# ШЕХОВЦОВ

Сергей Викторович

# ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ РОССИИ И ЕЕ ОТРАЖЕНИЕ В МОРФОЛОГИИ, ФИЛОГЕНИИ И ФИЛОГЕОГРАФИИ

1.5.12. – зоология

1.5.7. – генетика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук

Москва

2023

Работа выполнена в лаборатории молекулярных биотехнологий ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Научный консультант: Берман Даниил Иосифович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биоценологии ФГБУН Институт биологических проблем Севера ДВО РАН.

Официальные оппоненты:

Болотов Иван Николаевич доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, директор ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики академика Н.П. Лаверова Уральского отделения РАН. Кузнецова Наталия Александровна доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры зоологии и экологии Института биологии и химии Московского пелагогического государственного университета. Политов Дмитрий Владиславович доктор биологических наук, заведующий лабораторией популяционной генетики ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Ведущая организация: ФГБУН Институт экологии растений и животных УрО РАН (г. Екатеринбург).

Защита состоится « » 2023 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.109.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук (ИПЭЭ РАН) по адресу: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33. Тел/факс: +7(495)952-73-24, e-mail: <a href="mailto:admin@sevin.ru">admin@sevin.ru</a>

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук Российской академии наук по адресу: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, на сайте ФГБУН ИПЭЭ РАН по адресу: http://www.sev-in.ru и на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации по адресу: vak.minobrnauki.gov.ru

Автореферат разослан «	 2023 г

Ученый секретарь диссертационного совета к.б.н.

Е.А. Кацман

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, и, следовательно, в большой степени определяют продуктивность экосистемы. Во многих ландшафтах дождевые черви имеют наибольшую среди почвенной фауны биомассу, по которой можно оценить степень их влияния на экосистему. Однако, несмотря на выдающуюся экологическую роль, биоразнообразие дождевых червей до сих пор сравнительно мало изучено.

Общее число видов дождевых червей оценивают приблизительно 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.

Несмотря на ограниченной объем фауны, в систематике дождевых червей России есть принципиальные методологические пробелы. Причина этого — относительно малое число диагностических морфологических признаков, которые включают размеры, форму и окраску тела, количество сегментов, строение головной лопасти, число и локализацию 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 [Piearce 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. Такое положение приводит к тому, что на практике

не всегда просто идентифицировать некоторые внешне сходные виды дождевых червей, иногда – даже представителей разных родов.

Небольшое число таксономических признаков сопряжено с «проблемой вида» у дождевых червей. Использование биологической концепции у них 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 решение описанной проблемы весомый вклад могут внести молекулярно-генетические методы. Последовательности ДНК представляют собой хорошую основу для выяснения филогенетических отношений между группами любого уровня. Они могут использоваться вне зависимости от морфологических признаков. Не случайно основным методом реконструкции филогенетических отношений в последние годы стал молекулярно-генетический анализ, значительно потеснив традиционный анализ морфологических И признаков. Применимость ДНК-анализа была анатомических 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]. У дождевых червей по сравнению с названными группами есть определенные преимущества: большинство видов (за исключением т.н. перегринных, т.е. способных к пассивному перемещению на большие расстояния) имеют слабую способность к миграции, в связи с чем результаты анализа не осложняются эффектами вторичного расселения.

Для настоящей работы была выбрана группа видов дождевых червей, охватывающая возможные варианты способности к расселению (перегринные/оседлые), а среди последних – виды обитающие в различных регионах России.

Главной моделью для изучения генетического разнообразия дождевых червей в нашей работе стал *Eisenia nordenskioldi* — комплекс видов, имеющих в России крайне широкое распространение и обитающих в самых разных экологических условиях [Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997; Всеволодова-Перель, Лейрих, 2014]. Различными методами была исследована его филогения и филогеография, выделены несколько филогенетических линий, установлен диапазон размера ядерных геномов у разных 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, 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 работе проанализирован ряд видов дождевых червей, относящихся к разным родам и даже семействам, и образующих широкий диапазон размеров и локализации ареалов. На их примере мы попытались выявить общие закономерности и особенности изменчивости в этой группе.

Разработанность темы диссертации. Методологические подходы применения молекулярно-генетических методов ДЛЯ изучения изменчивости дождевых червей разрабатывались в основном европейскими учеными. В начале 2000-х годов появляются первые работы, 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 King с соавт. [King et al., 2008] впервые показали, 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] подтвердило полученные результаты. Филогенетические линии также выявлены в других группах почвенной фауны, таких, как энхитреиды [Schmelz et al., 2017], многоножки [Edgecombe, Giribet, 2019], коллемболы [Striuchkova et al., 2022], почвенные нематоды [Olson, 2015; Clavero-Camacho et al., 2022; Hosseinvand et al., 2022], орибатидные клещи [Schäffer et al.,

2010; Young et al., 2019; Yin et al., 2022], изоподы [Hutchins, Drukker, 2016; Yoshino, Kubota, 2022], стафилиниды [Pérez-Delgado et al., 2022]. 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 филогенетическими линиями, и существует ли репродуктивная изоляция.

В России к началу нашей работы существовали лишь единичные исследования, посвящённые изучению генетического разнообразия дождевых червей, которые были выполнены Б. Р. Стригановой и коллегами [Шепелева с соавт., 2008, 2010].

**Цели и задачи исследования.** Целью работы было изучение генетической изменчивости модельных видов дождевых червей, обладающих разными возможностями расселения и обитающих в разных регионах, на примере которых можно охарактеризовать значительную часть видов фауны России.

Были поставлены следующие задачи:

- 1) Провести филогенетический анализ ряда оседлых видов, обитающих в разных регионах России и выделяющихся значительной морфологической изменчивостью: *Eisenia nordenskioldi*, *Dendrobaena schmidti*, *Drawida ghilarovi*.
- 2) Детально изучить филогеографию вида *E. nordenskioldi*, имеющего среди оседлых видов наибольший ареал и адаптированного к наиболее широкому спектру условий среды.
- 3) Исследовать филогеографию перегринных 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 schmidti, 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 перегринных видов дождевых червей, имеющих широкое распространение 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*, *Drawida 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 и для линий *D. schmidti*. 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 перегринных 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*.

Практическая значимость работы лежит в плоскости экологических и экотоксикологических исследований, многие из которых проводятся на дождевых червях [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 можно предполагать 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. Для определения генетической принадлежности особей, а также для построения филогенетических деревьев и изучения филогеографии осуществляли амплификацию целевых генов путем ПЦР и секвенирование методом Сэнгера. 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 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 <sup>1</sup>Н ядерного магнитного резонанса [Weljie et al., 2006; Wishart, 2008].

### Основные положения, выносимые на защиту:

- 1) Для дождевых червей фауны России 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 перегринным 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 перегринных 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. 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 г.), 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 г.), 19-ом Всероссийском совещании по почвенной зоологии (г. Улан-Удэ, 2022 г.).

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 холодостойкости, Выводы.

**Публикации.** 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.

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 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. Центаловичем 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 многие молекулярногенетических 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. Бородина, 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. Костериным, 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.

# ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Представлен реферат литературы по фауне дождевых червей России и сопредельных территорий, включающий информацию о количестве видов и их ареалах (1.1), об основных морфологических признаках, использующихся в систематике группы, и их применимости для разграничения видов (1.2). Подробно рассмотрено использование молекулярно-генетических методов для изучения различных аспектов изменчивости дождевых червей (1.3). Проанализированы имеющиеся данные по морфологической и генетической изменчивости дождевых червей, встречающихся в России и рассмотренных в данной работе (1.4.1 – 1.4.9). Приведен обзор исследований по холодоустойчивости дождевых червей (1.5.1) и ее биохимическим основам (1.5.2). Для основных видов составлены карты распространения.

# Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Описаны методики выделения ДНК (2.1) и РНК (2.2), условия проведения полимеразной цепной реакции (2.3), анализ NGS: секвенирование транскриптомов (2.4) и метод RADSeq (2.5). Приведены сведения об электрофорезе нуклеиновых кислот (2.6), подготовке компетентных

клеток  $E.\ coli\ (2.7)$ , трансформации  $E.\ coli\ плазмидной ДНК (2.8), селекции колоний <math>E.\ coli$ , содержащих нужные встройки (2.9), и элюции ДНК из геля (2.10). Дана методика определения размера ядерных геномов (2.11) и анализа метаболитов при применении  $^1$ H ЯМР (2.12). Описаны все использованные биоинформатические методики, указаны программы и сайты (2.13).

#### Глава 3. EISENIA NORDENSKIOLDI

*Еізепіа погдепѕкіоіді* – вид с обширным ареалом, включающим Азиатскую Россию (вплоть до берегов Северного Ледовитого океана), Урал и большую часть Восточно-Европейской равнины, значительную часть севера Казахстана, Монголии, Китая, а также Корею. Все авторы, изучавшие данный вид, отмечали его большую морфологическую изменчивость. В России принята точка зрения Т.С. Всеволодовой-Перель [1997], согласно которой существуют два симпатричных на большей части их ареалов подвида: пигментированный *Е. п. nordenskioldi* (Eisen, 1879) и непигментированный *Е. п. pallida* Malevič, 1956, симпатричные на большей части их ареалов. Кроме того, по морфологии близки к *Е. п. nordenskioldi* виды *Е. atlavinyteae* Perel et Graphodatsky 1984 и *Е. sibirica* Perel et Graphodatsky, 1984 [Перель, Графодатский, 1984]. Западные же исследователи в пределах *Е. nordenskioldi* выделяют до девяти подвидов [Вlакетоге, 2013]. Принимая во внимание вышесказанное, мы ожидали обнаружить у *Е. nordenskioldi* высокую генетическую изменчивость.

Открытие филогенетических линий у *E. n. nordenskioldi*. В 2007–2011 гг. была собрана коллекция из 97 особей из 10 популяций *E. nordenskioldi*. В качестве внешних групп также взяты образцы E. fetida, Aporrectodea rosea, Dendrodrilus rubidus subrubicundus, Lumbricus rubellus и Octolasion tyrtaeum. Из каждого образца выделена тотальная ДНК, получены последовательности митохондриального гена cox1 и ядерного рибосомального спейсера 2 (ITS2). На филогенетических деревьях, построенных по гену cox I, образцы E. n. nordenskioldi разделились на шесть филогенетических линий, которым были присвоены номера 1-6, в дальнейшем вновь обнаруживаемым линиями присваивали следующие порядковые номера (на данный момент их выделено уже более 9). Каждая из линий имела высокую бутстрепную поддержку и байесовскую апостериорную вероятность. Нуклеотидные дистанции между линиями составили 13,6–18,4%, что близко к расстояниям между этими линиями и видами – внешними группами из других родов. Предварительный анализ филогеографии показал, что в пределах каждой из линий наблюдаются значительные генетические различия между отдаленными популяциями. Анализ изменчивости ядерных последовательностей ITS2 выявил те же 6 линий. Таким образом, впервые показано, что E. n. nordenskioldi подразделяется, как минимум, на шесть филогенетических линий, которые, судя по степени нуклеотидных различий, могут быть видами-двойниками. Другим важным результатом стало выявление филогеографических паттернов в пределах одной линии. Была

сделана попытка реконструировать время дивергенции между линиями при помощи метода молекулярных часов, используя оценку скорости нуклеотидных замен в 3,5% на миллион лет [Chang, Chen, 2005]. По результатам анализа, расхождение предкового таксона на современные филогенетические линии *E. nordenskioldi* происходило со среднего плиоцена до среднего плейстоцена (3,3 – 1,4 млн. лет назад). Следует отметить, что полученные оценки следует считать приблизительными из-за сложности калибровки молекулярных часов у этой группы, не оставляющей ископаемых остатков, однако верными по порядку величины. Таким образом, предположения о существовании у пигментированной формы *E. nordenskioldi* филогенетических линий полностью подтвердились.

