной фауне в пойме среднего течения реки Клязьмы / В: Пойменные почвы Русской равнины. М.: Изд-во МГУ. 1963. №. 2. С. 123–140.
51. Геокриология СССР. М.: Недра, 1989.
52. Гераськина А.П. Население дождевых червей (Lumbricidae) в основных типах темнохвойных лесов Печоро-Илычского заповедника // Зоологический Журнал. 2016а. Т. 95. №. 4. С. 394–405. Гераськина А.П. Дождевые черви (Oligochaeta, Lumbricidae) окрестностей пос. Домбай Тебердинского заповедника (Северо-Западный Кавказ, Карачаево-Черкессия) // Труды Зоологического Института РАН. 2016б. Т. 320, № 4. С. 450–466.

53. Гераськина А. П. Экологическая оценка динамики комплекса дождевых червей (Lumbricidae) в ходе восстановительных сукцессий. Смоленск: Изд. СГМУ, 2016в.
54. Гераськина А.П., Киселева Л.Л., Карпачев А.П., Абадонова М.Н. Влияние реинтродукции зубров на комплексы дождевых червей национального парка " Орловское Полесье" // Russian Journal of Ecosystems and Ecology. 2018. № 4. С. 1–21.
55. Гиляров М.С. Почвенная фауна лесных насаждений и открытых степных пространств бассейна р. Деркул / В: Труды Института Леса АН СССР. М. 1956. Т. 30. С. 235–278.
56. Гиляров М. Экологические принципы эволюции наземных животных. Избранные труды. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2012.
57. Гиляров М.С., Перель Т.С., 1973. Комплексы почвенных беспозвоночных хвойно-широколиственных лесов Дальнего Востока как показатель типа их почв / В: Экология Почвенных Беспозвоночных. М.: Наука. С. 40–59.
58. Глушкова О.Ю. Морфология и палеогеография позднеплейстоценовых оледенений Северо-Востока СССР / В: Плейстоценовые оледенения востока Азии. Магадан: СВКНИИ ДВНЦ АН СССР. 1984. С. 28–42.
59. Глушкова О.Ю., Смирнов В.Н. Реконструкция масштабов и морфологических особенностей плейстоценовых оледенений на Северо-Востоке России // Вестник Северо-Восточного Научного Центра ДВО РАН. 2021. №. 2. С. 50–67.
60. Голованова Е.В. Дождевые черви Омской области // Труды Томского государственного университета. 2010. Т. 275. С. 111–114.
61. Голованова Е.В. Дождевые черви-вселенцы в Западной Сибири // Экология и эволюция: новые горизонты. 2019. С. 494–495.
62. Голованова Е.В., Кругова Т.М., Нехорошева Л.В. Находка эндемичного вида *Eisenia malevici* Perel, 1962 (Oligochaeta: Lumbricidae) в Алтайском крае // Евразийский Энтомологический Журнал. 2015. Т. 14, № 6. С. 593–594.

63. Гонгальский К.Б. Пространственное распределение крупных почвенных беспозвоночных на пожарищах в ксерофильных экосистемах Черноморского побережья Кавказа // Аридные экосистемы. 2011. Т. 17, № 4 (49). С. 95–103.
64. Гонгальский К.Б., Покаржевский А.Д., Савин Ф.А. Почвенная мезофауна субсредиземноморских экосистем полуострова Абрау (Северо-западный Кавказ) // Зоологический Журнал. 2006. Т. 85, № 7. С. 813–820.
65. Гонгальский К.Б., Кузнецова Д.М., Елагин А.Д., Малявин С.А., Зайцев А.С. Почвенная мезофауна юга острова Кунашир (Курильские острова) // Доклады Академии наук. 2014. Т. 457, № 3. С. 1–4.
66. Горбунова А.Ю., Коробушкин Д.И., Дегтярев М.И., Костина Н.В., Гонгальский К.Б., Лебедев Ю.М., Зайцев А.С. Влияние дождевых червей на эмиссию CO<sub>2</sub> и CH<sub>4</sub> при разложении рисовой соломы в почвах разных типов при разном уровне влажности // Наземные и морские экосистемы Причерноморья и их охрана. 2018. С. 32–33.
67. Горбунова А.Ю., Коробушкин Д.И., Дегтярев М.И., Костина Н.В., Гонгальский К.Б., Зайцев А.С. Влияние дождевых червей на стабилизацию углерода и эмиссию парниковых газов при разной влажности почвы // Наземные и морские экосистемы Причерноморья и их охрана. 2020. С. 56.
68. Графодатский А.С., Перель Т.С., Раджабли С.И. Хромосомные наборы двух форм *Eisenia nordenskioldi* (Eisen) (Oligochaeta, Lumbricidae) // Доклады АН СССР. 1982. Т. 262, № 6. С. 1514–1516.
69. Двигубский И.А. Опыт естественной истории всѣх животных Российской Империи. Москва: Университетская Типография, 1829.
70. Долгин М.М., Колесникова А.А., Конакова Т.Н. Почвенная мезофауна среднетаежных лесов Республики Коми // Arctic Environmental Research. 2012. № 3. С. 73–85.
71. Ермаков А.И., Голованова Е.В. Видовой состав и численность дождевых червей в тундровых биоценозах горного массива Денежкин Камень

- (Северный Урал) // Сибирский Экологический Журнал. 2010. Т. 17, № 1. С. 15–20.
72. Ермолов С. А. Сообщества дождевых червей (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) хвойных и мелколиственных лесов лесостепного Приобья // Вопросы лесной науки. 2020. Т. 3. № 2. С. 1–24.
73. Жуков А.В., Пахомов А.Е., Кунах О.Н. Биологическое разнообразие Украины. Днепропетровская область. Дождевые черви (*Lumbricidae*) // Днепропетровск: Издательство Днепропетровского университета. 2007.
74. Зенкова И.В. Разнообразие почвенной фауны Хибин (итоги 10-летних исследований) // Труды Ферсмановской научной сессии ГИ КНЦ РАН. 2020. № 17. С. 195–200.
75. Зенкова И.В., Рапопорт И.Б. Разнообразие и высотно-поясное распределение дождевых червей в горах Хибинского массива (Мурманская область) // Горные экосистемы и их компоненты. 2012. С. 145–146.
76. Зенкова И.В., Рапопорт И.Б. Мониторинг разнообразия и численности дождевых червей лесных подзолах Мурманской области // Вклад заповедной системы в сохранение биоразнообразия и устойчивое развитие. 2017. С. 178–184.
77. Зенкова И.В., Пожарская В.В., Похилько А.А. Материалы к почвенной фауне Хибинского горного массива на примере горы Вудъяврчорр // Вестник Мурманского Государственного Технического Университета. 2009. Т. 12, № 3. С. 516–524.
78. Зенкова И.В., Пожарская В.В., Похилько А.А. Высотное распределение почвенной фауны Хибин // Почвоведение. 2011. № 9. С. 1083–1093.
79. Иванова А. А., Смульский И. И. Изменения инсоляции и палеоклимата в Западной Сибири за последние 50 тыс. лет / В: Материалы Всероссийской молодежной научно-практической конференции «Научная и производственная деятельность – средство формирования среды обитания человечества» Тюмень: ТИУ. 2016. С. 117–124.

80. Квавадзе Э.Ш. Дождевые черви (Lumbricidae) Кавказа. Тбилиси: Мецниереба. 1985.
81. Кесслер К.Ф. Материалы для познания Онежского озера и Обонежского края, преимущественно в зоологическом отношении. Санкт-Петербург: типография Императорской Академии наук, 1868.
82. Колесникова А.А., Долгин М.М., Акулова Л.И. Дождевые черви (Oligochaeta, Lumbricidae) Республики Коми // Труды Карельского научного центра РАН. 2023. № 1. С. 19–36.
83. Колесникова А.А., Долгин М.М., Акулова Л.И. Дождевые черви (Lumbricidae) европейского Северо-Востока России // Проблемы почвенной зоологии. 2018. С. 102.
84. Конакова Т.Н., Колесникова А.А., Таскаева А.А., Накул Г.Л. Разнообразие почвенных беспозвоночных бассейна р. Чёрная (Большеземельская тундра, Ненецкий автономный округ) // Евразийский Энтомологический Журнал. 2017. Т. 16, № 1. С. 88–98.
85. Кошманова Т.А., Лозовская М.В. Воздействие абиотических и антропогенных факторов на популяции дождевых червей в пойменных почвах долины нижнего течения р. Волга // Естественные Науки. 2013. № 2(43). С. 62–67.
86. Коцюба И.Ю., Гарбар А.В., Межжерин С.В. Кариотип *Dendrodrilus rubidus* f. *tenuis* (Eisen, 1874) фауны Украины // Науковий вісник УжНУ Серія Біологія. Приватне підприємство «Інватор», 2010. Т. 29. С. 187–189.
87. Кривошеина Н.П. Почвообитающие беспозвоночные основных типов леса Кадниковского лесничества Вологодской области // Влияние животных на продуктивность лесных биогеоценозов. М.: Наука, 1966. С. 166–180.
88. Крылова Л.П., Акулова Л.И. Дождевые черви (Oligochaeta, Lumbricidae) таежной зоны Республики Коми. Сыктывкар: Коми Государственный Педагогический Институт, 2011.
89. Кудряшева И.В. Почвенные беспозвоночные (мезофауна) лесов низовьев р. Онеги // Почвенная фауна Северной Европы. М.: Наука. 1987. С. 39–51.

90. Кудряшева И.В. Население почвообитающих беспозвоночных северотаежных биогеоценозов // Основные типы биогеоценозов северной тайги. М.: Наука, 1977. 214–229 р.
91. Кудряшева И.В. Роль дождевых червей (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*, *Eisenia nordenskioldi* (Eisen)) в разложении подстилки и опада в дубовых лесах лесостепи // Почвоведение. 1998. № 12. С. 1495–1501.
92. Кузин И.Л. Ледниковые» формы рельефа Западно-Сибирской и Русской равнин // Известия Русского Географического Общества. 2006. Т. 138. № 3. С. 41–55.
93. Кулагин Н.М. Материалы по естественной истории дождевых червей (сем. *Lumbricidae*). М: Известия Общества Любителей Естествознания, Антропологии и Этнографии. 1889. Т. 58. №. 2.
94. Курчева Г.Ф. Почвенные беспозвоночные советского Дальнего Востока. М.: Наука. 1977.
95. Лейрих А.Н., Мещерякова Е.Н., Берман Д.И. Механизмы и экологические следствия холодоустойчивости коконов дождевого червя *Dendrobaena octaedra* (*Lumbricidae*, *Oligochaeta*) // Зоологический журнал. 2005. Т. 84, № 8. С. 929–936.
96. Макарова О.Л., Колесникова А.А. Дождевые черви (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) в тундрах Восточной Европы // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2019. Т. 5, № 5. С. 466–477.
97. Максимова С. Л., Гурина Н. В. Дождевые черви (*Lumbricidae*) фауны Беларуси // Минск: Беларус. навука. 2014.
98. Максимова С.Л., Мухин Ю.Ф. Современное состояние люмбрикофауны и новые виды дождевых червей (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) в Беларуси // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. Серыя Біялагічных Навук. 2015. № 3. Р. 56–60.
99. Максимова С.Л., Мухин Ю.Ф. Видовой состав дождевых червей и их биотопическое распределение на территории Беларуси // Известия

- Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. 2016. №. 1. С. 56–60.
100. Малевич И.И. К фауне Oligochaeta Белорусской ССР // Сборник Трудов Зоологического Музея МГУ. М. 1937. № 4. С. 127–130.
101. Малевич И.И. Материалы к познанию дождевых червей орехово-плодовых лесов южной Киргизии // Доклады Академии Наук СССР. 1949. Т. 67, № 2. С. 397–400.
102. Малевич И.И. Новые и малоизвестные виды дождевых червей в фауне Европейской части СССР // Доклады АН СССР. 1950. №. 6. С. 1083–1086.
103. Малевич И.И. Материалы по фауне и экологии дождевых червей Белоруссии // Бюллетень МОИП. Отдел биологический. 1953. Т. 58. № 5. С. 39–49.
104. Малевич И.И. К фауне малощетинковых червей Урала и Приуралья // Ученые Записки Московского Городского Педагогического Института им. В.П. Потемкина. 1954. №. 28. С. 33–39.
105. Малевич И.И. К познанию дождевых червей Молдавской ССР // Ученые записки МГПИ им. Потемкина. 1955. Т. 38. № 3. С. 231–237.
106. Малевич И.И. К познанию дождевых червей Дальнего Востока // Ученые Записки Московского Городского Педагогического Института им. В.П. Потемкина. 1956. Т. 61. №. 4/5. С. 439–449.
107. Малевич И. И. К изучению распространения дождевых червей (Lumbricidae, Oligochaeta) в СССР // Ученые Записки Московского Городского Педагогического Института им. В.П. Потемкина. 1959. №. 8. С. 299–310.
108. Малевич И.И. Дождевые черви Крыма // В: Первое научное совещание зоологов педагогических институтов РСФСР. М.: МГПИ им. В.И. Ленина. 1962. С. 42–44.
109. Малевич И.И. К фауне дождевых червей Дагестана / В: Проблемы почвенной зоологии: Материалы II Всесоюзного совещания М.: Наука. 1966. С. 83–84.

110. Малевич И.И. Дождевые черви Тебердинского госзаповедника / В: Материалы III зоологической конференции. педагогических институтов РСФСР. 1967. С. 313–315.
111. Малевич И.И. Дождевые черви рода *Lumbricus* (Oligochaeta, Lumbricidae) и их распространение в СССР // Ученые Записки Московского Городского Педагогического Института им. В.И. Ленина. 1970. №. 272. С. 184–194.
112. Малевич И.И. Распространение семейства Lumbricidae в европейской части СССР (по картографическим материалам) // В: Фауна и экология беспозвоночных животных. М.: Наука. 1976. С. 3–11.
113. Малевич И.И., Матвеева В.Г. К фауне дождевых червей западной Белоруссии // Ученые Записки Московского Городского Педагогического Института им. В.И. Ленина. М. 1964. С. 398–403.
114. Малевич И.И., Перель Т.С. Дождевые черви Теллермановского лесничества и их распределение в нагорной дубраве и лесах поймы // Ученые Записки Московского Городского Педагогического Института им. В.П. Потемкина. 1958. Т. 84. С. 257–268.
115. Малинина Т.В., Перель Т.С. Характеристика хромосомных рас *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae) с использованием биохимических маркеров // Доклады АН СССР. 1984. Т. 279, № 5. С. 1265–1269.
116. Матвеева В.Г. Дождевые черви пойменных лугов реки Онеги // Проблемы почвенной зоологии. М.: Наука, 1966. С. 86–87.
117. Матвеева В.Г. Комплексы дождевых червей пойменных лугов в ландшафтных зонах Европейской территории СССР // Антропогенное воздействие на фауну почв. 1982. С. 54.
118. Матвеева В.Г., Перель Т.С. Дождевые черви семейства Lumbricidae Московской области. // Почвенные беспозвоночные Московской области. М.: Наука, 1982. С. 133–143.
119. Межжерин С.В., Гарбар А.В., Власенко Р.П., Онищук И.П., Коцюба И.Ю., Жалай Е.И. Эволюционный парадокс партеногенетических дождевых червей. Киев: Наукова Думка. 2018.



120. Межжерин С.В., Власенко Р.П., Гарбар А.В. Анализ клонового разнообразия двух видов апомиктических дождевых червей (*Lumbricidae: Aporrectodea*) и проблема изменчивости мелких и крупных организмов // Доповіді Національної Академії Наук України. 2007. №. 8. С. 151–156.
121. Межжерин С.В., Гарбар О.В., Онищук И.П., Власенко Р.П. Жалай Е.И. Клоновое разнообразие партеногенетических видов дождевых червей в фауне Украины // Вісник Українського Товариства Генетиків і Селекціонерів. 2008. Т. 6. №. 1. С. 88–92.
122. Межжерин С.В. Онищук И.П., Гарбар О.В., Жалай Е.И. Криптические биотипы дождевого червя *Octolasion lacteum* (Oligochaeta, Lumbricidae) в Украине // Вестник Зоологии. 2010. Т. 44, № 3. С. 195–207.
123. Павлинов И.Я. Зоологический музей Московского университета: фрагменты истории (1755-1991) // Зоологические Исследования. 2016. № 19. С. 57–157.
124. Перель Т.С. Дождевые черви (*Lumbricidae*) Южного Урала // Зоологический журнал. 1967. Т. 46. №. 9. С. 1321–1328.
125. Перель Т.С. Жизненные формы *Lumbricidae* // Журнал общей биологии – 1975. Т. 36. №. 2. С. 189–202.
126. Перель Т.С. Критический анализ системы *Lumbricidae* (с определительной таблицей родов фауны СССР) // Зоологический журнал. 1976. Т. 36. №. 6. С. 823–836.
127. Перель Т.С. Распространение и закономерности распределения дождевых червей фауны СССР. М.: Наука, 1979.
128. Перель Т.С. Географические особенности размножения дождевых червей сем. *Lumbricidae* (Oligochaeta) // Журнал Общей Биологии. 1982. Т. 43. № 5. С. 649–658.
129. Перель Т.С., Графодатский А.С. Полиморфизм *Eisenia nordenskioldi* (Eisen) (Oligochaeta, Lumbricidae) // Доклады АН СССР. 1983. Т. 269, № 4. С. 1019.

