

Использование ИК-спектromетрии для изучения видовой принадлежности и разделения генетических линий на примере рода *Eisenia* Malm, 1877

С.Ю. Князев, К.А. Бабий, Д.В. Соломатин, А.С. Абраменко,
Е.В. Голованова

Омский государственный педагогический университет, г. Омск

Ключевые слова: дождевые черви, ИК-Фурье спектроскопия, таксономическая идентификация

Дождевые черви, являясь инженерами экосистем (Lavelle et al., 1997; Blouin et al., 2013), играют важную роль в почвенной среде и функционировании экосистем за счет перемешивания почвы, переработки опада и создания биогенных структур с особыми свойствами (Bottinelli et al., 2015; Van Groenigen et al., 2019). Их влияние на почву видоспецифично даже в пределах одной экологической группы (Sapowicz et al., 2015; Vos et al., 2019), поэтому идентификация видов дождевых червей необходима для правильного понимания их воздействия на функции почвы.

Наиболее распространенный способ идентификации – анатомо-морфологическое определение дождевых червей, которое требует определенной квалификации и при этом имеет ряд ограничений. Например, определение неполовозрелых и поврежденных особей часто невозможно, из-за чего они не учитываются в исследованиях (Richard et al., 2010). Также нельзя произвести разделения видов-двойников (генетических линий) (Marchan et al., 2018).

Молекулярные методы позволяют определить виды дождевых червей (Shekhovtsov et al., 2017) и идентифицировать криптические виды (Shekhovtsov et al., 2016). Но на практике используются эти методы не так часто из-за высокой стоимости, недоступности оборудования и реактивов, поэтому ведутся поиски альтернативных методов (Vaupel et al., 2022).

Инфракрасная спектроскопия оказалась очень полезным и эффективным инструментом для идентификации почвенных организмов (Bellon-Maurel and McBratney, 2011), к тому же не требующим дорогих расходных материалов (Raupach et al., 2016). Показана эффективность ИК спектromетрии для таксономической идентификации бабочек (Тао et al., 2018), мух дрозофил (Aw, Dowell, Ballard, 2012), прямокрылых (Da Silva, Gutjahr, De Morais, 2018), комаров (Sikulu, 2014), долгоно-

сиков (Johnson, 2022), термитов (Jouquet et al., 2018) и дождевых червей (Pham et al., 2021). Также определена возможность идентификации криптических видов муравьев (Kinzner et al., 2015). Эти работы свидетельствуют о том, что различия спектрального состава у особей могут быть связаны с химическим составом их тел, определяемым их видовой принадлежностью. Поэтому мы считаем возможным использовать ИК-спектроскопию как способ идентификации видов дождевых червей и их генетических линий.

На территории Западной Сибири и Урала дождевые черви широко представлены родом *Eisenia* (Всеволодова-Перель, 1997). Род интересен тем, что включает в себя комплекс видов *Eisenia nordenskioldi*, содержащий несколько линий видов двойников (Shekhovtsov et al., 2017 Shekhovtsov et al., 2020).

Цель исследования – изучение химического состава тел дождевых червей рода *Eisenia* методом инфракрасной спектроскопии для установления возможности его использования для идентификации видов и генетических линий.

Задачи:

