

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Изменчивость размеров ядерных геномов у представителей комплекса *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida)

С.В. Шеховцов^{1,2}✉, Я.Р. Ефремов¹, Т.В. Полубаярова¹, С.Е. Пельтек¹

¹ Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

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

✉ shekhovtsov@bionet.nsc.ru

Аннотация. Размеры ядерного генома у большинства эукариот определяются преимущественно содержанием мобильных элементов и некодирующих последовательностей и варьируют в широких пределах. Они могут значительно различаться как между крупными таксонами (причем размер генома не коррелирует со сложностью организма – так называемый С-парадокс), так и между близкородственными видами в пределах рода. В то же время размах внутривидовой изменчивости по этому параметру изучен значительно хуже. Комплекс *Eisenia nordenskioldi* объединяет несколько близкородственных видов дождевых червей, широко распространенных на Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке России, заходящих своими ареалами и в сопредельные регионы. Для этого комплекса характерна значительная морфологическая, кариотипическая, экологическая и генетическая изменчивость. Целью настоящей работы было оценить размеры ядерного генома у нескольких филогенетических линий комплекса *E. nordenskioldi* при помощи проточной цитофотометрии. Получены данные о размерах генома для 13 популяций, относящихся к семи филогенетическим линиям *E. nordenskioldi*. Наши результаты показали, что между линиями комплекса наблюдается заметный разброс по размерам, что является еще одним подтверждением их видовой самостоятельности. В целом по размеру генома выборки разделены на две группы. В одну вошли три популяции с небольшим (250–500 м. п. н.), во вторую – с крупным (2300–3500 м. п. н.) размером генома. Кроме того, разные популяции в пределах одной филогенетической линии также имели заметные различия в размере генома (15–25 %). Полученные данные были сопоставлены с филогенетическими деревьями, построенными на основе транскриптомных данных. Судя по топологии филогенетических деревьев, предковые популяции комплекса с большей вероятностью имели большой размер генома, а уменьшение или увеличение его размера происходило в разных линиях независимо и, возможно, было связано с изменением размеров тела и/или переходом к собственно почвенному образу жизни.

Ключевые слова: дождевые черви; *Eisenia nordenskioldi*; размер генома; проточная цитофотометрия; филогения.

Для цитирования: Шеховцов С.В., Ефремов Я.Р., Полубаярова Т.В., Пельтек С.Е. Изменчивость размеров ядерных геномов у представителей комплекса *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(6):647-651. DOI 10.18699/VJ21.073

Variation in nuclear genome size within the *Eisenia nordenskioldi* complex (Lumbricidae, Annelida)

S.V. Shekhovtsov^{1,2}✉, Ya.R. Efremov¹, T.V. Poluboyarova¹, S.E. Peltek¹

¹ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

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

✉ shekhovtsov@bionet.nsc.ru

Abstract. The size of the nuclear genome in eukaryotes is mostly determined by mobile elements and noncoding sequences and may vary within wide limits. It can differ significantly both among higher-order taxa and closely related species within a genus; genome size is known to be uncorrelated with organism complexity (the so-called C-paradox). Less is known about intraspecific variation of this parameter. Typically, genome size is stable within a species, and the known exceptions turn out to be cryptic species. The *Eisenia nordenskioldi* complex encompasses several closely related earthworm species. They are widely distributed in the Urals, Siberia, and the Russian Far East, as well as adjacent regions. This complex is characterized by significant morphological, chromosomal, ecological, and genetic variation. The aim of our study was to estimate the nuclear genome size in several genetic lineages of the *E. nordenskioldi* complex using flow cytometry. The genome size in different genetic lineages differed strongly, which supports the hypothesis that they are separate species. We found two groups of lineages, with small (250–500 Mbp) and large (2300–3500 Mbp) genomes. Moreover, different populations within one lineage also

demonstrated variation in genome size (15–25 %). We compared the obtained data to phylogenetic trees based on transcriptome data. Genome size in ancestral population was more likely to be big. It increased or decreased independently in different lineages, and these processes could be associated with changes in genome size and/or transition to endogeic lifestyle.

Key words: earthworms; *Eisenia nordenskioldi*; genome size; flow cytometry; phylogeny.

