

The first results of DNA barcoding of freshwater Oligochaeta (Annelida) of the European North-East of Russia

Original Article

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGYBaturina M.A.¹, Golubev M.A.^{1,2}, Bakashkina A.S.^{1,2}, Marchenko J.V.^{1,2}¹Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 28 Kommunisticheskaya st., 167982 Syktyvkar, Russia²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Pitirim Sorokin Syktyvkar State University», 55 Oktyabrsky Ave., 167001 Syktyvkar, Russia

ABSTRACT. Oligochaetes inhabiting freshwater ecosystems are considered promising indicators of ecological status due to their sensitivity to environmental changes. However, traditional identification based on morphological characteristics is often challenging. The application of molecular techniques, particularly DNA barcoding of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (*cox1*) gene, improves the accuracy of species identification and enhances our understanding of oligochaete genetic diversity. This study presents new data on taxonomic and genetic diversity of aquatic oligochaetes (Annelida, Clitellata) from various freshwater bodies in the European North-East of Russia. A discrepancy was revealed between morphological (17 species) and molecular (26 genetic lineages) differentiation of taxa. Significant cryptic diversity was recorded in *Tubifex tubifex* (Müller, 1774) and *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparède, 1862, which were subdivided into 11 genetic lineages, with maximum intraspecific *cox1* distances reaching up to 26.1%. The presence of *Tasserkidrilus kessleri* (Hrabě, 1962), identified through molecular data, was recorded for the first time in the Vychegda River basin. The results confirm the high effectiveness of molecular approaches for studying biodiversity in northern freshwater ecosystems and provide a foundation for the development of a regional reference library of DNA barcodes.

Keywords: aquatic oligochaetes, DNA barcoding, *cox1*, European North-East Russia

For citation: Baturina M.A., Golubev M.A., Bakashkina A.S., Marchenko J.V. The first results of DNA barcoding of freshwater Oligochaeta (Annelida) of the European North-East of Russia // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 4. - P. 414-427. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-4-414

1. Introduction

Freshwater oligochaetes (Annelida: Oligochaeta), owing to their high sensitivity to various types of anthropogenic impact, are widely utilized in the ecological monitoring of aquatic ecosystems (Rodriguez and Reynoldson, 2011; Lafont et al., 2010; 2012; Vivien et al., 2014). Of particular significance in this context is the study of water bodies in the Northern European Russia – an extensive region characterized by diverse natural conditions and the presence of unique aquatic ecosystems. Despite its relative remoteness from major industrial centers, many catchment areas have been subjected to the influence of local and regional forms of economic activity, including timber harvesting, mineral extraction, wastewater discharge, and hydrological regime alterations. The application of molecular identification methods holds promise as a tool for biodiversity inventory and monitoring the state of the region's aquatic ecosystems.

Among aquatic oligochaetes, particular attention is paid to the family Naididae – the most diverse and ecologically significant group (Timm, 2017). Representatives of this family are widely distributed in freshwater ecosystems worldwide, including waterbodies of the European North-East of Russia (Popchenko, 1988; Baturina, 2007; 2022; Baturina and Fefilova, 2021). The high ecological plasticity of Naididae, including varying levels of tolerance to pollution, makes them important targets for bioindication. Consequently, developing reliable molecular identification methods constitutes a key objective for enhancing environmental monitoring programs (Lafont et al., 2010; 2012; Vivien et al., 2019; 2020a; 2020b).

The widespread use of oligochaetes in routine ecological assessment is often limited by difficulties in their precise species-level identification based on morphological characteristics (Lévêque et al., 2005), which compromises the accuracy of bioindication assessments

*Corresponding author.

