

УДК 595.142.34:575.858(476)

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *Dendrobaena octaedra* НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Е.А. Держинский, В.М. Коцур, И.В. Свирковская

Учреждение образования «Витебский государственный
университет имени П.М. Машерова»

Дождевые черви – важнейший компонент почвенной фауны. Вид *Dendrobaena octaedra* (Savigny, 1926) чрезвычайно широко распространен в Палеарктике и, в частности, в Республике Беларусь. Это подстилочный вид, характерный для лесной подстилки хвойных и неморальных лесов. Генетическое разнообразие *D. octaedra* изучено слабо, информация по его последовательностям ДНК получена, главным образом, в работах по ДНК-штрихкодированию.

Цель исследования – изучить генетическое разнообразие *D. octaedra* на территории Беларуси по сравнению с общей изменчивостью данного вида во всем мире на основании результатов секвенирования последовательностей митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (*cox1*).

Материал и методы. Собраны образцы *D. octaedra* из пяти точек Брестской, Могилевской и Гомельской областей. Для данных образцов проведены определение видовой принадлежности по морфологическим признакам, выделение ДНК, амплификация и секвенирование фрагмента митохондриального гена цитохром оксидазы I (*cox1*). Из базы данных GenBank были взяты последовательности *cox1* *D. octaedra* для образцов, у которых было указано место сбора (хотя бы с точностью до страны). Для полученной выборки построена сеть гаплотипов.

Результаты и их обсуждение. Получены последовательности *cox1* для 31 образца *D. octaedra* путем секвенирования по Сэнгеру. Было показано, что *D. octaedra* на территории Беларуси характеризуется сравнительно невысоким генетическим разнообразием по сравнению с западноевропейскими популяциями вида.

Заключение. По-видимому, *D. octaedra* заселил территорию Беларуси лишь после окончания последнего ледникового периода.

Ключевые слова: дождевые черви, *Dendrobaena octaedra*, *cox1*, цитохром оксидаза I, Беларусь, генетическое разнообразие.

GENETIC VARIABILITY OF THE EARTHWORM *Dendrobaena octaedra* IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Ye.A. Derzhinsky, V.M. Kotsur, I.V. Svirkovskaya

Educational Establishment “Vitebsk State P.M. Masherov University”

Earthworms are an essential component of soil fauna. *Dendrobaena octaedra* (Savigny, 1926) is a widespread earthworm in the Palearctic and, in particular, in the Republic of Belarus. This is a characteristic forest litter species of coniferous and broad-leaved forests. The genetic diversity of *D. octaedra* has been poorly studied; information on its DNA sequences has been obtained mainly from DNA barcoding.

The purpose of the work is to study the genetic diversity of *D. octaedra* in Belarus in comparison with the general variability of this species throughout the world based on the results of the mitochondrial cytochrome oxidase 1 (*cox1*) gene sequence.

Material and methods. We collected specimens of *D. octaedra* from five points of the Brest, Mogilev and Gomel regions. Identification of species by morphological features, DNA extraction, amplification and mitochondrial gene of cytochrome oxidase I (*cox1*) fragment sequencing was carried out for the collected samples. The *cox1* sequences of *D. octaedra* specimens provided with information about the collecting place (at least the country) were taken from the GenBank. A network of haplotypes was constructed for this sample.

Findings and their discussion. We obtained *cox1* sequences for 31 specimens of *D. octaedra* by Sanger sequencing. It was shown that *D. octaedra* in the territory of Belarus is characterized by a relatively low genetic variability in comparison with Western European populations of the species.

Conclusion. Apparently, *D. octaedra* populated the territory of Belarus only after the end of the last glaciation.

Key words: earthworms, *Dendrobaena octaedra*, *cox1*, cytochrome oxidase I, Belarus, genetic variability.