For citation: Shekhovtsov S.V., Efremov Ya.R., Poluboyarova T.V., Peltek S.E. Variation in nuclear genome size within the *Eisenia nordenskioldi* complex (Lumbricidae, Annelida). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):647–651. DOI 10.18699/VJ21.073

Введение

Количество ядерной ДНК у эукариот варьирует в широких пределах, причем размер генома в целом не коррелирует со сложностью строения организма (Cavalier-Smith, 1978; Gregory, 2001). Эта закономерность получила название С-парадокса (Thomas, 1971). В настоящее время закономерности изменчивости количества ядерной ДНК хорошо изучены как для таксонов высокого ранга, так и для групп близкородственных видов в разных классах животных (Gregory, 2005). В то же время картина изменчивости внутри видов исследована значительно хуже. Считается, что само поддержание общности генофонда вида подразумевает сохранение его размера и строения. От этого правила есть некоторые отступления: различия между самцами и самками из-за разницы в размере половых хромосом, полиплоидия, присутствие добавочных В-хромосом или крупных блоков гетерохроматина (Gregory, 2005; Viémont, 2008). Тем не менее в большинстве случаев внутривидовая изменчивость невысока и составляет не более нескольких процентов (Blommaert, 2020). Однако известны исключения, когда размеры геномов в разных популяциях одного вида различались более значительно (Alvarez-Fuster et al., 1991; Marescalchi et al., 1998; Neiman et al., 2011; Stelzer et al., 2011; Jeffery et al., 2016). Во многих случаях данная изменчивость может объясняться присутствием так называемых видов-двойников, которые ранее не были выявлены.

Комплекс *Eisenia nordenskioldi* (Eisen, 1874) – группа видов/филогенетических линий дождевых червей семейства Lumbricidae, широко распространенных в азиатской части России и заходящих также на Восточно-Европейскую равнину и в некоторые сопредельные страны (Перель, 1979; Жуков и др., 2007; Blakemore, 2013; Hong, Csuzdi, 2016; Шеховцов и др., 2017). В пределах этого комплекса отмечена огромная морфологическая (Малевиц, 1956; Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997), кариотипическая (Графодатский и др., 1982; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008), экологическая (Berman et al., 2019) и генетическая (Малинина, Перель, 1984; Shekhovtsov et al., 2013, 2016a, b, 2017, 2018a, b) изменчивость. Филогенетические работы, проведенные на геномных и транскриптомных данных, подтвердили глубокие различия между филогенетическими линиями комплекса (Shekhovtsov et al., 2019, 2020a, b) и показали, что его можно разделить по меньшей мере на два отдельных вида.

Значительные различия между линиями комплекса *E. nordenskioldi* на уровне ядерного и митохондриально-геномов указывают на очень давнюю их дивергенцию (Shekhovtsov et al., 2013, 2015). В связи с этим вполне вероятно, что за этот период могла накопиться и заметная

изменчивость в размерах ядерного генома, выражаемая не только как изменения плоидности. С целью исследовать этот вопрос мы изучили изменчивость размеров ядерного генома у нескольких филогенетических линий комплекса *E. nordenskioldi*, а также других видов рода *Eisenia* при помощи метода проточной цитофотометрии.

Материалы и методы

Живые особи дождевых червей были собраны в ходе полевого сезона 2020 г. в различных точках на Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке (см. таблицу). Живых червей промывали и сажали по одному в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой, где их выдерживали 3–7 дней до опорожнения кишечника. Размер генома у дождевых червей оценивали по интенсивности свечения ядер единичных клеток, окрашенных пропидий йодидом в соответствии с методикой D.W. Galbraith с коллегами (1997). Ядра клеток выделяли из нескольких хвостовых сегментов живого червя (100–300 мкг) либо из целой особи, если ее размер был мал. Часть материала (приблизительно 50–100 мкг) фиксировали в спирте для выделения ДНК на колонках, как описано ниже.

