Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):125-130
DOI 10.18699/VJ15.110

ДНК-штрихкодирование: сколько видов дождевых червей живет на юге Западной Сибири?

С.В. Шеховцов[1], Н.Э. Базарова[1, 2], Д.И. Берман[3], Н.А. Булахова[3, 4], Е.В. Голованова[5], С.В. Коняев[6], Т.М. Кругова[7], И.И. Любечанский[6], С.Е. Пельтек[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск, Россия
[3] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук», Магадан, Россия
[4] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия
[5] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный педагогический университет», Омск, Россия
[6] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия
[7] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный природный заповедник "Тигирекский"», Барнаул, Россия

Дождевые черви – широко распространенная и экологически важная группа. Представители ее занимают первое место по суммарной биомассе в некоторых экосистемах и зачастую определяют видовой состав всей почвенной фауны. В ряде работ зарубежных исследователей было показано, что для дождевых червей характерна значительная скрытая генетическая изменчивость. В некоторых случаях внутри одного морфологического вида обнаруживается несколько видов-двойников. В данной работе была сделана попытка оценить видовое разнообразие дождевых червей юга Западной Сибири с помощью метода ДНК-штрихкодирования (DNA barcoding). ДНК-штрихкодирование заключается в использовании коротких фрагментов генома для идентификации видов и позволяет работать с образцами, которые не могут быть достоверно определены традиционными способами, а также находить новые виды и приблизительно устанавливать их систематическое родство. В качестве целевой последовательности был взят фрагмент митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (*cox1*) длиной 658 п. н., амплифицированный при помощи универсальных праймеров. Считается, что на изучаемой территории (Новосибирская и Томская области, Алтайский край, Республика Алтай) обитает 16 видов и подвидов дождевых червей; все они относятся к семейству Lumbricidae. Проанализировано 259 особей дождевых червей из 12 географических пунктов. Обнаружено 27 генетических кластеров, 10 из которых соответствуют видам *A. caliginosa*, *E. fetida*, *O. tyrtaeum*, *D. r. tenuis*, *D. octaedra*, *E. balatonica*, *E. sibirica*, а также трем ранее известным генетическим линиям *E. nordenskioldi nordenskioldi*. Последовательности 17 из 27 кластеров не имеют сходства с известными видами дождевых червей. Часть червей новых кластеров морфологически близка к группе видов *Eisenia n. nordenskioldi* / *E. n. pallida* и, скорее всего, представляет новые генетические линии этого комплекса. Некоторые кластеры, вероятно, являются новыми, ранее не обнаруженными, видами. Таким образом, значительная часть разнообразия дождевых червей юга Западной Сибири еще не охарактеризована.

Ключевые слова: дождевые черви; Lumbricidae; Западная Сибирь; ДНК-штрихкодирование; *cox1*; цитохромоксидаза 1.

DNA barcoding: how many earthworm species are there in the south of West Siberia?

S.V. Shekhovtsov[1], N.E. Bazarova[1, 2], D.I. Berman[3], N.A. Bulakhova[3, 4], E.V. Golovanova[5], S.V. Konyaev[6], T.M. Krugova[7], I.I. Lyubechanskii[6], S.E. Peltek[1]

[1] Instutute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State Agricultural University, Novosibirsk, Russia
[3] Institute of Biological Problems of the North FEB RAS, Magadan, Russia
[4] Tomsk State University, Tomsk, Russia
[5] Omsk State Pedagogical University, Omsk, Russia
[6] Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russia
[7] Tigirek State Natural Reserve, Barnaul, Russia