E-mail address: baturina@ib.komisc.ru (M.A. Baturina)

Received: July 23, 2025; **Accepted:** August 15, 2025;

Available online: August 31, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



(Vivien et al., 2017). Progress in addressing this issue has been facilitated by the implementation of DNA barcoding methods, primarily based on the analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase I (*cox1*) gene. Comparing standardized DNA fragments with reference libraries enables rapid and accurate species identification, independent of specimen condition, thereby overcoming the limitations of traditional morphological approaches (Rougerie et al., 2009; Kvist et al., 2010; Martinsson et al., 2013).

For several regions, DNA reference databases of Oligochaeta are currently being developed, for example, Switzerland (Vivien et al., 2017) and Sweden (Erséus et al., 2023), and China (Zhou et al., 2021). For other territories, including Russia, such resources remain extremely limited. Given the regional specificity of species composition in northern waters, establishing comprehensive regional DNA barcode libraries represents an urgent task. This necessitates primary research aimed at identifying oligochaete species diversity using modern genetic methods. Such data are essential both for the fundamental understanding of the region's biological diversity and for developing effective environmental monitoring tools.

The aim of this study is to present the first DNA barcoding data for freshwater oligochaetes (Annelida: Oligochaeta) from the European North-East of Russia.

2. Materials and methods

A defining characteristic of the landscapes within the European North-East of Russia is their high water saturation (Popchenko, 1988). Most of the samples in this study were collected from the Vychegda River basin (Fig. 1). The Vychegda River, the largest left tributary of the Severnaya Dvina (White Sea basin), flows through the taiga zone of the European North of Russia, within the territories of the Komi Republic and Arkhangelsk Oblast. Its total length is 1130 km, with a catchment area of 121 thousand km². The average density of the river network is 0.62 km/km². The total basin area comprises 122,770 km², and its geographical coordinates span latitudes from 59°55' to 64°30' N and longitudes from 46°30' to 55°30' E. Oligochaete samples were collected in various types of water bod-

ies and the main river channel, during May-July 2021-2024. Additionally, several samples were taken from the Severnaya Dvina River (61°17'6" N; 46°38'9" E) in July 2024 and from water bodies in the Polar Ural (66°48'25" N; 65°48'12" E) in July 2023.

Oligochaete samples were collected using a handle blade trawl (Zinchenko et al., 2014) on gravel or sand substrates. Specimens were fixed in a 96 % ethanol. Morphological analysis was conducted using the «Hardware and Software Complex of Microscopy and Microanalysis (MCView)» (LOMO-Microsystems, Russia) and a «Nexcope NIB950FL-DIC v2» microscope (Novel Optics, China). Oligochaete specimens were identified to the finest possible taxonomic level (species, where feasible). Species determinations were based on existing taxonomic keys (Chekanovskaya, 1962; Timm, 2009) in accordance with the current classification of each group. Voucher specimens were deposited at the Institute of Biology, Komi Science Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar.

Molecular genetic analysis of 151 oligochaete specimens was conducted based on nucleotide sequences of a fragment of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (*cox1*) gene. The last 10–15 segments of each worm were placed in 10 µL of a 6% Chelex 100 solution, proteinase K was added, and samples were incubated for 30 minutes at 55 °C, followed by 15 minutes at 99 °C. Amplification and sequencing of the *cox1* fragments were performed at the Center for Collective Use "Molecular Biology" of the Institute of Biology, Komi Science Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, with a portion of DNA samples sequenced at Sintol LLC (Moscow). PCR amplification utilized the ScreenMix HS PCR premix (Eurogen, Russia), universal Metazoa primers (Folmer et al., 1994; Prosser, 2013), and a T100 thermal cycler (BioRad, USA). The PCR protocol included an initial denaturation step at 94 °C for 5 minutes, followed by four cycles of 90 °C for 30 seconds, 45 °C for 60 seconds, and 72 °C for 90 seconds; then 30 cycles of 90 °C for 30 seconds, 55 °C for 45 seconds, and 72 °C for 60 seconds; and a final elongation step at 72 °C for 5 minutes. The resulting sequences were submitted to the international molecular database NCBI GenBank.