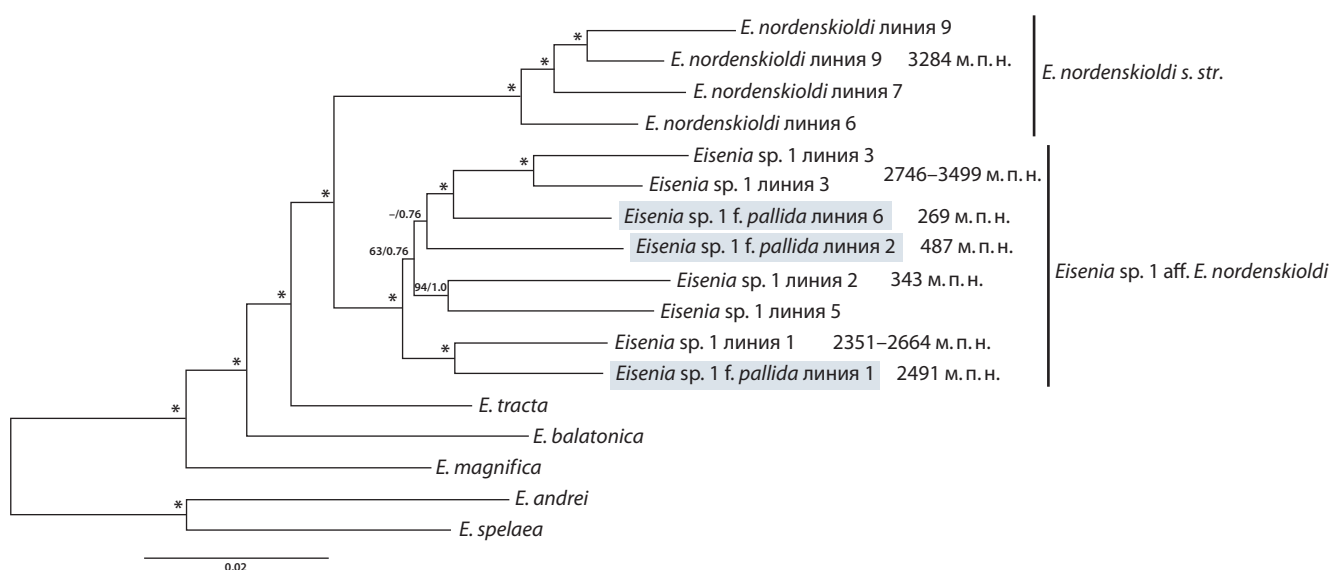
Живой материал помещали в чашку Петри с 500 мкл буфера Galbraith: 45 mM MgCl₂, 20 mM 3-[N-морфолино]пропансульфоновая кислота (MOPS), 30 mM цитрат Na, 0.1 % Triton X-100 (Galbraith et al., 1983). Материал измельчали лезвием бритвы. Жидкую фазу переносили в пробирку Eppendorf. Затем промывали материал 500 мкл буфера Galbraith и снова переносили жидкую фазу в ту же пробирку. Образец инкубировали 15–60 мин, затем пропускали через фильтр 40 мкм и наносили поверх 2 мл буфера Galbraith, содержащего 3 % глицерин. Проводили центрифугирование при 200 g в течение 10 мин; супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера Galbraith и добавляли 10 мкл РНКазы (1 е. а./мкл). Образец инкубировали 30 мин, добавляли 100 мкл раствора пропидий йодида (1 мг/мл) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSAria III (BD Biosciences, США). В качестве референсных геномов использовали клетки крови курицы (2C = 1250 м. п. н.) (Kasai et al., 2012) и селезенки мыши (2C = 3280 м. п. н.) (Redi et al., 2005).

Для определения генетической принадлежности особей проводили секвенирование фрагмента гена цитохром с-оксидазы I в соответствии с методикой, описанной в (Shekhovtsov et al., 2018c). Филогенетические деревья, построенные методами максимального правдоподобия и байесовского анализа на основе филогеномных данных, были взяты из работы S.V. Shekhovtsov с коллегами (2020b).