130. Перель Т.С., Графодатский А.С. Новые виды рода *Eisenia* (Lumbricidae, Oligochaeta) и их хромосомные наборы // Зоологический журнал. 1984. Т. 63. №. 4. С. 610.
131. Перель Т.С., Булатова Н.Ш., Викторов А.Г. Хромосомные расы и ареал *Eisenia altavinyteae* (Oligochaeta, Lumbricidae) // Доклады Академии Наук СССР. 1985. Т. 282, № 2. С. 499.
132. Пышкин В. Б. Дождевые черви (Lumbricidae) дубрав Горного Крыма // Природные исследования экосистем Горного Крыма. Симферополь: СГУ. 1986. С. 102–105.
133. Пышкин В.Б., Гладченко А.Ю. Эколого-фаунистический обзор люмбрицидофауны (Naplotaaxida: Lumbricidae) горного Крыма // Евразийский Союз Ученых. 2016. №. 1–5(22). С. 105–106.
134. Рапопорт И.Б. Видовой состав и численность дождевых червей (Oligochaeta, Lumbricidae) пояса широколиственных лесов терского варианта поясности (Центральный Кавказ) // Животный мир горных территорий. 2009. С. 118–123.
135. Рапопорт И.Б. Сезонная активность дождевых червей (Oligochaeta, Lumbricidae) пояса широколиственных лесов Кабардино-Балкарского государственного высокогорного заповедника и прилегающих территорий (Центральный Кавказ) // Известия Самарского Научного Центра Российской Академии Наук. 2010. Т. 12, № 1–5. С. 1345–1348.
136. Рапопорт И.Б. Фауна, экология и высотно-поясное распределение дождевых червей (Oligochaeta, Lumbricidae) центральной части Северного Кавказа: дис. канд. биолог. наук. Тольятти: Институт экологии Волжского бассейна РАН. 2011.
137. Рапопорт И.Б. Экология и хорология дождевых червей (Oligochaeta, Lumbricidae) Кабардино-Балкарского высокогорного заповедника (Центральный Кавказ) // Бюллетень Московского Общества Испытателей Природы. Отдел Биологический. 2012. Т. 117, № 2. С. 65–71.

138. Рапопорт И.Б. Высотное распределение дождевых червей (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) в центральной части Северного Кавказа // Зоологический Журнал. 2013. Т. 92, № 1. С. 3.
139. Рапопорт И.Б. Фауна, структура сообществ и высотно-поясное распределение дождевых червей (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) центральной части кубанского варианта поясности (Северо-Западный Кавказ, Республика Адыгея) // Вестник Адыгейского Государственного Университета. Серия 4 Естественно-математические и технические науки. 2014. № 4 (147). С. 77–84.
140. Рапопорт И.Б., Зенкова И.В., Цепкова Н.Л. Население дождевых червей (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) бассейна реки Карасу (Центральный Кавказ) // Зоологический журнал. Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российская академия наук", 2017. Т. 96, № 2. С. 172–183.
141. Рапопорт И.Б., Абуkenова В.С., Сиземская М.Л., Макарова О.Л. Тамара Семеновна Всеволодова-Перель (10.06. 1930–8.04. 2018) // Зоологический Журнал. 2019. Т. 98, № 4. С. 477–482.
142. Рыбалов Л.Б. Зонально-ландшафтная смена населения почвенных беспозвоночных в Приенисейском районе средней Сибири и роль температурных адаптаций в меридиональном (зональном) распределении беспозвоночных // Российский Энтомологический Журнал. 2002. Т. 11. № 1. С. 77–86.
143. Рыбалов Л.Б., Воробьева И.Г. Население почвенных беспозвоночных в таежных экосистемах среднего течения реки Енисей / В: Изучение биологического разнообразия на Енисейском экологическом трансекте. Животный мир. М.: Изд-во РАСХН. 2002. С. 8–42.
144. Светлов П.Г. К фауне *Oligochaeta* Самарской губернии // Известия Биологического научно-исследовательского института при Пермском государственном университете. 1926. Т. 4, № 6. С. 249.
145. Светлов П.Г. Почвенные малощетинковые черви – *Oligochaeta terricila* / В: Животный мир СССР. Т. 1. М., Л.: Изд-во АН СССР. 1936.

146. Светлов П.Г. Гигантские дождевые черви (*Allolobophora magnifica* sp. n.) северо-западного Алтая // Зоологический Журнал. 1957. Т. 36. № 2. С. 183–187.
147. Светлов П.Г. К фауне Oligochaeta Томской области // Вопросы Зоологии. Труды Томского Государственного Университета им. В. В. Куйбышева. Серия биологическая. 1946. Т. 97. С. 103.
148. Соколов А.А. Значение дождевых червей в почвообразовании // Алма-Ата: Изд-во АН Казахской ССР. 1956.
149. Справочник по климату СССР. Вып. 9, 12, 24, 25, 33. Ч. II, IV Л.: Гидрометеиздат, 1955, 1965, 1966, 1968.
150. Сямёнава М.К., Анісімава А.І. Роля розных відаў дажджавых чарвей у распаўсюджанні метастрангілід дзіка ва ўсходняй Беларусі // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. 1992. № 3. С. 109–113.
151. Стриганова Б.Р., Порядина Н.М. Животное население почв бореальных лесов Западно-Сибирской равнины. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005.
152. Тихомиров Б.А. Об условиях обитания дождевых червей в тундровых почвах // Природа. 1937. № 5. С. 52–58.
153. Хопкинс Д.М. История уровня моря в Берингии за последние 250 000 лет / В: Берингия в кайнозое. Материалы Всесоюзного симпозиума «Берингийская суша и ее значение для развития голарктических флор и фаун в кайнозое» Владивосток. 1976. С. 9-27.
154. Чекановская О.В. Дождевые черви и почвообразование. М., Л.: Издательство Академии Наук СССР, 1960.
155. Шашков М.П. Фауна дождевых червей (Lumbricidae) заповедника "Калужские засеки". // Труды государственного природного заповедника "Калужские засеки". Вып. 1. Калуга: изд-во "Полиграф-Информ". 2003. С. 90–93.

156. Шашков М.П., Бобровский М.В. Население дождевых червей малонарушенных пихто-ельников Печоро-Илычского заповедника // Принципы и способы сохранения биоразнообразия. 2008. Т. 6. С. 220.
157. Шейнкман В.С., Седов С.Н., Парначев В.П., Мельников В. П. Новые свидетельства внеледникового развития севера Западной Сибири в квартере. Доклады Академии Наук. 2017. Т. 477. № 4. С. 1–5.
158. Шепелева О.А., Кодолова О.П., Жуковская Е.А., триганова, Б.Р. Генетическое разнообразие популяций дождевого червя *Lumbricus rubellus* (Hoffm.) (Oligochaeta, Lumbriciae) // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2008. №. 2. С. 196-204.
159. Шепелева О.А., Кодолова О.П., Стриганова Б.Р. Перспективность использования метода электрофореза для определения таксономического статуса дождевых червей (Lumbricidae) // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2010. №. 2. С. 217–222.
160. Abukenova V.S. Earthworm fauna of Kazakh upland: (Oligochaeta: Lumbricidae) // Zoology in Middle East. 2010. Vol. 51, № S2. P. 161–169.
161. Anderson C., Cunha L., Sechi P., Kille P., Spurgeon D. Genetic variation in populations of the earthworm, *Lumbricus rubellus*, across contaminated mine sites // BMC Genetics. 2017. Vol. 18, № 1. P. 97.
162. Anderson F.E., Williams B.W., Horn K.M., Erséus C., Halanych K.M., Santos S.R., James S.W. Phylogenomic analyses of Crassicitellata support major Northern and Southern Hemisphere clades and a Pangaeian origin for earthworms // BMC Evolutionary Biology. 2017. Vol. 17, № 1. P. 1–18.
163. Andolfatto P., Davison D., Erezyilmaz D., Hu T.T., Mast J., Sunayama-Morita T., Stern D.L. Multiplexed shotgun genotyping for rapid and efficient genetic mapping // Genome Research. 2011. Vol. 21, № 4. P. 610–617.
164. Andre J., King R.A., Stürzenbaum S.R., Kille P., Hodson M.E., Morgan A.J. Molecular genetic differentiation in earthworms inhabiting a heterogeneous Pb-polluted landscape // Environmental Pollution. 2010. Vol. 158, № 3. P. 883–890.

165. Anisimov A.P., Roslik G. V, Ganin G.N. Cytogenetic description of the earthworm *Drawida ghilarovi* Gates, 1969 (Oligochaeta, Moniligastridae) from the southern Russian Far East // *Comparative Cytogenetics*, 2015. Vol. 9, № 4. P. 565.
166. Aramaki T., Blanc-Mathieu R., Endo H., Ohkubo K., Kanehisa M., Goto S., Ogata H. KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold // *Bioinformatics*, 2020. Vol. 36, № 7. P. 2251–2252.
167. Asensio V., Kille P., Morgan A.J., Soto M., Marigomez I. Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd // *European Journal of Soil Biology*, 2007. Vol. 43. P. S233–S238.
168. Aspe N.M., James S.W. Molecular phylogeny and biogeographic distribution of pheretimoid earthworms (Clitellata: Megascolecidae) of the Philippine archipelago // *European Journal of Soil Biology*, 2018. Vol. 85. P. 89–97.
169. Aspe N.M., Kajihara H., James S.W. A molecular phylogenetic study of pheretimoid species (Megascolecidae) in Mindanao and associated islands, Philippines // *European Journal of Soil Biology*, 2016. Vol. 73. P. 119–125.
170. Astakhov V. Ice margins of northern Russia revisited // *Developments in Quaternary Sciences*, 2011. Vol. 15. P. 323–336.
171. Astakhov V.I. Evidence of Late Pleistocene ice-dammed lakes in West Siberia // *Boreas*, 2006. Vol. 35, № 4. P. 607–621.
172. Atopkin D.M., Ganin G.N. Genetic differentiation of black and grey colored forms of the earthworm *Drawida ghilarovi* Gates, 1969 (Moniligastridae, Oligochaeta) on Russian Far East // *European Journal of Soil Biology*, 2015. Vol. 67. P. 12–16.
173. Baird N.A., Etter P.D., Atwood T.S., Currey M.C., Shiver A.L., Lewis Z.A., Selker E.U., Cresko W.A., Johnson E.A. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers // *PLoS One*, 2008. Vol. 3, № 10. P. e3376.

174. Baker V.R. Global Megaflood Paleohydrology / In: Palaeohydrology: traces, tracks and trails of extreme events. Cham: Springer International Publishing. 2020. P. 3–28.
175. Bakhtadze N., Bakhtadze G., Kvavadze E. The results of study of the genus *Dendrobaena* (Oligochaeta, Lumbricidae) species chromosome numbers // Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences. 2005. Vol. 172, № 1. P. 141–143.
176. Bakhtadze N., Kvavadze E., Bakhtadze G.,I. Results of karyologic investigation of *Dendrobaena* (*C.*) *marinae* Kvavadze,1985 (Oligochaeta, Lumbricidae) // Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences. 2003. Vol. 167. P. 315–316.
177. Bandelt H.-J., Forster P., Sykes B.C., Richards M.B. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. // Genetics, 1995. Vol. 141, № 2. P. 743–753.
178. Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. // Molecular Biology and Evolution. 1999. Vol. 16, № 1. P. 37–48.
179. Bantaowong U., Chanabun R., Tongkerd P., Sutcharit C., James S.W., Panha S. New earthworm species of the genus *Amynthas* Kinberg, 1867 from Thailand (Clitellata, Oligochaeta, Megascolecidae) // Zookeys, 2011. № 90. P. 35.
180. Bart S., Amossé J., Lowe C.N., Mougín C., Péry A.R.R., Pelosi C. *Aporrectodea caliginosa*, a relevant earthworm species for a posteriori pesticide risk assessment: current knowledge and recommendations for culture and experimental design // Environmental Science and Pollution Research. 2018. Vol. 25, № 34. P. 33867–33881.
181. Beaudet D., Terrat Y., Halary S., de la Providencia I.E., Hijri M. Mitochondrial genome rearrangements in *Glomus* species triggered by homologous recombination between distinct mtDNA haplotypes // Genome Biology and Evolution. 2013. Vol. 5, № 9. P. 1628–1643.

182. Beheregaray L.B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere // *Molecular Ecology* 2008. Vol. 17, № 17. P. 3754–3774.
183. Bely A.E., Wray G.A. Molecular phylogeny of nauidid worms (Annelida: Clitellata) based on cytochrome oxidase I // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2004. Vol. 30, № 1. P. 50–63.
184. Bennett K.D., Provan J. What do we mean by ‘refugia’? // *Quaternary Science Reviews*. 2008. Vol. 27, № 27–28. P. 2449–2455.
185. Berman D.I., Bulakhova N.A., Alfimov A.V., Meshcheryakova E.N. How the most northern lizard, *Zootoca vivipara*, overwinters in Siberia // *Polar Biology*. 2016. V. 39. P. 2411–2425.
186. Berman D.I., Bulakhova N.A., Meshcheryakova E.N. Cold hardiness and range of the earthworm *Eisenia sibirica* (Oligochaeta, Lumbricidae) // *Contemporary Problems of Ecology*., 2016. Vol. 9, № 1. P. 45–52.
187. Berman D.I., Meshcheryakova E.N., Leirikh A.N., Kurenschikov D.K. Geographic range and cold hardiness of the earthworm *Drawida ghilarovi* (Oligochaeta, Moniligastridae) // *Biological Bulletin*. 2010. Vol. 37, № 9. P. 895–904.
188. Berman D.I., Meshcheryakova E.N. Ranges and cold hardiness of two earthworm subspecies (*Eisenia nordenskioldi*, Lumbricidae, Oligochaeta) // *Biological Bulletin*. 2013. Vol. 40, № 9. P. 719–727.
189. Berman D.I., Meshcheryakova E.N., Alfimov A. V, Leirikh A.N. Distribution of the earthworm *Dendrobaena octaedra* (Lumbricidae, Oligochaeta) in the Northern Holarctic is restricted by its insufficient freeze tolerance // *Zoological Zhurnal*. 2002. Vol. 81, № 10. P. 1210–1221.
190. Berman D.I., Bulakhova N.A., Meshcheryakova E.N., Shekhovtsov S. V. Cold resistance and the distribution of genetic lineages of the earthworm *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae) // *Biological Bulletin*. 2019. Vol. 46, № 5. P. 430–437.