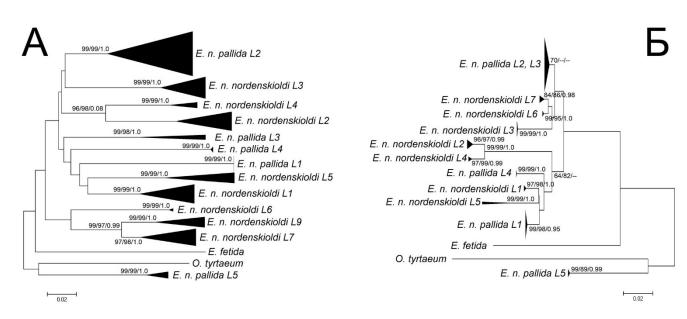


Рисунок 1 Филогенетические деревья, построенные методом минимальной эволюции для последовательностей cox1 (A) и ITS2 (Б). Последовательности, относящиеся к одной линии, показаны в виде треугольников. Числа обозначают бутстрепную поддержку методов минимальной эволюции / максимального правдоподобия / байесовскую апостериорную вероятность.

Филогенетические линии у *Е. п. pallida*. Аналогичная работа с целью поиска филогенетических линий была проведена у непигментированного подвида *Е. п. pallida* при помощи той же методики, что и для номинативного подвида. Последовательности в выборке *Е. п. pallida* (99 образцов из 18 точек) разделились на пять основных ветвей (филогенетических линий), каждая из которых имела свой ареал (Рис. 1). Линия 1 выделялась на фоне прочих линий наличием лишь одного гаплотипа митохондриального гена *cox1*, несмотря на обширный ареал, включающий в себя всю Сибирь. Одно из возможных объяснений этого феномена – быстрое расселение, возможно, при помощи человека. Филогенетические линии 2 и 3 найдены на юге Дальнего Востока в горах Сихотэ-Алиня и на прилегающих равнинах. Линия 4 на данный момент обнаружена только вблизи г. Олёкминск (Республика Саха). Образцы филогенетической линии

5 собраны в центральном и восточном Казахстане; судя по данным генетического анализа, они представляют собой одну из линий вида  $A.\ rosea$ , который имеет близкий диагноз (Рис. 1). Важным результатом работы стали свидетельства в пользу немонофилетичности как  $E.\ n.\ nordenskioldi$ , так и  $E.\ n.\ pallida$ .

Таким образом, существование филогенетических линий было показано и для непигментированной формы *E. nordenskioldi*. Суммарно мы выявили более 9 линий для пигментированной формы и 6 – для формы *pallida*. Эти линии имеют различные ареалы (Рис. 2 – 4).

**Филогеография отдельных линий** *E. n. nordenskioldi.* Для двух филогенетических линий пигментированной формы *E. nordenskioldi* (7-й и 9-й) был проведен детальный анализ филогеографии.

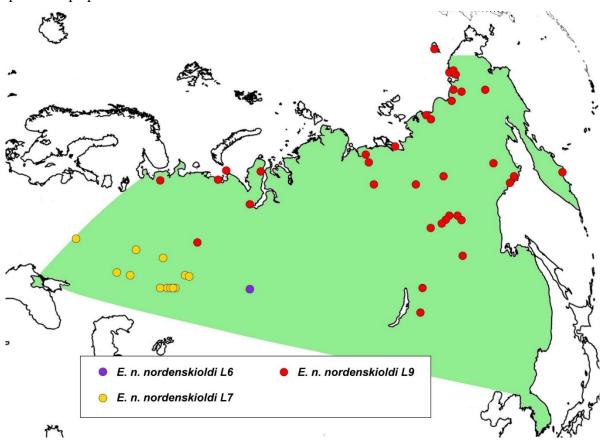


Рисунок 2. Точки, в которых обнаружены линии 6, 7 и 9 пигментированной формы E. *nordenskioldi*. Зеленым цветом закрашен ареал вида.

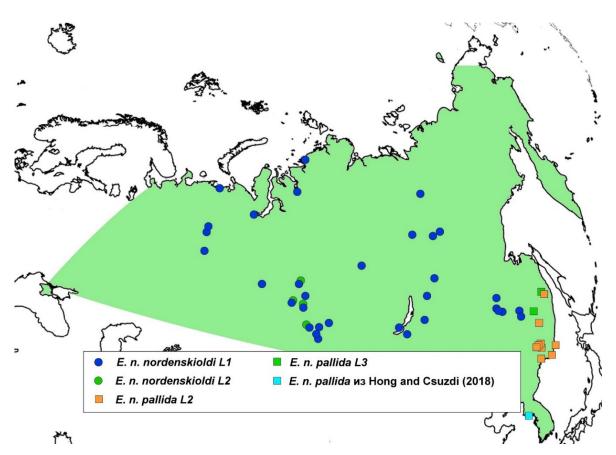


Рисунок 3. Точки, в которых обнаружены линии 1 и 2 пигментированной формы *E. nordenskioldi* и линии 2 и 3 непигментированной формы. Также представлены данные зарубежных исследователей.

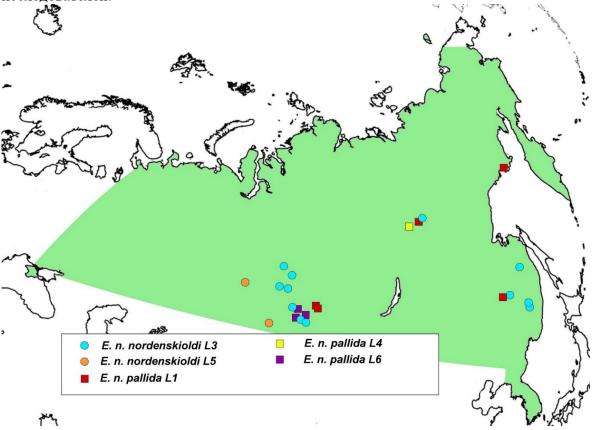


Рисунок 4. Точки, в которых обнаружены линии 3 и 5 пигментированной формы  $E.\ nordenskioldi$  и линии 1,4 и 6 непигментированной формы.

**Линия 7.** Выборка особей *E. nordenskioldi* с Урала и Восточно-Европейской равнины, включала в себя 61 образец из 12 точек (Рис. 5). Было выявлено несколько групп, самая географически обширная из них включала в себя все образцы с Восточно-Европейской равнины, а также из двух точек с западного склона Южного Урала. Было показано, что популяции вида с Восточно-Европейской равнины сравнительно недавно распространились в этот регион с Урала.

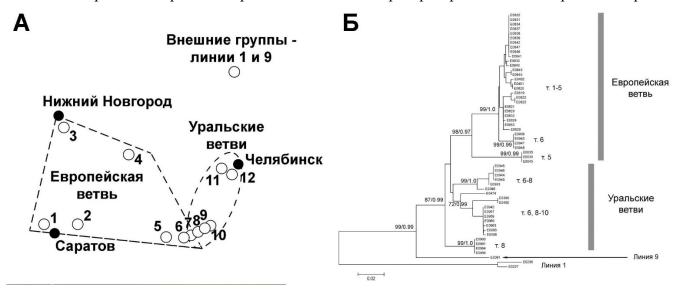


Рисунок 5. А: точки сбора образцов линии 7 E. n. nordenskioldi. Б: филогенетическое дерево, построенное по последовательностям cox1. Видно базальное положение уральских ветвей линии 7.

Линия 9. Для образцов линии 9 пигментированной формы *E. nordenskioldi* из Северной Азии была получена 331 последовательность *cox1*, а также 41 последовательность для линии 1 и 7 – для линии 3 данной формы (Рис. 6). На филогенетическом дереве были выявлены ветви, соответствующие всем трем обнаруженным генетическим линиям *E. n. nordenskioldi* (Рис. 7). В пределах линии 9 у основания дерева оказалась самая южная точка из Якутии (т. 17), другие базальные ветви также были относились к образцам из этого региона. Гаплотипы популяций из некоторых регионов обособились в отдельные клады. Так, примерно треть всей выборки образовывали ветвь, в которую вошли образцы из Якутии (показана красным цветом на Рис. 7). Гаплотипы из прибрежных (Тауйская губа) и континентальных (бассейн Колымы) популяций Магаданской области, Западной Сибири, побережья Восточно-Сибирского моря и с Камчатки образовывали по отдельной кладе на деревьях. Генетические различия между этими кладами были значительными, о чем свидетельствовали высокие значения попарных коэффициентов Fst. Анализ молекулярных часов показал, что описанные группы гаплотипов 9-ой линии из разных регионов дивергировали в нижнем и среднем плейстоцене.

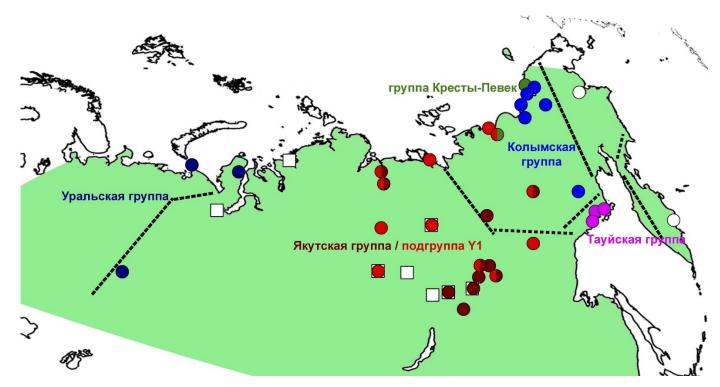


Рисунок 6. Карта находок образцов линии 9 пигментированной формы *E. nordenskioldi*. Пунктиром обозначены основные горные системы. Кружки обозначают линию 9, квадраты – другие линии. Различные генетические группы обозначены разными цветами (см. рис. 7).

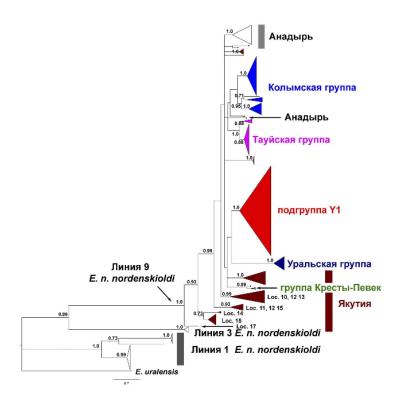


Рисунок 7. Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям cox1 образцов филогенетической линии 9 пигментированной формы E. nordenskioldi методом байесовского анализа. Цифры возле ветвей обозначают байесовские апостериорные вероятности. Отдельные клады обозначены в виде треугольников. Номера точек соответствуют рис. 6.

Считается, что во время максимума последнего оледенения север Европы и Северной Америки был покрыт ледниковыми щитами, что привело к «стиранию» всей биоты. В то же время полагают, что на севере Азии сплошного ледникового щита не существовало, а были лишь локальные оледенения. При этом происходила смена сообществ с тундровых и бореальных на тундростепные и обратно. Судя по нашим данным, многие локальные популяции линии 9 смогли успешно пережить эти изменения. Большие генетические расстояния между популяциями восточной части ареала свидетельствуют о том, что никаких катастрофичных событий (по отношению к адаптивным возможностям червей) за последний миллион лет на указанной территории не происходило. Таким образом, отдельные линии *E. nordenskioldi* имеют сложную филогеографическую структуру, на основе которой можно реконструировать их историю расселения.