Дождевые черви – одна из самых экологически значимых групп почвенной фауны, что обуславливает высокий интерес к ней. На территории Республики Беларусь встречаются 12 видов дождевых червей, из которых 1 представлен двумя подвидами [1; 2]. Один из самых распространенных из них – *Dendrobaena octaedra* (Savigny, 1826). Он отмечен на всей территории республики в различных биоценозах [2]. Это подстилочный вид, характерный, главным образом, для лесной подстилки хвойных и неморальных лесов и один из немногих видов дождевых червей, обитающих в бореальной и тундровой зоне. Он также встречается в гниющей древесине, под мхами и лишайниками. *D. octaedra* широко распространен в Палеарктике, на север до полуостровов Коль-

ский, Канин, Югорский и Новой Земли, достигая, таким образом, Ледовитого океана. Повсеместно встречается на территории Восточно-Европейской равнины; в лесостепи населяет плакорные лесные ценозы, а в степи отмечен в байрачных лесах и поймах рек [3–6]. В азиатской части России распространен от Урала до Дальнего Востока, но здесь он не является характерным для естественных биоценозов. На Урале распространен от полярных хребтов до Зилаирского плато; встречается преимущественно в пойменных лесах и на луговых почвах. В Западной Сибири отмечен в районе Салехарда, в южной части полуострова Ямал и на юге Западно-Сибирской равнины – в среднем течении реки Омь и в окрестностях Томска, Новосибирска, Тюмени. В Восточной Сибири найден на Енисее (окрестности Сургутихи) и на юге Красноярского края. На Дальнем Востоке обнаружен в пригороде Владивостока и в заповеднике Кедровая Падь и в южной части острова Сахалин [4]. Этот вид успешно заселил и сходные климатические зоны Северной Америки, главным образом, при участии человека [7].

Цель исследования – изучить генетическое разнообразие *D. octaedra* на территории Республики Беларусь по сравнению с общей изменчивостью данного вида во всем мире на основании результатов секвенирования последовательностей митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (*cox1*). Для этого мы попытались установить степень генетического сходства данного вида на территории республики по сравнению с предполагаемым центром разнообразия (Западная Европа) и регионами, куда он распространился сравнительно недавно (Северная Россия и Америка).

Материал и методы. Образцы дождевых червей были собраны нами в мае 2014 г. на территории Республики Беларусь в следующих точках: *Брестская обл.*: Пинский р-н, 2 км восточнее дер. Конюхи, 52°0'53.66" с.ш., 26°25'21.38" в.д., 2 экз. *Гомельская обл.*: Житковичский р-н, ст. Случь, 52°13'11.58" с.ш., 27°33'5.65" в.д., 13 экз.; Мозырский р-н, окрестности дер. Стрельск, 51°56'44.10" с.ш., 29°26'31.80" в.д., 12 экз. *Могилевская обл.*: Быховский р-н, окрестности дер. Прибор, 53°28'26.29" с.ш., 30°19'53.04" в.д., 1 экз.; Осиповичский р-н, окрестности дер. Дуброва, 53°27'43.56" с.ш., 28°37'44.93" в.д., 3 экз.

Выделение ДНК проводили при помощи набора фирмы BioSilica: фрагмент тела червя весом около 50 мг механически измельчали в гуанидинизотиоцианате; ДНК иммобилизовали на колонке и после промывок смывали водой. С полученной очищенной ДНК проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР). В состав реакции входили: 60 мМ Tris-HCl (pH 8.5), 1,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X-100, 0,7 мМ праймеров (HCO2198 (5'-TAAAC-TTCAG-GGTGA-CCAAAAAATC-A-3') и LCO1490m (5'-TACTC-AACAA-ATCACAAGA-TATTG-G-3' [8]), 1 ед. полимеразы TaqSE (Сибэнзим, Новосибирск). Реакцию ПЦР проводили, используя следующий профиль реакции: 3 мин при 94°C; 40 циклов, включающих в себя 20 с при 94°C, 20 с при 50°C и 1 мин при 72°C; финальный цикл синтеза – 5 мин при 72°C. Полученные продукты ПЦР визуализировали на трансиллюминаторе BioRad (США) при помощи окрашивания бромистым этидием. Очистку проводили смесью ферментов *E. coli* Exonuclease I и Shrimp Alkaline Phosphatase (New England Biolabs, USA) при 37°C в течение 30 мин. Секвенирование ДНК осуществляли при помощи набора BigDye 3.1 (Applied Biosystems, USA) с каждого из двух использованных праймеров. Капиллярный электрофорез продуктов секвенирования проводили в Межинститутском центре секвенирования СО РАН (г. Новосибирск).