191. Bhambri A., Dhaunta N., Patel S.S., Hardikar M., Bhatt A., Srikakulam N., Shridhar S., Vellarikkal S., Pandey R., Jayarajan R. Large scale changes in the transcriptome of *Eisenia fetida* during regeneration // PLoS One. 2018. Vol. 13, № 9. P. e0204234.
192. Bhambri A., Dhaunta N., Patel S.S., Pillai B. Gene expression program of regeneration in *Eisenia fetida*: a transcriptomics study // Canadian Journal of Biotechnology. 2017. Vol. 1. P. 108.
193. Bharti S.K., Roy R. Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy // Trends in Analytical Chemistry. 2012. Vol. 35. P. 5–26.
194. Bigelow N.H., Brubaker L.B., Edwards M.E., Harrison S.P., Prentice I.C., Anderson P.M., Andreev A.A., Bartlein P.J., Christensen T.R., Cramer W. Climate change and Arctic ecosystems: 1. Vegetation changes north of 55° N between the last glacial maximum, mid-Holocene, and present // Journal of Geophysical Research of Atmosphere. 2003. Vol. 108, № D19.
195. Blakemore R.J. Earthworms newly from Mongolia (Oligochaeta, Lumbricidae, *Eisenia*) // Zookeys. 2013. Vol. 285. P. 1–21.
196. Block W. To freeze or not to freeze? Invertebrate survival of sub-zero temperatures // Functional Ecology. 1991. P. 284–290.
197. Boore J.L. Complete mitochondrial genome sequence of the polychaete annelid *Platynereis dumerilii* // Molecular Biology and Evolution. 2001. Vol. 18, № 7. P. 1413–1416.
198. Boore J.L., Brown W.M. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the annelid worm *Lumbricus terrestris* // Genetics. 1995. Vol. 141, № 1. P. 305–319.
199. Boore J.L., Brown W.M. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool // Current Opinion in Genetics and Development. 1998. Vol. 8, № 6. P. 668–674.
200. Börner G.V., Yokobori S., Mörl M., Dörner M., Pääbo S. RNA editing in metazoan mitochondria: staying fit without sex // FEBS Letters. 1997. Vol. 409, № 3. P. 320–324.

201. Borner J., Rehm P., Schill R.O., Ebersberger I., Burmester T. A transcriptome approach to ecdysozoan phylogeny // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2014. Vol. 80. P. 79–87.
202. Bottinelli N., Hedde M., Jouquet P., Capowiez Y. An explicit definition of earthworm ecological categories—Marcel Bouché’s triangle revisited // *Geoderma*. 2020. Vol. 372. P. 114361.
203. Bottani S., Zabet N.R., Wendel J.F., Veitia R.A. Gene expression dominance in allopolyploids: hypotheses and models // *Trends in Plant Sciences*. 2018. Vol. 23, № 5. P. 393–402.
204. Bouché M.B. Relations entre les structures spatiales et fonctionnelles des écosystèmes illustrées par le rôle pédobiologique des vers de terre // *La vie dans les sols* / ed. Pesson P. Paris: Gauthiers Villars Paris, 1971. P. 187–209.
205. Bouché M.B. *Lombriciens de France. Ecologie et systématique*. Paris: INRA Editions, 1972. Vol. 72.
206. Bouché M.B. Strategies lombriciennes // *Ecological Bulletin*. 1977. № 25. P. 122–132.
207. Brami C., Glover A.R., Butt K.R., Lowe C.N. Avoidance, biomass and survival response of soil dwelling (endogeic) earthworms to OECD artificial soil: potential implications for earthworm ecotoxicology // *Ecotoxicology*. 2017. Vol. 26, № 4. P. 576–579.
208. Briones M.J.I. A taxonomic revision of the *Allolobophora caliginosa* complex (Oligochaeta, Lumbricidae): A preliminary study // *Canadian Journal of Zoology*. 1996. Vol. 74, № 2. P. 240–244.
209. Brennicke A., Marchfelder A., Binder S. RNA editing // *FEMS Microbiol. Rev.* Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, 1999. Vol. 23, № 3. P. 297–316.
210. Briones M.J.I., García-Souto D., Galindo J., Morán P., Keith A., Schmidt O. Molecular data confirms the existence of distinct lineages within *Lumbricus friendi* (Cognetti 1904) and related “friends” // *European Journal of Soil Biology*. 2022. Vol. 108. P. 103382.

211. Briones M.J.I., Morán P., Posada D. Are the sexual, somatic and genetic characters enough to solve nomenclatural problems in lumbricid taxonomy? // *Soil Biology and Biochemistry*. 2009. Vol. 41, № 11. P. 2257–2271.
212. Brown J.N., Samuelsson L., Bernardi G., Gooneratne R., Larsson D.G.J. Aqueous and lipid nuclear magnetic resonance metabolomic profiles of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* show potential as an indicator species for environmental metabolomics // *Environ. Toxicol. Chem.* 2014. Vol. 33, № 10. P. 2313–2322.
213. Brunsfeld S.J., Sullivan J., Soltis D.E., Soltis P.S. Comparative phylogeography of northwestern North America: a synthesis // *Molecular Ecology*. 2001. Vol. 14. P. 319–340.
214. Buch A.C., Brown G.G., Correia M.E.F., Lourençato L.F., Silva-Filho E.V. Ecotoxicology of mercury in tropical forest soils: impact on earthworms // *Science of Total Environment*. 2017. Vol. 589. P. 222–231.
215. Buckley T.R., James S., Allwood J., Bartlam S., Howitt R., Prada D. Phylogenetic analysis of New Zealand earthworms (Oligochaeta: Megascolecidae) reveals ancient clades and cryptic taxonomic diversity // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2011. Vol. 58, № 1. P. 85–96.
216. Buggs R.J.A., Chamala S., Wu W., Tate J.A., Schnable P.S., Soltis D.E., Soltis P.S., Barbazuk W.B. Rapid, repeated, and clustered loss of duplicate genes in allopolyploid plant populations of independent origin // *Current Biology*. 2012. Vol. 22, № 3. P. 248–252.
217. Bundgaard A., James A.M., Gruszczyk A. V., Martin J., Murphy M.P., Fago A. Metabolic adaptations during extreme anoxia in the turtle heart and their implications for ischemia-reperfusion injury // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 1–10.
218. Bundy J.G., Ramløv H., Holmstrup M. Multivariate metabolic profiling using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy of freeze-tolerant and freeze-intolerant earthworms exposed to frost // *Cryoletters*. 2003. Vol. 24, № 6. P. 347–358.

219. Calderon S., Holmstrup M., Westh P., Overgaard J. Dual roles of glucose in the freeze-tolerant earthworm *Dendrobaena octaedra*: cryoprotection and fuel for metabolism // *Journal of Experimental Biology*. 2009. Vol. 212, № 6. P. 859–866.
220. Callaghan T. V., Björn L.O., Chernov Y., Chapin T., Christensen T.R., Huntley B., Ims R.A., Johansson M., Jolly D., Jonasson S. Past changes in arctic terrestrial ecosystems, climate and UV radiation // *AMBIO*. 2004. Vol. 33, № 7. P. 398–403.
221. Canard B., Sarfati R.S. DNA polymerase fluorescent substrates with reversible 3'-tags // *Gene*. 1994. Vol. 148, № 1. P. 1–6.
222. Cariou M., Duret L., Charlat S. Is RAD-seq suitable for phylogenetic inference? An in silico assessment and optimization // *Ecology and Evolution*. 2013. Vol. 3, № 4. P. 846–852.
223. Casellato S. On polyploidy in Oligochaetes with particular reference to Lumbricids / In: *On Earthworms. Selected symposia and monographs*. 1987. P. 75–87.
224. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis // *Molecular Biology and Evolution*. 2000. Vol. 17, № 4. P. 540–552.
225. Catchen J., Hohenlohe P.A., Bassham S., Amores A., Cresko W.A. Stacks: an analysis tool set for population genomics // *Molecular Ecology* 2013. Vol. 22, № 11. P. 3124–3140.
226. Chai L., Yang Y., Yang H., Zhao Y., Wang H. Transcriptome analysis of genes expressed in the earthworm *Eisenia fetida* in response to cadmium exposure // *Chemosphere*. 2020. Vol. 240. P. 124902.
227. Chang C.-H., Chen J.-H. Taxonomic status and intraspecific phylogeography of two sibling species of *Metaphire* (Oligochaeta: Megascolecidae) in Taiwan // *Pedobiologia*. 2005. Vol. 49, № 6. P. 591–600.

228. Chang C.-H., Chuang S.-C., Wu J.H., Chen J.-H. New species of earthworms belonging to the *Metaphire formosae* species group (Clitellata: Megascolecidae) in Taiwan // *Zootaxa*. 2014. Vol. 3774, № 4. P. 324–332.
229. Chang C.-H., Johnston M.R., Görres J.H., Dávalos A., McHugh D., Szlavecz K. Co-invasion of three Asian earthworms, *Metaphire hilgendorfi*, *Amyntas agrestis* and *Amyntas tokioensis* in the USA // *Biological Invasions*. 2018. Vol. 20, № 4. P. 843–848.
230. Chang C.-H., Lin S.-M., Chen J.-H. Molecular systematics and phylogeography of the gigantic earthworms of the *Metaphire formosae* species group (Clitellata, Megascolecidae) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008. Vol. 49, № 3. P. 958–968.
231. Chang C.-H., Rougerie R., Chen J.-H. Identifying earthworms through DNA barcodes: Pitfalls and promise // *Pedobiologia*. 2009. Vol. 52, № 3. P. 171–180.
232. Chang C.-H., Snyder B.A., Szlavecz K. Asian pheretimoid earthworms in North America north of Mexico: an illustrated key to the genera *Amyntas* // *Zootaxa*. 2016. Vol. 4179, № 3. P. 495–529.
233. Chen L., DeVries A.L., Cheng C.-H.C. Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. Vol. 94, № 8. P. 3817–3822.
234. Chinopoulos C. Succinate in ischemia: Where does it come from? // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2019. Vol. 115, № 7. P. 105580.
235. Cho S.-J., Lee M.S., Tak E.S., Lee E., Koh K.S., Ahn C.H., Park S.C. Gene expression profile in the anterior regeneration of the earthworm using expressed sequence tags // *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry*. 2009. Vol. 73, № 1. P. 29–34.
236. Chouchani E.T., Pell V.R., Gaude E., Aksentijević D., Sundier S.Y., Robb E.L., Logan A., Nadtochiy S.M., Ord E.N.J., Smith A.C., Eyassu F., Shirley R., Hu C.H., Dare A.J., James A.M., Rogatti S., Hartley R.C., Eaton S., Costa A.S.H., et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS // *Nature*. 2014. Vol. 515, № 7527. P. 431–435.

237. Cicconardi F., Fanciulli P.P., Emerson B.C. Collembola, the biological species concept and the underestimation of global species richness // *Molecular Ecology*. 2013. Vol. 22, № 21. P. 5382–5396.
238. Clavero-Camacho I., Palomares-Rius J.E., Cantalapiedra-Navarrete C., Castillo P., Liébanas G., Archidona-Yuste A. A Proposed new species complex within the cosmopolitan ring nematode *Criconea annuliferum* (de Man, 1921) Micoletzky, 1925 // *Plants*. 2022. Vol. 11, № 15. P. 1977.
239. Clement M., Snell Q., Walker P., Posada D., Crandall K. TCS: estimating gene genealogies // *IEEE Computer Society*, 2002. Vol. 3. P. 184.
240. Costanzo J.P. Overwintering adaptations and extreme freeze tolerance in a subarctic population of the wood frog, *Rana sylvatica* // *Journal of Comparative Physiology B*. 2019. Vol. 189, № 1. P. 1–15.
241. Costanzo J.P., Lee Jr R.E. Avoidance and tolerance of freezing in ectothermic vertebrates // *Journal of Experimental Biology*., 2013. Vol. 216, № 11. P. 1961–1967.
242. Costanzo J.P., Reynolds A.M., do Amaral M.C.F., Rosendale A.J., Lee R.E. Cryoprotectants and extreme freeze tolerance in a subarctic population of the wood frog // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 2. P. e0117234.
243. Crozier R.H., Crozier Y.C., Mackinlay A.G. The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates // *Molecular Biology and Evolution*. 1989. Vol. 6, № 4. P. 399–411.
244. Csuzdi C., Pavlíček T. Earthworms from Israel. II. Remarks on the genus *Perelia* Easton, 1983 with descriptions of a new genus and two new species // *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 2005. Vol. 51, № 2. P. 75–96.
245. Csuzdi C., Chang C.-H., Pavlíček T., Szederjesi T., Esopi D., Szlávecz K. Molecular phylogeny and systematics of native North American lumbricid earthworms (Clitellata: Megadrili) // *PLoS One*. 2017. Vol. 12, № 8. P. e0181504.

246. Csuzdi C., Zicsi A. Earthworms of Hungary (Annelida: Oligochaeta, Lumbricidae). Hungary, Budapest: Hungarian Natural History Museum. 2003.
247. Darwin C. On the formation of mould // Proceedings of the Geological Society of London. 1838. Vol. 2. P. 574–576.
248. Darwin C. The formation of vegetable mould, through the action of worms: with observations on their habits. London: J. Murray, 1881.
249. Davies P.L. Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth // Trends in Biochemical Sciences. 2014. Vol. 39, № 11. P. 548–555.
250. De Sosa I., Marchán D.F., Novo M., Díaz Cosín D.J., Giribet G., Fernández R. Insights into the origin of parthenogenesis in oligochaetes: Strong genetic structure in a cosmopolitan earthworm is not related to reproductive mode // European Journal of Soil Biology 2017. Vol. 81. P. 31–38.
251. De Wit P., Erséus C. Genetic variation and phylogeny of Scandinavian species of *Grania* (Annelida: Clitellata: Enchytraeidae), with the discovery of a cryptic species // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. 2010. Vol. 48, № 4. P. 285–293.
252. Decaëns T., Porco D., Rougerie R., Brown G.G., James S.W. Potential of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology // Applied Soil Ecology. 2013. Vol. 65. P. 35–42.
253. Decaëns T., Porco D., James S.W., Brown G.G., Chassany V., Dubs F., Dupont L., Lapied E., Rougerie R., Rossi J.-P. DNA barcoding reveals diversity patterns of earthworm communities in remote tropical forests of French Guiana // Soil Biology and Biochemistry. 2016. Vol. 92. P. 171–183.
254. Del Latte L., Bortolin F., Rota-Stabelli O., Fusco G., Bonato L. Molecular-based estimate of species number, phylogenetic relationships and divergence times for the genus *Stenotaenia* (Chilopoda, Geophilomorpha) in the Italian region // Zookeys. 2015. № 510. P. 31.
255. DeSalle R., Schierwater B., Hadrys H. MtDNA: The small workhorse of evolutionary studies // Frontiers in Biosciences. 2017. Vol. 22. P. 873–887.

256. DeVries A.L., Wohlschlag D.E. Freezing resistance in some Antarctic fishes // Science. 1969. Vol. 163, № 3871. P. 1073–1075.
257. Díaz Cosín D.J., Novo M., Fernández R. Reproduction of earthworms: sexual selection and parthenogenesis / In: Biology of earthworms. 2011. P. 69–86.
258. Domínguez J., Aira M., Breinholt J.W., Stojanovic M., James S.W., Pérez-Losada M. Underground evolution: new roots for the old tree of lumbricid earthworms // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2015. Vol. 83. P. 7–19.
259. Domínguez J., Aira M., Porto P.G., Díaz Cosín D.J., Pérez-Losada M. Multigene phylogeny reveals two new isolated and relic earthworm genera (Oligochaeta: Lumbricidae) // Zoological Journal of the Linnean Society. 2018. Vol. 182, № 2. P. 258–274.
260. Dong Y., Jiang J., Yuan Z., Zhao Q., Qiu J. Population genetic structure reveals two lineages of *Amyntas triastriatus* (Oligochaeta: Megascolecidae) in China, with notes on a new subspecies of *Amyntas triastriatus* // International Journal of Environmental Research. 2020. Vol. 17, № 5. P. 1538.
261. Donnelly R.K., Harper G.L., Morgan A.J., Orozco-Terwengel P., Pinto-Juma G.A., Bruford M.W. Nuclear DNA recapitulates the cryptic mitochondrial lineages of *Lumbricus rubellus* and suggests the existence of cryptic species in an ecotoxicological soil sentinel // Biological Journal of the Linnean Society. 2013. Vol. 110, № 4. P. 780–795.
262. Donnelly R.K., Harper G.L., Morgan A.J., Pinto-Juma G.A., Bruford M.W. Mitochondrial DNA and morphological variation in the sentinel earthworm species *Lumbricus rubellus* // European Journal of Soil Biology 2014. Vol. 64. P. 23–29.
263. Drummond A.J., Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees // BMC Evolutionary Biology. 2007. Vol. 7, № 1. P. 1–8.
264. Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 // Molecular Biology and Evolution. 2012. Vol. 29, № 8. P. 1969–1973.