 $\boldsymbol{E}$ . nordenskioldi Филогения комплекса ПО ланным послеловательностей митохондриальных геномов. Для ряда филогенетических линий E. nordenskioldi были получены наборы транскриптомных данных (см. ниже). Из них были извлечены митохондриальные последовательности и проведена сборка митохондриальных геномов. Проверку правильности последовательностей и закрытие гэпов осуществляли при помощи ПЦР. В связи со сложностью амплификации и сборки контрольного района, было невозможно реконструировать контрольные районы мтДНК, а также части двух фланкирующих генов тРНК. Таким образом, анализируемая часть митохондриального генома включала в себя все 13 белоккодирующих генов, 2 гена рибосомальной РНК, и 20 из 22 генов тРНК (без тРНК-Арг и тРНК-Гис). Всего получены последовательности мтДНК для представителей 8 филогенетических линий E. nordenskioldi: шести – пигментированной формы и двух – непигментированной. Кроме того, были собраны митохондриальные геномы трех видов рода Eisenia, которые использовались в качестве внешних групп: E. spelaea, E. balatonica и E. tracta. Чтобы выявить возможные различия между компонентами генома, были извлечены несколько наборов данных, включающих в разных комбинациях белок-кодирующие гены, гены рРНК и тРНК и межгенные спейсеры. Самым медленно эволюционирующим геном оказался cox1, в то время как atp8 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%. Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень генетических различий между филогенетическими линиями E. nordenskioldi незначительно меньше такового между разными видами и даже родами люмбрицид.

По данным филогенетического анализа род *Eisenia* оказался монофилетичным. *E. balatonica* был сестринской группой клады, объединяющей *E. nordenskioldi* и *E. tracta*. 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* оказался сестринской группой *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 номинативного подвида и *E. n. pallida*. Полученные филогенетические данные подтвердили точку зрения, высказанную выше: подвиды *E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida* оказались полифилетичными.

**E**. Филогения nordenskioldi, реконструируемая комплекса основании **транскриптомных данных.** Для оценки работы метода была использована платформа IonTorrent для секвенирования транскриптомов пяти образцов E. n. nordenskioldi. Для каждого образца было получено 0,75-1 миллионов ридов и 26,230-41,886 транскриптов, предсказано 11937-18498 уникальных белков. Финальный набор генов, полученный при помощи двух разных филогенетических программ (HaMStR и ProteinOrtho), составлял 203 и 809 генов (аминокислотные выравнивания содержали 28165 и 130935 а.к., соответственно). Филогенетические деревья, построенные по аминокислотным и нуклеотидным наборам данных, полученных при помощи разных программ, имели идентичную топологию. E. n. nordenskioldi оказался монофилетичным по отношению к E. andrei и L. rubellus. Среднее количество аминокислотных замен для конкатенированного набора данных HaMStR между линиями Е. п. nordenskioldi составляло 1,73%; между Е. n. nordenskioldi и Е. andrei – 3,06%; Е. n. nordenskioldi и L. rubellus – 4,50%. Для набора ProteinOrtho значения были несколько выше: 2,60%, 4,75% и 6,87%, соответственно. Различия по нуклеотидным последовательностям, как и ожидалось, были выше: для набора генов ProteinOrtho, соответственно, 4,02%, 7,63% и 9,96%.

В ходе вышеописанного предварительного исследования было показано, что секвенирование транскриптомов представляет более выгодный путь получения мультигенных наборов данных по сравнению с традиционными ПЦР и секвенированием по Сэнгеру. Большинство белковых последовательностей оказались идентичными или различались не более чем 1% замен во всех исследуемых образцах. 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.

Данную работу продолжили на расширенной выборке, просеквенировав транскриптомы девяти образцов пигментированной формы *E. nordenskioldi* и трёх — непигментированной, относящихся к разным филогенетическим линиям, а также пяти внешних групп — различных видов рода *Eisenia*. Было создано два набора данных, содержащие 287 и 227 генов, соответственно. На филогенетических деревьях (Рис. 8) исследованные образцы 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* оказался сестринским видом *E. nordenskioldi*. *E. nordenskioldi* разделился на две группы: в одну из них входили филогенетические линии 6, 7 и 9 *E. n. nordenskioldi*, во вторую – все остальные линии, включая все линии формы *pallida*. Филогенетические отношения в пределах второй группы не были разрешены. Во всех случаях родственными оказывались линии 1 *E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida*; линия 3 *E. n. nordenskioldi* и линия 6 *E. n. pallida*; линии 2 и 5 *E. n. nordenskioldi*. Полученные данные позволили окончательно разрешить несколько важных вопросов: в то время как на некоторых деревьях, построенных на основе митохондриальных геномов, *E. nordenskioldi* оказывался полифилетичным, филогеномные наборы данных однозначно указывают на монофилию комплекса. В то же время было доказано, что ни *E. n. nordenskioldi*, ни *E. n. pallida* не монофилетичны. В целом, полученные данные показывают глубокие генетические различия между филогенетическими линиями комплекса *E. nordenskioldi* как в митохондриальном, так и в ядерном геноме.

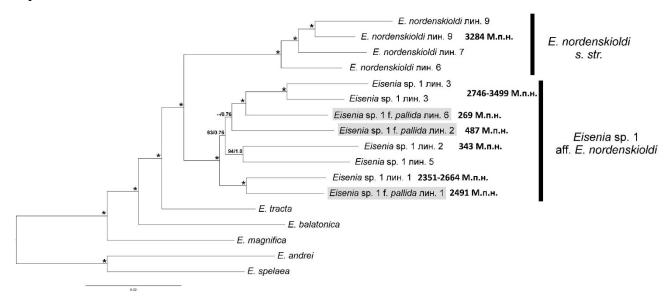


Рисунок 8. Филогенетическое дерево, построенное для комплекса *E. nordenskioldi* на основе транскриптомных данных, с оценками размеров ядерных геномов отдельных линий. Серыми прямоугольниками показана форма *pallida*. Цифры возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку метода максимального правдоподобия / байесовскую апостериорную вероятность; звёздочки означают поддержку 100/1.0.

**Изменчивость размеров ядерного генома у** *E. nordenskioldi*. Для образцов из ряда популяций *E. nordenskioldi* с Урала, Сибири и Дальнего Востока был проведен анализ размера ядерного генома (Рис. 8). Показано, 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. Таким образом, было показано, что между линиями комплекса *E. nordenskioldi* существуют значительные различия не только на уровне последовательностей генов (количества замен), но и на уровне строения геномов, связанные, скорее всего, с различиями в числе хромосом (см. ниже). Интересно, что одна из линий формы *pallida*, которая, как считалось [Всеволодова-Перель, Лейрих, 2014], диплоидна, имела большой размер генома.

Кроме того, 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, приблизительно 13% и 27%, соответственно. Известно [Viktorov et al., 1997; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008], что у октоплоидных популяций *E. nordenskioldi* число хромосом может варьировать в относительно широких пределах. В данном случае можно было бы предполагать существование сходного механизма.

**Хромосомная изменчивость** Для комплекса *E. nordenskioldi* характерна большая кариотипическая изменчивость [Графодатский с соавт., 1982; Перель, Графодатский, 1983; Булатова с соавт., 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 сопоставление можно провести по опубликованным данным для разных популяций *E. nordenskioldi*. Кроме того, в ряде случаев оказалось возможным соотнести плоидность популяции и ее принадлежность к определенной филогенетической линии. Мы просуммировали полученные данные на рис. 9, 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.

Сестринский вид комплекса *E. nordenskioldi*, *E. tracta*, имеет 36 хромосом, как и родственный им обоим вид *E. balatonica*. 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 Малининой и 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. Викторов [Viktorov, 1997] отнес к партеногенетикам только форму *acystis* из Средней Азии, которая была выделена в отдельный вид; все остальные популяции *E. nordenskioldi*, изученные Викторовым, 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, в комплексе *E. nordenskioldi* число хромосом крайне вариабельно даже в пределах линий: некоторые линии объединяют в себе представителей разных хромосомных рас, а полиплоидия не ведет к утрате амфимиксиса.

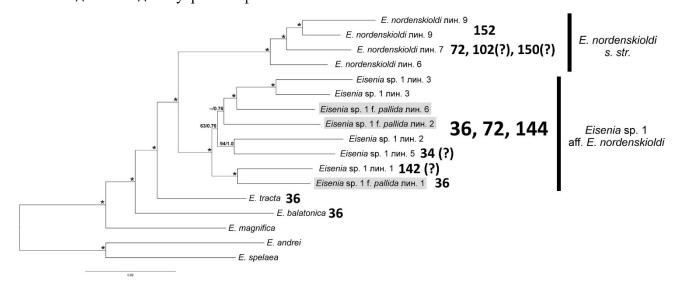


Рисунок 9. Положение хромосомных рас E. nordenskioldi различной плоидности на филогенетическом дереве по литературным данным.

Сравнение морфологической и генетической изменчивости у *E. nordenskioldi* было проведено в ряде популяций, в основном – для хорошо изученной нами линии 9 (см. выше), характерной для высоких широт Сибири и Дальнего Востока. Цель состояла в подробном описании морфологической изменчивости и выделении признаков, уклоняющихся от диагноза вида. В ходе работы были проанализирована морфология 132 особей из 17 популяций. В соответствии с Кадастром и определителем дождевых червей России [Всеволодова-Перель, 1997], взрослые особи *E. nordenskioldi* имеют длину тела от 60 до 140 мм и 80–130 сегментов, ширину (диаметр) – 4–8 мм. В нашей выборке самые маленькие особи с выраженным пояскам (половозрелые) имели длину 38–40 мм и количество сегментов в пределах диагноза. Особи преимущественно имели размер от малого до среднего, крупных особей для линии 9 не наблюдалось. Пигментация животных также широко варьировала, от полной до светло-коричневой лишь на дорзальной стороне нескольких передних сегментов. Головная лопасть была в равной степени представлена двумя вариантами: эпилобической открытой и эпилобической закрытой; у одной особи – танилобической. Положение первой дорзальной поры сильно

варьировало – в бороздках 3/4, 5/6 или даже 6/7 (по диагнозу – в бороздке 4/5). Поясок начинался в диапазоне от 26-го до 28-го сегмента, а заканчивался на 32-ом либо 33-ем (по диагнозу – с 27-го по 33-ий). Вариабельность положения пубертатных валиков была меньшей, но изменчивость их формы оказалась значительной: у одних особей они имели неправильную форму, в то время как у других – вид треугольников или трапеций.

Два вида рода *Eisenia* (*E. atlavyniteae* и *E. sibirica*) были выделены из *E. nordenskioldi* Перель и Графодатским [1984]. *E. atlavyniteae* по типовому диагнозу внешне практически не отличается от *E. nordenskioldi* за исключением небольшого смещения пояска к переднему концу: он начинается на 26-ом, ½ 26-ого, реже на 27-ом сегменте и заканчивается на ½ 33-го или на 33-ем сегменте. Этому диагнозу соответствовали около десяти особей в нашей выборке. У *E. sibirica* поясок располагается с 27-го до 32-го – ½ 33-го сегмента; такие варианты также были нами обнаружены. У этих отклоняющихся особей пубертатные валики также часто смещены на ½ 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 морфологические различия между филогенетическими линиями *E. nordenskioldi*? Для ответа на этот вопрос была изучена морфологическая изменчивость особей линий 1 и 9 пигментированной формы в трех точках, в которых они были обнаружены симпатрично. Ни один из изученных признаков не мог четко дифференцировать эти линии, однако для каждой наблюдались характерные соотношения определенных вариантов: формы головной лопасти, положения пояска, положения и формы пубертатных валиков, размеров тела. Таким образом, можно утверждать, что филогенетические линии *E. nordenskioldi* различаются морфологически, то есть не являются в строгом смысле криптическими.

Изучение возможной гибридизации между филогенетическими линиями *E. nordenskioldi* при помощи метода RADSeq. Для ряда образцов был применен метод RADSeq, основанный на секвенировании нового поколения и дающий набор из тысяч геномных локусов длиной около 100 п.н. и позволяющий реконструировать аллели для этих локусов. В двух локалитетах, в которых ранее было обнаружено симпатричное обитание особей двух линий пигментированной формы *E. nordenskioldi*: окр. п. Жуя (Иркутская область, филогенетические линии 1 и 9) и окр. г. Биробиджан (Еврейская Автономная область, линии 1 и 3) были проанализированы восемь и шесть образцов, соответственно. Для обеих выборок анализ реконструировал ожидаемое разбиение на 2 группы. В каждой из выборок обнаружено по одному образцу, сочетающему аллели каждой группы в соотношении примерно 50:50. Этот результат указывает на возможную гибридизацию между линиями, что было неожиданным, принимая во

внимание глубокие генетические различия между ними. При этом у остальных особей не наблюдается примесей аллелей, что заставляет предположить, что способность к скрещиванию ограничивается образованием гибридов первого поколения, по всей видимости, стерильных.