Полученные секвенограммы анализировали и при необходимости редактировали вручную в программе Chromas (Technelysium Pty Ltd). Последовательности *D. octaedra* из других стран были извлечены из базы данных GenBank [9]. Из полученных последовательностей были взяты только полноразмерные (длиной 658 п.н.) и не содержащие плохо прочитанные нуклеотиды: DQ092896–DQ092897, FJ214235, GU013836, JQ909013–JQ909017, JQ909019–JQ909026, JQ909028–JQ909032, JQ909036–JQ909054, KJ772497, KJ772504, KM611809, KM611907, KM611927, KM611950, KM611963, KM611988, KM612001, KM612002, KM612177, KM612210, KM612256, KX400644, KX400645, KX400719, KY750709, MF544155, MF544169, MF544179, MF544188, MF544212, MF544264, MF544393, MF544395, MF544459, MF544468, MF544642, MF544644, MF544663, MF544692, MF544807, MF544823, MF544825, MF544834, MF545029, MF545096, MF545115, MF545138, MF545184, MG421121 MG422081, MG422154, MG422238, MG422366, MG422458, MG422594, MG422679, MG422725, MG422759, MG423289, MG423458, MG423472, MH755642–MH755678. Вычисление нуклеотидного и гаплотипического разнообразия, попарных значений Fst было проведено в программе Arlequin v.3.0 [10]. Сеть гаплотипов была построена при помощи программы Network v. 4 [11].

Результаты и их обсуждение. Нами была получена 31 последовательность фрагмента гена *cox1*. Все они имели идентичную длину (658 п.н. без праймеров). Из базы данных GenBank были взяты полноразмерные и качественно прочитанные последовательности для *D. octaedra* из следующих стран: Канада (63 шт.), Франция (10 шт.), США (10 шт.), Россия (43 шт.), Австрия (2 шт.), Венгрия, Дания и Гренландия (по 1 шт.). Образцы из Канады и США были объединены в выборку Северная Америка; из Франции, Австрии, Дании и Венгрии – в выборку Западная Европа.

Показатели генетического разнообразия данных выборок представлены в табл. 1. Видно, что для выборки из Беларуси характерно невысокое нуклеотидное разнообразие, но при этом она отличается наивысшим гап-

типическим разнообразием, в то время как в Западной Европе оно наименьшее. Наибольшее нуклеотидное разнообразие оказалось характерным для выборки из Западной Европы, наименьшее – для России и Беларуси.