Fig.1. Sample point map. Marked in grey are the sampling locations.

The *cox1* sequences obtained in our study were compared with GenBank (NCBI) sequences. In cases of unidentified sequences, an additional search was performed using BLAST analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). All sequences have been registered in NCBI GenBank.

Initial processing of molecular data was performed using the Unipro UGENE software package (Okonechnikov et al., 2012). Nucleotide sequences were aligned using the ClustalO algorithm (Sievers et al., 2011). A phylogenetic tree with bootstrap support values (750 replicates) was constructed using the maximum likelihood method applying the optimal substitution model GTR + G + I, as calculated in MEGA X software (Nei and Kumar, 2000; Kumar et al., 2018). Genetic distances were also calculated in MEGA X using the Kimura 2-parameter (K2P) model (Kimura, 1980) for the purpose of comparison with previously published (Vivien et al., 2015; Vivien et al., 2017; Liu et al., 2017; Zhou et al., 2021).

Species delimitation was performed using the hierarchical clustering algorithm ASAP and ABGD (<https://spartexplorer.mnhn.fr>) with default settings. The final phylogenetic tree was edited using ITOL (<https://itol.embl.de>), where samples belonging to the same genetic cluster were grouped together. On the illustrated trees, the bootstrap values higher than 70 % are shown.

3. Results

A total of 151 oligochaete worm specimens from diverse aquatic habitats – including small lakes; small, medium, and large rivers – were sequenced. Morphological analysis assigned the specimens to two families: 149 to Naididae (11 – subfamily Naidinae, 138 – subfamily Tubificinae), 2 to Lumbriculidae (Table 1). Seventeen species were identified in total. The most abundantly represented taxa were: *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparède, 1862 (73 specimens), *Tubifex tubifex* (Müller, 1774) (34 specimens), and *Limnodrilus udekemianus* Claparède, 1862 (8 specimens) (Table 1).

Intraspecific genetic distances among the studied specimens exhibited considerable variation. The highest divergence was recorded for *Tubifex tubifex* (up to 26.1%), *Limnodrilus hoffmeisteri* (up to 25.7%), and *Limnodrilus udekemianus* (up to 13.5%). Conversely, the lowest distances (<1%) were observed in *Tasserkidrilus kessleri* (0.3%) and *Potamothenix hammoniensis* (0.7%).

Based on the dataset partitioning using the ASAP algorithm of the data set (151 specimens, 17 species) delineated 26 robust genetic groups (Table 1, Fig. 2). Delimitation with the ABGD algorithm yielded, in our view, overestimated results, recovering 34 groups within the same dataset. Therefore, subsequent discussion relies on the ASAP results (Table 1, Fig. 2). Compared to morphological identifications, *T. tubifex*