**Холодостойкость филогенетических линий** *E. nordenskioldi*. Хотя ареал всего комплекса почти полностью расположен в пределах территорий с низкими зимними температурами, условия в почве существенно различаются в разных его частях. Мы предположили, что разные линии могут иметь разную холодостойкость (разные минимальные переносимые температуры), которая наряду с палеогеографией влияет на их ареалы. Для проверки этого предположения проведено определение холодоустойчивости червей шести линий *E. nordenskioldi*: четырех линий пигментированной формы (1, 3, 7 и 9-й) и двух линий формы *pallida* (1-й и 3-й).

9-ая линия пигментированной формы *E. nordenskioldi* занимает самую северную и самую суровую часть ареала комплекса с крайне жесткими зимними условиями. Она оказалась наиболее устойчивой к отрицательным температурам: взрослые черви переносят до -34 °C. 7-ая линия *E. n. nordenskioldi* выдерживает охлаждение до -23 °C. Следует отметить, что 7-я и 9-я линии близкородственны, что, по-видимому, и объясняет их сходство по этому признаку. 1-ая линия и 3-я линии пигментированной формы обладали заметно более низкой холодостойкостью, до -12 °C. Однако, они были обнаружены в Якутии и в низовьях Оби, в условиях с очень жестким климатом. Объяснить это можно несколькими причинами: зимовкой в глубине почвы (норным образом жизни) в местах, где нет вечной мерзлоты; обитанием в таликовых зонах с более высокими температурами почвы по сравнению с окружающими территориями; значительной холодоустойчивостью у северных популяций линий в сравнении с южносибирских.

Черви 1-й линии формы *pallida* из пригородов Магадана обладают поразительно высокой криорезистентностью — -28 °C. Они обнаружены здесь только на огородах и не расселяются в природные местообитания. Черви 3-й линии формы *pallida*, найденные пока только в Хабаровском крае, переносят температуру не ниже -10 °C, что соответствует условиям в местах зимовки.

Обусловлены ли ареалы линий исключительно их холодостойкостью? С одной стороны, действительно, самая устойчивая 9-я линия (-34 °C) чрезвычайно широко распространена в самых холодных регионах Севера и Якутии. Очень низкие значения предельно переносимых температур имеют также 1-я линия формы pallida (-28 °C) и 7-я линия формы nordenskioldi (-23 °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*. Напротив, у червей 3-й линии формы *pallida* холодостойкость минимальная из исследованных (-10 °C). 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* – все это примеры несоответствия экофизиологических возможностей червей и занимаемых ими ареалов. Таким образом, характер ареалов линий не может быть объяснен исключительно их резистентностью к отрицательным температурам.

# ГЛАВА 3. ЭНДЕМИКИ РЕГИОНОВ РОССИИ

**Dendrobaena schmidti** (Michaelsen, 1907) — кавказский эндемик, который во многих биотопах является доминантным видом. Он был описан Михаэльсеном [Michaelsen, 1907], отметившим большой полиморфизм по окраске и размерам тела. В дальнейшей Всеволодова-Перель [Перель, 1966] выделила из *D. schmidti* партеногенетический подвид *D. s. tellermanica* (позже признан отдельным видом *D. tellermanica* [Всеволодова-Перель, 2003]). Далее Квавадзе [1985] разделил *D. schmidti* на восемь подвидов (*D. s. schmidti*, *D. s. tellermanica*, *D. s. surbiensis*, *D. s. montana*, *D. s. colchica*, *D. s. marinae*, *D. s. malevichi* и *D. s. jaloniensis*).

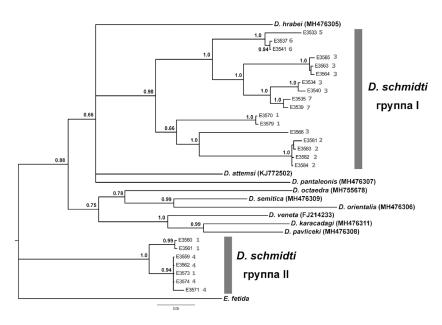


Рисунок 10. Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям *cox1* Байесовским методом. В узлах дерева приведены значения байесовских апостериорных вероятностей.

В настоящей работе было проведено исследование генетической изменчивости семи популяций D. schmidti с особями различного размера и окраски при помощи локусов cox1 и ITS2. На филогенетических деревьях, построенных как по cox1 (Рис. 10), так и по ITS2, было выявлено

две клады, названные нами группой I и группой II, каждая из которых, в свою очередь, подразделялась на ряд более мелких подгрупп.

Все изученные особи имели диагностические признаки, типичные для *D. schmidti*, при этом внешний вид их (размер и окраска тела) сильно различался. Группа I включала в себя большей частью непигментированных и слабопигментированных червей; в случае наличия бурой (пурпурной) окраски она доходила только до пояска. В то же время черви группы II были пигментированы полностью или почти полностью, а сама окраска была выражена заметно сильнее. Наблюдались и различия в размерах тела: большая часть особей, относящихся к группе I, длиннее 5 см, а относящихся к группе II — короче 3 см. Значения критериев Стьюдента и Крамера-Уэлча для имеющихся выборок показало, что различия между ними достоверны при р<0,01. Таким образом, изученная выборка с Западного Кавказа разделилась на две группы, которые можно было бы считать отдельными видами; их различия несомненны и статистически достоверны на уровне выборок, но отдельные особи могут иметь фенотип, «пограничный» между двумя группами. Таким образом, различение выявленных групп только по внешнему виду проблематично и может быть применено только для больших выборок.

Мы также провели анализ RADSeq для трех популяций, в каждой из которых были обнаружены и крупные, и мелкие формы. Анализ показал, что наиболее вероятным является подразделение выборки на 4 группы. Один из образцов по результатам анализа оказался предполагаемым гибридом между крупной и мелкой формами.

**Drawida ghilarovi** Gates, 1969 — единственный российский вид рода *Drawida*, приуроченного, главным образом, к Восточной и Южной Азии. Для образцов из окр. г. Бикин и пос. Лесопильное в Хабаровском крае, расположенных на расстоянии около 20 км друг от друга, а также из заповедника Кедровая Падь (Рис. 11A) нами было проведено секвенирование гена cox1. Всего на момент исследования в GenBank было 60 последовательностей *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.

Методами МL и байесовского анализа были получены сходные деревья (Рис. 11Б). Филогенетический анализ показал, что комплекс *D. ghilarovi* можно разделить на несколько клад. Два гаплотипа (R108 и KY711515), которые были названы 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, 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, в основном с юга Приморского края. Другая (клада III, зеленые и синие точки) был распространен намного дальше на север; к нему относились коричневые, серые и черные морфы. Последние на

филогенетическом дереве представлены двумя ветвями (показаны черным цветом на Рис. 11). Базальные ветви в кладе III были представлены коричневыми морфами, однако поддержка их положения была крайне слабой.

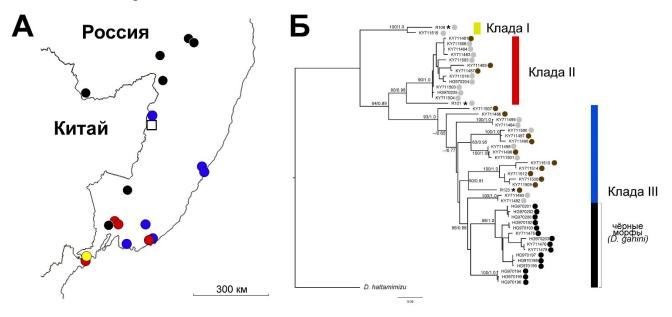


Рисунок 11. А: распространение клад комплекса *D. ghilarovi*. Различные клады показаны точками разного цвета в соответствии с панелью Б. Белым прямоугольником обозначен участок отбора проб в Хабаровском крае, желтой точкой — заповедник «Кедровая Падь» Б: Филогенетическое дерево, построенное с использованием алгоритма МL. Цифры указывают бутстрепную поддержку метода максимального правдоподобия / байесовские апостериорные вероятности. Цвета соответствуют точка на панели А; 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.

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. Всего было получено 17,5—19,5 М.п.н. single-end прочтений. Окончательный отфильтрованный набор данных включал 8990 ортогрупп. Длина выравнивания белков составляла 2 606 498 аминокислот, а выравнивания нуклеотидных последовательностей — 11 164 195 п.н. Количество нуклеотидных различий между кладами D. ghilarovi было довольно высоким, что свидетельствует в пользу их давней дивергенции и возможности рассматривать их как отдельные виды. 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. Таким образом, филогенетические деревья, построенные при помощи cox1, не согласуются с транскриптомными данными.

Считается, что пигменты, придающие дождевым червям коричневую или пурпурную окраску, принадлежат к порфиринам [Laverack, 1960; 1963]. Поскольку морфы *D. ghilarovi* различаются по пигментации, мы предположили существование различий в присутствии

транскриптов, принадлежащих к пути биосинтеза порфиринов, и провели проведен поиск генов пути биосинтеза этих веществ в транскриптомах четырех образцов *Drawida*, и во всех из них был обнаружен один и тот же набор генов этого пути. Хотя разные морфы *D. ghilarovi* также различаются по своим экологическим характеристикам [Ганин и др., 2013, 2014], ни одна из трех морф не образовала отдельную филогенетическую ветвь. Очевидно, что пигментация *D. ghilarovi* — очень пластичный признак. Как показано в данной работе, сходная лабильность пигментации наблюдается у *A. caliginosa, D. schmidti* и комплекса *E. nordenskioldi*. При этом отличие *D. ghilarovi* от вышеупомянутых таксонов состоит в том, что он, по-видимому, использует разные пигменты, а не только меняет концентрацию одного из них. Мы наблюдали, что у коричневых образцов *D. ghilarovi* пигмент мигрирует в хлороформную фазу во время экстракции, однако у серых остается в водной фазе, поэтому, вероятно, он имеет совершенно другую химическую природу.

Дальний Восток России – северная граница распространения Moniligastridae. Это находит отражение и в филогеографии: популяции, принадлежащие к кладам I и II, встречаются только на самом юге региона (показаны желтыми и красными точками на Рисунке 11А). Только клада III смогла расселиться на север, причем в Хабаровском крае и Еврейской автономной области встречаются большей частью черная морфа. Общее генетическое разнообразие комплекса намного выше на юге, что подтверждает гипотезу о том, что российские популяции *D. ghilarovi* относительно недавно расселились на север.

Согласно филогенетическому анализу, комплекс *D. ghilarovi* подразделяется на три клады, и между ними существуют значительные различия как на митохондриальном, так и на ядерном уровнях. Таким образом, 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. Разделение на виды по окраске не соответствует филогении вида и приведет к выделению полифилетических или парафилетических видов.

Полученные данные продемонстрировали, что филогенетические линии среди оседлых видов дождевых червей — частое явление, а сами линии имеют значительные различия как по митохондриальной, так и по ядерной ДНК.

# Глава 5. ПЕРЕГРИННЫЕ ВИДЫ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ

Aporrectodea caliginosa (Savigny, 1826). К комплексу A. caliginosa традиционно относят четыре вида: A. caliginosa, A. trapezoides, A. nocturna и A. tuberculata [Perez-Losada et al., 2009]. На территории России встречаются первые два (в отечественной литературе их считают

подвидами [Всеволодова-Перель, 1997]; в связи со значительными генетическими различиями мы далее рассматриваем их как отдельные виды). Считается, что внешне *A. caliginosa* и *A. trapezoides* почти идентичны, за исключением пигментации (первый непигментирован, в то время как второй имеет бурую окраску) и формы пубертатных валиков. Зарубежные исследователи [Porco et al., 2013], в пределах *A. caliginosa* выделяют три филогенетических линии.