265. Duman J.G. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods // Annual Reviews in Physiology. 2001. Vol. 63, № 1. P. 327–357.
266. Duman J.G. Animal ice-binding (antifreeze) proteins and glycolipids: an overview with emphasis on physiological function // Journal of Experimental Biology. 2015. Vol. 218, № 12. P. 1846–1855.
267. Dupont L., Lazrek F., Porco D., King R.A., Rougerie R., Symondson W.O.C., Livet A., Richard B., Decaëns T., Butt K.R. New insight into the genetic structure of the *Allolobophora chlorotica* aggregate in Europe using microsatellite and mitochondrial data // Pedobiologia. 2011. Vol. 54, № 4. P. 217–224.
268. Dupont L., Porco D., Symondson W.O.C., Roy V. Hybridization relics complicate barcode-based identification of species in earthworms // Molecular Ecology Resources. 2016. Vol. 16, № 4. P. 883–894.
269. Easton E.G. A guide to the valid names of Lumbricidae (Oligochaeta) / In: Earthworm Ecology. Netherlands, Dordrecht: Springer. 1983. P. 475–487.
270. Eaton D.A.R., Overcast I. ipyrad: Interactive assembly and analysis of RADseq datasets // Bioinformatics. 2020. Vol. 36, № 8. P. 2592–2594.
271. Ebersberger I., Strauss S., von Haeseler A. HaMStR: profile hidden Markov model based search for orthologs in ESTs // BMC Evolutionary Biology. 2009. Vol. 9, № 1. P. 157.
272. Edgecombe G.D., Giribet G. The molecularization of centipede systematics // Perspectives on Evolutionary and Developmental Biology Essays for Alessandro Minelli / ed. Fusco G. Padova University Press, 2019. P. 153–165.
273. Edwards C.A., Lofty J.R. Biology of earthworms. UK, London: Engl. Chapman Hall. 1977.
274. Eidesen P.B., Ehrich D., Bakkestuen V., Alsos I.G., Gilg O., Taberlet P., Brochmann C. Genetic roadmap of the Arctic: plant dispersal highways, traffic barriers and capitals of diversity // New Phytologist. 2013. Vol. 200, № 3. P. 898–910.

275. Eisen G. On the Oligochaeta collected during the Swedish expeditions to the Arctic regions in the years 1870, 1875 and 1876. // Kongl. Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar. 1879. Vol. 15. P. 1–49.
276. El-Gebali S., Mistry J., Bateman A., Eddy S.R., Luciani A., Potter S.C., Qureshi M., Richardson L.J., Salazar G.A., Smart A., Sonnhammer E.L.L., Hirsh L., Paladin L., Piovesan D., Tosatto S.C.E., Finn R.D. The Pfam protein families database in 2019 // Nucleic Acids Research. 2019. Vol. 47, № D1. P. D427–D432.
277. Ellis L.L., Huang W., Quinn A.M., Ahuja A., Alfrejd B., Gomez F.E., Hjelman C.E., Moore K.L., Mackay T.F.C., Johnston J.S. Intrapopulation genome size variation in *D. melanogaster* reflects life history variation and plasticity // PLoS Genetics. 2014. Vol. 10, № 7. P. e1004522.
278. Elshire R.J., Glaubitz J.C., Sun Q., Poland J.A., Kawamoto K., Buckler E.S., Mitchell S.E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species // PLoS One. 2011. Vol. 6, № 5. P. e19379.
279. Erséus C., Källersjö M. 18S rDNA phylogeny of Clitellata (Annelida) // Zoologica Scripta. 2004. Vol. 33, № 2. P. 187–196.
280. Erséus C., Klinth M.J., Rota E., De Wit P., Gustafsson D.R., Martinsson S. The popular model annelid *Enchytraeus albidus* is only one species in a complex of seashore white worms (Clitellata, Enchytraeidae) // Organisms Diversity & Evolution. 2019. Vol. 19. P. 105–133.
281. Eversmann E.F. Addenda ad celeberrimi Pallasii Zoographiam Rosso-Asiaticam // Ученые записки Казанского Университета. 1835-1842.
282. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis // Evolutionary Bioinformatics. 2005. Vol. 1. P. 117693430500100000.
283. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Molecular Ecology Resources. 2010. Vol. 10, № 3. P. 564–567.

284. Falk J. Beitrage zur Kenntnis des Russischen Reiches. St. Petersburg: Imperial Saint Petersburg Academy of Sciences, 1786.
285. Fang J., Wang B., Fang K., Liu T., Yan S., Wang X. Assessing the bioavailability and biotoxicity of spiromesifen and its main metabolite spiromesifen-enol (M01) reveals the defense mechanisms of earthworms (*Eisenia fetida*) // Science of The Total Environment. 2021. Vol. 796. P. 151910.
286. Fang K., Han L., Liu Y., Fang J., Wang X., Liu T. Enantioselective bioaccumulation and detoxification mechanisms of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to mandipropamid // Science of The Total Environment. 2021. Vol. 796. P. 149051.
287. Fernandez R., Novo M., Gutierrez M., Almodovar A., Cosín D.J.D. Life cycle and reproductive traits of the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) in laboratory cultures // Pedobiologia. 2010. Vol. 53, № 5. P. 295–299.
288. Fernández R., Almodóvar A., Novo M., Gutiérrez M., Cosín D.J.D. A vagrant clone in a peregrine species: phylogeography, high clonal diversity and geographical distribution in the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) // Soil Biology and Biochemistry. 2011a. Vol. 43, № 10. P. 2085–2093.
289. Fernández R., Bergmann P., Almodóvar A., Cosín D.J.D., Heethoff M. Ultrastructural and molecular insights into three populations of *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) (Oligochaeta, Lumbricidae) with different reproductive modes // Pedobiologia. 2011b. Vol. 54, № 5–6. P. 281–290.
290. Fernández R., Almodóvar A., Novo M., Simancas B., Díaz Cosín D.J. Adding complexity to the complex: New insights into the phylogeny, diversification and origin of parthenogenesis in the *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta, Lumbricidae) // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2012. Vol. 64, № 2. P. 368–379.
291. Fernández R., Almodóvar A., Novo M., Gutiérrez M., Díaz Cosín D.J. Earthworms, good indicators for palaeogeographical studies? Testing the genetic structure and demographic history in the peregrine earthworm

- Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) in southern Europe // *Soil Biology and Biochemistry*. 2013. Vol. 58. P. 127–135.
292. Fernández R., Novo M., Marchán D.F., Cosín D.J.D. Diversification patterns in cosmopolitan earthworms: similar mode but different tempo // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2016. Vol. 94. P. 701–708.
293. Fernández Merchán D., Fernández R., Domínguez J., Díaz Cosín D.J., Novo Rodríguez M. Genome-informed integrative taxonomic description of three cryptic species in the earthworm genus *Carpetania* (Oligochaeta, Hormogastridae) // *Systematics and Biodiversity*. 2020. Vol. 18, № 3. P. 1–14.
294. Folmer O., Hoeh W.R., Black M.B., Vrijenhoek R.C. Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994. Vol. 3. P. 294–299.
295. Fu L., Niu B., Zhu Z., Wu S., Li W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data // *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28, № 23. P. 3150–3152.
296. Galbraith D.W., Harkins K.R., Maddox J.M., Ayres N.M., Sharma D.P., Firoozabady E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues // *Science*. 1983. Vol. 220, № 4601. P. 1049–1051.
297. Galbraith D.W., Lambert G.M., Macas J., Dolezel J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants // *Current Protocols in Cytometry*. 1997. Vol. 2, № 1. P. 6–7.
298. Ganin G.N., Atopkin D.M. Molecular differentiation of epigeic and anceic forms of *Drawida ghilarovi* Gates, 1969 (Moniligastridae, Clitellata) in the Russian Far East: Sequence data of two mitochondrial genes // *European Journal of Soil Biology* 2018. Vol. 86. P. 1–7.
299. García J.A., Fragoso C. Influence of different food substrates on growth and reproduction of two tropical earthworm species (*Pontoscolex corethrurus* and *Amyntas corticis*) // *Pedobiologia*. 2003. Vol. 47, № 5–6. P. 754–763.
300. Garrick R.C., Newton K.E., Worthington R.J. Cryptic diversity in the southern Appalachian Mountains: genetic data reveal that the red centipede,

- Scolopocryptops sexspinosus*, is a species complex // Journal of Insect Conservation. 2018. Vol. 22. P. 799–805.
301. Gates G.E. Contributions to North American earthworms No. 3. Toward a revision of the earthworm family Lumbricidae IV. The *trapezoides* species group // Bulletin of the Tall Timbers Research Station. 1972. Vol. 12. P. 1–146.
302. Georgi J.-G. Bemerkungen einer Reise im russischen Reich im Jahre 1772. St. Petersburg: Kayserl. Academie der Wissenschaften, 1775.
303. Gerstfeldt G. Ueber einige zum Theil neue Arten Platoden, Anneliden, Myriapoden and Crustaceen Sibirien's, namentlich, seines ostlichen Theiles und des Amur-Gebietes // Mémoires présentés à l'Académie impériale des Sci. St. Petersbg. par Divers Savans dans ses Assem. 1858. Vol. 8. P. 259–296.
304. Gibbard P.L., Head M.J. IUGS ratification of the Quaternary System/Period and the Pleistocene Series/Epoch with a base at 2.58 Ma // Quaternaire. 2009. Vol. 20, № vol. 20/4. P. 411–412.
305. Gibbard P.L., Head M.J., Walker M.J.C. Formal ratification of the Quaternary System/Period and the Pleistocene Series/Epoch with a base at 2.58 Ma // Journal of Quaternary Science. 2010. Vol. 25, № 2. P. 96–102.
306. Giska I., Sechi P., Babik W. Deeply divergent sympatric mitochondrial lineages of the earthworm *Lumbricus rubellus* are not reproductively isolated // BMC Evolutionary Biology. 2015. Vol. 15, № 1. P. 217.
307. Golovanova E. V, Kniazev S.Y., Babiy K.A., Tsvirko E.I., Karaban K., Solomatin D. V. Dispersal of earthworms from the Rudny Altai (Kazakhstan) into Western Siberia // Ecologica Montenegrina. 2021. Vol. 45. P. 48–61.
308. González V.L., Andrade S.C.S., Bieler R., Collins T.M., Dunn C.W., Mikkelsen P.M., Taylor J.D., Giribet G. A phylogenetic backbone for Bivalvia: an RNA-seq approach // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2015. Vol. 282, № 1801. P. 20142332.
309. Goujon M., McWilliam H., Li W., Valentin F., Squizzato S., Paern J., Lopez R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI // Nucleic Acids Research. 2010. Vol. 38, № S2. P. W695–W699.

310. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data // *Nature Biotechnology*. 2011. Vol. 29, № 7. P. 644.
311. Graether S.P., Kuiper M.J., Gagne S.M., Walker V.K., Jia Z., Sykes B.D., Davies P.L.  $\beta$ -Helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect // *Nature*. 2000. Vol. 406, № 6793. P. 325–328.
312. Gray M. Diversity and evolution of mitochondrial RNA editing systems // *IUBMB Life*. 2003. Vol. 55, № 4-5. P. 227–233.
313. Gregory T.R., Johnston J.S. Genome size diversity in the family Drosophilidae // *Heredity*. 2008. Vol. 101, № 3. P. 228–238.
314. Greminger M.P., Stölting K.N., Nater A., Goossens B., Arora N., Bruggmann R., Patrignani A., Nussberger B., Sharma R., Kraus R.H.S. Generation of SNP datasets for orangutan population genomics using improved reduced-representation sequencing and direct comparisons of SNP calling algorithms // *BMC Genomics*. 2014. Vol. 15, № 1. P. 1–15.
315. Grosswald M.G. New approach to the ice age paleohydrology of northern Eurasia / In: Benito G., Baker V.R., Gregory K.J., *Palaeohydrology and Environmental Change*. New York: Wiley and Sons. Pp. 199–214.
316. Grube E. // *Reise in den äussersten Norden und Osten Sibiriens* / ed. von Middendorff T.A. St. Petersburg, 1851.
317. Guo Y., Yuan H., Fang D., Song L., Liu Y., Liu Y., Wu L., Yu J., Li Z., Xu X. An improved 2b-RAD approach (I2b-RAD) offering genotyping tested by a rice (*Oryza sativa* L.) F2 population // *BMC Genomics*. 2014. Vol. 15, № 1. P. 1–13.
318. Hebert P.D.N., Ratnasingham S., De Waard J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2003. Vol. 270, № S1. P. S96–S99.

319. Heethoff M., Etzold K., Scheu S. Mitochondrial COII sequences indicate that the parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Savigny 1826) constitutes of two lineages differing in body size and genotype // *Pedobiologia*. 2004. Vol. 48, № 1. P. 9–13.
320. Hendrix P.F., Callaham M.A., Drake J.M., Huang C.-Y., James S.W., Snyder B.A., Zhang W. Pandora's box contained bait: The global problem of introduced earthworms // *Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics*. 2008. Vol. 39, № 1. P. 593–613.
321. Hewitt G.M. Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones // *Genetica*. 2011. Vol. 139, № 5. P. 617–638.
322. Hewitt G.M. The structure of biodiversity – insights from molecular phylogeography // *Frontiers in Zoology*. 2004. Vol. 1, № 1. P. 1–16.
323. Hewitt G.M. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time // *Molecular Ecology*. 2001. Vol. 10, № 3. P. 537–549.
324. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford: Oxford University Press. 2002.
325. Holmstrup M. Physiology of cold hardiness in cocoons of five earthworm taxa (Lumbricidae: Oligochaeta) // *Journal of Comparative Physiology B*. 1994. Vol. 164, № 3. P. 222–228.
326. Holmstrup M., Overgaard J. Freeze tolerance in *Aporrectodea caliginosa* and other earthworms from Finland // *Cryobiology*. 2007. Vol. 55, № 1. P. 80–86.
327. Holmstrup M., Petersen B.F. Freeze-tolerance in the subarctic earthworm *Eisenia nordenskioeldi* (Eisen) // *Cryo-letters*. 1997. V. 18. № 3. P. 153–156.
328. Holmstrup M., Westh P. Dehydration of earthworm cocoons exposed to cold: a novel cold hardiness mechanism // *Journal of Comparative Physiology B*. 1994. Vol. 164, № 4. P. 312–315.
329. Holmstrup M., Westh P. Effects of dehydration on water relations and survival of lumbricid earthworm egg capsules // *Journal of Comparative Physiology B*. 1995. Vol. 165, № 5. P. 377–383.

330. Holmstrup M. Overwintering adaptations in earthworms // *Pedobiologia*. 2003. Vol. 47, № 5–6. P. 504–510.
331. Holmstrup M. Cold hardiness strategy in cocoons of the lumbricid earthworm *Dendrobaena octaedra* (Savigny) // *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 1992. Vol. 102, № 1. P. 49–54.
332. Holmstrup M., Costanzo J.P., Lee Jr R.E. Cryoprotective and osmotic responses to cold acclimation and freezing in freeze-tolerant and freeze-intolerant earthworms // *Journal of Comparative Physiology B*. 1999. Vol. 169, № 3. P. 207–214.
333. Holmstrup M., Overgaard J., Bayley M. Small *Dendrobaena* earthworms survive freezing better than large worms // *Cryobiology*. 2007. Vol. 54, № 3. P. 298–300.
334. Holmstrup M., Overgaard J., Bindesbøl A.-M., Pertoldi C., Bayley M. Adaptations to overwintering in the earthworm *Dendrobaena octaedra*: genetic differences in glucose mobilisation and freeze tolerance // *Soil Biology and Biochemistry*. 2007. Vol. 39, № 10. P. 2640–2650.
335. Holmstrup M., Simonsen V. Genetic and physiological differences between two morphs of the lumbricid earthworm *Dendrodrilus rubidus* (Savigny, 1826) // *Soil Biology and Biochemistry*. 1996. Vol. 28, № 8. P. 1105–1107.
336. Holmstrup M., Sørensen L.I., Bindesbøl A.-M., Hedlund K. Cold acclimation and lipid composition in the earthworm *Dendrobaena octaedra* // *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 2007. Vol. 147, № 4. P. 911–919.
337. Holmstrup M., Zachariassen K.E. Physiology of cold hardiness in earthworms // *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 1996. Vol. 115, № 2. P. 91–101.
338. Hong Y., Csuzdi C. New data to the earthworm fauna of the Korean Peninsula with redescription of *Eisenia koreana* (Zicsi) and remarks on the *Eisenia nordenskioldi* species group (Oligochaeta, Lumbricidae) // *Zoological Studies*. 2016. Vol. 55. P. 1–15.



