

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/Letters2020-6-01

Оригинальное исследование

Генетическая и размерная изменчивость *Octolasion tyrtaeum* (Lumbricidae, Annelida)

С.В. Шеховцов ^{1, 2}, С.А. Ермолов³, Е.А. Держинский⁴, Т.В. Полубоярова ^{1, 2}, М.С. Ларичева³, С.Е. Пельтек ¹

Аннотация: *Octolasion tyrtaeum* (Savigny, 1826) – космополитный вид дождевых червей, широко распространенный в Палеарктике. В пределах вида наблюдается значительная морфологическая изменчивость: длина тела взрослых особей может варьировать от 4 до более чем 15 см. Кроме того, существует несколько генетически различающихся групп (филогенетических линий, или гаплогрупп). Ранее было высказано предположение, что размерная изменчивость обусловлена генетически: особи, относящиеся к «большой» (L) и «малой» (S) филогенетическим линиям, имели значительные отличия по размеру тела. В настоящей работе мы исследовали морфологическую (на основании промеров тела) и молекулярно-генетическую (при помощи митохондриального гена *cox1*) изменчивость у нескольких популяций *O. tyrtaeum* из Республики Беларусь и Новосибирской области. В Новосибирской области были обнаружены популяции с крупными (10.5–15.5 см) и средними (7–9 см) особями, относящимися к гаплогруппе L, а также мелкие особи (4–6 см) с гаплогруппой S. *O. tyrtaeum* из Беларуси были представлены особями малого размера с пятью различными гаплотипами гаплогруппы N. Все исследованные особи имели типичный для *O. tyrtaeum* набор диагностических признаков. Можно сказать, что размеры тела коррелируют с гаплотипом неабсолютно: хотя гаплотипы особей из популяций 1 и 2 были идентичны, они значительно различались размерами тела. Кроме того, отмечены определенные различия между особями, относящимися к гаплогруппам N и S: при сходной длине тела особи гаплогруппы N имели почти вдвое больший диаметр. Таким образом, соответствие морфологической и генетической изменчивости у *O. tyrtaeum* не так однозначно, как считалось ранее, и обусловлено и генетическими, и экологическими различиями.

Ключевые слова: *Octolasion tyrtaeum*; *Octolasion lactaeum*; дождевые черви; Lumbricidae.

Благодарности: Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 19-54-04006_Бел_мол_а, грантом Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований № 20191920 и бюджетным проектом № 0324-2019-0040-C-01.

Для цитирования: 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;6(1):5-9. DOI 10.18699/Letters2020-6-01

Original article

Genetic and body size variation in *Octolasion tyrtaeum* (Lumbricidae, Annelida)

S.V. Shekhovtsov ^{1, 2}, S.A. Ermolov³, Ye.A. Derzhinsky⁴, T.V. Poluboyarova ^{1, 2}, M.S. Laricheva³, S.E. Peltek ¹

Abstract: *Octolasion tyrtaeum* (Savigny, 1826) is a cosmopolitan earthworm species widespread in the Palearctic. It is characterized by high morphological diversity. The length of adult individuals varies from 4 to over 15 cm. Moreover, there are several genetic groups (genetic lineages, or haplogroups) within this species. Earlier studies suggested that morphological diversity is caused by genetic differences: individuals belonging to the “big” and “small” genetic lineages had strongly different body size. Here we studied morphological (based on body measurements) and genetic (based on the mitochondrial *cox1* gene) diversity within several populations of *O. tyrtaeum* from the Brest oblast of Belarus and the Novosibirsk oblast of Russia. In Novosibirsk oblast we found populations with big (10.5–15.5 cm long) and medium (7–9 cm) individuals belonging to the L haplogroup, as well as small ones (4–6 cm) with the S haplogroup. *O. tyrtaeum* from Belarus was represented by small individuals with five different haplotypes of the N haplogroup. All studied specimens had the typical diagnosis for *O. tyrtaeum*. Body size did not show absolute correlation with haplotype: although