Филогеография *А. caliginosa* была изучена нами при помощи гена *cox1* в выборке 550 образцов из 49 популяций (Рис. 12). Из них 460 особей относились к филогенетической линии 2, а 90 — к линии 3 этого вида. Показано, что обе линии *А. caliginosa* были распределены по изученной территории неравномерно. Линия 2 составляла 83,6% выборки и была обнаружена на всей изучаемой территории. Ее генетическое разнообразие было высоко на протяжении всего ареала (Рис. 13). Линия 3 составляла лишь 16,4% от общей численности выборки, а ареал ее был дизьюнктивным (Рис. 12). Показатели генетической изменчивости линии 3 также были заметно ниже, чем у линии 2, и притом уменьшались с запада на восток. Так, в Беларуси было выявлено в общей сложности восемь гаплотипов, тогда как во всей азиатской части России — всего три.

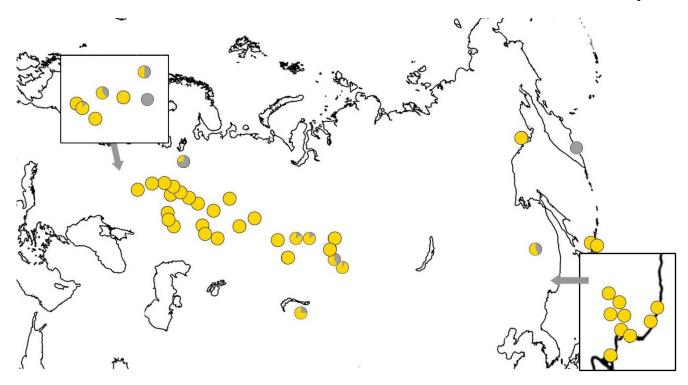


Рисунок 12. Точки сбора образцов *A. caliginosa*. Желтым цветом показана филогенетическая линия 2, серым — линия 3. Площади секторов пропорциональны соотношению числа образцов.

Чтобы проверить, характерны ли различия между линиями только для российских популяций, была проанализирована объединенная выборка, включающая в себя еще и данные из GenBank. Она состояла из 496 последовательностей линии 2 и 180 последовательностей линии 3. Включение в выборку последовательностей из зарубежных популяций существенно не изменило соотношение генетической изменчивости линий. Полученные результаты можно объяснить тем,

что *A. caliginosa*, как и другие перегринные виды, расселялась по территории Палеарктики из предполагаемого рефугиума на юге Западной Европы [Hewitt et al., 2008]. При этом 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.

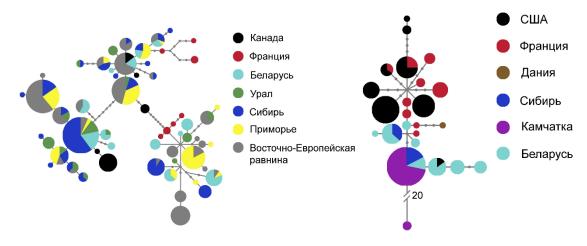


Рисунок 13. Сети гаплотипов линий 2 (слева) и 3 (справа) *А. caliginosa*. Гаплотипы из различных регионов отмечены цветом; размер кружка пропорционален количеству образов, имеющих данный гаплотип; точки обозначают отсутствующие гаплотипы.

Морфологические различия между филогенетическими линиями A. caliginosa. На примере выборки трех линий A. caliginosa (включая найденную в одной точке линию 1), собранных на территории Республики Беларусь (Рис. 14) была предпринята попытка выявить внешние различия между ними. Проводили измерение длины и ширины тела, длины и ширины пояска, подсчет числа сегментов, оценивали окраску. Особей с отклонениями от типичного диагноза брали для генетического анализа. Вся выборка включала 251 взрослую особь с полностью развитым пояском; изучение морфологии и секвенирование гена сох І проводили для 59 особей. Опубликованные диагнозы обычно дают чёткие границы признаков и опускают «выпадающие» варианты, которые могут составлять значительную часть популяции. Кроме того, диагнозы видов различаются у разных авторов. Так, в наиболее авторитетном отечественном источнике, определителе 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 [Csuzdi, Zicsi, 2003]. В нашей выборке были найдены особи, у которых поясок начинался на 27-ом, 28-ом и 29-ом сегментах, а заканчивался на 33-ом и 34-ом. Ранее, в российской выборке A. caliginosa мы также находили особей, у которых поясок занимал сегменты 26-32. Таким образом, можно утверждать, что положение пояска варьирует в пределах 25/26/27/28/29 -32/33/34/35. У подавляющей части выборки пубертатные валики имели вид бугорков, что типично для A. caliginosa, в то же время как у двух особей — валиков, характерных для A.

trapezoides. Хотя большая часть особей выборки не имела пигментации (что считается типичным признаком *A. caliginosa*), также обнаружены особи с буроватой, желтоватой или красноватой окраской (Рис. 14), а некоторые особи по этому параметру были похожи на *A. trapezoides* или *A. nocturna*.

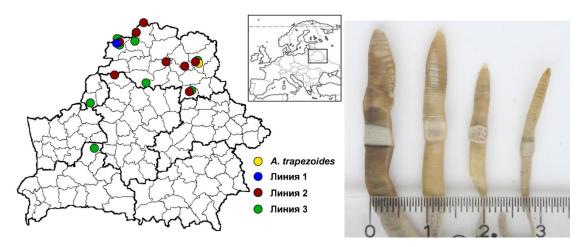


Рисунок 14. Точки сбора образцов *A. caliginosa* в Республике Беларусь и изменчивость окраски особей.

Как видно из вышеприведённых данных, морфологическая изменчивость у A. caliginosa высокая, и многие из особей изученной выборки могли быть определены как A. trapezoides или А. nocturna на основании только внешних признаков. Анализ ДНК показал, что в изученной выборке присутствовали представители всех трёх филогенетических линий A. caliginosa. Между выборками разных линий наблюдались статистически значимые морфологические различия. Так, особи линии 1 были значительно мельче, чем линий 2 и 3, имели меньшее число сегментов и более короткий поясок. Особи 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. A. caliginosa – один из видов дождевых червей, которые наиболее часто используются экологических экотоксикологических работах [Bart et al., 2018]. При этом практически никогда не указывают, какая именно линия исследовалась. 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 различения линий. Таким образом, экологические и экотоксикологические работы, проведённые на представителях разных линий, могут быть не сравнимы напрямую, и для последующих исследований следует рекомендовать выявлять генетическую принадлежность тестируемых популяций.

**Aporrectodea rosea** (Savigny, 1826). Fernandez с соавт. [2016] показали, что *A. rosea* разделяется на две ветви, которые авторы назвали евросибирской и средиземноморской. Первая встречается повсеместно, вторая приурочена исключительно к Средиземноморью.

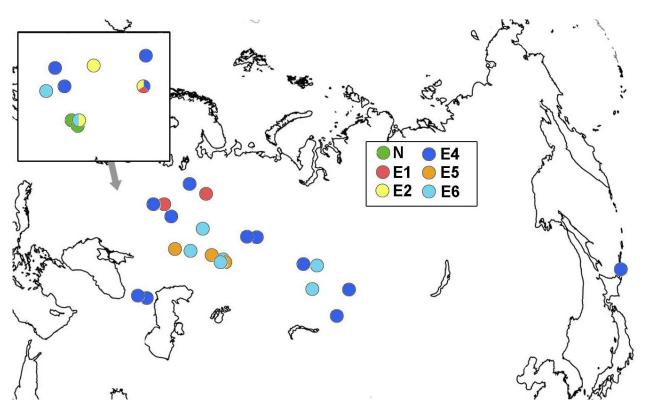


Рисунок 15. Точки сбора образцов A. rosea. Цветом отмечены различные филогенетические линии.

В нашей работе был использован 191 образец *А. rosea* из различных точек России, Беларуси и Казахстана (Рис. 15), для которых были амплифицированы локусы *cox1* и НЗ. На филогенетических деревьях (Рис. 16) видны средиземноморская и евросибирская ветви, найденные Fernández et al. [2016]. В пределах евросибирской ветви, часть образцов из Беларуси (N-1 — N-5) занимала обособленное положение и была сестринской к остальным образцам группы. Положение на деревьях новых гаплотипов *А. rosea* из Беларуси свидетельствуют о том, что история вида не ограничивалась только дивергенцией на две ветви в средиземноморском регионе, как предполагали Fernández et al. [2016]. Это обусловлено тем, что вопреки тщательному сбору образцов *А. rosea* из Средиземноморья Fernández et al. [2016] 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 восток, и обратно на запад.

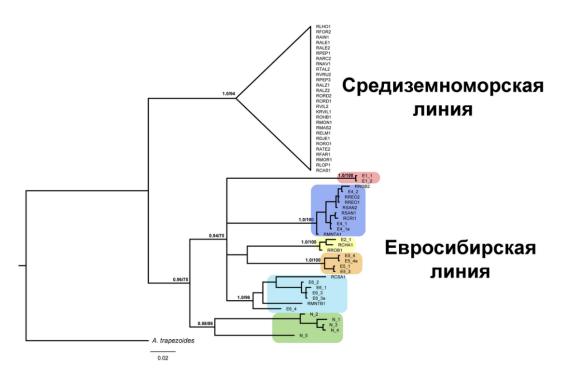


Рисунок 16. Филогенетическое дерево, построенное методом Байесовского анализа для конкатенированных последовательностей *cox1* и гена гистона НЗ *А. rosea*. Цифры возле ветвей обозначают Байесовскую апостериорную вероятность / бутстрепную поддержку метода максимального правдоподобия.

**Octolasion tyrtaeum** (Savigny, 1826). Считается, что *O. tyrtaeum* представлен двумя дискретными формами, которые имеют отличия по размерам тела: мелкая (4–8 см) и крупная (10–15 см) [Heethoff et al. 2004], которые иногда встречаются симпатрично. Первые молекулярногенетические работы [Heethoff et al., 2004] показали, что последовательности митохондриальной ДНК этих форм различаются почти 20% нуклеотидных замен; они были названы филогенетическими линиями L («крупной») и S («мелкой»).

Мы собрали выборку особей этого вида с территории России, Беларуси и Казахстана и провели секвенирование локусов *cox1*, *cox2* и ITS2 (Рис. 17). По данным филогенетического анализа (Рис. 18) часть образцов была близка к западноевропейским образцам линии S; другая же часть, несмотря на малый размер (длина около 5 см), была отнесена к линии L. Несколько особей из Беларуси выделились в отдельную ветвь, которую мы назвали линией «N». При включении в дерево родственного вида *O. cyaneum* он объединялся в одну группу с линиями S и N. Таким образом, *O. tyrtaeum* оказывается парафилетичным по отношению к *O. cyaneum*. Также был обнаружен один случай несовпадения филогении, реконструированной на основе ядерной и митохондриальной ДНК: образец по мтДНК относился к линии S, однако его последовательности ITS2 относились к линии L, что, скорее всего, объясняется гибридизацией между линиями.



Рисунок 17. Точки сбора образцов O. tyrtaeum. Гаплотипы «мелкой» митохондриальной линии (линии S) представлены черным цветом; «крупной» линии L – белым; "новой" линии N – серым. Размеры кружков пропорциональны размеру выборки.