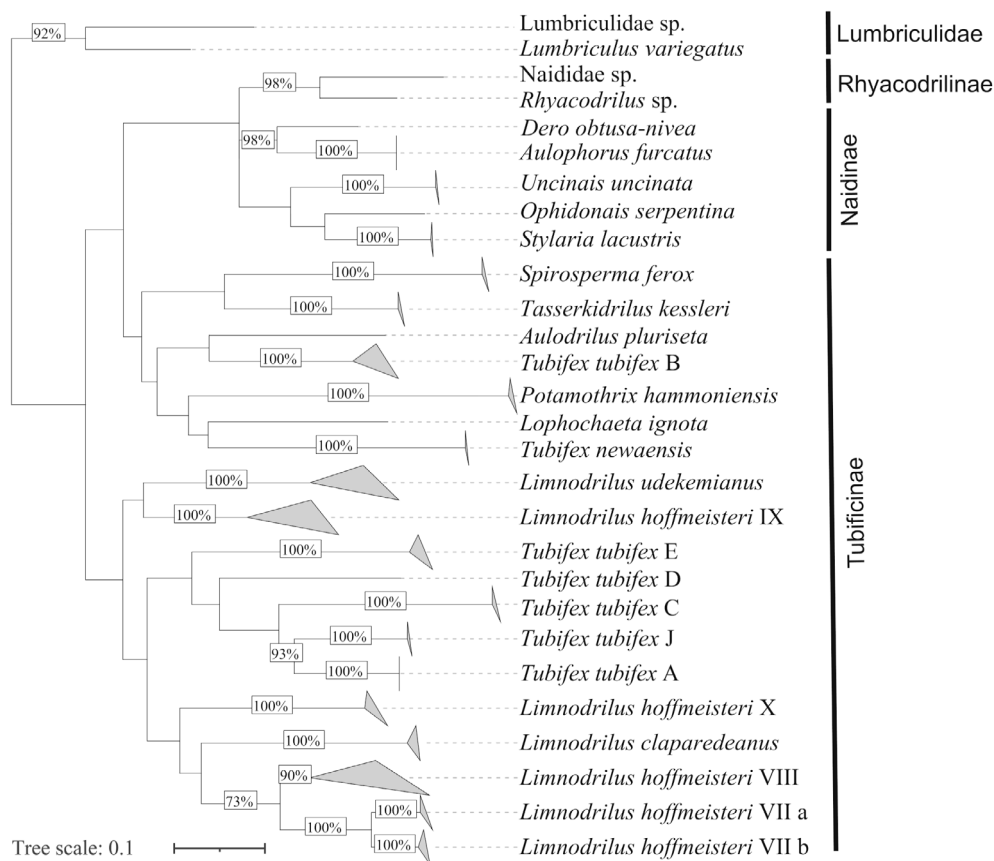


Fig.2. Maximum likelihood phylogenetic tree based on *cox1* gene sequences. The tree displays sequences partitioned by ASAP. Sequences of each group (Table 1) are collapsed into triangles, with the area of the triangle proportional to intragroup distances. Bootstrap support values >70% are shown at nodes.

Table 1. Genetic groups delimited by the ASAP algorithm. For each group, the number of specimens, maximum intragroup *cox1* variability, and minimum intergroup *cox1* variability are provided.