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт биологических проблем Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁴ Витебский государственный университет имени П.М. Машерова, Витебск, Беларусь


¹ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Institute of Biological Problems of the North of Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ Vitebsk State University named after P.M. Masharov, Vitebsk, Belarus

 e-mail: shekhovtsov@bionet.nsc.ru

 Шеховцов С.В., Ермолов С.А., Держинский Е.А., Полубоярова Т.В., Ларичева М.С., Пельтек С.Е., 2020

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License

specimens from populations 1 and 2 had identical haplotypes, they demonstrated statistically significant differences in body size. Moreover, individuals belonging to the N and S haplogroups also had certain differences: adult worms with the N haplotypes had body diameter twice as big as those with the S haplotypes despite similar length. We can conclude that the correspondence between morphological and genetic variation in *O. tyrtaeum* is not as clear as it was believed earlier, and is probably caused by both genetic and ecological factors.

Key words: *Octolasion tyrtaeum*; *Octolasion lactaeum*; earthworms; Lumbricidae.

Acknowledgements: This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 19-54-04006_Bel_mol_a), the Republican Foundation for Basic Research of Belarus (grant No. 20191920), and the Budget project No. 0324-2019-0040-C-01.

For citation: Shekhovtsov S.V., Ermolov S.A., Derzhinsky Ye.A., Poluboyarova T.V., Laricheva M.S., Peltek S.E. Genetic and body size variation in *Octolasion tyrtaeum* (Lumbricidae, Annelida). *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;6(1):5-9. DOI 10.18699/Letters2020-6-01 (in Russian)

Введение

Многие виды дождевых червей отличаются большой морфологической и генетической изменчивостью. Большинство изученных видов этой группы состоит из нескольких (от двух до десяти) филогенетических линий, различающихся 5–20 % нуклеотидных замен в митохондриальной ДНК (King et al., 2008; Porco et al., 2013; Shekhovtsov et al., 2016). При этом степень различий между ядерными геномами этих линий, как правило, неизвестна, хотя имеющиеся данные свидетельствуют в пользу того, что их можно считать отдельными видами (Shekhovtsov et al., 2019, 2020). Морфологические различия между филогенетическими линиями в некоторых случаях также наблюдаются (Dupont et al., 2011). В большинстве же работ отсутствуют детальный морфологический и морфометрический анализы, что затрудняет интерпретацию генетических различий.

Один из примеров высокой внутривидовой изменчивости у дождевых червей – космополитный вид *Octolasion tyrtaeum* (Savigny, 1826), также называемый *Octolasion lacteum* (Örley, 1885). Этот вид – космополит западноевропейского происхождения, широко расселившийся по Голарктике (Tiunov et al., 2006; Hendrix et al., 2008). Считается,

что для *O. tyrtaeum* существуют две формы, различающиеся размерами: малая (4–8 см) и большая (10–15 см) (Heethoff et al., 2004; Shekhovtsov et al., 2014). Одна из первых работ по генетической изменчивости дождевых червей, проведенная М. Heethoff с коллегами (2004), показала, что последовательности митохондриальной ДНК малой и большой форм значительно разнятся: авторы обнаружили две филогенетические линии, или гаплогруппы, вида, различающиеся почти 20 % нуклеотидных замен. Крупные и мелкие экземпляры *O. tyrtaeum* относились к «большой» (L) и «малой» (S) линиям соответственно. В работе (Shekhovtsov et al., 2014) также была выявлена высокая генетическая изменчивость: показано, что корреляция между размерами тела и принадлежностью к определенной филогенетической линии неабсолютная – часть мелких особей *O. tyrtaeum* имела последовательности мтДНК, характерные для линии L. Кроме того, в Беларуси была обнаружена еще одна филогенетическая линия (N) (Shekhovtsov et al., 2014).