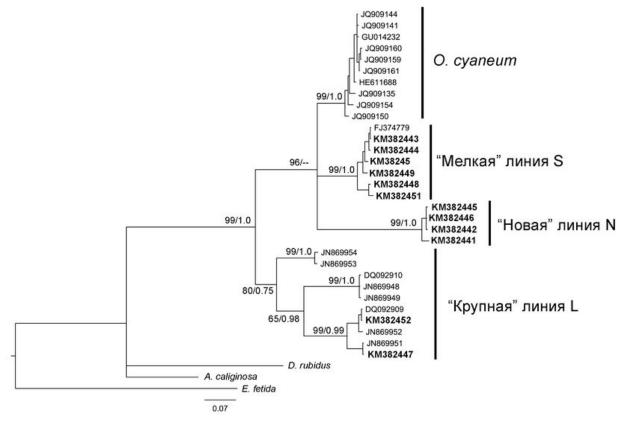


Рисунок 18. Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям гена *cox1 O. tyrtaeum*. Образцы GenBank, полученные в нашей работе, выделены жирным шрифтом. Цифры над ветвями обозначают бутстрепную поддержку метода максимальной парсимонии / байесовские апостериорные вероятности.

Далее для нескольких популяций *О. tyrtaeum*, относящихся к разным филогенетическим линиям, была проведена морфометрия. Все особи имели типичный для *О. tyrtaeum* набор

диагностических признаков, но заметно различались по размерам (статистически достоверно в большинстве пар популяций). Следует отметить, что, в некоторых популяциях при сходной длине тела животные отличались по пропорциям. Детальных данных об изменчивости размеров О. tyrtaeum в литературе нет, в связи с чем пока сложно сказать, можно ли считать естественную изменчивость непрерывной или дискретной. Было показано, что размеры особей до определенной степени коррелируют с их гаплотипом, однако гаплотип определяет размеры тела не абсолютно. Кроме того, были отмечены определенные различия между животными, относящимися к «мелкой» линии (S) и линии N: при сходной длине тела особи линии N имеют почти вдвое больший диаметр. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что соответствие морфологической и генетической изменчивости у О. tyrtaeum не так однозначно, как считалось ранее, и обусловлено и генетическими, и экологическими различиями.

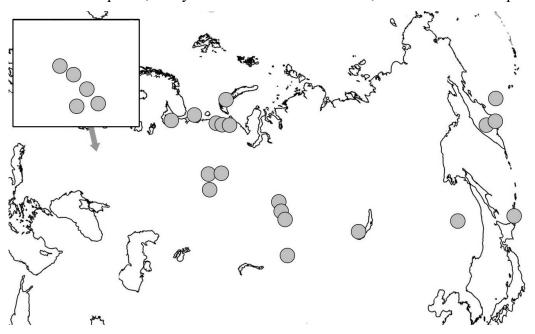


Рисунок 19. Точки сбора образцов *D. octaedra*.

**Dendrobaena** octaedra (Savigny, 1826). Для анализа генетической изменчивости *D. octaedra* была собрана и прогенотипирована по гену *cox1* выборка из 99 образцов из 24 точек (Рис. 19). В ней было обнаружено 40 уникальных гаплотипов; в наборе из 157 полноразмерных фрагментов длиной 658 п.н., взятых из GenBank – 41 гаплотип. На основании этих данных были построены филогенетические деревья. Оказалось, что генетическая изменчивость *D. octaedra* очень мала. Подавляющее большинство гаплотипов относились к одной группе (названа нами линией 1). Изменчивость внутри нее была невелика, средние р-дистанции составляли 2,3%. В пределах этой линии не выделялось какой-либо приуроченности отдельных гаплотипов к конкретному региону. Два гаплотипа из GenBank (МF121744 и MF121754) отличались от всех остальных значительно, 19% замен по p-distance. Эти гаплотипы принадлежат образцам из

Франции (Нормандия, 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.

*D. octaedra* – холодостойкий вид, распространенный во многих районах Севера [Берман и др., 2001]. В связи с этим логично предположить, что многие из этих популяций переживали оледенения *in situ*, подобно популяциям *E. nordenskioldi*. Однако генетические данные не подтверждают этого: в отличие от *E. nordenskioldi*, имеющей уникальные гаплотипы почти в каждой северной популяции линии 9 (см. выше), у *D. octaedra*, отсутствует какая-либо географическая структура генетической изменчивости. Таким образом, более вероятной следует считать гипотезу о недавнем (послеледниковом) расселении вида по всей северной Голарктике.

**Lumbricus rubellus** Hoffmeister, 1843 в Западной Европе известен большой генетической изменчивостью [King et al., 2008; James et al., 2010; Klarica et al., 2012; Porco et al., 2013; Martinsson, Erséus, 2017b]. James с соавт. [2010] выделили 2 филогенетические линии в пределах этого вида, названные линиями 1 и 2. Впоследствии Martinsson и Erséus [2017b] просуммировали данные по *L. rubellus* и несколько изменили номенклатуру: самые распространенные линии (1 и 2 по James et al. [2010]) они обозначили как В и А, соответственно, а прочие назвали G, H1, H2 и т.д.

Нами была собрана коллекция L. rubellus (175 образцов из 23 точек; рис. 20) и проведено секвенирование гена cox1; также в выборку были взяты 260 последовательностей cox1, имевшихся в базе данных GenBank. На построенных филогенетических деревьях выделилось множество линий, центральное место среди которых занимала линия А/2, к которой относилось подавляющее большинство последовательностей, взятых из GenBank. Прочие линии были представлены небольшим числом гаплотипов. На дереве также видно 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 А/2. Мы не выявили каких-либо специфических для отдельных регионов гаплотипов. Таким образом, при высоком генетическом разнообразии L. rubellus, большая часть особей даже в Западной Европе представлена линией А/2, и эта же линия заселила огромные пространства Северной Евразии. Причиной наблюдаемых паттернов мог быть как эффект основателя (из-за большей численности линии А/2 в исходном ареале более вероятно, что именно она будет представлена в интродуцированных популяциях), так и какие-либо биологические особенности, обуславливающие ее преимущественное расселение. Последнее предположение вполне вероятно

в свете имеющихся экологических работ [Donnelly et al., 2013; Kille et al., 2013; Jones et al., 2016; Anderson et al., 2017].

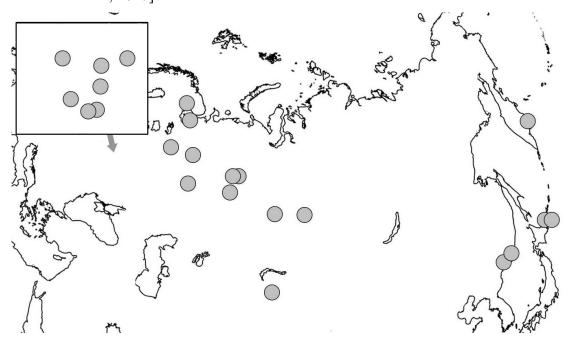


Рисунок 20. Точки сбора образцов *L. rubellus*.

Dendrodrilus rubidus (Eisen, 1874), по принятой в настоящее время классификации [Sims, Gerard, 1999; Csuzdi et. al., 2017] включает в себя несколько подвидов (которые зачастую называют формами): D. r. tenuis, D. r. rubidus, D. r. subrubicundus и D. r. norvegicus. Считается, что первые два имеют партеногенетический тип размножения, а последние два – амфимиктичны. По мнению Всеволодовой-Перель [1997], на территории России D. rubidus представлен подвидами tenuis и subrubicundus. Нами была собрана выборка из 48 образцов, для которых просеквенировали фрагмента гена *cox1*: 28 для формы *tenuis*, 13 – для *subrubicundus* и 7 – для rubidus (Рис. 21). Все последовательности D. rubidus, независимо от формы, объединились на филогенетическом дереве в одну ветвь без какого-либо подразделения внутри нее. Ни одна из форм не образовывала обособленные группы. Среднее значение генетических расстояний (рdistance) внутри выборки D. rubidus составляло 1,7%. Основываясь на полученных данных, можно утверждать, что разделение D. rubidus на подвиды [Всеволодова-Перель, 1997] не обосновано, так как между ними отсутствуют генетические различия и их ареалы практически идентичны. 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 филогенетических

линий, ни заметной генетической изменчивости между географически удаленными популяциями.

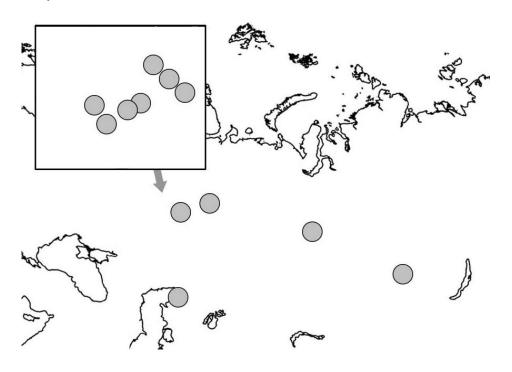


Рисунок 21. Точки сбора образцов *D. rubidus*.

Закономерности генетической изменчивости перегринных видов Мы предприняли попытку сравнительного анализа полученных паттернов генетического разнообразия для исследованных перегринных видов. Следует оговориться, что их выборки варьируют по числу образцов и популяций, поэтому к результатам анализа следует относиться с известной осторожностью. Тем не менее, можно утверждать, что очевидно значительное уменьшение числа филогенетических линий в Беларуси и в России по сравнению с Западной Европой только для *А. rosea* и *L. rubellus* (Таблица 1). Если рассматривать значения нуклеотидной и гаплотипической изменчивости (отражающие, соответственно, количество нуклеотидных замен и количество разных гаплотипов) вне зависимости от принадлежности к филогенетическим линиям (Таблица 2), можно сказать, что генетическая изменчивость у разных перегринных видов сильно (на порядок) варьирует: как отмечено выше, *D. octaedra* и *D. rubidus* имеют заметно меньшую генетическую изменчивость по сравнению с другими изученными перегринными видами.

Значительное падение нуклеотидного разнообразия (рі) в белорусской и российских выборках по сравнению с Западной Европой наблюдалось для *L. rubellus*, *O. tyrtaeum* и *D. octaedra*. У *A. caliginosa* и *A. rosea* нуклеотидное разнообразие белорусской и западноевропейской выборок сходно, при этом в выборках из европейской части России и Западной Сибири видно существенное его уменьшение. Для *D. rubidus* выраженного снижения нуклеотидного разнообразия не отмечено, но здесь следует учесть его невысокое генетическое

разнообразие в принципе. При этом для большинства видов и регионов гаплотипическая изменчивость велика (>0,8). Заметное снижение гаплотипической изменчивости для российских выборок по отношению к западноевропейским и белорусским отмечается только у O. tyrtaeum, для которого в целом выявлено сравнительно мало гаплотипов.

Таким образом, разделение большинства видов на филогенетические линии оказывается характерным и для перегринных видов. Филогенетические линии проявили разную способность к расселению с утратой большей или меньшей доли своей генетической изменчивости. При этом они сохраняют значительную ее часть, что выражено, прежде всего, в большом числе гаплотипов в российских выборках этой группы видов.

Хромосомную изменчивость некоторых перегринных видов, известную из литературы, можно соотнести с полученными нами данными о числе филогенетических линий. *D. octaedra* почти везде представлен одной линией, при этом известно три расы, пента-, гекса- и октоплоидная [Межжерин с соавт., 2018]. Та же закономерность характерна и для *D. rubidus* – одна линия, шесть известных хромосомных рас. У *A. rosea* описано совместное обитание четырех хромосомных рас [Межжерин с соавт., 2018]; поскольку мы ни разу не обнаруживали сосуществование в одной точке столько филогенетических линий этого вида, можно предположить, что одной линии здесь соответствует несколько хромосомных рас. Таким образом, для перегринных видов, как и для *E. nordenskioldi*, характерна закономерность «одна линия – несколько хромосомных рас».

Таблица 1. Число известных филогенетических линий перегринных видов в различных географических регионах.