Earthworms are a widespread and ecologically important group of animals, which has the highest total biomass in some ecosystems and often defines the composition of soil fauna. Earthworms are known to have high cryptic genetic diversity. In this study we attempted to estimate earthworm species diversity in the south of West Siberia by DNA barcoding. This method employs short fragments of the genome to identify species, and allows one to work with specimens that cannot be identified by conventional techniques, as well as to search for new species and predict their phylogenetic affinities. As the target sequence we took a fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase 1 (*cox1*) gene. The studied territory (Novosibirsk and Tomsk oblasts, Altai krai, and the Altai Republic) is known to contain 16 species and subspecies of earthworms. We analyzed 259 individuals from twelve locations and detected 27 genetic clusters. Ten of them correspond to known species (*A. caliginosa*, *E. fetida*, *O. tyrtaeum*, *D. r. tenuis*, *D. octaedra*, *E. balatonica*, *E. sibirica*, as well as three genetic lineages of E. nordenskioldi nordenskioldi). Seventeen of the 27 clusters do not have close sequence similarity to any known earthworm species. Representatives of some of these novel clusters are morphologically similar to the *Eisenia n. nordenskioldi* /

УДК 575.858
Поступила в редакцию 25.09.2015 г.
Принята к публикации 20.10.2015 г.
Опубликована онлайн 15.12.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: shekhovtsov@bionet.nsc.ru

E. n. pallida species complex and may belong to new genetic lineages of this complex. The rest of the novel clusters probably represent new earthworm species. Therefore, we can conclude that a large portion of earthworm biodiversity in the south of West Siberia is still unexplored.

Keywords: earthworms; Lumbricidae; West Siberia; DNA barcoding; *cox1*; cytochrome oxidase.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

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;20(1):125-130. DOI 10.18699/VJ15.110

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shekhovtsov S.V., Bazarova N.E., Berman D.I., Bulakhova N.A., Golovanova E.V., Konyaev S.V., Krugova T.M., Lyubechanskii I.I., Peltek S.E. DNA barcoding: how many earthworm species are there in the south of West Siberia? Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):125-130. DOI 10.18699/VJ15.110

Дождевые черви, как известно, – важная в экологическом отношении группа. Мировая фауна содержит относительно немного видов, около 3 700 (Hendrix et al., 2008), из которых в России обнаружены только 47 (Всеволодова-Перель, 1997). Одна из причин столь малого разнообразия – небольшое число морфологических диагностических признаков, что связано с образом жизни червей. Обитание в почве накладывает ограничения на морфологическую изменчивость. Диагностическими признаками для дождевых червей служат положение пояска и половых отверстий, форма головной лопасти, число и расположение (сближенность) щетинок, иногда размер и окраска тела. Зачастую эти признаки эволюционируют конвергентно у разных видов и групп, и напротив, возможна значительная внутривидовая изменчивость.

Самая полная и наиболее часто используемая сводка по дождевым червям нашей страны – кадастр дождевых червей России – составлена Т.С. Всеволодовой-Перель (1997). В этом источнике для азиатской России приводится 28 видов и подвидов дождевых червей. На рассматриваемой в данной работе территории (Новосибирская и Томская области, Алтайский край, Республика Алтай) обитает 16 видов дождевых червей. Все они относятся к семейству Lumbricidae. Восемь из них – инвазивные виды-космополиты (*Allolobophora parva*, *Dendrodrilus rubidus tenuis*, *D. r. subrubicundus*, *Octolasion tyrtaeum* (= *O. lacteum*), *Aporrectodea caliginosa*, *Dendrobaena octaedra*, *Eiseniella tetraedra* и *Eisenia fetida*). Для Западной Сибири указаны также *Lumbricus terrestris*, *L. castaneus*, *L. rubellus* и *Aporrectodea rosea* (Стриганова, Порядина, 2005); однако, по мнению Т.С. Всеволодовой-Перель, обнаружение двух последних видов является ошибкой определения. Четыре вида рода *Eisenia* (*E. malevici*, *E. altaica*, *E. salairica* и *E. tracta*) – эндемики Алтая и Салаирского кряжа. Оставшиеся пять видов – это близкородственная группа *Eisenia n. nordenskioldi*/*E. n. pallida*/*E. atlavinyteae*, широко распространенная по всей Сибири, а также более редкие виды *E. sibirica* и *E. balatonica*.