339. Hope A.G. Mammalian diversification across the Holarctic: spatiotemporal evolution in response to environmental change. PhD Thesis: The University of New Mexico. 2011.
340. Hosseinvand M., Eskandari A., Palomares-Rius J.E., Castillo P., Abolafia J., Ghaderi R. Morphological and molecular characterisation of a new cryptic species of *Criconemoides informis* group, *C. neoinformis* n. sp., and *C. persicus* n. sp., with notes on *C. avicenniae* // *Nematology*. 2022. Vol. 1. P. 1–20.
341. Huang J., Xu Q., Sun Z.J., Tang G.L., Su Z.Y. Identifying earthworms through DNA barcodes // *Pedobiologia*. 2007. Vol. 51, № 4. P. 301–309.
342. Hubby J.L., Lewontin R.C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura* // *Genetics*. 1966. Vol. 54, № 2. P. 577.
343. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // *Bioinformatics*. 2001. Vol. 17, № 8. P. 754–755.
344. Hutchins B., Drukker N. *Miktoniscus medcofi* (Isopoda, Trichoniscidae) in Texas: a range extension for the genus and species // *The Southwestern Naturalist*. 2016. Vol. 61, № 1. P. 78–79.
345. Jaenike J., Parker Jr E.D., Selander R.K. Clonal niche structure in the parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum* // *The American Naturalist*. 1980. Vol. 116, № 2. P. 196–205.
346. Jaenike J., Selander R.K. Evolution and ecology of parthenogenesis in earthworms // *American Zoologist*. 1979. Vol. 19, № 3. P. 729–737.
347. James S.W., Porco D., Thibaud Decaëns B.R., Rougerie R., Erséus C. DNA barcoding reveals cryptic diversity in *Lumbricus terrestris* L., 1758 (Clitellata): resurrection of *L. herculeus* (Savigny, 1826) // *PLoS One*. 2010. Vol. 5, № 12.
348. Jennings R.M., Halanych K.M. Mitochondrial genomes of *Clymenella torquata* (Maldanidae) and *Riftia pachyptila* (Siboglinidae): evidence for conserved gene order in Annelida // *Molecular Biology and Evolution*. 2005. Vol. 22, № 2. P. 210–222.

349. Jeratthitikul E., Bantaowong U., Panha S. DNA barcoding of the Thai species of terrestrial earthworms in the genera *Amynthas* and *Metaphire* (Haplotaxida: Megascolecidae) // *European Journal of Soil Biology* 2017. Vol. 81. P. 39–47.
350. Jiang X., Yang Y., Liu P., Li M. Transcriptomics and metabolomics reveal Ca<sup>2+</sup> overload and osmotic imbalance-induced neurotoxicity in earthworms (*Eisenia fetida*) under tri-n-butyl phosphate exposure // *Science of The Total Environment*. 2020. Vol. 748. P. 142169.
351. Jiménez Pinadero S., Marchán D.F., Novo M., Trigo D., Domínguez J., Díaz Cosín D.J. Sorry atlanticus, you are not my type: molecular assessment splits *Zophoscolex* (Lumbricidae: Crassiclitellata) into French and Iberian genera // *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2022. Vol. 194, № 3. P. 726–735.
352. Jones G.L., Wills A., Morgan A.J., Thomas R.J., Kille P., Novo M. The worm has turned: Behavioural drivers of reproductive isolation between cryptic lineages // *Soil Biology and Biochemistry*. 2016. Vol. 98. P. 11–17.
353. Jones O.A.H., Dias D.A. Environmental metabolomics of soil organisms // *eMagRes*. 2014. P. 1–12.
354. Jones P., Binns D., Chang H.-Y., Fraser M., Li W., McAnulla C., McWilliam H., Maslen J., Mitchell A., Nuka G., Pesseat S., Quinn A.F., Sangrador-Vegas A., Scheremetjew M., Yong S.-Y., Lopez R., Hunter S. InterProScan 5: genome-scale protein function classification // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30, № 9. P. 1236–1240.
355. Joshi J., Edgecombe G.D. Revision of the scolopendrid centipede *Digitipes* Attems, 1930, from India (Chilopoda: Scolopendromorpha): reconciling molecular and morphological estimates of species diversity // *Zootaxa*. 2013. Vol. 3626, № 1. P. 99–145.
356. Joshi J., Edgecombe G.D. Molecular phylogeny and systematics of the centipede genus *Ethmostigmus* Pocock (Chilopoda: Scolopendromorpha) from peninsular India // *Invertebrate Systematics*. 2018. Vol. 32, № 6. P. 1316–1335.

357. Joshi J., Karanth K.P. Coalescent method in conjunction with niche modeling reveals cryptic diversity among centipedes in the Western Ghats of South India // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 8. P. e42225.
358. Kapli P., Lutteropp S., Zhang J., Kobert K., Pavlidis P., Stamatakis A., Flouri T. Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo // Bioinformatics. 2017. Vol. 33, № 11. P. 1630–1638.
359. Kasai F., O'Brien P.C.M., Ferguson-Smith M.A. Reassessment of genome size in turtle and crocodile based on chromosome measurement by flow karyotyping: close similarity to chicken // Biology Letters. 2012. Vol. 8, № 4. P. 631–635.
360. Kashmenskaya M.N., Polyakov A. V. Karyotype analysis of five species of earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae) // Comparative Cytogenetics. 2008. Vol. 2, № 2. P. 121–125.
361. Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability // Molecular Biology and Evolution. 2013. Vol. 30, № 4. P. 772–780.
362. Katz A.D., Giordano R., Soto-Adames F.N. Operational criteria for cryptic species delimitation when evidence is limited, as exemplified by North American *Entomobrya* (Collembola: Entomobryidae) // Zoological Journal of the Linnean Society. 2015. Vol. 173, № 4. P. 818–840.
363. Kille P., Andre J., Anderson C., Ang H.N., Bruford M.W., Bundy J.G., Donnelly R., Hodson M.E., Juma G., Lahive E. DNA sequence variation and methylation in an arsenic tolerant earthworm population // Soil Biology and Biochemistry. 2013. Vol. 57. P. 524–532.
364. Kim S., Jeon D., Lee J.-Y., Cho S.-J., Lim Y., Eyun S., Park S.C., Seo Y.-J. Upregulation of cellulase activity and mRNA levels by bacterial challenge in the earthworm *Eisenia andrei*, supporting the involvement of cellulases in innate immunity // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2020. Vol. 521, № 1. P. 15–18.

365. King R.A., Tibble A.L., Symondson W.O.C. Opening a can of worms: Unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms // *Molecular Ecology* 2008. Vol. 17, № 21. P. 4684–4698.
366. Klarica J., Kloss-Brandstätter A., Traugott M., Juen A. Comparing four mitochondrial genes in earthworms—implications for identification, phylogenetics, and discovery of cryptic species // *Soil Biology and Biochemistry*. 2012. Vol. 45. P. 23–30.
367. Klinth M.J., Rota E., Erséus C. Taxonomy of North European *Lumbricillus* (Clitellata, Enchytraeidae) // *Zookeys*. 2017. № 703. P. 15.
368. Knoop V. When you can't trust the DNA: RNA editing changes transcript sequences // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011. Vol. 68, № 4. P. 567–586.
369. Knott K.E., Haimi J. High mitochondrial DNA sequence diversity in the parthenogenetic earthworm *Dendrobaena octaedra* // *Heredity*. 2010. Vol. 105, № 4. P. 341–347.
370. Kobayashi S. Terrestrial Oligochaeta from Manchoukuo // *The Science reports of the Tohoku Imperial University, IV Series*. 1940. Vol. 15. P. 256–261.
371. Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S. V, Pääbo S., Villablanca F.X., Wilson A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989. Vol. 86, № 16. P. 6196–6200.
372. Kocot K.M., Citarella M.R., Moroz L.L., Halanych K.M. PhyloTreePruner: A phylogenetic tree-based approach for selection of orthologous sequences for phylogenomics // *Evolutionary Bioinformatics*. 2013. Vol. 9. P. 429–435.
373. Komatsu G., Baker V.R., Arzhannikov S.G., Gallagher R., Arzhannikova A. V, Murana A., Oguchi T. Catastrophic flooding, palaeolakes, and late Quaternary drainage reorganization in northern Eurasia // *International Geology Review*. 2016. Vol. 58, № 14. P. 1693–1722.

374. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Molecular Biology and Evolution*. 2018. Vol. 35, № 6. P. 1547–1549.
375. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers // *Bioinformatics*. 1994. Vol. 10, № 2. P. 189–191.
376. Kvavadze E. A new genus of earthworms *Omodeoia* gen. nov. (Oligochaeta, Lumbricidae) // *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*. 1993. Vol. 148, № 3. P. 129–134.
377. Kvavadze E. Shape of genital setae - a taxonomic character of the genus *Eisenia* (Oligochaeta, Lumbricidae) // *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*. 1996. Vol. 154, № 2. P. 297–299.
378. Kvavadze E.S., Bakhtadze N., Bakhtadze G. About validity of genus *Omodeoia* Kvavadze, 1993 (Oligochaeta, Lumbricidae) // *Proceedings of the Georgian Academy of Sciences B*. 2007. Vol. 5, № 3. P. 1–7.
379. Lambeck K., Purcell A., Funder S., Kjaer K.H., Larsen E., Moller P.E.R. Constraints on the Late Saalian to early Middle Weichselian ice sheet of Eurasia from field data and rebound modelling // *Boreas*. 2006. Vol. 35, № 3. P. 539–575.
380. Larson D.J., Middle L., Vu H., Zhang W., Serianni A.S., Duman J., Barnes B.M. Wood frog adaptations to overwintering in Alaska: New limits to freezing tolerance // *Journal of Experimental Biology*. 2014. Vol. 72, № 8. P. 1420–1425.
381. Latif R., Malek M., Csuzdi C. When morphology and DNA are discordant: Integrated taxonomic studies on the *Eisenia fetida/andrei* complex from different parts of Iran (Annelida, Clitellata: Megadrili) // *European Journal of Soil Biology* 2017. Vol. 81. P. 55–63.
382. Laverack M.S. The identity of the porphyrin pigments of the integument of earthworms // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1960. Vol. 1, № 4. P. 259–266.
383. Laverack M.S. *The physiology of earthworms*. New York: Pergamon Press, 1963. 206 p.

384. Lavrov D. V, Pett W. Animal mitochondrial DNA as we do not know it: mt-genome organization and evolution in nonbilaterian lineages // *Genome Biology and Evolution*. 2016. Vol. 8, № 9. P. 2896–2913.
385. Lechner M., Findeiß S., Steiner L., Marz M., Stadler P.F., Prohaska S.J. Proteinortho: detection of (co-) orthologs in large-scale analysis // *BMC Bioinformatics*. 2011. Vol. 12, № 1. P. 1–9.
386. Lee B.-T., Shin K.-H., Kim J.-Y., Kim K.-W. Progress in earthworm ecotoxicology / In: Kim Y.J., Platt U. *Advanced Environmental Monitoring*. Netherlands, Dordrecht: Springer. 2008. P. 248–258.
387. Lee M.S., Cho S.J., Tak E.S., Lee J.A., Cho H.J., Park B.J., Shin C., Kim D.K., Park S.C. Transcriptome analysis in the midgut of the earthworm (*Eisenia andrei*) using expressed sequence tags // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005. Vol. 328, № 4. P. 1196–1204.
388. Lees J., Yeats C., Perkins J., Sillitoe I., Rentzsch R., Dessailly B.H., Orengo C. Gene3D: a domain-based resource for comparative genomics, functional annotation and protein network analysis // *Nucleic Acids Research*. 2012. Vol. 40, № D1. P. D465–D471.
389. Lentzsch P., Golldack J. Genetic diversity of *Aporrectodea caliginosa* from agricultural sites in Northeast Brandenburg, Germany // *Pedobiologia*. 2006. Vol. 50, № 4. P. 369–376.
390. Lewontin R.C., Hubby J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura* // *Genetics*. 1966. Vol. 54, № 2. P. 595.
391. Li G., Li D., Rao H., Liu X. Potential neurotoxicity, immunotoxicity, and carcinogenicity induced by metribuzin and tebuconazole exposure in earthworms (*Eisenia fetida*) revealed by transcriptome analysis // *Science of The Total Environment*. 2022. Vol. 807. P. 150760.
392. Liming Z.Y.S. Mitochondrial DNA polymorphisms in animals: a review // *Zoological Research*. 1992. № 3. P. 16.

393. Linné C. von. *Systema naturae*. Tom. I Pars II. Vindobonae: Typis Ioannis Thomae, 1766.
394. Liu T., Chen D., Li Y., Wang X., Wang F. Enantioselective bioaccumulation and toxicity of the neonicotinoid insecticide dinotefuran in earthworms (*Eisenia fetida*) // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018. Vol. 66, № 17. P. 4531–4540.
395. Liu T., Liu Y., Fang K., Zhang X., Wang X. Transcriptome, bioaccumulation and toxicity analyses of earthworms (*Eisenia fetida*) affected by trifloxystrobin and trifloxystrobin acid // *Environmental Pollution*. 2020. Vol. 265. P. 115100.
396. Liu H., Zhang Y., Wang G., Chen J., Zhang Q., Ruan H. Development and characterization of microsatellite markers in the earthworm *Drawida gisti* Michaelsen, 1931 and cross-amplification in two other congeners // *Molecular Biology Reports*. 2020. Vol. 47. № 10. P. 8265–8269.
397. Liu Y., Fang K., Zhang X., Liu T., Wang X. Enantioselective toxicity and oxidative stress effects of acetochlor on earthworms (*Eisenia fetida*) by mediating the signaling pathway // *Science of The Total Environment*. 2021. Vol. 766. P. 142630.
398. Lowe C.N., Butt K.R. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: a critical review // *European Journal of Soil Biology* 2007. Vol. 43. P. S281–S288.
399. Lundheim R. Physiological and ecological significance of biological ice nucleators // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2002. Vol. 357, № 1423. P. 937–943.
400. Lyman R.A., Edwards C.E. Revisiting the comparative phylogeography of unglaciated eastern North America: 15 years of patterns and progress // *Ecology and Evolution*. 2022. Vol. 12, № 4. P. e8827.
401. MacDonald G.M., Kremenetski K. V, Beilman D.W. Climate change and the northern Russian treeline zone // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2008. Vol. 363, № 1501. P. 2283–2299.

402. Maggia M.-E., Decaëns T., Lapied E., Dupont L., Roy V., Schimann H., Orivel J., Muriene J., Baraloto C., Cottenie K. At each site its diversity: DNA barcoding reveals remarkable earthworm diversity in neotropical rainforests of French Guiana // *Applied Soil Ecology*. 2021. Vol. 164. P. 103932.
403. Mallet J. Species, concepts of // *Encyclopedia of Biodiversity*. San Diego: Academic Press. 2001. Vol. 5. P. 427–440.
404. Mallet J. Alternative views of biological species: reproductively isolated units or genotypic clusters? // *National Science Review*. 2020. Vol. 7, № 8. P. 1401–1407.
405. Marchán D.F., Fernández R., de Sosa I., Cosín D.J.D., Novo M. Pinpointing cryptic borders: Fine-scale phylogeography and genetic landscape analysis of the *Hormogaster elisae* complex (Oligochaeta, Hormogastridae) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2017. Vol. 112. P. 185–193.
406. Marchán D.F., Hedde M., Lapied E., Maggia M.-E., Novo Rodríguez M., Domínguez J., Decaëns T. Contrasting phylogeographic patterns of earthworms (Crassiclitellata, Lumbricidae) on near-shore Mediterranean islands. // *European Journal of Soil Biology*. 2021a. Vol. 10. P. 33.
407. Marchán D.F., Jiménez S., Decaëns T., Domínguez J. Systematic revision of *Gatesona* (Crassiclitellata, Lumbricidae), an endemic earthworm genus from the Massif Central (France) // *PLoS One*. 2021b. Vol. 16, № 9. P. e0255978.
408. Marchán D.F., Sánchez N., Novo M., Fernández R., Pardos F., Díaz Cosín D.J. Cryptic characters for cryptic taxa: On the taxonomic utility of the genital chaetae in earthworms (Oligochaeta, Hormogastridae) // *Zoologischer Anzeiger*. 2016. Vol. 264. P. 17–28.
409. Marchán D.F., Cosín D.J.D., Novo M. Why are we blind to cryptic species? Lessons from the eyeless // *European Journal of Soil Biology*. 2018a. Vol. 86. P. 49–51.
410. Marchán D.F., Decaëns T., Domínguez J., Novo M. Perspectives in earthworm molecular phylogeny: recent advances in Lumbricoidea and standing questions // *Diversity*. 2022. Vol. 14, № 1. P. 30.