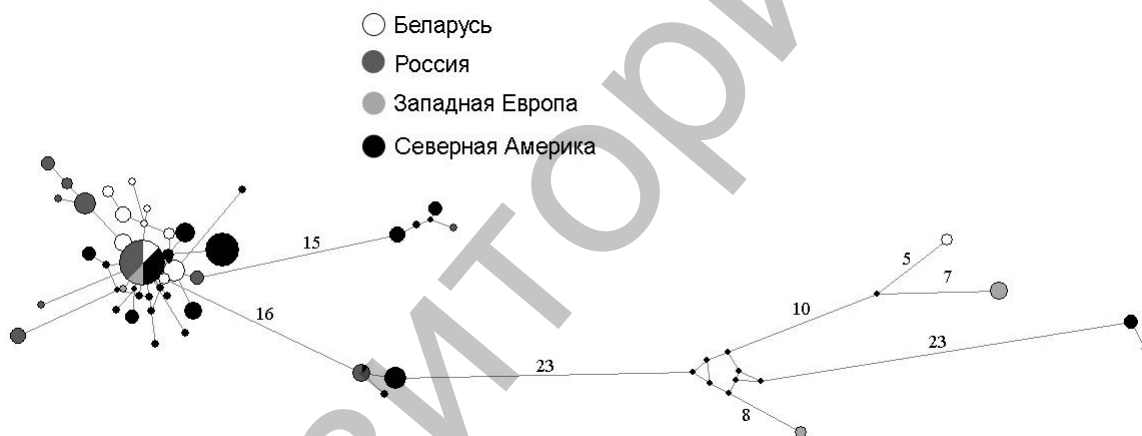
Таблица 1

Выборки *D. octaedra*, исследованные в данной работе

Показатель \ Регион	N	n	π	h
Беларусь	31	14	0.011(0.006)	0.939(0.021)
С. Америка	75	21	0.019(0.009)	0.893(0.022)
З. Европа	14	5	0.046(0.024)	0.802(0.069)
Россия	43	13	0.011(0.006)	0.855(0.038)

Примечание. N – число образцов, n – число уникальных гаплотипов, π – нуклеотидное разнообразие, h – гаплотипическое разнообразие. В скобках указано среднее квадратичное отклонение.

Для исследованной выборки была построена сеть гаплотипов (рис.). Можно видеть, что подавляющее большинство образцов представлено одной большой группой последовательностей, довольно близких друг к другу. При этом существуют гораздо более редкие гаплотипы, имеющие очень много нуклеотидных замен по сравнению с основным кластером. Среди этих гаплотипов большое количество приходится на долю Западной Европы, чем и объясняется в несколько раз более высокое по сравнению с другими регионами генетическое разнообразие.

Рис. Сеть гаплотипов, построенная для выборки *D. octaedra*

Размеры кружков пропорциональны количеству особей, относящихся к данному гаплотипу.

Цифры обозначают количество нуклеотидных замен для самых длинных ветвей.

Для выборок был также проведен популяционно-генетический анализ при помощи программы Arlequin. Значения попарных коэффициентов Фишера F_{st} представлены в табл. 2. Ожидается, что белорусская выборка оказалась наиболее близка к российской. При этом генетические расстояния данных двух выборок от североамериканской имеют близкие значения.

Таблица 2

Значения попарных коэффициентов F_{st} для исследованных выборок

Все значения достоверны ($p < 0,01$)

Регион	Беларусь	С. Америка	З. Европа
Беларусь	–	–	–
С. Америка	0.094	–	–
З. Европа	0.344	0.346	–
Россия	0.074	0.061	0.413

Считается [12; 13], что во время максимума последнего оледенения большая часть севера Европы была покрыта ледниковым щитом, а более южные районы, вплоть до побережья Черного и Каспийского морей, были зоной мерзлотных почв. В таких условиях стоит ожидать, что большинство видов дождевых червей вымерли, и затем распространились из более южных рефугиумов. При этом существует гипотеза, что *D. octaedra* как достаточно холодоустойчивый вид мог пережить оледенение в рефугиумах [4; 14]. Полученные нами результаты, однако, не могут подтвердить подобную гипотезу. Наивысшее генетическое разнообразие *D. octaedra* наблюдается в Западной Европе, на территории, наиболее близкой географически к предполагаемому доледниковому ареалу. Выборки из восточной Евразии и Северной Америки характеризуются меньшим нуклеотидным разнообразием. При этом изученная нами выборка из Беларуси, несмотря на большую географическую близость к Западной Европе, не отличается более высокими показателями.

В то же время можно сказать, что число гаплотипов в инвазивных популяциях весьма велико, что говорит о многочисленных случаях заноса этого вида и подтверждает ранее полученные заключения [7]. Та же ситуация характерна и для других космополитных видов дождевых червей [15; 16].

Заключение. В данной работе мы показали, что *D. octaedra* на территории Республики Беларусь характеризуется сравнительно невысоким генетическим разнообразием по сравнению с западноевропейскими популяциями вида. Это говорит о том, что *D. octaedra*, по-видимому, заселил страну лишь после окончания последнего ледникового периода.