	Западная Европа	Беларусь	Европейская Россия	Западная Сибирь	Дальний Восток
A. caliginosa	3	3	2	2	2
A. rosea	11	5	4	2	1
L. rubellus	8	1	1	1	1
O. tyrtaeum	2	3	2	2	1
D. octaedra	2	1	1	1	1
D. rubidus	1	1	1	1	1
Всего	27	14	11	9	7

Таблица 2. Показатели генетического разнообразия для изученных перегринных видов в различных географических регионах. Pi – нуклеотидное разнообразие, h – гаплотипическое разнообразие.

		падная Белару		ларусь Европейская Россия		Западная Сибирь		Дальний Восток		
	pi	h	pi	h	pi	h	pi	h	pi	h
A. caliginosa	0,0690	0,898	0,0776	0,905	0,0131	0,934	0,0258	0,891	0,0514	0,585
A. rosea	0,1144	0,970	0,1169	0,813	0,0951	0,817	0,0649	0,514	-	-
L. rubellus	0,0953	0,985	0,0430	0,955	0,0232	0,951	-	-	0,0237	0,945
O. tyrtaeum	0,1207	0,933	0,0558	0,836	0,0693	0,463	0,0466	0,274	-	-
D. octaedra	0,0454	0,879	0,0113	0,938	0,0158	0,833	0,0050	0,911	0,0248	0.800

# Глава 6. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ХОЛОДОСТОЙКОСТИ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ

Для двух холодостойких видов дождевых червей (*D. octaedra* и *Eisenia* sp. aff. nordenskioldi f. pallida 1) были получены <sup>1</sup>Н ЯМР спектры метаболитов. Список идентифицированных метаболитов включал в себя 45 веществ (Таблица 3). Из этого набора у *Eisenia* sp. aff. nordenskioldi f. pallida 1 для 22 веществ при замораживании наблюдалось статистически значимое изменение концентраций: 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.

Таблица 3. Концентрации веществ, идентифицированных в метаболических спектрах контрольных (конт.) и замороженных (опыт) дождевых червей, нмоль/г. 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	Eisenia sp. :	aff. n. f. <i>pallida</i>	D. octaedra		
	конт.	опыт	конт.	опыт	
Глюкоза		$110000 \pm$		$177000 \pm$	
	$2400 \pm 400$	6000***	$2000 \pm 400$	27000***	
Сцилло-инозитол	$1070\pm70$	$1830 \pm 270 ***$	$2100\pm400^{\S}$	$2500\pm200$	
Лактат	$520\pm100$	$8700 \pm 500***$	$630\pm170$	$1300\pm300$	
Сукцинат	$380\pm30$	$5200 \pm 900***$	$260\pm40^{\S}$	$830 \pm 100***$	
Малат	$3400\pm270$	$1930 \pm 200***$	$930 \pm 100^{\S\S\S}$	$1470\pm200$	
Фумарат	$137\pm20$	$123 \pm 17$	$110 \pm 10$	$100 \pm 10$	
Аланин	$14700\pm2000$	$34300 \pm 2300 ***$	$8300\pm2300$	24000 ± 900***	
Аспарагин	$1400\pm230$	$1830 \pm 90$	$730\pm130$	$930\pm170$	
Аспартат	$2000\pm300$	$530 \pm 170***$	$860\pm100$	$1120\pm100$	
Глутамин	$3700 \pm 600$	$2900 \pm 400$	$1130\pm130$	$750 \pm 70$	
Глутамат	$5200 \pm 400$	$5000 \pm 700$	$4430\pm170$	$5000 \pm 400$	
Глицин	$237\pm27$	$1170 \pm 200***$	$240 \pm 50$	$480 \pm 50 *$	
Гистидин	$980 \pm 80$	$1160\pm70$	$930 \pm 100$	$960 \pm 80$	
Лейцин	$290 \pm 40$	$1600 \pm 500***$	$133\pm23^{\S}$	$250 \pm 50*$	
Изолейцин	$93 \pm 10$	$730 \pm 200***$	$60 \pm 10$	$100 \pm 8*$	
Лизин	$610 \pm 80$	$1600 \pm 500$	$250\pm40^{\S\S}$	$270 \pm 50$	
Метионин	$360 \pm 40$	$290 \pm 50$	$190 \pm 13^{\S\S\S}$	$157 \pm 10$	
Фенилаланин	$200\pm30$	$770 \pm 230*$	$103 \pm 17^{\S}$	$163 \pm 17*$	
Треонин	$800 \pm 130$	$2900 \pm 270***$	$1600\pm400$	$2500 \pm 500$	
Тирозин	$113 \pm 13$	$570 \pm 170***$	$100 \pm 10$	$142 \pm 8*$	
Валин	$123 \pm 17$	$1030 \pm 270$ ***	$75 \pm 8$	$160 \pm 17***$	
Метионина сульфоксид	$2170\pm170$	$2270\pm130$	$1900 \pm 200$	$1930 \pm 170$	
3-метилгистидин	$37 \pm 10$	$49 \pm 6$	$670\pm130^{\S}$	$970 \pm 170$	
Ансерин	$83 \pm 13$	$57 \pm 13$	$180\pm30^{\S}$	$167\pm20$	

Бетаин	$1240\pm30$	$1270\pm130$	$800 \pm 100^{\S\S}$	$870\pm130$
Путресцин	$290 \pm 40$	$280\pm30$	$500 \pm 90$	$420\pm30$
Инозинат	$37 \pm 10$	$500\pm200 *$	$127\pm27^{\S\S}$	$100 \pm 13$
Инозин	$180 \pm 40$	$900 \pm 170***$	$100 \pm 40$	$60 \pm 13$
АТФ	$23 \pm 13$	$17 \pm 10$	$12.3 \pm 2.7$	$16.7 \pm 2.7$
АДФ	$100 \pm 40$	$120 \pm 60$	$163 \pm 20$	$160 \pm 20$
$AM\Phi$	$600\pm100$	$430\pm130$	$850 \pm 50$	$880 \pm 50$
Муравьиная кислота	$103 \pm 20$	$190 \pm 30*$	$260\pm40^{\S\S\S}$	$303 \pm 20$
NAD	$71 \pm 6$	$20\pm4***$	$70 \pm 10$	$75 \pm 8$
Никотинамид	$76 \pm 7$	$170 \pm 13***$	$84 \pm 7$	$73 \pm 10$
UDP-N-ацетилглюкозамин	$77 \pm 3$	$37 \pm 10**$	$85 \pm 6$	$77 \pm 6$
Холин	$64 \pm 8$	$380 \pm 70***$	$81 \pm 7$	$113 \pm 10*$
Фосфохолин	$100 \pm 10$	$100 \pm 17$	$320 \pm 50^{\S\S\S}$	$250 \pm 40$
Глицерофосфохо-лин	$320\pm23$	$290 \pm 40$	$2200 \pm 500$	$3000\pm130$
3-гидроксиизобути-рат	$70 \pm 13$	$170 \pm 40$	$100 \pm 20$	$127\pm20$
2-оксобутират	$15000 \pm 4000$	$19000\pm9000$	$8800 \pm 900$	$10500 \pm 1100$
Ацетат	$187 \pm 10$	$670 \pm 130***$	$190 \pm 30$	$280 \pm 17$
Диметилмалонат	$34 \pm 4$	$49 \pm 3*$	$93 \pm 23$	$127 \pm 10$
2-аминоизобутират	$120\pm50$	$130\pm23$	$107 \pm 23$	$200 \pm 30$
Малеиновая кислота	$6300\pm1700$	$8000 \pm 4000$	$4100 \pm 500$	$4900 \pm 500$
Гидроксиоктаноат	$18000\pm4000$	$22000\pm9000$	$10200\pm600$	$12700\pm1000$

Анализ свидетельствует, что глюкоза — единственный низкомолекулярный криопротектор у обоих видов. Средняя ее концентрация 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]. Прочих веществ, могущих быть криопротекторами, в достаточных для этой роли концентрациях обнаружено не было.

Замораживание приводит к гипоксии в связи с невозможностью кровеносной системы доставлять кислород к клеткам. Оно активирует анаэробный гликолиз и накопление метаболитов, связанных с гипоксией. Лактат — основной продукт гликолиза у большинства животных. При этом Bundy et al. [2003] не обнаружили лактата у замороженных особей *D. остаеdra*, в отличие от неустойчивых к замораживанию видов дождевых червей. Наши данные подтверждают наблюдения Bundy et al. [2003]. Однако достоверное увеличение количества лактата было отмечено нами 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 показано для многих модельных видов [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: 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 Ноlmstrup et al. [2007], что более мелкие D. octaedra лучше переносят замораживание, чем крупные особи.

Холодостойкость дождевых червей в Главе 3 изучалась для *E. nordenskioldi* как экофизиологический признак, с помощью которого можно дифференцировать филогенетические линии вида. Различия по этому признаку обусловлены, в том числе, концентрацией конкретных молекул, главным образом, низкомолекулярных криопротекторов, а те, в свою очередь, генетическими отличиями линий.

### выводы

- 1. Распространенные на территории России дождевые черви (Eisenia nordenskioldi, Drawida ghilarovi, Dendrobaena octaedra, D. schmidti, 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. schmidti, 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 североевроазиатского 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 перегринных 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 перегринных 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. Однако, современные ареалы филогенетических линий этого комплекса определяются не столько их холодостойкостью, сколько историей расселения.

# ОСНОВНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

# Статьи в журналах, рекомендуемых ВАК

- 1. **Shekhovtsov S.V.**, Golovanova E.V., Peltek S.E. Cryptic diversity within the Nordenskiold's earthworm, *Eisenia nordenskioldi subsp. nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida) // European Journal of Soil Biology 2013. V. 58 P. 13–18.
- 2. **Shekhovtsov S.V.**, Golovanova E.V., Peltek S.E. Genetic diversity of the earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Lumbricidae, Annelida) // Pedobiologia 2014. V.57 P. 245–250.
- 3. **Shekhovtsov S.V.**, Golovanova E.V., Peltek S.E. Invasive lumbricid earthworms of Kamchatka (Oligochaeta) // Zoological Studies 2014. V.53 P. 52.
- 4. **Шеховцов С. В.**, Берман Д. И., Пельтек С. Е. Филогеография дождевого червя *Eisenia nordenskioldi nordenskioldi* (Lumbricidae, Oligochaeta) на северо-востоке Евразии // Доклады Академии Наук 2015. Том 461, № 1, с. 118–121.
- 5. **Shekhovtsov S.V.**, Berman D.I., Bazarova N.E., Bulakhova N.A., Porco D., Peltek S.E. Cryptic genetic lineages in *Eisenia nordenskioldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae) // European Journal of Soil Biology 2016 V. 75 P. 151–156.
- 6. **Shekhovtsov S.V.**, Golovanova E.V., Peltek S.E. Mitochondrial DNA variation in *Eisenia n. nordenskioldi* (Lumbricidae) in Europe and Southern Urals // Mitochondrial DNA. 2016. V. 27. I. 6. P. 4643–4645.
- 7. **Shekhovtsov S.V.**, Golovanova E.V., Peltek S.E., Different dispersal histories of lineages of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae, Annelida) in the Palearctic // Biological Invasions 2016 V. 18 P. 751–761.
- 8. **Шеховцов С.В.**, Базарова Н.Э., Берман Д.И., Булахова Н.А., Голованова Е.В., Коняев С.В., Кругова Т.М., Любечанский И.И., Пельтек С.Е. ДНК-штрихкодирование: сколько видов дождевых червей живет на юге Западной Сибири? // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т. 20. № 1. С. 125–130.
- 9. Берман Д. И., **Шеховцов С. В.**, Пельтек С. Е. Видимо-невидимое разнообразие дождевых червей Сибири // Природа. 2016. №. 5. С. 16–28.
- 10. **Шеховцов С.В.**, Берман Д.И., Голованова Е.В., Пельтек С.Е. Генетическое разнообразие дождевого червя *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida) // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 5. С. 589-595.
- 11. **Шеховцов С. В.**, Голованова Е. В., Базарова Н. Э, Белова Ю. Н., Берман Д. И., Держинский Е. А., Шашков М. П., Пельтек С. Е. Генетическое разнообразие видов комплекса *Aporrectodea caliginosa* на территории России // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017; 21. № 3. С. 374–379.
- 12. **Shekhovtsov S.V.**, Berman D.I., Bulakhova N.A., Vinokurov N.N., Peltek S.E. Phylogeography of *Eisenia nordenskioldi nordenskioldi* (Lumbricidae, Oligochaeta) from the north of Asia // Polar Biology. 2018. V. 41. I. 2. P. 237–247.
- 13. **Shekhovtsov S.V.**, Blakemore R.J., Sundukov Yu. N., Gongalsky K.B., Peltek S.E. Earthworm fauna (Oligochaeta, Megadrili) of the Southern Kuril Islands and its origin // Animal Biodiversity and Conservation. 2018. V.41(1). P.9–17.