411. Marchán D.F., Fernández R., de Sosa I., Sánchez N., Cosín D.J.D., Novo M. Integrative systematic revision of a Mediterranean earthworm family: Hormogastridae (Annelida, Oligochaeta) // *Invertebrate Systematics*. 2018b. Vol. 32, № 3. P. 652.
412. Marchán D.F., Fernández R., Domínguez J., Díaz Cosín D.J., Novo M. Genome-informed integrative taxonomic description of three cryptic species in the earthworm genus *Carpetania* (Oligochaeta, Hormogastridae) // *Systematics and Biodiversity*. 2020a. Vol. 18, № 3. P. 203–215.
413. Marchán D.F., Novo M., Sánchez N., Domínguez J., Cosín D.J.D., Fernández R. Local adaptation fuels cryptic speciation in terrestrial annelids // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2020b. Vol. 146. P. 106767.
414. Marlétaz F., Peijnenburg K.T.C.A., Goto T., Satoh N., Rokhsar D.S. A new spiralian phylogeny places the enigmatic arrow worms among gnathiferans // *Current Biology*. 2019. Vol. 29, № 2. P. 312–318.
415. Marshall C.B., Fletcher G.L., Davies P.L. Hyperactive antifreeze protein in a fish // *Nature*. 2004. Vol. 429, № 6988. P. 153–153.
416. Marshall K.E., Thomas R.H., Roxin Á., Chen E.K.Y., Brown J.C.L., Gillies E.R., Sinclair B.J. Seasonal accumulation of acetylated triacylglycerols by a freeze-tolerant insect // *Journal of Experimental Biology*. 2014. Vol. 217, № 9. P. 1580–1587.
417. Marske K.A., Boyer S.L. Phylogeography reveals the complex impact of the Last Glacial Maximum on New Zealand's terrestrial biota // *Journal of the Royal Society of New Zealand*. 2022. P. 1–22.
418. Martinsson S., Erséus C. Cryptic diversity in the well-studied terrestrial worm *Cognettia sphagnetorum* (Clitellata: Enchytraeidae) // *Pedobiologia*. 2014. Vol. 57, № 1. P. 27–35.
419. Martinsson S., Erséus C. Barcoding gap, but no support for cryptic speciation in the earthworm *Aporrectodea longa* (Clitellata: Lumbricidae) // *Mitochondrial DNA Part A*. 2017a. Vol. 28, № 2. P. 147–155.

420. Martinsson S., Erséus C. Cryptic speciation and limited hybridization within *Lumbricus* earthworms (Clitellata: Lumbricidae) // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2017b. Vol. 106. P. 18–27.
421. Martinsson S., Erséus C. Hybridisation and species delimitation of Scandinavian *Eisenia* spp. (Clitellata: Lumbricidae) // European Journal of Soil Biology. 2018a. Vol. 88. P. 41–47.
422. Martinsson S., Erséus C. Cryptic diversity in supposedly species-poor genera of *Enchytraeidae* (Annelida: Clitellata) // Journal of the Linnean Society 2018b. Vol. 183, № 4. P. 749–762.
423. Martinsson S., Rota E., Erséus C. Revision of *Cognettia* (Clitellata, Enchytraeidae): re-establishment of *Chamaedrillus* and description of cryptic species in the *sphagnetorum* complex // Systematics and Biodiversity. 2015. Vol. 13, № 3. P. 257–277.
424. Mayilswami S., Krishnan K., Megharaj M., Naidu R. Gene expression profile changes in *Eisenia fetida* chronically exposed to PFOA // Ecotoxicology. 2016. Vol. 25, № 4. P. 759–769.
425. Mayilswami S., Krishnan K., Naidu R., Megharaj M. Transcriptome analysis of *Eisenia fetida* chronically exposed to benzo (a) pyrene // Environmental Technology and Innovation. 2017. Vol. 7. P. 54–62.
426. Mayr E. Of what use are subspecies? // Auk. 1982. Vol. 99, № 3. P. 593–595.
427. McWilliam H., Li W., Uludag M., Squizzato S., Park Y.M., Buso N., Cowley A.P., Lopez R. Analysis tool web services from the EMBL-EBI // Nucleic Acids Research. 2013. Vol. 41, № W1. P. W597–W600.
428. Meinhardt U. Comparative observations on the laboratory biology of endemic earthworm species, II Biology of bred species // Zeitschrift für Angewandte Zoologie. 1974. Vol. 61. P. 137–182.
429. Members C.-L.I.P. Last Interglacial Arctic warmth confirms polar amplification of climate change // Quaternary Science Reviews. 2006. Vol. 25, № 13–14. P. 1383–1400.

430. Merriman B., R&D Team I.T., Rothberg J.M. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing // *Electrophoresis*. 2012. Vol. 33, № 23. P. 3397–3417.
431. Meshcheryakova E.N., Berman D.I. Cold hardiness and geographic distribution of earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae, Moniligastridae) // *Entomological Review*. 2014. Vol. 94, № 4. P. 486–497.
432. Meyer M., Kircher M. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing // *Cold Spring Harbor Protocols*. 2010. № 6. P. pdb-prot5448.
433. Mezhzherin S. V, Onyschuk I.P., Garbar A. V, Zhalay E.I. Cryptic biotypes of earthworm *Octolasion lacteum* (Oligochaeta, Lumbricidae) in Ukraine. // *Vestnik Zoologii*. 2010. Vol. 44, № 3. P. 195–207.
434. Mezhzherin S. V, Vlasenko R.P., Garbar A. V. Features of the genetic structure of the earthworms *Aporrectodea* (Superspecies) *caliginosa* (Oligochaeta: Lumbricidae) complex in Ukraine // *Cytology and Genetics*. 2008. Vol. 42, № 4. P. 256.
435. Michaelsen W. Revision der Kinberg'schen Oligochaeten-Typen // *Öfversigt af Kongliga Vetenskaps-Akademiens Förhandlingar*. 1899. Vol. 56. P. 413–448.
436. Michaelsen W. *Das Tierreich*. Vol. 10: Oligochaeta. Berlin: Friedländer und Sohn. 1900.
437. Michaelsen W. Oligochaeten der Zoologischen Museen zu St. Petersburg und Kiew // *Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de St.-Pétersbourg*. 1901. Vol. 15, № 2. P. 137–215.
438. Michaelsen W. *Die geographische verbreitung der Oligochaeten*. Berlin: Friedländer und Sohn. 1903.
439. Michaelsen W. Die Lumbriciden des Kaukasischen Museums in Tiflis // *Mitteilungen des Kaukasischen Museums*. 1907. Vol. 3. P. 81–93.
440. Michaelsen W. Zur Kenntnis der Lumbriciden und ihrer Verbreitung // *Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de St.-Pétersbourg*. 1909. Vol. 3, № 13. P. 876.

441. Mikami Y., Fukushima A., Kuwada-Kusunose T., Sakurai T., Kitano T., Komiyama Y., Iwase T., Komiyama K. Whole transcriptome analysis using next-generation sequencing of sterile-cultured *Eisenia andrei* for immune system research // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 2. P. e0118587.
442. Minamiya Y., Yokoyama J., Fukuda T. A phylogeographic study of the Japanese earthworm, *Metaphire sieboldi* (Horst, 1883) (Oligochaeta: Megascolecidae): Inferences from mitochondrial DNA sequences // European Journal of Soil Biology 2009. Vol. 45, № 5–6. P. 423–430.
443. Moore J.-D., Görres J.H., Reynolds J.W. Exotic Asian pheretimoid earthworms (*Amyntas* spp., *Metaphire* spp.): Potential for colonisation of south-eastern Canada and effects on forest ecosystems // Environmental Reviews. 2018. Vol. 26, № 2. P. 113–120.
444. Moritz C., Dowling T.E., Brown W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics // Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 1987. Vol. 18, № 1. P. 269–292.
445. Muldal S. The chromosomes of the earthworms: I. The evolution of polyploidy // Heredity. 1952. Vol. 6, № 1. P. 56–76.
446. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1986. Vol. 51. P. 263–273.
447. Naciri Y., Linder H.P. Species delimitation and relationships: the dance of the seven veils // Taxon. 2015. Vol. 64, № 1. P. 3–16.
448. Nagalakshmi U., Waern K., Snyder M. RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis // Current Protocols in Molecular Biology. 2010. Vol. 89, № 1. P. 4–11.
449. Nagy H., Dózsa-Farkas K., Hong Y., Felföldi T. Extending the geographic distribution of *Bryodrilus ehlersi* (Annelida, Enchytraeidae): Morphological and molecular comparison of korean and european specimens // Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae. 2020. Vol. 66, № 4. P. 345–360.

450. Narum S.R., Buerkle C.A., Davey J.W., Miller M.R., Hohenlohe P.A. Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics // *Molecular Ecology*. 2013. Vol. 22, № 11. P. 2841.
451. Newbold L.K., Robinson A., Rasnaca I., Lahive E., Soon G.H., Lapied E., Oughton D., Gashchak S., Beresford N.A., Spurgeon D.J. Genetic, epigenetic and microbiome characterisation of an earthworm species (*Octolasion lacteum*) along a radiation exposure gradient at Chernobyl // *Environmental Pollution*. 2019. Vol. 255. P. 113238.
452. Niessen F., Hong J.K., Hegewald A., Matthiessen J., Stein R., Kim H., Kim S., Jensen L., Jokat W., Nam S.-I. Repeated Pleistocene glaciation of the East Siberian continental margin // *Nature Geosciences*. 2013. Vol. 6, № 10. P. 842–846.
453. Novo M., Almodóvar A., Díaz-Cosín D.J. High genetic divergence of hormogastrid earthworms (Annelida, Oligochaeta) in the central Iberian Peninsula: evolutionary and demographic implications // *Zoologica Scripta*. 2009. Vol. 38, № 5. P. 537–552.
454. Novo M., Almodóvar A., Fernández R., Trigo D., Cosín D.J.D. Cryptic speciation of hormogastrid earthworms revealed by mitochondrial and nuclear data // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2010. Vol. 56, № 1. P. 507–512.
455. Novo M., Almodóvar A., Fernández R., Giribet G., Cosín D.J.D. Understanding the biogeography of a group of earthworms in the Mediterranean basin—The phylogenetic puzzle of Hormogastridae (Clitellata: Oligochaeta) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2011. Vol. 61, № 1. P. 125–135.
456. Novo M., Almodóvar A.N.A., Fernandez R., Trigo D., Díaz-Cosín D.J., Giribet G. Appearances can be deceptive: different diversification patterns within a group of Mediterranean earthworms (Oligochaeta, Hormogastridae) // *Molecular Ecology* 2012a. Vol. 21, № 15. P. 3776–3793.
457. Novo M., Fernández R., Marchán D.F., Gutiérrez M., Cosín D.J.D. Compilation of morphological and molecular data, a necessity for taxonomy: The case of

- Hormogaster abbatissae* sp. n. (Annelida, Clitellata, Hormogastridae) // Zookeys. 2012b. № 242. P. 1–16.
458. Novo M., Riesgo A., Fernández-Guerra A., Giribet G. Pheromone evolution, reproductive genes, and comparative transcriptomics in Mediterranean earthworms (Annelida, Oligochaeta, Hormogastridae) // Molecular Biology and Evolution. 2013. Vol. 30, № 7. P. 1614–1629.
459. Novo M., Fernández R., Fernandez Marchan D., Trigo D., Diaz Cosin D.J., Giribet G. Unearthing the historical biogeography of Mediterranean earthworms (Annelida: Hormogastridae) // Journal of Biogeography. 2015a. Vol. 42, № 4. P. 751–762.
460. Novo M., Lahive E., Díez-Ortiz M., Matzke M., Morgan A.J., Spurgeon D.J., Svendsen C., Kille P. Different routes, same pathways: Molecular mechanisms under silver ion and nanoparticle exposures in the soil sentinel *Eisenia fetida* // Environmental Pollution. 2015b. Vol. 205. P. 385–393.
461. Novo M., Fernández R., Andrade S.C.S., Marchán D.F., Cunha L., Cosín D.J.D. Phylogenomic analyses of a Mediterranean earthworm family (Annelida: Hormogastridae) // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2016. Vol. 94. P. 473–478.
462. Nylander J.A.A. MrModeltest ver. 2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden. 2004.
463. Oeyen J.P., Funke S., Boehme W., Wesener T. The evolutionary history of the rediscovered Austrian population of the giant centipede *Scolopendra cingulata* Latreille 1829 (Chilopoda, Scolopendromorpha) // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 9. P. e108650.
464. Olson M.J. Discovery and Delimitation: Criconematid Nematodes of North American Grasslands. PhD Thesis: The University of Nebraska-Lincoln. 2015.
465. Omodeo P. Cariologia dei Lumbricidae // Caryologia. 1952. Vol. 4, № 2. P. 173–275.
466. Omodeo P. Contributo alla revisione dei Lumbricidae. // Archivio Zoologico Italiano. 1956. Vol. 41. P. 129–212.

467. Omodeo P. Evolution and biogeography of megadriles (Annelida, Clitellata) // Italian Journal of Zoology. 2000. Vol. 67. P. 179–201.
468. Orr-Weaver T.L. When bigger is better: the role of polyploidy in organogenesis // Trends in Genetics. 2015. Vol. 31, № 6. P. 307–315.
469. Otomo P.V., Owojori O.J., Reinecke S.A., Daniels S., Reinecke A.J. Using estimates of metal bioavailability in the soil and genetic variation of allozymes to investigate heavy metal tolerance in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta) // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2011. Vol. 74, № 7. P. 2070–2074.
470. Overgaard J., Slotsbo S., Holmstrup M., Bayley M. Determining factors for cryoprotectant accumulation in the freeze-tolerant earthworm, *Dendrobaena octaedra* // Journal of Experimental Zoology Part A. 2007. Vol. 307A, № 10. P. 578–589.
471. Overgaard J., Tollarova M., Hedlund K., Petersen S.O., Holmstrup M. Seasonal changes in lipid composition and glycogen storage associated with freeze-tolerance of the earthworm, *Dendrobaena octaedra* // Journal of Comparative Physiology B. 2009. Vol. 179, № 5. P. 569–577.
472. Owen J., Hedley B.A., Svendsen C., Wren J., Jonker M.J., Hankard P.K., Lister L.J., Stürzenbaum S.R., Morgan A.J., Spurgeon D.J. Transcriptome profiling of developmental and xenobiotic responses in a keystone soil animal, the oligochaete annelid *Lumbricus rubellus* // BMC Genomics. 2008. Vol. 9, № 1. P. 1–21.
473. Patton H., Hubbard A., Andreassen K., Winsborrow M., Stroeven A.P. The build-up, configuration, and dynamical sensitivity of the Eurasian ice-sheet complex to Late Weichselian climatic and oceanic forcing // Quaternary Science Reviews. 2016. Vol. 153. P. 97–121.
474. Paul S., Arumugaperumal A., Rathy R., Ponesakki V., Arunachalam P., Sivasubramaniam S. Data on genome annotation and analysis of earthworm *Eisenia fetida* // Data in Brief. 2018. Vol. 20. P. 525–534.