Работа выполнена при поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (номер государственной регистрации 20191920 от 30.07.2019 г.). Авторы благодарны С.В. Шеховцову (Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск) за техническую помощь при подготовке публикации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хотько, Э.И. Почвенная фауна Беларуси / Э.И. Хотько. – Минск: Наука и техника, 1993. – 252 с.
2. Максимова, С.Л. Дождевые черви (Lumbricidae) фауны Беларуси: справочник-определитель / С.Л. Максимова, Н.В. Гурина. – Минск: Беларуская навука, 2014. – 56 с.
3. Перель, Т.С. Распространение и закономерности распределения дождевых червей фауны СССР / Т.С. Перель. – М.: Наука, 1979. – 272 с.
4. Всеволодова-Перель, Т.С. Дождевые черви фауны России: кадастр и определитель / Т.С. Всеволодова-Перель. – М.: Наука, 1997. – 102 с.
5. Стриганова, Б.Р. Животное население почв бореальных лесов Западно-Сибирской равнины / Б.Р. Стриганова, Н.М. Порядина. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 234 с.
6. Shekhovtsov, S.V. Phylogeography of earthworms from high latitudes of Eurasia / S.V. Shekhovtsov, D.I. Berman, N.A. Bulakhova, O.L. Makarova, S.E. Peltek // Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae. – 2018. – Vol. 64, iss. 4. – P. 369–382.
7. Cameron, E.K. Genetic structure of invasive earthworms *Dendrobaena octaedra* in the boreal forest of Alberta: insights into introduction mechanisms / E.K. Cameron, E.M. Bayne, D.W. Coltman // Molecular Ecology. – 2008. – Vol. 17, iss. 5. – P. 1189–1197.
8. Folmer, O. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek // Molecular Marine Biology and Biotechnology. – 1994. – Vol. 3, iss. 5. – P. 294–299.
9. GenBank [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. – Дата доступа: 01.11.2019.
10. Excoffier, L. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis / L. Excoffier, G. Laval, S. Schneider // Evolutionary Bioinformatics Online. – 2005. – Vol. 1. – P. 47–50.
11. Bandelt, H.-J. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies / H.-J. Bandelt, P. Forster, A. Röhl // Molecular Biology and Evolution. – 1999. – Vol. 16, iss. 1. – P. 37–48.
12. Hewitt, G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages / G. Hewitt // Nature. – 2000. – Vol. 405. – P. 907–913.
13. Tarasov, P.E. Last glacial maximum biomes reconstructed from pollen and plant macrofossil data from northern Eurasia / P.E. Tarasov, V.S. Volkova, T. Webb III, J. Guiot, A.A. Andreev, L.G. Bezusko, T.V. Bezusko, G.V. Bykova, N.I. Dorofeyuk, E.V. Kvavadze, I.M. Osipova, N.K. Panova, D.V. Sevastyanov // Journal of Biogeography. – 2000. – Vol. 27, iss. 3. – P. 609–620.
14. Hansen, P.L. Low genetic variation for *Dendrobaena octaedra* from Greenland compared to populations from Europe and North America: Refuge or selection? / P.L. Hansen, M. Holmstrup, M. Bayley, V. Simonsen // Pedobiologia. – 2006. – Vol. 50, iss. 3. – P. 225–234.
15. Porco, D. Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America / D. Porco, T. Decaens, L. Deharveng, S.W. James, D. Skarżyński, C. Erséus, K.R. Butt, B. Richard, P.D.N. Hebert // Biological Invasions. – 2013. – Vol. 15, iss. 4. – P. 899–910.
16. Shekhovtsov, S.V. Different dispersal histories of lineages of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae, Annelida) in the Palearctic / S.V. Shekhovtsov, E.V. Golovanova, S.E. Peltek // Biological Invasions. – 2016. – Vol. 18, iss. 3. – P. 751–761.