1. Оценить различия ИК-спектров тел дождевых червей рода *Eisenia*;
2. Определить существуют ли общие закономерности деления видов по ИК-спектрам, генотипам и по морфо-анатомическим признакам;
3. Установить возможность разделения генетических линий дождевых червей методом ИК-спектроскопии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования послужили дождевые черви 9 видов рода *Eisenia*: *Eisenia atlavinyteae* Perel & Graphodatsky, 1984, *E. fetida* (Savigny, 1826), *E. nordenskioldi nordenskioldi* (Eisen, 1879), *E. nordenskioldi pallida* Malevic 1956, *E. sibirica* Perel et Graphodatsky, 1984, *E. angusta* Perel, 1994, *E. nana* Perel, 1985, *E. tracta* Perel, 1985, *E. ventripapillata* Perel, 1985. Дождевые черви были собраны на 6 участках: в окрестностях с. Чернолучье (Омский район, Омская область, N 55°16'33", E 73°02'35"), окрестности с. Екатерининское (Тарский район, Омская область, N 56°53'03" E 74°35'10"), на территории Парка культуры и отдыха имени 30-летия Победы (г. Омск, 54°57' N, 73°21' E), в окрестностях д. Хомутовки (городской округ Первоуральск, Свердловская область, N 56°51'37.7", E 59°46'02.8"), в окрестностях п. Большие поля (Омский район, Омская область, N 55°02'40.8", E 73°22'51.6"), в окрестностях с. Манжерок (Майминский район, Республика Алтай N 51°47'22.0", E 85°43'32.9"). Видовую идентификацию собранных червей проводили по определителю Т.С. Всеволодовой-Перель (1997) и материалам статьи Т.С. Перель (1985).

Для изучения состава тел дождевых червей мы поместили их в 18 двухлитровых пластиковых контейнеров с перфорированными крышками по два микрокосма на каждый вид. Микрокосмы были заполнены 1.5 л почвы, очищенной от макрофауны с помощью сит с диаметром ячейки 4 мм. Во всех микрокосмах в качестве подстилки использовалась сухая листва *Populus tremula* (L., 1753) по 9.00 ± 0.05 г. Таким образом, мы нивелировали влияние типа почвы и опада на состав тела червей. Почву в микрокосмах поливали одинаковым количеством дистиллированной воды, чтобы поддерживать влажность на уровне 50%.

В каждый микрокосм добавляли по 8 особей дождевых червей. В микрокосмах дождевые черви содержались в течение 90 суток, и каждые 30 дней производилась замена почвы. Затем их промывали дистиллированной водой. Для очистки кишечника содержали червей в течении пяти суток в отдельных контейнерах по 2 особи на фильтровальной бумаге, которую меняли по мере загрязнения. После этого их замораживали на 24 ч, заранее удалив последние сегменты тела, так как они часто содержали остатки почвы. Далее червей высушивали при температуре 60°C в течение 48 часов и потом измельчали в порошок. Всего было подготовлено по 6–12 образцов каждого вида.

Порошки исследовали в таблетках, спрессованных в смеси с бромистым калием (соотношение 1:100, диаметр 3.5 мм). В качестве опорного спектра использован спектр чистого бромистого калия, предварительного высушенного при температуре $\sim 600^\circ\text{C}$ в течение 6 часов.

ИК-спектры поглощения регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре «ФТ-801» (СИМЕКС) в диапазоне $500\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ (число сканов 32, разрешение 4 см^{-1}). В спектрах были удалены полосы, связанные с CO_2 интерференцией ($1800\text{--}2600\text{ см}^{-1}$). Для анализа данных были выбраны только спектры от 3500 до 500 см^{-1} , чтобы не учитывать шум на двух краях спектрального диапазона. Коррекция базовой линии и нормализация спектров произведена с использованием программного обеспечения ZaiR 3.5 (СИМЭКС).

Для статистической обработки и моделирования на всех спектрах определяли положение, интенсивность и площадь полос поглощения (ПП). Различия характеристик ПП видов дождевых червей проверяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим использованием попарного критерия Тьюки (Tukey HSD test) в программном пакете Statistica 13.0. Анализ методом главных компонент (PCA) и линейный дискриминантный анализ (LDA) были выполнены в программном пакете R.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Типичный ИК спектр червя рода *Eisenia* приведен на рис. 1.

В целом по функционально-групповому составу исследуемые виды близки. Дисперсионный анализ с последующим тестом Тьюки показал, что основные отличия наблюдаются для ПП 1080, 1154, 1236, 1316, 1454, 1544, 2929, 3079 см^{-1} при $P = 0.05$ (рис. 2).