475. Paul S., Balakrishnan S., Arumugaperumal A., Lathakumari S., Syamala S.S., Arumugaswami V., Sivasubramaniam S. The transcriptome of anterior regeneration in earthworm *Eudrilus eugeniae* // *Molecular Biology Reports*. 2021. Vol. 48, № 1. P. 259–283.
476. Paul S., Heckmann L.-H., Sørensen J.G., Holmstrup M., Arumugaperumal A., Sivasubramaniam S. Transcriptome sequencing, de novo assembly and annotation of the freeze tolerant earthworm, *Dendrobaena octaedra* // *Gene Reports*. 2018. Vol. 13. P. 180–191.
477. Perel T.S. Die Regenwürmer (Lumbricidae) des Gebirgigen Mittelasian // *Pedobiologia*. 1969. Vol. 9. P. 55–68.
478. Pérez-Delgado A.J., Arribas P., Hernando C., López H., Arjona Y., Suárez-Ramos D., Emerson B.C., Andújar C. Hidden island endemic species and their implications for cryptic speciation within soil arthropods // *Journal of Biogeography*. 2022. Vol. 49, № 7. P. 1367–1380.
479. Pérez-Losada M., Eiroa J., Mato S., Domínguez J. Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences // *Pedobiologia*. 2005. Vol. 49, № 4. P. 317–324.
480. Pérez-Losada M., Ricoy M., Marshall J.C., Domínguez J. Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta: Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009. Vol. 52, № 2. P. 293–302.
481. Pérez-Losada M., Breinholt J.W., Aira M., Domínguez J. An updated multilocus phylogeny of the Lumbricidae (Annelida: Clitellata: Oligochaeta) earthworms // *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology*. 2015. Vol. 2015.
482. Peters R.S., Meusemann K., Petersen M., Mayer C., Wilbrandt J., Ziesmann T., Donath A., Kjer K.M., Aspöck U., Aspöck H. The evolutionary history of holometabolous insects inferred from transcriptome-based phylogeny and



- comprehensive morphological data // BMC Evolutionary Biology. 2014. Vol. 14, № 1. P. 1–16.
483. Petersen C.R., Holmstrup M., Malmendal A., Bayley M., Overgaard J. Slow desiccation improves dehydration tolerance and accumulation of compatible osmolytes in earthworm cocoons (*Dendrobaena octaedra* Savigny) // Journal of Experimental Biology. 2008. Vol. 211, № 12. P. 1903–1910.
484. Peterson B.K., Weber J.N., Kay E.H., Fisher H.S., Hoekstra H.E. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 5. P. e37135.
485. Pearce T. Yellow earthworms: distinctive pigmentation associated with arsenic- and copper-tolerance in *Lumbricus rubellus* // Soil Biology and Biochemistry. 2002. Vol. 34, № 12. P. 1833–1838.
486. Pizl V. *Dendrobaena baksanensis* sp. n. (Oligochaeta, Lumbricidae), a new earthworm from Caucasus, USSR // Vestnik Ceskoslovenske Spolecnosti Zoologicke. 1984, Vol 48, № 2, P. 115-117.
487. Plisko J.D. Designation of lectotypes for *Microchaetus microchaetus* (Rapp, 1849) and *Microchaetus rappi* Beddard, 1886, and historical perspectives on these species (Oligochaeta: Microchaetidae) // Annals of the Natal Museum. 1999. Vol. 40, № 1. P. 269–276.
488. Polzin T., Daneshmand S.V. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs // Operations Research Letters. 2003. Vol. 31, № 1. P. 12–20.
489. Ponesakki V., Paul S., Mani D.K.S., Rajendiran V., Kanniah P., Sivasubramaniam S. Annotation of nerve cord transcriptome in earthworm *Eisenia fetida* // Genomics Data. 2017. Vol. 14. P. 91–105.
490. Pop A.A., Wink M., Pop V. V. Use of 18S, 16S rDNA and cytochrome c oxidase sequences in earthworm taxonomy (Oligochaeta, Lumbricidae) // Pedobiologia. 2003. Vol. 47, № 5–6. P. 428–433.
491. Pop A.A., Cech G., Wink M., Csuzdi C., Pop V. V. Application of 16S, 18S rDNA and COI sequences in the molecular systematics of the earthworm family

- Lumbricidae (Annelida, Oligochaeta) // *European Journal of Soil Biology* 2007. Vol. 43. P. S43–S52.
492. Porco D., Potapov M., Bedos A., Busmachiu G., Weiner W.M., Hamra-Kroua S., Deharveng L. Cryptic diversity in the ubiquitous species *Parisotoma notabilis* (Collembola, Isotomidae): a long-used chimeric species? *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 9. P. e46056.
493. Porco D., Decaëns T., Deharveng L., James S.W., Skarzyński D., Erséus C., Butt K.R., Richard B., Hebert P.D.N. Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America // *Biological Invasions*. 2013. Vol. 15, № 4. P. 899–910.
494. Potapov A.M., Tiunov A. V, Scheu S., Larsen T., Pollierer M.M. Combining bulk and amino acid stable isotope analyses to quantify trophic level and basal resources of detritivores: a case study on earthworms // *Oecologia*. 2019. Vol. 189. P. 447–460.
495. Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation // *Molecular Ecology* 2012. Vol. 21, № 8. P. 1864–1877.
496. Rapoport I.B. Morpho-ecological forms of *Dendrobaena schmidti* Michaelsen, 1907 (Oligochaeta, Lumbricidae) of North Caucasus / In: Fourth International Oligochaete Taxonomy Meetings. 2009. P. 39.
497. Rasmussen L., Holmstrup M. Geographic variation of freeze-tolerance in the earthworm *Dendrobaena octaedra* // *Journal of Comparative Physiology B*. 2002. Vol. 172, № 8. P. 691–698.
498. Rawlings T.A., Collins T.M., Bieler R. A major mitochondrial gene rearrangement among closely related species // *Molecular Biology and Evolution*. 2001. Vol. 18, № 8. P. 1604–1609.
499. Redi C.A., Zacharias H., Merani S., Oliveira-Miranda M., Aguilera M., Zuccotti M., Garagna S., Capanna E. Genome Sizes in Afrotheria, Xenarthra,

- Euarchontoglires, and Laurasiatheria // *Journal of Heredity*. 2005. Vol. 96, № 5. P. 485–493.
500. Reynolds J.W. Earthworms of the world // *Global Biodiversity*. 1994. Vol. 4, № 1. P. 11–16.
501. Robotti C.A. Biochemical polymorphism of earthworms: 4. enzymes of *Eisenia fetida andrei* Bouché (Annelida Oligochaeta) // *Monitore Zoologico Italiano*. 1982. Vol. 16, № 4. P. 341–344.
502. Roelofs D., Makama S., De Boer T.E., Vooijs R., Van Gestel C.A.M., Van Den Brink N.W. Surface coating and particle size are main factors explaining the transcriptome-wide responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to silver nanoparticles // *Environmental Science: Nano Journal*. 2020. Vol. 7, № 4. P. 1179–1193.
503. Rogatzki M.J., Ferguson B.S., Goodwin M.L., Gladden L.B. Lactate is always the end product of glycolysis // *Frontiers in Neuroscience*. 2015. Vol. 9. P. 22.
504. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics*. 2003. Vol. 19, № 12. P. 1572–1574.
505. Ronquist F., Teslenko M., Van Der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // *Systematic Biology*. 2012. Vol. 61, № 3. P. 539–542.
506. Rusk N. Torrents of sequence // *Nature Methods*. 2011. Vol. 8, № 1. P. 44.
507. Rybak A. V, Belykh E.S., Maystrenko T.A., Shadrin D.M., Pylina Y.I., Chadin I.F., Velegzhaninov I.O. Genetic analysis in earthworm population from area contaminated with radionuclides and heavy metals // *Science of The Total Environment*. 2020. Vol. 723. P. 137920.
508. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // *Science*. 1985. Vol. 230, № 4732. P. 1350–1354.

509. Saltonstall K. Genotypes, Invasive / In: Simberloff D., Rejmanek M. Encyclopedia of Biological Invasions. USA, Oakland: University of California Press, 2011. P. 270–272.
510. von Saltzwedel H., Scheu S., Schaefer I. Genetic structure and distribution of *Parisotoma notabilis* (Collembola) in Europe: Cryptic diversity, split of lineages and colonization patterns // PLoS One. 2017. Vol. 12, № 2. P. e0170909.
511. Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA // Science. 1981. Vol. 1, №. 4526. P. 1205-1210.
512. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1977. Vol. 74, № 12. P. 5463–5467.
513. Satler J.D., Carstens B.C., Garrick R.C., Espíndola A. The phylogeographic shortfall in hexapods: a lot of leg work remaining // Insect Systematics and Diversity. 2021. Vol. 5, № 5. P. 1–18.
514. Schäffer S., Pfingstl T., Koblmüller S., Winkler K.A., Sturmhuber C., Krisper G. Phylogenetic analysis of European *Scutovertex mites* (Acari, Oribatida, Scutoverticidae) reveals paraphyly and cryptic diversity: a molecular genetic and morphological approach // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2010. Vol. 55, № 2. P. 677–688.
515. Schmelz RM R.M., Beylich A., Boros G., Dózsa-Farkas K., Graefe U. How to deal with cryptic species in Enchytraeidae, with recommendations on taxonomical descriptions // Opuscula Zoologica. 2017. Vol. 48, № S2. P. 45–51.
516. Schmid W.D. Survival of frogs in low temperature // Science. 1982. Vol. 215, № 4533. P. 697–698.
517. Schneeweiss G.M., Schoenswetter P. A re-appraisal of nunatak survival in arctic-alpine phylogeography // Molecular Ecology. 2011. Vol. 20, P. 190–192.
518. Schult N., Pittenger K., Davalos S., McHugh D. Phylogeographic analysis of invasive Asian earthworms (*Amyntas*) in the northeast United States // Invertebrate Biology. 2016. Vol. 135, № 4. P. 314–327.

519. Seesamut T., Jirapatrasilp P., Sutcharit C., Tongkerd P., Panha S. Mitochondrial genetic population structure and variation of the littoral earthworm *Pontodrilus longissimus* Seesamut and Panha, 2018 along the coast of Thailand // *European Journal of Soil Biology* 2019. Vol. 93. P. 103091.
520. Shafer A.B.A., Cullingham C.I., Cote S.D., Coltman D.W. Of glaciers and refugia: a decade of study sheds new light on the phylogeography of northwestern North America // *Molecular Ecology* 2010. Vol. 19, № 21. P. 4589–4621.
521. Shao Y., Wang X.-B., Zhang J.-J., Li M.-L., Wu S.-S., Ma X.-Y., Wang X., Zhao H.-F., Li Y., Zhu H.H. Genome and single-cell RNA-sequencing of the earthworm *Eisenia andrei* identifies cellular mechanisms underlying regeneration // *Nature Communications*. 2020. Vol. 11, № 1. P. 1–15.
522. Sheinkman V. Quaternary glaciation in North-Western Siberia—New evidence and interpretation // *Quaternary International*. 2016. Vol. 420. P. 15–23.
523. Shen H.-P., Chang C.-H., Ota H. The biogeographical history of giant earthworms of the *Metaphire formosae* species group (Clitellata: Megascolecidae) in Taiwan and the Ryukyu Archipelago, with the description of a new species from Yonagunijima, Southern Ryukyus // *Organisms Diversity and Evolution*. 2022. Vol. 22. P. 47–60.
524. Sherlock E., Berridge L. History of the earthworm collections at the Natural History Museum, London: (Oligochaeta) // *Zoology in the Middle East*. 2012. Vol. 58, № sup4. P. 151–158.
525. Shorter A.W. Prof. J. W. Michaelsen // *Nature*. 1937. Vol. 140. P. 308–309.
526. Simon C., Buckley T.R., Frati F., Stewart J.B., Beckenbach A.T. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA // *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2006. Vol. 37. P. 545–579.

527. Simonsen V., Laskowski R., Bayley M., Holmstrup M. Low impact of metal pollution on genetic variation in the earthworm *Dendrobaena octaedra* measured by allozymes // *Pedobiologia*. 2008. Vol. 52, № 1. P. 51–60.
528. Sims R.W., Gerard B.M. Earthworms: keys and notes for the identification and study of the species. UK, London: Brill/Backhuys, 1985.
529. Sloan D.B., Havird J.C., Sharbrough J. The on-again, off-again relationship between mitochondrial genomes and species boundaries // *Molecular Ecology* 2017. Vol. 26, № 8. P. 2212–2236.
530. Sloan D.B., Wu Z. Molecular evolution: the perplexing diversity of mitochondrial RNA editing systems // *Current Biology*. 2016. Vol. 26, № 1. P. R22–R24.
531. Soltis D.E., Visger C.J., Marchant D.B., Soltis P.S. Polyploidy: pitfalls and paths to a paradigm // *American Journal of Botany*. 2016. Vol. 103, № 7. P. 1146–1166.
532. Spurgeon D.J., Weeks J.M., Van Gestel C.A.M. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology // *Pedobiologia*. 2003. Vol. 47, № 5–6. P. 588–606.
533. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30, № 9. P. 1312–1313.
534. Stauch G., Gualtieri L. Late Quaternary glaciations in northeastern Russia // *Journal of Quaternary Science*. 2008. Vol. 23, № 6-7. P. 545–558.
535. Steinhauser S., Beckert S., Capesius I., Malek O., Knoop V. Plant mitochondrial RNA editing // *Journal of Molecular Evolution*. 1999. Vol. 48, № 3. P. 303–312.
536. Stille B., Ochman H., Selander R.K. Genetic structure of populations of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* // *Oikos*. 1980. P. 195–201.
537. Storey J.M., Storey K.B. Adaptations of metabolism for freeze tolerance in the gray tree frog, *Hyla versicolor* // *Canadian Journal of Zoology*. 1985. Vol. 63, № 1. P. 49–54.

538. Storey K.B., Storey J.M. Natural freezing survival in animals // *Annu. Rev. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 1996. Vol. 27, № 1. P. 365–386.
539. Storey K.B., Storey J.M. Persistence of freeze tolerance in terrestrially hibernating frogs after spring emergence // *Copeia*. 1987. № 3. P. 720–726.
540. Storey K.B., Storey J.M. Molecular physiology of freeze tolerance in vertebrates // *Physiological Reviews*. 2017. Vol. 97, № 2. P. 623–665.
541. Storey K.B., Storey J.M. Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially-hibernating amphibians // *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 1986. Vol. 83, № 4. P. 613–617.
542. Storey K.B., Storey J.M. Natural freeze tolerance in ectothermic vertebrates // *Annual Review of Physiology*. 1992. Vol. 54, № 1. P. 619–637.
543. Striuchkova A., Malykh I., Potapov M., Kuznetsova N. Sympatry of genetic lineages of *Parisotoma notabilis* sl (Collembola, Isotomidae) in the East European Plain // *Zookeys*. 2022. Vol. 1137. P. 1–15.
544. Svendsen J.I., Alexanderson H., Astakhov V.I., Demidov I., Dowdeswell J.A., Funder S., Gataullin V., Henriksen M., Hjort C., Houmark-Nielsen M. Late Quaternary ice sheet history of northern Eurasia // *Quaternary Science Reviews*. 2004. Vol. 23, № 11–13. P. 1229–1271.
545. Svendsen J.I., Astakhov V.I., Bolshiyakov D.Y.U., Demidov I., Dowdeswell J.A., Gataullin V., Hjort C., Hubberten H.W., Larsen E., Mangerud J.A.N. Maximum extent of the Eurasian ice sheets in the Barents and Kara Sea region during the Weichselian // *Boreas*. 1999. Vol. 28, № 1. P. 234–242.
546. Taheri S., James S., Roy V., Decaëns T., Williams B.W., Anderson F., Rougerie R., Chang C.-H., Brown G., Cunha L. Complex taxonomy of the ‘brush tail’ peregrine earthworm *Pontoscolex corethrurus* // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2018. Vol. 124. P. 60–70.
547. Tamashiro R.A., White N.D., Braun M.J., Faircloth B.C., Braun E.L., Kimball R.T. What are the roles of taxon sampling and model fit in tests of cyto-nuclear

- discordance using avian mitogenomic data? // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2019. Vol. 130. P. 132–142.
548. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // *Molecular Biology and Evolution*. 2007. Vol. 24, № 8. P. 1596–1599.
549. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. // *Molecular Biology and Evolution*. 2011. Vol. 28, № 10. P. 2731–2739.
550. Tamura K., Subramanian S., Kumar S. Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks // *Molecular Biology and Evolution*. 2004. Vol. 21, № 1. P. 36–44.
551. Tao J., Han Q., Zhou H., Diao X. Transcriptomic responses of regenerating earthworms (*Eisenia foetida*) to retinoic acid reveals the role of pluripotency genes // *Chemosphere*. 2019. Vol. 226. P. 47–59.
552. Tarasov P.E., Volkova V.S., Webb T., Guiot J., Andreev A.A., Bezusko L.G., Bezusko T. V, Bykova G. V, Dorofeyuk N.I., Kvavadze E. V, Osipova I.M., Panova N.K., Sevastyanov D. V. Last glacial maximum biomes reconstructed from pollen and plant macrofossil data from northern Eurasia // *Journal of Biogeography*. 2000. Vol. 27, № 3. P. 609–620.
553. Terhivuo J. Morphological and morphometric variation of the parthenogenetic earthworm *Dendrobaena octaedra* (Sav.) (Oligochaeta, Lumbricidae) in eastern Fennoscandia // *Annales Zoologici Fennici*. 1988. P. 303–320.
554. Terhivuo J., Saura A. Allozyme variation in parthenogenetic *Dendrobaena octaedra* (Oligochaeta: Lumbricidae) populations of eastern Fennoscandia. // *Pedobiologia*. 1990. Vol. 34, № 2. P. 113–139.
555. Terhivuo J., Saura A. Clonal and morphological variation in marginal populations of parthenogenetic earthworms *Octolasion tyrtaeum* and *O. cyaneum* (Oligochaeta, Lumbricidae) from eastern Fennoscandia // *Italian Journal of Zoology*. 1993a. Vol. 60, № 1. P. 87–96.