Нельзя не отметить резкий контраст между весьма небольшим видовым разнообразием (по сравнению с большинством других групп животных, распространенных на той же территории) и огромной общей биомассой и экологической значимостью этой группы.

Между тем уже одна из первых работ, проведенных на дождевых червях методами ДНК-штрихкодирования (DNA barcoding) (King et al., 2008), показала, что для большинства видов характерна весьма значительная скрытая изменчивость. В пределах нескольких широко распространенных видов, исследованных King с коллегами, было найдено от двух до пяти криптических генетических линий, заметно отличающихся друг от друга: число попарных замен между этими линиями составляло до 22 %. Подобная картина была обнаружена и в последующих исследованиях как на отдельных видах дождевых червей, так на обширных их выборках (Peréz-Losada et al., 2012; Porco et al., 2013).

ДНК-штрихкодирование заключается в использовании коротких фрагментов генома для идентификации видов (Hebert et al., 2003). Наиболее часто используемая для ДНК-штрихкодирования последовательность у животных – митохондриальный ген цитохромоксидазы 1 (*cox1*, COI). Этот метод очень полезен при исследовании образцов, которые не могут быть достоверно определены традиционными способами, например, ювенильных особей, коконов (Richard et al., 2010), фрагментов организмов или же следов их жизнедеятельности (фекалии, содержимое желудка и т. д.), ДНК, выделенной из образцов почвы (Bienert et al., 2012). Применяется он также и для групп, содержащих большое количество трудно определяемых видов, или же для таких, систематика которых плохо разработана. ДНК-штрихкодирование имеет более ограниченные задачи, чем молекулярная филогения, которые не включают в себя исследование взаимоотношений между видами или уточнение их систематического положения (Waugh, 2007). Тем не менее метод в некоторых случаях позволяет находить новые виды и приблизительно устанавливать их систематическое родство. Хотя само по себе ДНК-штрихкодирование не может лежать в основе таксономических исследований, оно позволяет идентифицировать предполагаемые новые виды (Decaëns et al., 2013). Например, в работе по фауне дождевых червей Новой Зеландии (Buckley et al., 2011) авторы на основании результатов ДНК-штрихкодирования предположили существование 50 новых видов дождевых червей, что составляет около 1/4 от известной фауны этой группы на данной территории.

Таблица 1. Использованные образцы дождевых червей

Место сбора образцов	Число особей, *n*	Число кластеров, Ncl
с. Подгорное, Чаинский р-н, Томская обл.	28	5
Новосибирск, Новосибирская обл.	56	7
с. Дубровка, Маслянинский р-н, Новосибирская обл.	27	5
с. Темиртау, Таштагольский р-н, Кемеровская обл.	12	2
с. Макарьевка, Солтонский р-н, Алтайский край	32	9
г. Мустаг, Таштагольский р-н, Кемеровская обл.	4	3
р. Мухор-Черга, Шебалинский р-н, Республика Алтай	4	1
с. Артыбаш, Турочакский р-н, Республика Алтай	38	3
г. Эвречала, Турочакский р-н, Республика Алтай	8	3
г. Сарлык, Шебалинский р-н, Республика Алтай	5	2
Государственный природный заповедник «Тигирекский», Краснощековский р-н, Алтайский край	31	7
с. Чарышское, Чарышский р-н, Алтайский край	14	1

В нашей работе была поставлена задача – изучить генетическое разнообразие дождевых червей на территории юга Западной Сибири при помощи метода ДНК-штрихкодирования. С этой целью была собрана коллекция червей из ряда географических точек и проведено секвенирование фрагмента митохондриального гена *cox1*. Полученные последовательности сравнивали с нашей базой данных надежно определенных видов дождевых червей, а также базами данных GenBank и BOLD.