Обычно считается, что размеры тела у дождевых червей определяются условиями обитания, однако в случае *O. tyrtaeum* свой вклад определенно вносит и генетическая компонента. В настоящей работе мы попытались оценить

Таблица 1. Исследованные популяции *O. tyrtaeum*

Номер популяции	Точка сбора образцов	Число особей	Гаплогруппа	Фенотип	Дл (σ)	Ш (σ)	Чсег (σ)	ДлП (σ)	ШП (σ)
1	Россия, НСО, Искитимский р-н, Солдатское озеро, 54°39'25" N, 083°06'03" E	10	L	Крупные	125.1 (15.9)	4.4 (0.5)	163.7 (3.3)	6.3 (0.9)	4.7 (0.6)
2	Россия, НСО, Новосибирский район, пойма р. Иня, 54°57'22" N, 83°09'35" E	10	L	»	80.9 (5.5)	3.7 (0.3)	152.2 (14.3)	5.2 (0.8)	4.1 (0.4)
3	Россия, НСО, Новосибирский район, сосновый лес, 54°57'31" N, 83°09'46" E	10	S	Мелкие	56.9 (2.8)	2.3 (0.2)	125.2 (7.3)	4.0 (0.3)	2.7 (0.3)
4	Беларусь, Брестская область, Барановичский р-н, 53°12'30" N, 26°06'36" E	14	N	»	51.3 (5.5)	4.0 (0)	121.2 (14.6)	3.6 (0.9)	4.2 (0.3)
5	Беларусь, Брестская область, Кобринский район, 52°14'05" N, 24°24'47" E	6	N	»	58.8 (4.8)	4.0 (0)	124.7 (5.2)	4.8 (0.3)	4.2 (0.4)

Примечание. Здесь и в табл. 2: Дл – длина тела; Ш – ширина тела в самом широком месте, за исключением пояска; Чсег – число сегментов; ДлП – длина пояска; ШП – ширина пояска; σ – среднеквадратическое отклонение.

Table 1. *O. tyrtaeum* populations used in this study

No.	Location	n	Haplogroup	Phenotype	L (σ)	D (σ)	Nseg (σ)	CL (σ)	CD (σ)
1	Russia, Novosibirsk oblast, Iskitim region, Soldatskoye lake, 54°39'25"N, 083°06'03"E	10	L	Big	125.1 (15.9)	4.4 (0.5)	163.7 (3.3)	6.3 (0.9)	4.7 (0.6)
2	Russia, Novosibirsk oblast, Novosibirsk region, floodplain of Inya river, 54°57'22"N, 83°09'35"E	10	L	»	80.9 (5.5)	3.7 (0.3)	152.2 (14.3)	5.2 (0.8)	4.1 (0.4)
3	Russia, Novosibirsk oblast, Novosibirsk region, pine forest, 54°57'31"N, 83°09'46"E	10	S	Small	56.9 (2.8)	2.3 (0.2)	125.2 (7.3)	4.0 (0.3)	2.7 (0.3)
4	Belarus, Brest oblast, Baranovich region, 53°12'30"N, 26°06'36"E	14	N	»	51.3 (5.5)	4.0(0)	121.2 (14.6)	3.6 (0.9)	4.2 (0.3)
5	Belarus, Brest oblast, Kobrin region, 52°14'05"N, 24°24'47"E	6	N	»	58.8 (4.8)	4.0 (0)	124.7 (5.2)	4.8 (0.3)	4.2 (0.4)

Note. Here and in Table 2: L, total body length; D, the largest body diameter, except for the clitellum; Nseg, number of segments; CL, clitellum length; CD, clitellum diameter; σ, standard deviation.