Исследованные образцы

Вид/линия	Точка сбора образцов	Геном, м.п.н.	С.о.	Повт.
<i>E. nordenskioldi</i> линия 9	Магаданская область, г. Магадан	3284	168	4
<i>Eisenia</i> sp. 1 линия 1	Новосибирская область, с. Китерня	2351	124	4
	Свердловская область, с. Хомутовка	2664	128	4
<i>Eisenia</i> sp. 1 линия 2	Республика Алтай, база Бирюзовая Катунь	343	30	4
<i>Eisenia</i> sp. 1 линия 3	Кемеровская область, с. Кузедеево	2746	126	3
	Кемеровская область, с. Золотой Китат	3499	227	4
	Алтайский край, с. Макарьевка	2780	9	4
	Новосибирская область, с. Китерня	3120	49	3
	Хабаровский край, с. Тигровое	3215	43	3
<i>Eisenia</i> sp. 1 f. <i>pallida</i> линия 1	Магаданская область, г. Магадан	2494	18	4
<i>Eisenia</i> sp. 1 f. <i>pallida</i> линия 2	Хабаровский край, с. Лесопильное	487	3	3
<i>Eisenia</i> sp. 1 f. <i>pallida</i> линия 6	Алтайский край, с. Макарьевка	269	28	3

Примечание. С. о. – стандартная ошибка; повт. – число повторностей.



Филогенетическое дерево, построенное для комплекса *E. nordenskioldi* на основе транскриптомных данных, из (Shekhovtsov et al., 2020b).

Серыми прямоугольниками показана непигментированная форма *pallida*. Цифры возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку метода максимальной правдоподобия/байесовскую апостериорную вероятность, звездочки – поддержку 100/1.0.

Результаты и обсуждение

В нашей работе получена информация о размерах ядерного генома для нескольких филогенетических линий комплекса *E. nordenskioldi* (см. таблицу и рисунок). Данные свидетельствуют о том, что в пределах комплекса наблюдается значительный разброс по размерам генома. Можно выделить две группы размеров: небольшие (250–500 м.п.н.) и крупные (2350–3500 м.п.н.) геномы. Небольшие геномы выявлены для двух непигментированных линий, *Eisenia* sp. 1 aff. *E. nordenskioldi*, и для пигментированной линии 2 того же вида. Крупные геномы (2350–3500 м.п.н.) были характерны для всех остальных филогенетических линий.

Результаты показали, что разные линии комплекса *E. nordenskioldi* имеют значительно различающиеся размеры генома. Это может объясняться тем, что они – действительно отдельные виды, о чем свидетельствуют генетические данные (Shekhovtsov et al., 2020 a, b), или же влиянием полиплоидии. Известно, что для *E. nordenskioldi* характерно существование нескольких рас различной плоидности, $2n$, $4n$, $6n$, $7n$, $8n$, с количеством хромосом от 36 до 142–152 соответственно (Viktorov, 1997). Диплоидный набор хромосом при этом присущ представителям непигментированной формы *pallida* (Viktorov, 1997; Всеволодова-Перель, Лейрих, 2014). Исходя из этого можно было бы предполагать, что непигментированные формы

E. nordenskioldi являются предковыми. Однако транскриптомные данные продемонстрировали (см. рисунок) (Shekhovtsov et al., 2020b), что такие формы вовсе не находятся в основании филогенетического дерева комплекса и его предковые формы, скорее всего, были пигментированными. Кроме того, одна из линий *pallida* имела крупный геном, а одна из пигментированных линий – небольшой геном. Таким образом, нельзя утверждать, что все непигментированные популяции диплоидны, а пигментированные – исключительно полиплоидны. Это подтверждается и филогенетическими данными, согласно которым линии *pallida* возникали несколько раз независимо.

Те же рассуждения можно применить и к размерам генома: более вероятно, что предки комплекса имели крупный геном. Этот геном, скорее всего, был диплоидным, так как большинство популяций вида способны к амфимиктическому размножению. Для вида *Eisenia* sp. 1 также наиболее вероятным будет предположение, что исходным состоянием был крупный геном, а в дальнейшем отдельные ветви (линии) претерпели уменьшение размеров генома.