Материалы и методы

Образцы дождевых червей были собраны в 2011–2015 гг. в различных точках Западной Сибири (табл. 1, рис. 1). Выборки включали как половозрелых, так и ювенильных особей. Для ряда половозрелых животных было проведено морфологическое определение.

ДНК выделяли из нескольких сегментов заднего конца тела при помощи наборов фирмы BioSilica (г. Новосибирск). Для амплификации фрагмента митохондриального гена *cox1* применяли универсальные праймеры: прямой LCO1490m (5′-TACTC-AACAA-ATCAC-AAAGA-TATTG-G-3′), указанный в статье Folmer с коллегами (2014) с модификациями, и обратные HCO2198 (5′-TAAAC-TTCAG-GGTGA-CCAAA-AAATC-A-3′) (Folmer et al., 1994) и COI-E- (5′-TATAC-TTCTG-GGTGT-CCGAA-GAATC-A-3′) (Bely, Wray, 2004). Использовали следующий профиль амплификации: 2 мин при 94 °C; 5 циклов: 20 с при 94 °C; 20 с при 45 °C; 50 с при 72 °C; 33 цикла: 20 с при 94 °C; 20 с при 55 °C; 50 с при 72 °C.

Секвенирование фрагментов гена *cox1* проводили при помощи набора BigDye 3.1 фирмы Applied Biosystems (США). Капиллярный электрофорез был выполнен в Коллективном центре секвенирования СО РАН (г. Новосибирск). Ручная обработка полученных последовательностей была проведена в программе Chromas. Для построения филогенетических деревьев применяли программу Mega v. 5.0 (Tamura et al., 2011). Поиск родственных последовательностей проводился в базах данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) и BOLD (www.boldsystems.org). Для построения деревьев методом минимальной эволюции использовали модель замен Kimura-2-parameter. Генетические дистанции для анализа *K*/θ были вычислены при помощи программы Mega v. 5.0 (Tamura et al., 2011).

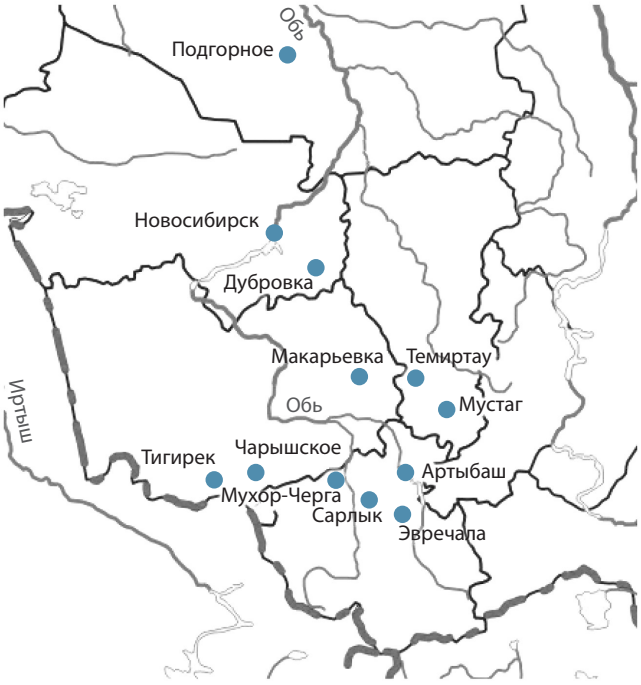

Рис. 1. Точки сбора образцов.