Таблица 2. Статистические достоверные различия между популяциями при $p < 0.01$

Номер популяции	2	3	4	5
1	Дл, Ш, ДлП, ШП	Дл, Ш, Чсег, ДлП, ШП	Дл, Ш, Чсег, ДлП, ШП	Дл, Чсег, ДлП, ШП
2	–	Дл, Ш, ДлП, ШП	Дл, Ш, Чсег, ДлП	Дл, Чсег, ДлП
3	–	–	Дл, Ш, ШП	Ш, ШП
4	–	–	–	Дл, ДлП

Table 2. Statistically significant differences among the studied populations at $p < 0,01$

No.	2	3	4	5
1	L, D, CL, CD	L, D, Nseg, CL, CD	L, D, Nseg, CL, CD	L, Nseg, CL, CD
2	–	L, D, CL, CD	L, D, Nseg, CL	L, Nseg, CL
3	–	–	L, D, CD	D, CD
4	–	–	–	L, CL

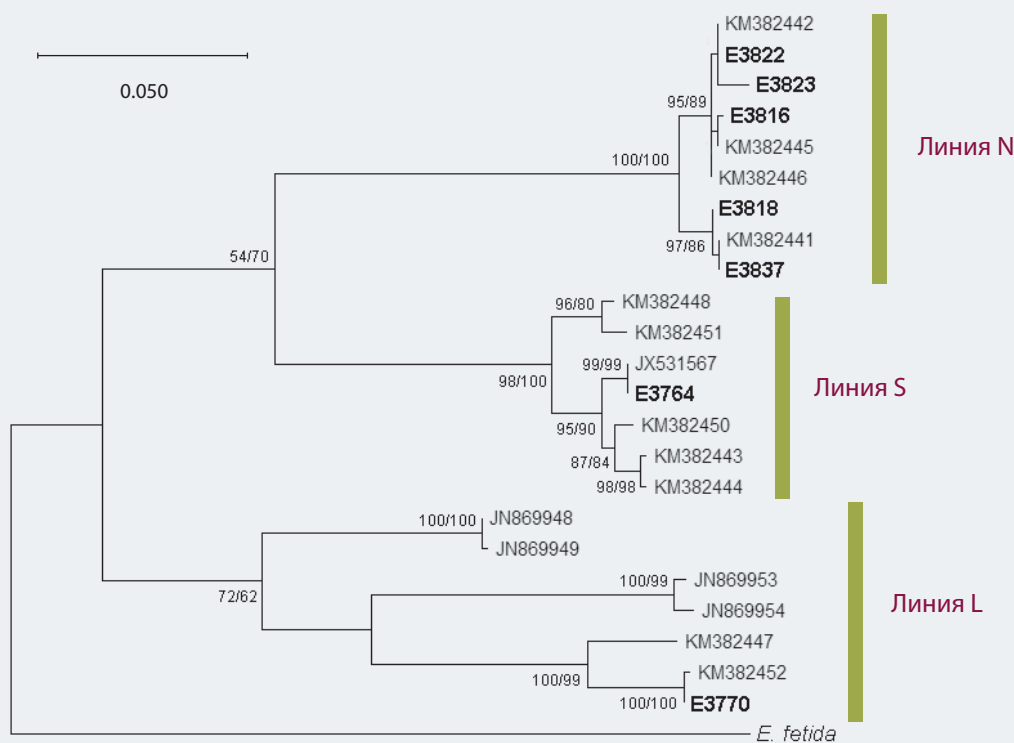
зависимость морфометрических параметров от генотипа. Для этого были проведены детальная морфометрия и ДНК-штрихкодирование образцов *O. tyrtaeum* двух точек из Республики Беларусь и трех – из Новосибирской области.

Материалы и методы

Образцы *O. tyrtaeum* были собраны в 2019 г. на территории Новосибирской области РФ и Брестской области Республики Беларусь (табл. 1) и зафиксированы в 96 % этаноле. Морфологическое определение образцов проводили при помощи ключа Т.С. Всеволодовой-Перель (1997). Морфометрия осуществлена для следующих признаков: длина тела, наибольший диаметр тела (диаметр тела в месте с наибольшей

шириной, исключая поясok), длина и диаметр пояса, число сегментов. Размеры тела определяли для червей, фиксированных в этаноле. Достоверность различий между выборками оценивали при помощи теста Стьюдента.