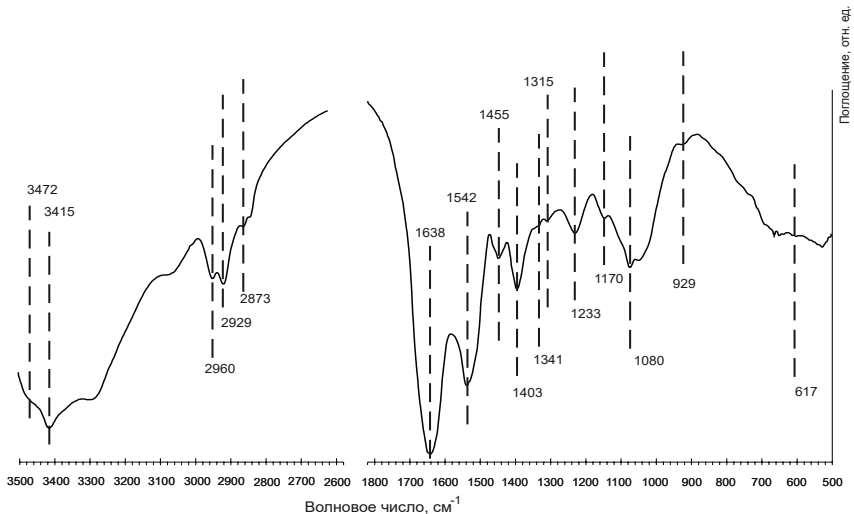


Рисунок 1. Типичный ИК-спектр дождевого червя рода *Eisenia*.

Анализ методом главных компонент по площадям пика показал, что разделение видов по спектральному составу тел по большей части согласуется с диагнозом, который был присвоен дождевым червям при морфо-анатомической идентификации. Ряд видов со сходным спектральным составом пересекаются на факторной плоскости, что может говорить об их родовой близости или они могут быть видами-двойниками.

На факториальной плоскости хорошо видно, что *E. fetida* хорошо отделен от остальных изученных представителей рода *Eisenia* (рис. 3). Отмеченная закономерность соотносится с результатами исследования Чузди с соавторами (2022), согласно которому род *Eisenia* содержит две клады: европейскую, в которую входит *E. fetida*, и азиатскую, включающую виды *E. nordenskioldi*, *E. tracta* и *E. nana*.

Вид *E. nordenskioldi* неоднократно пытались разделить на более мелкие таксоны из-за его морфологического, кариологического и экологического разнообразия (Shekhovtsov et al., 2020). Почвенный *E. n. pallida* получил статус непигментированного подвида *E. nordenskioldi* (Всеволодовой-Перель, 1997). В своем исследовании

С.В. Шеховцов с соавторами (2020) на основании генетических данных указывает, что непигментированные особи с диагнозом *E. n. pallida* относятся к нескольким генетическим линиям. По полученным нами данным спектральный состав тела *E. n. pallida* отличается от почвенно-подстилочной *E. nordenskioldi* (рис. 3).