В данной работе объединены результаты ДНК-штрихкодирования 259 образцов дождевых червей из 12 точек юга Западной Сибири. В качестве источника референсных

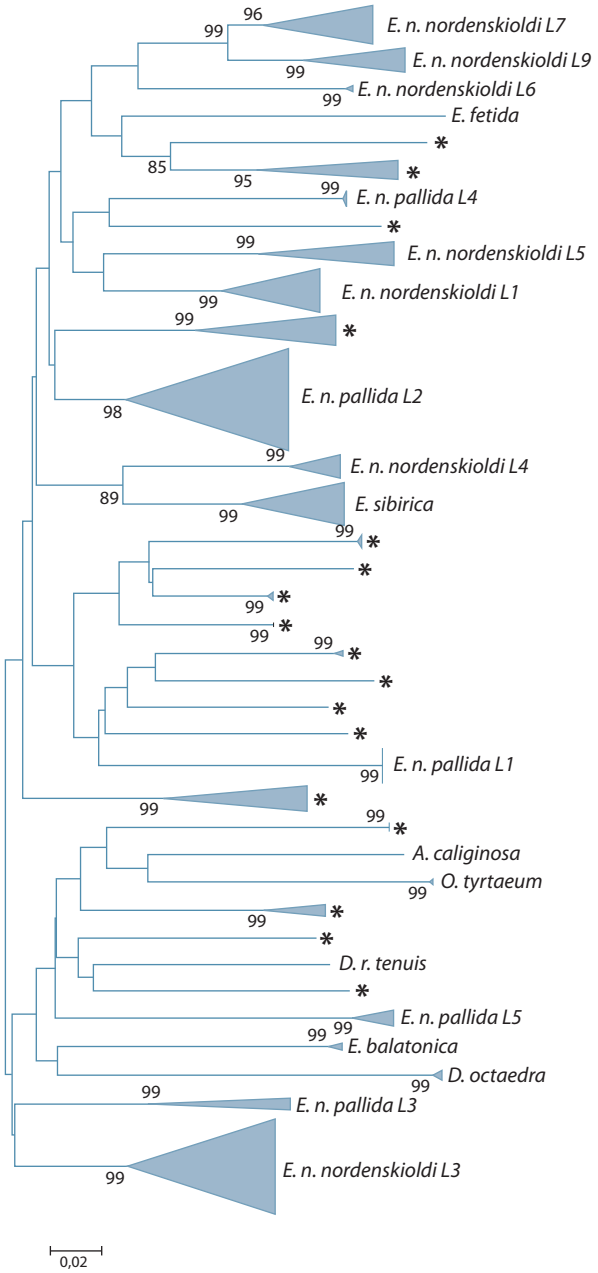

Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям гена *cox1* методом минимальной эволюции.

Цифры возле ветвей обозначают бутстрепную поддержку. Каждый кластер обозначен треугольником, основание которого пропорционально количеству образцов, а высота – размаху нуклеотидной изменчивости. Звездочками отмечены новые кластеры, обнаруженные в данной работе. Для *E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida* указаны номера генетических линий.

последовательностей использованы базы данных GenBank и BOLD, а также надежно определенные образцы некоторых видов дождевых червей с территории России (*E. n. nordenskioldi*, *E. n. pallida*, *E. sibirica*, *E. balatonica*, *E. fetida*, *D. r. tenuis*, *D. r. subrubicundus*, *O. tyrtaeum*, *D. octaedra*, *A. caliginosa*, *A. trapezoides*, *A. rosea*, *L. rubellus*) (Shekhovtsov et al., 2013, 2014a, b, 2015).

Результаты и обсуждение

Результаты филогенетического анализа представлены на рис. 2. Известно, что на деревьях, построенных по последовательностям митохондриальной ДНК, как правило, не выделяются ветви, соответствующие таксонам надвидового ранга (Pop et al., 2007; Chang, James, 2011; James, Davidson, 2012), что обусловлено высокой скоростью эволюции последовательностей митохондриальной ДНК у дождевых червей. Многие роды и даже семейства на таких деревьях оказываются полифилетичными. По этой причине принято считать, что митохондриальная ДНК полезна для выявления новых видов дождевых червей, но непригодна для исследования филогенетических взаимоотношений в группе.