Для двух филогенетических линий (линии 1 и 3 *Eisenia* sp. 1) было взято несколько популяций из разных географических точек. Проведенный анализ показал, что существует и значительная изменчивость размеров генома внутри линий, приблизительно 13 и 27 % соответственно. На рисунке продемонстрировано, что генетические расстояния между двумя популяциями линии 3 достаточно глубоки. Известно (Viktorov, 1997; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008), что у октаплоидных популяций *E. nordenskioldi* число хромосом может варьировать в относительно широких пределах. В этом случае мы можем предполагать сходный механизм.

У многих животных повышение пloidности приводит к увеличению размера тела (Otto, 2007). Для дождевых червей, однако, эта закономерность может не работать: Т.В. Малинина и Т.С. Перель (1984) не обнаружили различий в размере тела между расами *E. nordenskioldi* разной пloidности. В нашей работе мы не имели возможности измерить размеры тела, так как особи были полностью или большей частью измельчены в живом состоянии, однако грубые оценки показывают, что филогенетические линии с небольшим геномом отличались небольшим или средним размером тела (4–7 см в длину). В то же время линии с большими геномами могли быть как крупными (*Eisenia* sp. 1 линии 3 – до более 10 см в длину), так и среднего размера (5–10 см у остальных линий). Таким образом, хотя мы и не наблюдали четкой закономерности, можно предположить, что размеры ядерного генома в некоторой степени определяют размеры тела.

Заключение

В настоящей работе мы показали, что размеры ядерного генома у различных филогенетических линий комплекса *E. nordenskioldi* варьируют в широких пределах, что подтверждает глубину различий между ними, выявленную при помощи молекулярно-генетических методов. Кроме того, существует и изменчивость размеров генома внутри линий. В ходе эволюции комплекса, по всей видимости, происходило как увеличение, так и уменьшение размеров генома.

Список литературы / References

- Всеволодова-Перель Т.С. Дождевые черви России: кадастр и определитель. М.: Наука, 1997.
[Vsevolodova-Perel T.S. The Earthworms of the Russian Fauna: Cadaster and Key. Moscow: Nauka Publ., 1997. (in Russian)]
- Всеволодова-Перель Т.С., Булатова Н.Ш. Полиплоидные расы дождевых червей (Lumbricidae, Oligochaeta), распространенные в пределах Восточно-Европейской равнины и в Сибири. *Изв. РАН. Сер. биол.* 2008;4:448-452. DOI 10.1134/S1062359008040092.
[Vsevolodova-Perel T.S., Bulatova N.Sh. Polyploid races of earthworms (Lumbricidae, Oligochaeta) in the East European Plain and Siberia. *Biology Bulletin.* 2008;35(4):385-388. DOI 10.1134/S1062359008040092.]
- Всеволодова-Перель Т.С., Лейрих А.Н. Распространение и экология дождевого червя *Eisenia nordenskioldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae), массового на юге Сибири и Дальнего Востока. *Зоол. журн.* 2014;93:45-52. DOI 10.7868/S0044513414010206.
[Vsevolodova-Perel T.S., Leirikh A.N. Distribution and ecology of the earthworm *Eisenia nordenskioldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae) dominant in southern Siberia and the Russian Far Eastern. *Entomol. Rev.* 2014;94(4):479-485. DOI 10.1134/S0013873814040034.]
- Графодатский А.С., Перель Т.С., Раджабли С.И. Хромосомные наборы двух форм *Eisenia nordenskioldi* (Eisen.) (Oligochaeta, Lumbricidae). *Докл. АН СССР.* 1982;262:1514-1516.
[Grafodatsky A.S., Perel T.S., Radzhabli S.I. Chromosome sets of two forms of *Eisenia nordenskioldi* (Eisen.) (Oligochaeta: Lumbricidae). *Doklady Akademii Nauk SSSR = Reports of the Academy of Sciences of USSR.* 1982;262:1514-1516. (in Russian)]
- Жуков О.В., Пахомов О.Е., Кунах О.М. Біологічне різноманіття України. Дніпропетровська область. Дощові черв'яки (Lumbricidae). Дніпропетровськ: Вид-во Дніпропетр. Нац. ун-ту, 2007.
[Zhukov A.V., Pakhomov O.Ye., Kunach O.N. Biological Diversity of Ukraine. The Dnipropetrovsk region. Earthworms (Lumbricidae). Dnipropetrovsk, 2007. (in Ukrainian)]
- Малевиц И.И. К познанию дождевых червей Дальнего Востока. *Ученые записки МГПИ им. В.П. Потемкина.* 1956;61:439-449.
[Malevich I.I. On the study of earthworms in the Far East. *Uchenye Zapiski MGPI im. V.P. Potemkina = Transactions of the V.P. Potemkin Moscow City Pedagogical Institute.* 1956;61:439-449. (in Russian)]
- Малинина Т.В., Перель Т.С. Характеристика хромосомных рас *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae) с использованием биохимических маркеров. *Докл. АН СССР.* 1984;279:1265-1269.
[Malinina T.V., Perel T.S. Characterization of *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae) chromosome races using allozyme markers. *Doklady Akademii Nauk SSSR = Reports of the Academy of Sciences of USSR.* 1984;279:1265-1269. (in Russian)]
- Перель Т.С. Распространение и закономерности распределения дождевых червей фауны СССР. М.: Наука, 1979.
[Perel T.S. The Range and Regularities in the Distribution of Earthworms of the USSR Fauna. Moscow: Nauka Publ., 1979. (in Russian)]
- 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;21(5):588-595. DOI 10.18699/VJ17.24-о.
[Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Golovanova E.V., Peltek S.E. Genetic diversity of the earthworm *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017;21(5):588-595. DOI 10.18699/VJ17.24-о. (in Russian)]
- Alvarez-Fuster A., Juan C., Petitpierre E. Genome size in *Tribolium* flour-beetles: inter- and intraspecific variation. *Genet. Res.* 1991;58:1-5. DOI 10.1017/S0016672300029542.
- Berman D.I., Bulakhova N.A., Meshcheryakova E.N., Shekhovtsov S.V. Cold resistance and the distribution of genetic lineages of