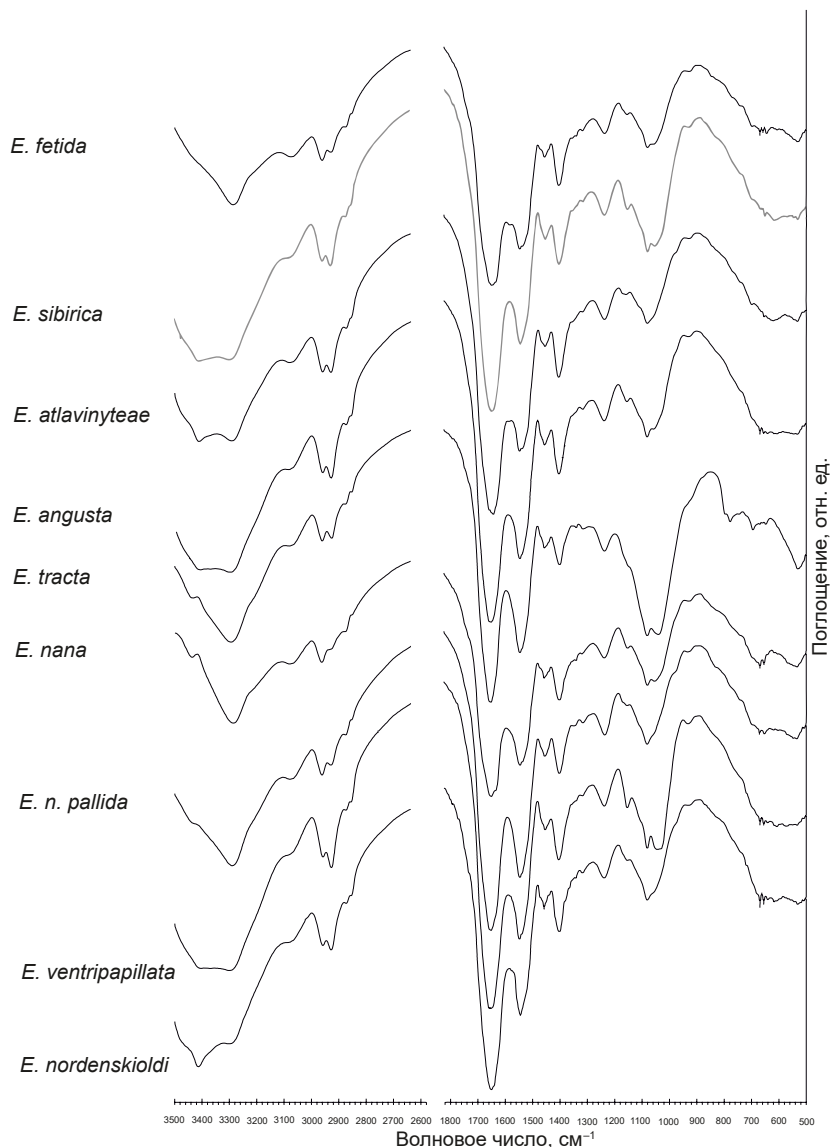


Рисунок 2. Примеры ИК спектров разных видов дождевых червей рода *Eisenia*.

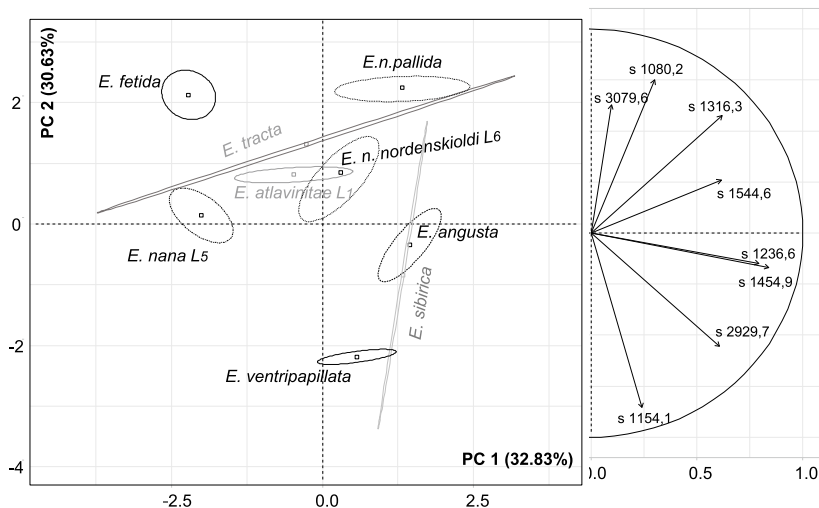


Рисунок 3. Разделение червей рода *Eisenia* по площади (*S*) полосы/пики методом главных компонент (PCA).