В связи с этим кластеризацию проводили следующим образом: кластером, соответствующим одной операционной таксономической единице (Operational Taxonomic Unit, OTU), считали ветвь с бутстрепной поддержкой не менее 95, которая не объединяется с какой-либо другой ветвью на дереве с бутстрепной поддержкой более 90. Исключение было сделано для генетических линий *E. n. nordenskioldi* 7 и 9, а также *E. n. nordenskioldi* линии 4 и *E. sibirica* (см. рис. 2), ареалы которых заметно отличаются, что дает основание предполагать значительные биологические различия.

В выборке обнаружено 27 кластеров. Семь из них относились к известным видам (*A. caliginosa*, *E. fetida*, *E. balatonica*, *E. sibirica*, *O. tyrtaeum*, *D. r. tenuis*, *D. octaedra*). Три известных в Западной Сибири вида-космополита (*E. tetraedra*, *D. r. subrubicundus*, *A. parva*) мы не нашли, скорее всего, в связи с тем, что характерные для них биотопы не были обследованы. Также не удалось обнаружить ни одного достоверно определенного алтайского эндемика. Три кластера соответствовали генетическим линиям *E. n. nordenskioldi*, характерным для данного региона (Shekhovtsov et al., 2013). Оставшиеся 17 из 27 кластеров не имели близкого сходства ни с одной из ранее изученных последовательностей ДНК дождевых червей (табл. 2).

Одним из методов анализа валидности выделения видов на основании последовательностей ДНК является метод K/θ, или «правило 4» (4× rule) (Birky et al., 2010). Изначально он был разработан для организмов с бесполым размножением, однако может применяться и в тех случаях, когда изучаемые популяции изолированы и не могут обмениваться генами (что, очевидно, можно допустить для дождевых червей с их слабой способностью к миграциям). Этот подход был использован, например, при анализе комплекса видов *A. caliginosa* (Fernández et al., 2012). Автор метода K/θ показал, что генетические кластеры можно с 95 %-й вероятностью считать разными видами в том случае, если они дивергировали $4 \times Ne$ поколения назад, где Ne – эффективная численность популяций. Оценить этот параметр можно, вычислив отношение K/θ, где K – генетическое расстояние между кластерами, а θ – внутри кластеров. Таким образом, для того, чтобы считать кластеры разными видами, отношение K/θ должно быть больше 4.

По данным нашего анализа, правило это выполнялось для 20 из 26 впервые обнаруженных кластеров. Исключениями были линии 2 и 3 в пределах подвида *E. n. pallida*,

линии 1, 5 и 9 *E. n. nordenskioldi*, а также один из впервые обнаруженных кластеров (Тигирек + Чарышское + Сарлык). Очевидно, что отношение K/θ зависит от степени выявленной генетической изменчивости внутри кластера. Birky с коллегами отмечали, что оценка проводится на основании небольшой выборки из очень больших популяций (Birky et al., 2010). В нашем случае было изучено несколько популяций, находящихся на большом расстоянии друг от друга. Следствием этого было разделение кластеров на несколько ветвей, для которых правило $K/\theta > 4$ выполнялось. Так, кластер Тигирек + Чарышское + Сарлык разделился на два: Тигирек + Чарышское и Сарлык. Линии *E. n. pallida* и *E. n. nordenskioldi* также разделились на несколько субкластеров. Таким образом, использование метода K/θ приводит к увеличению количества выделяемых генетических кластеров.

Черви, относящиеся к 9 из 17 кластеров, были морфологически сходны с группой *E. n. nordenskioldi / E. n. pallida*. По нашим данным, на территории России обитают девять генетических линий *E. n. nordenskioldi* (четыре из них в регионе, охватываемом данной работой) и пять линий *E. n. pallida* (лишь одна из них обнаружена в Западной Сибири). Эти линии имеют различия как по митохондриальной, так и по ядерной ДНК, для них характерны значительно различающиеся ареалы. Принимая во внимание высокую генетическую изменчивость комплекса *E. nordenskioldi* (Shekhovtsov et al., 2013), можно предположить, что некоторые из обнаруженных кластеров могут представлять собой новые линии этого комплекса видов.