- 14. **Shekhovtsov S.V.**, Berman D.I., Bulakhova N.A., Makarova O.L., Peltek S.E. Phylogeography of earthworms from high latitudes of Eurasia // Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae. 2018. V. 64. I. 4. P. 369–382.
- 15. **Shekhovtsov S.V.**, Ershov N.I., Vasiliev G.N., Peltek S.E. Transcriptomic analysis confirms differences among nuclear genomes of cryptic earthworm lineages living in sympatry // BMC Evolutionary Biology. 2019. V. 19(S1). P. 50.
- 16. **Шеховцов С.В.**, Шеховцова И.Н., Пельтек С.Е. ДНК-штрихкодирование: методы и подходы // Успехи Современной Биологии. 2019. Т. 139. № 3. С. 211–220.
- 17. **Shekhovtsov S.V.**, Peltek S.E. The complete mitochondrial genome of *Aporrectodea rosea* (Annelida: Lumbricidae) // Mitochondrial DNA Part B. 2019. V. 4. I. 1. P. 1752–1753.
- 18. Берман Д.И., Булахова Н.А., Мещерякова Е.Н., **Шеховцов С.В.** Холодоустойчивость и распространение филогенетических линий дождевого червя *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae) // Известия РАН. Серия биологическая. 2019. № 5. С. 457–465.
- 19. Korobushkin D.I., Gongalsky K.B., Gorbunova A.Yu., Palatov D.M., **Shekhovtsov S.V.**, Tanasevitch A.V., Volkova J.S., Chimidov S.N., Dedova E.B., Ladatko V.A., Sunitskaya T.V., John K., Saifutdinov R.A., Zaitsev A.S. Mechanisms of soil macrofauna community sustainability in temperate rice-growing systems // Scientific Reports. V. 9. P. 10197.
- 20. **Shekhovtsov S.V.**, Golovanova E.V., Ershov N.I., Poluboyarova T.V., Berman D.I., Bulakhova N.A., Szederjesi T., Peltek S.E. Phylogeny of the *Eisenia nordenskioldi* complex based on mitochondrial genomes // European Journal of Soil Biology. 2020. V. 96. P. 103137.
- 21. **Шеховцов С.В.**, Рапопорт И.Б., Полубоярова Т.В., Гераськина А.П., Голованова Е.В., Пельтек С.Е. Морфотипы и генетическая изменчивость *Dendrobaena schmidti* (Lumbricidae, Annelida) // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020. Т. 24. №. 1. С. 48–54.
- 22. **Shekhovtsov S.V.**, Derzhinsky Ye.A., Poluboyarova T.V., Golovanova E.V., Ershov N.I., Berman D.I., Bulakhova N.A., Szederjesi T., Peltek S.E. Phylogeography and genetic lineages of *Aporrectodea rosea* (Lumbricidae, Annelida) // European Journal of Soil Biology. 2020. V. 99. P. 103191
- 23. **Shekhovtsov S.V.**, Shipova A.A., Poluboyarova T.V., Vasiliev G.V., Golovanova E.V., Geraskina A.P., Bulakhova N.A., Szederjesi T., Peltek S. E. Species delimitation of the *Eisenia nordenskioldi* complex (Oligochaeta, Lumbricidae) using transcriptomic data // Frontiers in Genetics. 2020. V. 11. P. 1508.
- 24. **Shekhovtsov S.V.**, Ermolov S.A., Poluboyarova T.V., Kim-Kashmenskaya M.N., Derzhinsky Ye. A., Peltek S.E. Morphological differences between genetic lineages of the peregrine earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826) // Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae. 2021. V. 67. № 3. P. 235–246.
- 25. **Шеховцов С.В.**, Ефремов Я.Р., Полубоярова Т.В., Пельтек С.Е. Изменчивость размеров ядерных геномов у представителей комплекса *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida) // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. V. 25. I. 6. P. 647–651.
- 26. **Shekhovtsov S.V.**, Shipova A.A., Bulakhova N.A., Berman D.I. Differentiation within the *Drawida ghilarovi* complex (Moniligastridae: Annelida) revealed by multigene transcriptomic dataset analysis // European Journal of Soil Biology. 2022. V. 111. P. 103411.

- 27. Golovanova E.V., Kniazev S.Y., Karaban K., Babiy KA., **Shekhovtsov S.V.** First short-term study of the relationship between native and invasive earthworms in the zone of soil freezing in Western Siberia—Experiments in Mesocosms // Diversity. 2023. V. 15. I. 2. P. 248.
- 28. Lyubechanskii I.I., Golovanova E.V., Dudko R. Yu., Azarkina G.N., Rusalimova O.A., Samoylova E.S., **Shekhovtsov S.V.**, Barsukov P.A. Impact of no-tillage on soil invertebrate communities in the southern forest steppe of West Siberia: preliminary research // Diversity. 2023. V. 15(3). P. 402.
- 29. **Shekhovtsov S.V.**, Derzhinsky Ye.A., Ermolov S.A., Kim-Kashmenskaya M.N., Poluboyarova T.V., Kotsur V.M., Golovanova E.V. Earthworms (Annelida: Megadrili) of Belarus // Zootaxa. 2023. V. 5255. № 1. P. 38–61.
- 30. **Шеховцов** С.В., Васильев Г.В., Латиф Р., Полубоярова Т.В., Пельтек С.Е., Рапопорт И.Б. Митохондриальный геном *Dendrobaena tellermanica* Perel 2003 (Annelida: Lumbricidae) // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. Т. 27. № 2. С. 146–152.
- 31. Ermolov S.A., **Shekhovtsov S.V.**, Geraskina A.P., Derzhinsky E.A., Kotsur V.M., Poluboyarova T.V., Peltek S.E. Morphological and genetic analysis of *Dendrodrilus rubidus* (*Bimastos rubidus*) (Oligochaeta, Lumbricidae) in Russia and Belarus // Russian Journal of Ecosystem Ecology. 2023. Vol. 8. №1. P. 15-27.

## Статьи в прочих изданиях

- 32. Zubko K.S., Skalon N.V., **Shekhovtsov S.V.**, Teplova N.S. Current status of rare species of earthworms (Clitellata: Lumbricidae) in Kuznetsk-Salair Mountain Area (Kemerovo Region, Russia) // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2019. V. 224. №. 1. P. 012026.
- 33. **Шеховцов С.В.**, Ермолов С.А., Держинский Е.А., Полубоярова Т.В., Ларичева М.С., Пельтек С.Е. Генетическая и размерная изменчивость *Octolasion tyrtaeum* (Lumbricidae, Annelida) // Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020. Т. 6. № 1. С. 5–9.

# Тезисы конференций

- 34. **Шеховцов С.В.**, Е.В. Голованова, С.Е. Пельтек. Виды-двойники *Eisenia nordenskioldi* subsp. *nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida) // Материалы всероссийской конференции молодых ученых "Экология: традиции и инновации". Екатеринбург. 2012. с. 159–162.
- 35. **Шеховцов С.В.**, Голованова Е.В., Пельтек С.Е. Генетическое разнообразие *Eisenia nordenskioldi* subsp. *nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida) на территории Западной Сибири // Материалы VI Международной конференции молодых ученых «Биоразнообразие. Экология. Адаптация. Эволюция.», посвященная 150-летию со дня рождения известного ботаника В.И. Липского (Одесса, 13 17 мая 2013 г.). Одесса 2013. С. 113–114.
- 36. **Шеховцов С.В.**, Берман Д.И., Голованова Е.В., Пельтек С.Е. Внутривидовая генетическая изменчивость дождевого червя *Eisenia nordenskioldi nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida) // Материалы XVII Всероссийского совещания по почвенной зоологии. 22-26 сентября 2014, г. Сыктывкар. С. 256–258.
- 37. **Шеховцов С.В.**, Базарова Н.Е., Голованова Е.В., Держинский Е.А., Пельтек С.Е. Филогеография космополитных видов дождевых червей на территории России // Биология –

- наука XXI века: 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 18 22 апреля 2016 г.). Сборник тезисов. Пущино, 2016. С. 209–210.
- 38. **Шеховцов С.В.**, Базарова Н.Э., Голованова Е.В., Держинский Е.А., Шашков М.П., Белова Ю.Н., Пельтек С.Е. Филогеография космополитных видов дождевых червей на территории России // Материалы IV Всероссийской конференции молодых ученых (с международным участием) Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы. Улан-Удэ, 2016. С. 45–46. 39. **Shekhovtsov S.V.**, Ershov N.I., Vasiliev G.V., Peltek S.E. Inferring phylogeny among cryptic lineages of *Eisenia nordenskioldi nordenskioldi* (Lumbricidae) based on transcriptomic data // Biodiversity: Genomics and Evolution (BioGenEvo-2018). Новосибирск, 21-24 августа 2018 г. С.
- 42. 40. **Шеховцов С.В.**, Берман Д.И. Видовой комплекс *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Oligochaeta): филогения, филогеография, экология // Проблемы почвенной зоологии XVIII

Всероссийское совещание по почвенной зоологии. Москва, 22-26 октября 2018 г. С. 224–225.

- 41. Булахова Н.А., Мещерякова Е.Н., **Шеховцов С.В.** Филогенетические линии дождевого червя *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae) обладают разной холодоустойчивостью // Биологические проблемы Севера: Материалы международной научной конференции, посвященной памяти В. Л. Контримавичуса. Магадан, 18–22 сентября 2018 г. С. 147.
- 42. **Shekhovtsov S.V.**, Shipova A.A., Poluboyarova T.V., Peltek S.E. Multigene phylogenies for the earthworm *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida) // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020): The Twelfth International Multiconference. Новосибирск, 6-10 июля 2020. Р. 248.
- 43. Голованова Е.В., Князев С.Ю., Бабий К.А., Цвирко Е.И., **Шеховцов С.В.** Алтайский эндемик *Eisenia tracta* в Омской области источники и пути расселения, распространение, характеристики биотопов // Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных: сборник статей V Международной конференции. Томск, 26–28 октября 2020 г. С. 50–54.
- 44. **Shekhovtsov S.V.**, Rapoport I.B. Cryptic diversity in the *Dendrobaena schmidti* complex (Lumbricidae, Annelida) // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology. Новосибирск, 4–8 июля 2022. С. 171.
- 45. Ермолов С.А., **Шеховцов С.В.** Дождевые черви (Oligochaeta, Lumbricidae) лесостепного Приобья Новосибирской области: биотопическое распределение, комплексы жизненных форм, полиморфизм // Биота, генезис и продуктивность почв: материалы XIX всероссийского совещания по почвенной зоологии. Улан-Удэ, 15–19 августа 2022. С. 71-72.
- 46. Рапопорт И.Б., **Шеховцов С.В.** Фауна и зоогеография дождевых червей (Oligochaeta: Acanthodrilidae, Megascolecidae, Lumbricidae) районов Западной Азии // Биота, генезис и продуктивность почв: материалы XIX всероссийского совещания по почвенной зоологии. Улан-Удэ, 15–19 августа 2022. С. 134-135.