Согласно генетическому анализу (Shekhovtsov et al., 2017; Shekhovtsov et al., 2020) исследуемые нами *E. nana* и *E. nordenskioldi* относятся соответственно к 5 и 6 линии генетического комплекса *E. nordenskioldi*. По полученным нами спектральным данным *E. nana* и *E. nordenskioldi* различаются (рис. 3), как и их морфологическая структура. Голованова Е. В. относит их к двум разным видам (неопубликованные данные). Данный факт также подтверждают исследования Чузди с соавторами (2022), где *E. nana* рассматривается как отдельный вид. Экологические исследования воздействия *E. nana* и *E. nordenskioldi* на почву показало, что данные виды различно изменяют катионный состав (Бабий и др., 2021), а также определен разный ионный состав их копролитов (Babiy et al., 2021). Некоторое сходство химического состава тела *E. nana* и *E. tracta* выглядит закономерным, так как согласно данным Чузди с соавторами (2022) это два близкородственных вида, но чтобы сделать подобный вывод по спектральному анализу нужно увеличить размер выборки для *E. tracta*.

Сходство спектрального состава тела *E. nordenskioldi* и *E. atlavinyteae* говорит о том (рис. 3), что всё-таки *E. atlavinyteae* не представляет собой отдельный вид, что совпадает с данными генетического анализа (Shekhovtsov et al., 2020).

E. sibirica собрана в месте, где был отобран типовой экземпляр, поэтому не удивительно, что она сильно отличается по химическому составу тела от *E. nordenskioldi*, у которой встречаются особи с морфологией,

подходящей под диагноз *E. sibirica*. С другой стороны, выборка для *E. sibirica* была небольшой, поэтому для более точного диагноза необходимо провести дополнительные сборы и исследования.

Химический состав тела *E. ventripapillata* сильно отличается от состава других изученных представителей рода *Eisenia*, поэтому его статус отдельного вида очевиден и не подвергался сомнению ранее (Перель, 1985).

Для проверки возможности использования данных спектров ИК идентифицировать виды дождевых червей использовали линейный дискриминантный анализ (табл.). С этой целью весь набор данных, представленный 96 особями, был разделен по видам на две части, из которых (66% выборки) были отобраны для построения модели, а остальные 34% были использованы для оценки точности предсказания. Общая точность (количество правильных прогнозов/общее количество данных проверки) составила 83%, что указывает на приемлемую точность классификации (табл.).

Таблица. Матрицы с результатами дискриминантных моделей (LDA) для прогнозирования видовой принадлежности дождевых червей в проверочном наборе данных ($n = 6$ для *E. sibirica*, *E. tracta* и $n = 12$ для семи других видов)

Предсказанные	<i>E. angusta</i>	<i>E. atlavinitae</i>	<i>E. fetida</i>	<i>E. nana</i>	<i>E. n. nordenskioldi</i>	<i>E. sibirica</i>	<i>E. tracta</i>	<i>E. ventripapillata</i>	<i>E. n. pallida</i>
<i>E. angusta</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. atlavinitae</i>	0	1	0	0	2	0	0	0	0
<i>E. fetida</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>E. nana</i>	0	0	0	4	0	0	0	0	0
<i>E. n. nordenskioldi</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>E. sibirica</i>	0	2	0	0	0	3	0	0	0
<i>E. tracta</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0
<i>E. ventripapillata</i>	0	0	0	0	0	0	0	4	0
<i>E. n. pallida</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2

Примечание. Общая точность = 0.8314. Тестовая выборка (34%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инфракрасная спектроскопия может использоваться в качестве метода оценки таксономического статуса дождевых червей или служить дополнением к молекулярным методам. В частности, этим методом