- the earthworm *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Biol. Bull.* 2019;46:430-437. DOI 10.1134/S1062359019050042.
- Biéumont C. Genome size evolution: Within-species variation in genome size. *Heredity.* 2008;101:297-298. DOI 10.1038/hdy.2008.80.
- Blakemore R.J. Earthworms newly from Mongolia (Oligochaeta, Lumbricidae, *Eisenia*). *ZooKeys.* 2013;285:1-21. DOI 10.3897/zookeys.285.4502.
- Blommaert J. Genome size evolution: towards new model systems for old questions. *Proc. Royal Soc. B.* 2020;287:20201441. DOI 10.1098/rspb.2020.1441.
- Cavalier-Smith T. Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J. Cell Sci.* 1978;34:247-278.
- Galbraith D.W., Harkins K.R., Maddox J.M., Ayres N.M., Sharma D.P., Firoozabady E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science.* 1983;220:1049-1051.
- Galbraith D.W., Lambert G.M., Macas J., Dolezel J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *Curr. Protoc. Cytom.* 1997;2:6-7.
- Gregory T.R. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biol. Rev.* 2001;76:65-101. DOI 10.1111/j.1469-185X.2000.tb00059.x.
- Gregory T.R. Genome size evolution in animals. In: *The Evolution of the Genome.* San Diego: Elsevier, 2005;3-87. DOI 10.1016/B978-012301463-4/50003-6.
- Hong Y., Csuzdi C. New data to the earthworm fauna of the Korean peninsula with redescription of *Eisenia koreana* (Zicsi) and remarks on the *Eisenia nordenskioldi* species group (Oligochaeta, Lumbricidae). *Zool. Stud.* 2016;55:1-15. DOI 10.6620/ZS.2016.55-12.
- Jeffery N.W., Hultgren K., Chak S.T.C., Gregory T.R., Rubenstein D.R. Patterns of genome size variation in snapping shrimp. *Genome.* 2016;59:393-402. DOI 10.1139/gen-2015-0206.
- Kasai F., O'Brien P.C.M., Ferguson-Smith M.A. Reassessment of genome size in turtle and crocodile based on chromosome measurement by flow karyotyping: close similarity to chicken. *Biol. Lett.* 2012;8:631-635. DOI 10.1098/rsbl.2012.0141.
- Marescalchi O., Scali V., Zuccotti M. Flow-cytometric analyses of intraspecific genome size variations in *Bacillus atticus* (Insecta, Phasmatodea). *Genome.* 1998;41:629-635. DOI 10.1139/g98-064.
- Neiman M., Paczesniak D., Soper D.M., Baldwin A.T., Hehman G. Wide variation in ploidy level and genome size in a New Zealand freshwater snail with coexisting sexual and asexual lineages. *Evolution.* 2011;65:3202-3216. DOI 10.1111/j.1558-5646.2011.01360.x.
- Otto S.P. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell.* 2007;131:452-462. DOI 10.1016/j.cell.2007.10.022.
- Redi C.A., Zacharias H., Merani S., Oliveira-Miranda M., Aguilera M., Zuccotti M., Garagna S., Capanna E. Genome sizes in afrotheria, xenarthra, euarchontoglires, and laurasiatheria. *J. Hered.* 2005;96:485-493. DOI 10.1093/jhered/esi080.