Выделение ДНК и амплификацию фрагмента гена цитохромоксидазы 1 (*cox1*) делали в соответствии с протоколом, описанным в работе (Shekhovtsov et al., 2018). Секвенирование ДНК проводили в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН. Ручное редактирование и сборку последовательностей выполняли в программе Chromas v.2.6.6 (Technelysium Pty Ltd). Идентификацию филогенетической линии осуществляли с помощью программы blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Филогенетические деревья



Филогенетическое дерево последовательностей *cox1* *O. tyrtaeum*, построенное методом максимального правдоподобия. Цифры возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку узла алгоритмами максимальной парсимонии/максимального правдоподобия; шкала отражает ожидаемое число замен на позицию

A phylogenetic tree of *O. tyrtaeum cox1* sequences built using the Maximum Likelihood algorithm. Numbers near the branches indicate Maximum Parsimony/Maximum Likelihood bootstrap support; scale denotes the expected numbers of substitutions per site

построены в программе MEGA X (Kumar et al., 2018) с использованием алгоритмов максимальной парсимонии и максимального правдоподобия (с моделью замен GTR + I). Для каждого метода выполнено 1000 бутстрепных повторов. В выборку входили уникальные гаплотипы *cox1* *O. tyrtaeum*, взятые из работ (Heethoff et al., 2004; Klarica et al., 2012; Shekhovtsov et al., 2013, 2014).

Результаты

Все исследованные особи (см. табл. 1) имели типичный для *O. tyrtaeum* набор диагностических признаков (положение пояса и пубертатных валиков, форма головной лопасти и т. д.). При этом наблюдались заметные различия в размерах тела: особи в популяции 1 имели длину 10.5–15.5 см, популяции 2 – 7–9 см, популяций 3–5 – 4–6 см. Различия по длине были статистически достоверными для большинства пар популяций; во многих случаях также были достоверными различия и по другим морфометрическим признакам (табл. 2). Следует отметить, что, хотя популяции 3–5 имели сходную длину тела, их пропорции были разными: диаметры тела и пояса у особей популяций 4 и 5 были почти вдвое больше, чем у популяции 3, и почти равнялись таковым у крупных *O. tyrtaeum* (см. табл. 1). Образцы из популяций 1 и 2 относились к гаплогруппе L; все особи представлены единствен-

ным гаплотипом (см. табл. 1, рисунок). Популяция 3 была представлена гаплогруппой S, генетическая изменчивость в пределах популяции также отсутствует. *O. tyrtaeum* из Беларуси относились к гаплогруппе N с пятью различными гаплотипами. Из них в популяции 4 были обнаружены три, в популяции 5 – четыре гаплотипа.

Обсуждение

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

Тем не менее размеры тела до определенной степени коррелируют с гаплотипом: крупные особи нашей выборки (популяции 1 и 2) относились к гаплогруппе L, мелкие – к S и N. Эти результаты соответствуют литературным данным (Heethoff et al., 2004; Shekhovtsov et al., 2014). Однако сравнение популяций 1 и 2 показывает, что гаплотип определяет размеры тела неабсолютно. Этому можно дать два объяснения: во-первых, вклад в морфотип вносит и эколо-

гическая составляющая (условия в месте обитания червей), во-вторых, нельзя исключать, что, несмотря на близкое генетическое родство популяций 1 и 2, между ними существуют и различия, определяющие размеры тела.

Следует отметить, что *O. tyrtaeum* – космополит, заселивший Западную Сибирь недавно, скорее всего, в последние десятилетия (Всеволодова-Перель, 1997). В связи с этим генетические различия между местными популяциями должны быть незначительными, и первое объяснение можно считать предпочтительным.