можно проводить первичную оценку собранного материала дождевых червей и по полученным данным проводить отбор особей для дальнейшего генетического анализа.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (№ 22-14-20034).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бабий К.А., Князев С.Ю., Голованова Е.В., Абраменко А.С. Влияние экзотического *Eisenia nana* (Opisthopora, Lumbricidae) на катионный состав трех типов почв юга Западной Сибири (эксперимент в микрокосмах) // Russian Journal of Ecosystem Ecology. 2021. Vol. 6. № 3. Р. 1–12.
- Всеволодова-Перель Т.С. Дождевые черви фауны России: Кадастр и определитель. Москва: Наука, 1997. 102 с.
- Перель Т.С. Особенности фауны дождевых червей (Oligochaeta, Lumbricidae) в Алтайских рефугиумах неморальной растительности // Доклады академии наук СССР. 1985. Т. 283. № 3. С. 752–756.
- Aw W.C. Dowell F.E., Ballard J.W.O. Using near-infrared spectroscopy to resolve the species, gender, age, and the presence of *Wolbachia* infection in laboratory-reared *Drosophila* // G3 (Bethesda). 2012. Vol. 2. № 9. P. 1057–1065.
- Babiy K.A., Kniazev S.Yu., Golovanova E.V. et al. What determines ion content of Lumbricid casts: soil type, species, or ecological group? // Polish Journal of Ecology. 2021. Vol. 69. № 2. P. 96–110.
- Bellon-Maurel V., McBratney A. Near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopic techniques for assessing the amount of carbon stock in soils – critical review and research perspectives // Soil Biology and Biochemistry. 2011. Vol. 43. P. 1398–1410.
- Blouin M. et al. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services: earthworm impact on ecosystem services // European Journal of Soil Science. 2013. Vol. 64. P. 161–182.
- Bottinelli N., Jouquet P., Capowiez Y. et al. Why is the influence of soil macrofauna on soil structure only considered by soil ecologists? // Soil and Tillage Research. 2015. Vol. 146. P. 118–124.
- Capowiez Y., Bottinelli N., Sammartino S. et al. Morphological and functional characterisation of the burrow systems of six earthworm species (Lumbricidae) // Biology and Fertility of Soils. 2015. Vol. 51. P. 869–877.
- Csuzdi C., Koo J., Hong Y. The complete mitochondrial DNA sequences of two sibling species of lumbricid earthworms, *Eisenia fetida* (Savigny,

- 1826) and *Eisenia andrei* (Bouche, 1972) (Annelida, Crassieclitellata): comparison of mitogenomes and phylogenetic positioning // ZooKeys. 2022. Vol. 1097. P. 167–181.
- Da Silva R., Gutjahr A., De Morais J. Solving taxonomic Orthoptera problems by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): The case of *Aganacris* Walker, 1871 (Tettigoniidae: Phaneropterinae; Scudderini) // Zootaxa. 2018. Vol. 4461. P. 445–450.
- Johnson J.B. Discrimination of Goniapterini weevil genera using near infrared spectroscopy // Journal of Near Infrared Spectroscopy. 2022. Vol. 30. № 5. P. 264–269.
- Jouquet P., Pando A., Aroui H. et al. Evidence from mid-infrared spectroscopy (MIRS) that the biochemical fingerprints of *Odontotermes obesus* colonies change according to their geographical location and age // Insectes Sociaux. 2018. Vol. 65. P. 77–84.
- Kinzner M.C., Wagner H.C., Peskoller A. et al. A nearinfrared spectroscopy routine for unambiguous identification of cryptic ant species // PeerJ. 2015. Vol. 3. № e991. P. 1–19.
- Lavelle P., Bignell D. M. L., Wolters V. et al. Soil function in a changing world: The role of invertebrate ecosystem engineers // European Journal of Soil Science. 1997. Vol. 33. P. 159–193.
- Marchan D. F., Cosin D. J. D., Novo M. Why are we blind to cryptic species? Lessons from the eyeless // European Journal of Soil Biology. 2018. Vol. 86. P. 49– 51.
- Pham T., Rumpel C., Capowiez Y. et al. Mid-infrared spectroscopy of earthworm bodies to investigate their species belonging and their relationship with the soil they inhabit // Applied Soil Ecology. 2021. Vol. 162. 103894.
- Raupach M.J. Amann R., Wheeler Q. D., Roos C. The application of “-omics” technologies for the classification and identification of animals // Organisms Diversity & Evolution. 2016. Vol. 16. P. 1–12.
- Richard B., Decaens T., Rougerie R. et al. Reintegrating earthworm juveniles into soil biodiversity studies: species identification through DNA barcoding // Molecular Ecology Resources. 2010. Vol. 10. P. 606–614.
- Shekhovtsov S.V., Bazarova N.E., Berman D.I. et al. DNA barcoding: how many earthworm species are there in the south of West Siberia? // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2017. Vol. 7. № 1. P. 57–62.
- Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Bazarova N.E. et al. Cryptic genetic lineages in *Eisenia nordenskioldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae) // European Journal of Soil Biology. 2016. Vol. 75. P. 151–156.
- Shekhovtsov S.V., Shipova A.A., Poluboyarova T.V. et al. Species delimitation of the *Eisenia nordenskioldi* complex (Oligochaeta, Lumbricidae) using transcriptomic data // Frontiers in Genetics. 2020. Vol. 11(598196). P. 1–10.