Можно ли считать, что выявленные кластеры соответствуют видам дождевых червей? По данным анализа Hebert с коллегами (2003), для кольчатых червей характерен более высокий уровень дивергенции последовательной мтДНК между видами одного рода по сравнению с другими животными. Для 70 % родов характерна дивергенция последовательностей *cox1* разных видов свыше 16 %. По данным тех же авторов, степень внутривидовой изменчивости редко превышает 2 %. Однако уровни попарной дивергенции между генетическими линиями *E. nordenskioldi* составляют от 16 до 29 %. Генетическая изменчивость внутри линий этого вида, для которых имеются данные по достаточному количеству популяций, превышает 5 % и доходит у линии 2 *E. n. pallida* до 8,6 %. Таким образом, если судить по степени изменчивости мтДНК, то обнаруженные нами кластеры уверенно можно считать отдельными видами.

Между тем представители значительно различающихся митохондриальных генетических линий одного вида могут в некоторых случаях не иметь существенных различий по ядерным маркерам, что показано, например, для *L. rubellus* (Giska et al., 2015), а также, по нашим данным, для линий 2 и 3 *E. n. pallida*. Таким образом, существование предполагаемого нового вида дождевых червей необходимо подтверждать и при помощи ядерных маркеров.

Хотя метод ДНК-штрихкодирования не может дать окончательный ответ на то, сколько же всего видов дождевых червей обитает на юге Западной Сибири, полученные данные показывают, что видовое разнообразие дождевых червей юга Западной Сибири может быть значимо выше, чем принято считать на основании данных традиционного морфологического анализа. Даже весьма ограниченная выборка из небольшого числа географических точек позволила уверенно выявить 17 новых генетических кластеров дождевых червей. Они, по-видимому, соответствуют новым таксонам, что позволяет удвоить ранее известное число видов с данной территории (с 16 до 33). Проведенная работа подтверждает представления о высокой криптической изменчивости дождевых червей и свидетельствует о перспективности дальнейших исследований в этом направлении.

Таблица 2. Новые кластеры *cox1*, обнаруженные в данной работе

n	Место сбора образцов
1	Артыбаш
5	Артыбаш
11	Артыбаш, Макарьевка, Эвречала
2	Макарьевка
2	Макарьевка
2	Макарьевка
4	Тигирек, Макарьевка
4	Тигирек
1	Тигирек
1	Тигирек
1	Тигирек
12	Тигирек, Сарлык, Чарышское
3	Тигирек, Мухор-Черга
1	Эвречала
1	Мустаг
1	Мустаг
1	Мустаг

n – число особей, митохондриальный гаплотип которых относится к данному кластеру.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю признательность Тамаре Семеновне Всеволодовой-Перель за определение части наших сборов.

Работа поддержана бюджетным финансированием (проект № VI.58.1.3), государственным заданием 6.1957.2014/К и грантом Президента Российской Федерации МК-6685.2015.4.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Список литературы

Всеволодова-Перель Т.С. Дождевые черви России: кадастр и определитель: М.: Наука, 1997.

Стриганова Б.Р., Порядина Н.М. Животное население почв бореальных лесов Западно-Сибирской равнины: М.: КМК, 2005.

Bely A.E., Wray G.A. Molecular phylogeny of naidid worms (Annelida: Clitellata) based on cytochrome oxidase I. Mol. Phylogenet. Evol. 2004;30:50-63. DOI 10.1016/S1055-7903(03)00180-5

Birky C.W. Jr., Adams J., Gemmel M., Perry J. Using population genetic theory and DNA sequences for species detection and identification in asexual organisms. PLoS One. 2010;5(5):10609. DOI 10.1371/journal.pone.0010609

Bienert F., De Danieli S., Miquel C., Coissac E., Poillot C., Brun J.-J. Tracking earthworm communities from soil DNA. Mol. Ecol. 2012; 21(8):2017-2030. DOI 10.1111/j.1365-294X.2011.05407.x