556. Terhivuo J., Saura A. Genic and morphological variation of the parthenogenetic earthworm *Aporrectodea rosea* in southern Finland (Oligochaeta, Lumbricidae) // *Annales Zoologici Fennici*. 1993b. P. 215–224.
557. Terhivuo J., Saura A. Island biogeography of North European parthenogenetic Lumbricidae: I. Clone pool affinities and morphometric differentiation of Åland populations // *Ecography*. 1997. Vol. 20, № 2. P. 185–196.
558. Terhivuo J., Saura A. Low clonal diversity and morphometrics in the parthenogenetic earthworm *Octolasion cyaneum* (Sav.) // *Pedobiologia*. 2003. Vol. 47, № 5–6. P. 434–439.
559. Terhivuo J., Saura A. Dispersal and clonal diversity of North-European parthenogenetic earthworms / In: Hendrix P.F. *Biological Invasions Belowground: Earthworms as Invasive Species*. Netherlands, Dordrecht: Springer. 2006. P. 5–18.
560. Terhivuo J., Saura A. Clone distribution of the earthworm *Eiseniella tetraedra* (Sav.) (Oligochaeta: Lumbricidae) across an altitudinal gradient on subarctic mountains of NW Europe // *Pedobiologia*. 2008. Vol. 51, № 5–6. P. 375–384.
561. Terhivuo J., Lundqvist E., Saura A. Clone diversity of *Eiseniella tetraedra* (Oligochaeta: Lumbricidae) along regulated and free-flowing boreal rivers // *Ecography*. 2002. Vol. 25, № 6. P. 714–720.
562. Terhivuo J., Saura A., Hongell K. Genetic and morphological variation in the parthenogenetic earthworm *Eiseniella tetraedra* (Sav.) (Oligochaeta: Lumbricidae) from South Finland and North Norway // *Pedobiologia*. 1994. Vol. 38, № 1. P. 81–96.
563. Thomas B.C., Pedersen B., Freeling M. Following tetraploidy in an *Arabidopsis* ancestor, genes were removed preferentially from one homeolog leaving clusters enriched in dose-sensitive genes // *Genome Research*. 2006. Vol. 16, № 7. P. 934–946.
564. Thunders M., Cavanagh J., Li Y. De novo transcriptome assembly, functional annotation and differential gene expression analysis of juvenile and adult *E.*

- fetida*, a model oligochaete used in ecotoxicological studies // *Biological Research*. 2017. Vol. 50, № 1. P. 1–5.
565. Tiersch T.R., Chandler R.W., Wachtel S.S., Elias S. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content // *Cytometry*. 1989. Vol. 10, № 6. P. 706–710.
566. Tilikj N., Novo M. How to resist soil desiccation: Transcriptional changes in a Mediterranean earthworm during aestivation // *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 2022. Vol. 264. P. 111112.
567. Tiunov A. V, Hale C.M., Holdsworth A.R., Vsevolodova-Perel T.S. Invasion patterns of Lumbricidae into the previously earthworm-free areas of northeastern Europe and the western Great Lakes region of North America // In: Hendrix P.F. *Biological Invasions Belowground: Earthworms as Invasive Species*. Netherlands, Dordrecht: Springer, 2006. P. 23–34.
568. Tiunov A. V, Scheu S. Microfungal communities in soil, litter and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae): a laboratory experiment // *Applied Soil Ecology*. 2000. Vol. 14, № 1. P. 17–26.
569. Tiunov A. V, Scheu S. Carbon availability controls the growth of detritivores (Lumbricidae) and their effect on nitrogen mineralization // *Oecologia*. 2004. Vol. 138. P. 83–90.
570. Toonen R.J., Puritz J.B., Forsman Z.H., Whitney J.L., Fernandez-Silva I., Andrews K.R., Bird C.E. ezRAD: a simplified method for genomic genotyping in non-model organisms // *PeerJ*. 2013. Vol. 1. P. e203.
571. Toxopeus J., Sinclair B.J. Mechanisms underlying insect freeze tolerance // *Biological Reviews*. 2018. Vol. 93, № 4. P. 1891–1914.
572. Truong H.T., Ramos A.M., Yalcin F., de Ruiter M., van der Poel H.J.A., Huvenaars K.H.J., Hogers R.C.J., van Enckevort L.J.G., Janssen A., van Orsouw N.J. Sequence-based genotyping for marker discovery and co-dominant scoring in germplasm and populations // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 5. P. e37565.

573. Uvarov A. V. Inter-and intraspecific interactions in lumbricid earthworms: their role for earthworm performance and ecosystem functioning // *Pedobiologia*. 2009. Vol. 53, № 1. P. 1–27.
574. Uvarov A. V, Scheu S. Effects of density and temperature regime on respiratory activity of the epigeic earthworm species *Lumbricus rubellus* and *Dendrobaena octaedra* (Lumbricidae) // *European Journal of Soil Biology*. 2004. Vol. 40, № 3–4. P. 163–167.
575. Uvarov A. V, Tiunov A. V, Scheu S. Effects of seasonal and diurnal temperature fluctuations on population dynamics of two epigeic earthworm species in forest soil // *Soil Biology and Biochemistry*. 2011. Vol. 43, № 3. P. 559–570.
576. Van Orsouw N.J., Hogers R.C.J., Janssen A., Yalcin F., Snoeijers S., Verstege E., Schneiders H., van der Poel H., Van Oeveren J., Verstegen H. Complexity reduction of polymorphic sequences (CRoPSTM): a novel approach for large-scale polymorphism discovery in complex genomes // *PLoS One*. 2007. Vol. 2, № 11. P. e1172.
577. Van Praagh B. The biology and conservation of the giant Gippsland earthworm *Megascolides australis* McCoy, 1878 // *Soil Biology and Biochemistry*. 1992. Vol. 24, № 12. P. 1363–1367.
578. Van Praagh B.D., Hinkley S.D. Survey of the giant gippsland earthworm, *Megascolides australis* in areas potentially affected by a realignment of the South Gippsland Highway – Bena to Korumburra // *Scientific Reports*. 2002. Vol. 4. P. 1–4.
579. Van Tassell C.P., Smith T.P.L., Matukumalli L.K., Taylor J.F., Schnabel R.D., Lawley C.T., Haudenschild C.D., Moore S.S., Warren W.C., Sonstegard T.S. SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries // *Nature Methods*. 2008. Vol. 5, № 3. P. 247–252.
580. Vedovini A. Systematique, caryologie et ecologie des Oligochètes Terrestres de la région Provençale. University Provence, 1973.
581. Viktorov A.G. Diversity of polyploid races in the family Lumbricidae // *Soil Biology and Biochemistry*. 1997. Vol. 29, № 3–4. P. 217–221.

582. Vlasenko R.P., Mezhzherin S. V., Garbar A. V., Kotsuba Y. Polyploid races, genetic structure and morphological features of earthworm *Aporrectodea rosea* (Savigny, 1826) (Oligochaeta, Lumbricidae) in Ukraine // Comparative Cytogenetics. 2011. Vol. 5, № 2. P. 91–103.
583. Voigtländer K., Iorio E., Decker P., Spelda J. The subgenus *Monotarsobius* in the Iberian Peninsula with a description of a new pseudo-cryptic species from Northern Spain revealed by an integrative revision of *Lithobius crassipes* L. Koch, 1862 (Chilopoda, Lithobiomorpha, Lithobiidae) // Zookeys. 2017. № 681. P. 1–38.
584. Voituron Y., Barré H., Ramløv H., Douady C.J. Freeze tolerance evolution among anurans: Frequency and timing of appearance // Cryobiology. 2009a. Vol. 58, № 3. P. 241–247.
585. Voituron Y., Paaschburg L., Holmstrup M., Barré H., Ramløv H. Survival and metabolism of *Rana arvalis* during freezing // Journal of Comparative Physiology B. 2009b. Vol. 179, № 2. P. 223–230.
586. Wang S., Meyer E., McKay J.K., Matz M. V. 2b-RAD: a simple and flexible method for genome-wide genotyping // Nature Methods. 2012. Vol. 9, № 8. P. 808–810.
587. Wang Y., Pedersen M.W., Alsos I.G., De Sanctis B., Racimo F., Prohaska A., Coissac E., Owens H.L., Merkel M.K.F., Fernandez-Guerra A. Late Quaternary dynamics of Arctic biota from ancient environmental genomics // Nature. 2021. Vol. 600, № 7887. P. 86–92.
588. Wang Z., Gerstein M., Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics // Nature Reviews Genetics. 2009. Vol. 10, № 1. P. 57–63.
589. Weider L.J., Hobaek A. Phylogeography and arctic biodiversity: a review // Annales Zoologici Fennici. 2000. P. 217–231.
590. Weigert A., Golombek A., Gerth M., Schwarz F., Struck T.H., Bleidorn C. Evolution of mitochondrial gene order in Annelida // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2016. Vol. 94. P. 196–206.

591. Weljie A.M., Newton J., Mercier P., Carlson E., Slupsky C.M. Targeted profiling: quantitative analysis of  $^1\text{H}$  NMR metabolomics data // *Analytical Chemistry*. 2006. Vol. 78, № 13. P. 4430–4442.
592. Wen J., Egan A.N., Dikow R.B., Zimmer E.A. Utility of transcriptome sequencing for phylogenetic inference and character evolution / In: Hörandl E., Appelhans M.S. *Next-Generation Sequencing in Plant Systematics*, 2015.
593. Wendler N., Mascher M., Nöh C., Himmelbach A., Scholz U., Ruge-Wehling B., Stein N. Unlocking the secondary gene-pool of barley with next-generation sequencing // *Plant Biotechnology Journal*. 2014. Vol. 12, № 8. P. 1122–1131.
594. Wesener T., Voigtländer K., Decker P., Oeyen J.P., Spelda J. Barcoding of Central European *Cryptops* centipedes reveals large interspecific distances with ghost lineages and new species records from Germany and Austria (Chilopoda, Scolopendromorpha) // *Zookeys*. 2016. Vol. 564, № 564. P. 21–46.
595. Wesener T., Voigtländer K., Decker P., Oeyen J.P., Spelda J., Lindner N. First results of the German Barcode of Life (GBOL) – Myriapoda project: Cryptic lineages in German *Stenotaenia linearis* (Koch, 1835) (Chilopoda, Geophilomorpha) // *Zookeys*. 2015. Vol. 510, № 510. P. 15–29.
596. Westergaard K.B., Alsos I.G., Popp M., Engelskjøn T., Flatberg K.I., Brochmann C. Glacial survival may matter after all: nunatak signatures in the rare European populations of two west-arctic species // *Molecular Ecology* 2011. Vol. 20, № 2. P. 376–393.
597. Willerslev E., Davison J., Moora M., Zobel M., Coissac E., Edwards M.E., Lorenzen E.D., Vestergård M., Gussarova G., Haile J. Fifty thousand years of Arctic vegetation and megafaunal diet // *Nature*. 2014. Vol. 506, № 7486. P. 47–51.
598. Wishart D.S. Quantitative metabolomics using NMR // *Trends in Analytical Chemistry*. 2008. Vol. 27, № 3. P. 228–237.
599. Yang Y., Sun Y., Zhang N., Li J., Zhang C., Duan X., Ding Y., Zhao R., Zheng Z., Geng D. The up-regulation of two identified wound healing specific proteins-

- HSP70 and lysozyme in regenerated *Eisenia fetida* through transcriptome analysis // Journal of Ethnopharmacology. 2019. Vol. 237. P. 64–73.
600. Yin Y., Yao L., Hu Y., Shao Z., Hong X., Hebert P.D.N., Xue X. DNA barcoding uncovers cryptic diversity in minute herbivorous mites (Acari, Eriophyoidea) // Molecular Ecology Resources. 2022. Vol. 22, № 5. P. 1986–1998.
601. Yoshino H., Kubota K. Phylogeographic analysis of *Ligidium japonicum* (Isopoda: Ligiidae) and its allied species reveals high biodiversity and genetic differentiation in the Kanto region, Japan // Entomological Science. 2022. Vol. 25, № 2. P. e12501.
602. Young M.R., Proctor H.C., Dewaard J.R., Hebert P.D.N. DNA barcodes expose unexpected diversity in Canadian mites // Molecular Ecology. 2019. Vol. 28, № 24. P. 5347–5359.
603. Yu Y., Blair C., He X. RASP 4: Ancestral state reconstruction tool for multiple genes and characters // Molecular Biology and Evolution. / ed. Yoder A. 2020. Vol. 37, № 2. P. 604–606.
604. Yu Y., Harris A.J., Blair C., He X. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): A tool for historical biogeography // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2015. Vol. 87. P. 46–49.
605. Yuan Z., Jiang J., Dong Y., Zhao Q., Gao X., Qiu J. The dispersal and diversification of earthworms (Annelida: Oligochaeta) related to paleogeographical events in the Hengduan Mountains // European Journal of Soil Biology 2019. Vol. 94. P. 103118.
606. Yuan Z., Jiang J., Dong Y., Zhao Q., Sun J., Qiu J. Unearthing the genetic divergence and gene flow of the earthworm *Amyntas* YN2017 sp. (Oligochaeta: Megascolecidae) populations based on restriction site-associated DNA sequencing // European Journal of Soil Biology. 2020. Vol. 99. P. 103210.
607. Yurkov A.M., Chernov I.Y., Tiunov A. V. Influence of *Lumbricus terrestris* earthworms on the structure of the yeast community of forest litter // Microbiology. 2008. Vol. 77. P. 107–111.

608. Zenkova I. V., Rapoport I.B. Species richness and high altitude distribution of earthworms in the Khibiny Massive (Murmansk Region) / In: Pavlíček T. Advances in Earthworm Taxonomy VI (Annelida: Oligochaeta). Germany, Heidelberg: Kasperek Verlag, 2013. P. 141–151.
609. Zhang D.-X., Hewitt G.M. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies // Biochemical Systematics and Ecology. 1997. Vol. 25, № 2. P. 99–120.
610. Zhang L., Sechi P., Yuan M., Jiang J., Dong Y., Qiu J. Fifteen new earthworm mitogenomes shed new light on phylogeny within the *Pheretima* complex // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. P. 20096.
611. Zhang L., Ji F., Li M., Cui Y., Wu B. Short-term effects of Dechlorane Plus on the earthworm *Eisenia fetida* determined by a systems biology approach // Journal of Hazardous Materials. 2014. Vol. 273. P. 239–246.
612. Zhang B., Chen T.-W., Mateos E., Scheu S., Schaefer I. Cryptic species in *Lepidocyrtus lanuginosus* (Collembola: Entomobryidae) are sorted by habitat type // Pedobiologia. 2018. Vol. 68. P. 12–19.
613. Zhang Y.F., Ganin G.N., Atopkin D.M., Wu D.H. Earthworm *Drawida* (Moniligastridae) Molecular phylogeny and diversity in Far East Russia and Northeast China // European Zoological Journal. 2020. Vol. 87, № 1. P. 180–191.
614. Zhao J., Duan G., Zhu Y., Zhu D. Gut microbiota and transcriptome response of earthworms (*Metaphire guillelmi*) to polymyxin B exposure // Journal of Environmental Science. 2022. In press.
615. Zhong M., Struck T.H., Halanych K.M. Phylogenetic information from three mitochondrial genomes of Terebelliformia (Annelida) worms and duplication of the methionine tRNA // Gene. 2008. Vol. 416, № 1–2. P. 11–21.
616. Zicsi A. *Eiseniella koreana*, eine neue Regenwurm-Art (Oligochaeta: Lumbricidae) aus Korea // Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici. 1972. Vol. 64. P. 129–132.

617. Zuckerkandl E., Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history // Journal of Theoretical Biology. 1965. Vol. 8, № 2. P. 357–366.