- Sikulu M.T.* Non-destructive near infrared spectroscopy for simultaneous prediction of age and species of two major African malaria vectors: *An. gambiae* and *An. Arabiensis* // *NIR News*. 2014. Vol. 25. № 5. P. 4–6.
- Tao D., Wang Z., Li G., Qiu G.* Accurate identification of the sex and species of silkworm pupae using near infrared spectroscopy // *Journal of Applied Spectroscopy*. 2018. Vol. 85. P. 949–952.
- Van Groenigen J.W., Van Groenigen K.J., Koopmans, G.F. et al.* How fertile are earthworm casts? A meta-analysis // *Geoderma*. 2019. Vol. 338. P. 525–535.
- Vaupel A., Hommel B., Beule L.* High-resolution melting (HRM) curve analysis as a potential tool for the identification of earthworm species and haplotypes // *PeerJ*. 2022. Vol. 10. № e13661. P. 1–14.
- Vos H.M.J., Koopmans G.F., Beezemer L. et al.* Large variations in readily-available phosphorus in casts of eight earthworm species are linked to cast properties // *Soil Biology and Biochemistry*. 2019. Vol. 138. № 107583. P. 1–10.

УДК 574 (061.3)

Э 40

ИЭРиЖ
ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ



**Совет молодых
учёных ИЭРиЖ**

Экология: факты, гипотезы, модели. Материалы конф. молодых
Э 40 ученых, 17–21 апреля 2023 г. / ИЭРиЖ УрО РАН — Екатеринбург:
ООО Универсальная Типография «Альфа Принт», 2023. — 284 с.

В сборнике опубликованы материалы Всероссийской конференции молодых ученых «Экология: факты, гипотезы, модели», посвященной 90-летию со дня рождения профессора С.Г. Шиятова. Конференция проходила с 17 по 21 апреля 2023 г. на базе Института экологии растений и животных УрО РАН. Организаторами мероприятия выступили ИЭРиЖ УрО РАН, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина и Информационный центр по атомной энергии.

Работы участников конференции молодых ученых были представлены в форме устных и постерных докладов в рамках традиционного конкурса научных работ. Представленные исследования были посвящены проблемам дендрохронологии и структуре сообществ в контексте климатогенной и антропогенной динамики, многоуровневому изучению биоразнообразия, анализу ископаемых остатков и экологических закономерностей эволюции, выявлению механизмов инвазии чужеродных видов, а также популяционным аспектам экотоксикологии.

*В оформлении обложки использована фотография фотоконкурса конференции
Болдырева Степана Леонидовича.*

ISBN 978-5-9076897-0-8



9 785907 680708

© Авторы, 2023

© ИЭРиЖ УрО РАН, 2023

© ООО Универсальная Типография