- Shekhovtsov S.V., Bazarova N.E., Berman D.I., Bulakhova N.A., Golovanova E.V., Konyaev S.V., Krugova T.M., Lyubchanskii I.I., Peltek S.E. DNA barcoding: How many earthworm species are there in the south of West Siberia? *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017;7:57-62. DOI 10.1134/S2079059717010130.
- 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). *Eur. J. Soil Biol.* 2016a;75:151-156. DOI 10.1016/j.ejsobi.2016.06.004.
- 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 Biol.* 2018a;41:237-247. DOI 10.1007/s00300-017-2184-2.
- Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Bulakhova N.A., Makarova O.L., Peltek S.E. Phylogeography of earthworms from high latitudes of Eurasia. *Acta Zool. Acad. Sci. Hungaricae.* 2018b;64:369-382. DOI 10.17109/AZH.64.4.369.2018.
- Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Peltek S.E. Phylogeography of the earthworm *Eisenia nordenskioldi nordenskioldi* (Lumbricidae, Oligochaeta) in northeastern Eurasia. *Dokl. Biol. Sci.* 2015;461:85-88. DOI 10.1134/S0012496615020039.
- 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;19:50. 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.* 2020a;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. Mitochondrial DNA variation in *Eisenia n. nordenskioldi* (Lumbricidae) in Europe and Southern Urals. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp. Seq. Anal.* 2016b;27:4643-4645. DOI 10.3109/19401736.2015.1101594.
- 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. *Front. Genet.* 2020b;11:1508. DOI 10.3389/fgene.2020.598196.
- Shekhovtsov S.V., Sundukov Y.N., Blakemore R.J., Gongalsky K.B., Peltek S.E. Identifying earthworms (Oligochaeta, Megadrili) of the southern Kuril islands using DNA barcodes. *Anim. Biodivers. Conserv.* 2018c;41:9-17. DOI 10.32800/abc.2018.41.0009.
- Stelzer C.-P., Riss S., Stadler P. Genome size evolution at the speciation level: The cryptic species complex *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *BMC Evol. Biol.* 2011;11:90. DOI 10.1186/1471-2148-11-90.
- Thomas C.A.J. The genetic organization of chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* 1971;5:237-256.
- Viktorov A.G. Diversity of polyploid races in the family Lumbricidae. *Soil. Biol. Biochem.* 1997;29:217-221. DOI 10.1016/S0038-0717(96)00086-7.

ORCID ID

S.V. Shekhovtsov orcid.org/0000-0001-5604-5601
Ya.R. Efremov orcid.org/0000-0002-0649-7543
T.V. Poluboyarova orcid.org/0000-0002-5652-0553
S.E. Peltek orcid.org/0000-0002-3524-0456

Благодарности. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00661_а, бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № 0259-2021-0010 и Курчатовским геномным центром ИЦиГ СО РАН (075-15-2019-1662). Секвенирование ампликонов ДНК проведено в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск). Авторы выражают глубокую благодарность Д.И. Берману, Н.А. Булаховой и Е.В. Головановой за предоставленные образцы дождевых червей.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.02.2021. После доработки 30.03.2021. Принята к публикации 31.03.2021.