Buckley T.R., James S., Allwood J., Bartlam S., Howitt R., Prada D. Phylogenetic analysis of New Zealand earthworms (Oligochaeta: Megascolecidae) reveals ancient clades and cryptic taxonomic diversity. Mol. Phylogenet. Evol. 2011;58:e85-96. DOI 10.1016/j.ympev.2010.09.024

Chang C.-H., James S. A critique of earthworm molecular phylogenetics. Pedobiologia. 2011;54:S3-S9. DOI 10.1016/j.pedobi.2011.07.015

Decaëns T., Porco D., Rougerie R., Brown G.G., James S.W. Potential of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology. Appl. Soil Ecol. 2013;65:35-42. http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.01.001

Fernández R., Almodóvar A., Novo M., Simancas B., Díaz Cosín D.J. Adding complexity to the complex: New insights into the phylogeny, diversification and origin of parthenogenesis in the *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta, Lumbricidae). Mol. Phylogen. Evol. 2012;64(2):368-379. http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2012.04.011

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Marine Biol. Biotech. 1994;3:294-299.

Giska I., Sechi P., Babik W. Deeply divergent sympatric mitochondrial lineages of the earthworm *Lumbricus rubellus* are not reproductively isolated. BMC Evol. Biol. 2015;15:217. DOI 10.1186/s12862-015-0488-9

Hebert P.D.N., Ratnasingham S., deWaard J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. 2003;270:96-99. DOI 10.1098/rsbl.2003.0025

Hendrix P.F., Callaham M.A., Drake J.M., Huang C.-Y., James S.W., Snyder B.A., Zhang W. Pandora's box contained bait: the global problem of introduced earthworms. Ann. Rev. Ecol., Evol. Systematics. 2008;39:593-613. DOI 10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173426

James S.W., Davidson S.K. Molecular phylogeny of earthworms (Annelida : Crassiclitellata) based on 28S, 18S and 16S gene sequences. Invertebrate Systematics. 2012;26:213-229. http://dx.doi.org/10.1071/IS11012

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

Pérez-Losada M., Bloch R., Breinholt J.W., Pfenninger M., Domínguez J. Taxonomic assessment of Lumbricidae (Oligochaeta) earthworm genera using DNA barcodes. Eur. J. Soil Biol. 2012;48:41-47. DOI 10.1016/j.ejsobi.2011.10.003

Pop A.A., Cech G., Wink M., Csuzdi C., Pop V.V. Application of 16S, 18S rDNA and COI sequences in the molecular systematics of the earthworm family Lumbricidae (Annelida, Oligochaeta). Eur. J. Soil Biol. 2007;43:S43-S52. DOI 10.1016/j.ejsobi.2007.08.007

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

Richard B., Decaëns T., Rougerie R., James S.W., Porco D., Hebert P.D.N. Re-integrating earthworm juveniles into soil biodiversity studies: species identification through DNA barcoding. Mol. Ecol. Res. 2010;10(4):606-614. DOI 10.1111/j.1755-0998.2009.02822.x

Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Peltek S.E. Phylogeography of the Earthworm *Eisenia nordenskioldi* sub sp. *nordenskioldi* (Lumbricidae, Oligochaeta) in Northeastern Eurasia. Doklady Biological Sciences. 2015;461:1-4. DOI 10.1134/S0012496615020039

Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Cryptic diversity within the Nordenskiold'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. 2014a;57:245-250. http://dx.doi.org/10.1016/j.pedobi.2014.09.002

Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Invasive lumbricid earthworms of Kamchatka (Oligochaeta). Zoological Studies. 2014b;53:52. DOI 10.1186/s40555-014-0052-0

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 2011;28:2731-2739. DOI 10.1093/molbev/msr121

Waugh J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. BioEssays. 2007;29:188-197. DOI 10.1002/bies.20529