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

Заключение

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

Список литературы / References

Всеволодова-Перель Т.С. Дождевые черви России: кадастр и определитель. М.: Наука, 1997.
[Vsevolodova-Perel T.S. Earthworms of Russia: Kadaster and Key. Moscow: Nauka Publ., 1997. (in Russian)]
Dupont L., Lazrek F., Porco D., King R.A., Rougerie R., Symondson W.O.C., Livet A., Richard B., Decaën T., Butt K.R., Mathieu J. New insight into the genetic structure of the *Allolobophora chlorotica* aggregate in Europe using microsatellite and mitochondrial data. *Pedobiologia*. 2011;54:217-224. DOI 10.1016/j.pedobi.2011.03.004.
Heethoff M., Etzold K., Scheu S. Mitochondrial COII sequences indicate that the parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Savigny 1826) constitutes of two lineages differing in body size and genotype. *Pedobiologia*. 2004;8(1):9-13. DOI 10.1016/j.pedobi.2003.04.001.
Hendrix P.F., Callahan M.A. Jr., Drake J.M., Huang C.Y., James S.W., Snyder B.A., Zhang W. Pandora's box contained bait: the global problem of

introduced earthworms. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2008;39:593-613. DOI 10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173426.
King R.A., Tibble A.L., Symondson W.O.C. Opening a can of worms: unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms. *Mol. Ecol.* 2008;17(21):4684-4698. DOI 10.1111/j.1365-294X.2008.03931.x.
Klarica J., Kloss-Brandstätter A., Traugott M., Juen A. Comparing four mitochondrial genes in earthworms – Implications for identification, phylogenetics, and discovery of cryptic species. *Soil Biol. Biochem.* 2012;45:23-30. DOI 10.1016/j.soilbio.2011.09.018.
Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018;35(6):1547-1549. DOI 10.1093/molbev/msy096.
Porco D., Decaens T., Deharveng L., James S.W., Skarzynski D., Erséus C., Butt K.R., Richard B., Hebert P.D.N. Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America. *Biol. Invasions*. 2013;15:899-910. DOI 10.1007/s10530-012-0338-2.
Shekhovtsov S.V., Ershov N.I., Vasiliev G.V., Peltek S.E. Transcriptomic analysis confirms differences among nuclear genomes of cryptic earthworm lineages living in sympatry. *BMC Evol. Biol.* 2019;19(1):50. DOI 10.1186/s12862-019-1370-y.
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. *Eur. J. Soil Biol.* 2020;96:103137. DOI 10.1016/j.ejsobi.2019.103137.
Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Cryptic diversity within the Nordenskiöld's earthworm, *Eisenia nordenskioldi* subsp. *nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida). *Eur. J. Soil Biol.* 2013;58:13-18. DOI 10.1016/j.ejsobi.2013.05.004.
Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Genetic diversity of the earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Lumbricidae, Annelida). *Pedobiologia*. 2014;57:245-250. DOI 10.1016/j.pedobi.2014.09.002.
Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Mitochondrial DNA variation in *Eisenia n. nordenskioldi* (Lumbricidae) in Europe and Southern Urals. *Mitochondrial DNA Part A*. 2016;27(6):4643-4645. DOI 10.3109/19401736.2015.1101594.
Shekhovtsov S.V., Sundukov Y.N., Blakemore R.J., Gongalsky K. Identifying earthworms (Oligochaeta, Megadrili) of the Southern Kuril Islands using DNA barcodes. *Anim. Biodiv. Conserv.* 2018;41(1):9-17. DOI 10.32800/abc.2018.41.0009.
Tiunov A.V., Hale C.M., Holdsworth H.M., Vsevolodova-Perel T.S. Invasion patterns of Lumbricidae into the previously earthworm-free areas of northeastern Europe and the western Great Lakes region of North America. *Biol. Invasions*. 2006;8:1223-1234. DOI 10.1007/978-1-4020-5429-7_4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 03.02.2020. После рецензирования 24.02.2020. Принята к публикации 24.02.2020.