REFERENCES

1. Khotko E.I. *Pochvennaya fauna Belarusi* [Soil Fauna of Belarus], Minsk: Nauka i Tekhnika, 1993, 252 p.
2. Maksimova S.L., Gurina N.V. *Dozhdevyie chervi (Lumbricidae) fauny Belarusi: spravochnik-opredelitel* [Earthworms (Lumbricidae) of the Fauna of Belarus: Handbook & Guide], Minsk: Belaruskaya navuka, 2014, 56 p.
3. Perel T.S. *Rasprostraneniye i zakonornosti raspredeleniya dozhdevyikh chervev fauny SSSR* [Distribution and Spreading Patterns of Earthworms of the Fauna of the USSR], M.: Nauka, 1979, 272 p.
4. Vsevolodova-Perel T.S. *Dozhdevyie chervi fauny Rossii: kadastr i opredelitel* [Earthworms of the Fauna of Russia: Cadastre and Guide], M.: Nauka, 1997, 102 p.
5. Striganova B.R., Poryadina N.M. *Zhivotnoye naseleniye pochv borealnykh lesov Zapadno-Sibirskoy Ravniny* [The Animal Population of the Soils of the Boreal Forests in West Siberian Plain], M.: Tovarichestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2005, 234 p.

6. Shekhovtsov, S.V. Phylogeography of earthworms from high latitudes of Eurasia / S.V. Shekhovtsov, D.I. Berman, N.A. Bulakhova, O.L. Makarova, S.E. Peltek // *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. – 2018. – Vol. 64, iss. 4. – P. 369–382.
7. Cameron, E.K. Genetic structure of invasive earthworms *Dendrobaena octaedra* in the boreal forest of Alberta: insights into introduction mechanisms / E.K. Cameron, E.M. Bayne, D.W. Coltman // *Molecular Ecology*. – 2008. – Vol. 17, iss. 5. – P. 1189–1197.
8. Folmer, O. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. – 1994. – Vol. 3, iss. 5. – P. 294–299.
9. GenBank [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. – Date of access: 01.11.2019.
10. Excoffier, L. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis / L. Excoffier, G. Laval, S. Schneider // *Evolutionary Bioinformatics Online*. – 2005. – Vol. 1. – P. 47–50.
11. Bandelt, H.-J. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies / H.-J. Bandelt, P. Forster, A. Röhl // *Molecular Biology and Evolution*. – 1999. – Vol. 16, iss. 1. – P. 37–48.
12. Hewitt, G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages / G. Hewitt // *NATURE*. – 2000. – Vol. 405. – P. 907–913.
13. Tarasov, P.E. Last glacial maximum biomes reconstructed from pollen and plant macrofossil data from northern Eurasia / P.E. Tarasov, V.S. Volkova, T. Webb III, J. Guiot, A.A. Andreev, L.G. Bezusko, T.V. Bezusko, G.V. Bykova, N.I. Dorofeyuk, E.V. Kvavadze, I.M. Osipova, N.K. Panova, D.V. Sevastyanov // *Journal of Biogeography*. – 2000. – Vol. 27, iss. 3. – P. 609–620.
14. Hansen, P.L. Low genetic variation for *Dendrobaena octaedra* from Greenland compared to populations from Europe and North America: Refuge or selection? / P.L. Hansen, M. Holmstrup, M. Bayley, V. Simonsen // *Pedobiologia*. – 2006. – Vol. 50, iss. 3. – P. 225–234.
15. Porco, D. Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America / D. Porco, T. Decaens, L. Deharveng, S.W. James, D. Skarżyński, C. Erséus, K.R. Butt, B. Richard, P.D.N. Hebert // *Biological Invasions*. – 2013. – Vol. 15, iss. 4. – P. 899–910.
16. Shekhovtsov, S.V. Different dispersal histories of lineages of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae, Annelida) in the Palearctic / S.V. Shekhovtsov, E.V. Golovanova, S.E. Peltek // *Biological Invasions*. – 2016. – Vol. 18, iss. 3. – P. 751–761.

Поступила в редакцию 28.11.2019

Адрес для корреспонденции: e-mail: dernoctuid@mail.ru – Держинский Е.А.