Name of the taxon	Specimens	Maximum <i>cox1</i> intra lineage variability (%)	Mean <i>cox1</i> intra lineage variability (%)	Minimum <i>cox1</i> inter lineage variability (%)	Accession number of Genbank
<i>Tubifex tubifex</i> A	4	0.0	0.0	14.7	PV167186, PV168425, PV168432, PV583595
<i>Tubifex tubifex</i> B	13	5.5	2.9	21.9	PV167187, PV168422, PV168423, PV168427-PV168429, PV168430, PV168433, PV168436, PV168437, PV583594, PV943483, PV943484
<i>Tubifex tubifex</i> C	5	0.9	8.6	19.1	PV167192, PV168419, PV168420, PV168421, PV168435
<i>Tubifex tubifex</i> D	1	0.0	0.0	20.0	PV168434
<i>Tubifex tubifex</i> E	7	3.1	1.6	21.3	PV167185, PV167193, PV167194, PV168424, PV168426, PV168431, PV168438
<i>Tubifex tubifex</i> J	4	0.5	0.3	14.7	PV167188-PV167191
<i>Tubifex newaensis</i>	3	0.4	0.2	23.1	PV688125, PV939129, PV939130
<i>Lophochaeta ignota</i>	1	0.0	0.0	21.9	PV939125
<i>Tasserkidrilus kessleri</i>	3	0.5	0.3	21.9	PV939131-PV939133
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> VII a	47	1.5	0.1	8.7	PQ656725-PQ656728, PQ656730, PQ656732-PQ656734, PQ656737, PQ656738, PQ656740, PQ656742, PQ656764-PQ656767, PQ656769, PQ656770, PQ656772-PQ656784, PQ656786-PQ656790, PQ656793, PQ658046-PQ658051, PQ658053-PQ658055, PV939138, PV939139
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> VII b	9	1.7	0.6	8.7	PQ656723, PQ656731, PQ656771, PQ656785, PQ658052, PV939134-PV939137
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> VIII	7	16.4	10.6	17.5	PQ656735, PQ656739, PQ656791, PQ656792, PV939140, PV939141, PV943482
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> IX	5	11.9	5.1	20.7	PQ656724, PQ656729, PQ656741, PQ656763, PV939142
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> X	5	2.8	1.2	20.9	PV939143-PV939147
<i>Limnodrilus clapedeanus</i>	5	2.2	1.6	21.1	PV939148-PV939152
<i>Limnodrilus udekemianus</i>	8	13.5	9.7	21.9	PQ656736, PQ656762, PQ656768, PV939153-PV939157
<i>Spirosperma ferox</i>	2	0.7	0.7	23.9	PV939158, PV939159
<i>Potamothrix hammoniensis</i>	6	1.2	0.7	23.5	PV939160-PV939165
<i>Aulodrilus pluriseti</i>	1	0.0	0.0	22.2	PV939127
<i>Rhyacodrilus</i> sp.	1	0.0	0.0	18.9	PV943480
<i>Naididae</i> sp.	1	0.0	0.0	19.3	PV943481
<i>Aulophorus furcatus</i>	3	0.0	0.0	13.4	PV939166-PV939168
<i>Dero obtusa-nivea</i>	1	0.0	0.0	13.4	PV939124
<i>Stylaria lacustris</i>	2	0.3	0.3	14.8	PV939169, PV939170
<i>Uncinaiis uncinata</i>	4	0.3	0.2	15.0	PV939171-PV939174
<i>Ophidonais serpentina</i>	1	0.0	0.0	14.8	PV939128
<i>Lumbriculidae</i> sp.	1	0.0	0.0	23.3	PV939123
<i>Lumbriculus variegatus</i>	1	0.0	0.0	19.7	PV939126

comprised six distinct lineages (A, B, C, D, E, J), while *L. hoffmeisteri* resolved into five groups (VIIa, VIIb, VIII, IX, X). The remaining specimens clustered into 15 genetic groups congruent with morphological assignments, as illustrated in Fig. 2.

Among the 26 genetic groups identified across the studied waterbodies of the European North-East Russia, all were represented in the NCBI GenBank database from other geographical regions. Exceptions included *Oligochaeta* sp. (attributed to family Lumbriculidae via BLAST analysis) and *Naididae* sp., which showed highest similarity to *Rhyacodrilus* sp. (GenBank: PP137071, Sweden). Two taxa - *Dero* sp. and *Tasserkidrilus kessleri* were exclusively identified through molecular methods. *Dero* sp. exhibited identical *cox1* sequences to *Dero nivea* (GenBank: PP136348, Sweden) and *Dero obtusa* (GenBank: AF534838, USA). Immature Tubificinae specimens possessing hair chaetae were genetically assigned to *Tasserkidrilus kessleri*, matching reference sequences of this species (GenBank: PP137164, Netherlands).

For the delineated genetic groups, minimum intergroup genetic distances ranged from 8.7% to 23.9% (Table 1), indicating a high degree of genetic differentiation. Maximum intragroup distances (Table 1) varied between 0.0% and 16.4%. Most groups exhibited maximum intragroup distances below 1%, including taxa such as *Tubifex tubifex* lineages A, D, J, *Tubifex newaensis*, *Spirosperma ferox*, and *Aulophorus furcatus*. The highest values were recorded for *Limnodrilus hoffmeisteri* lineages VIII and IX, and *L. udekemianus*, correlating with elevated mean intragroup distances (Table 1).

4. Discussion

The present study confirms the efficacy of the mitochondrial *cox1* gene as a standard marker for DNA barcoding of aquatic oligochaetes. Application of the ASAP method delineated 26 genetic groups, exceeding the number of morphologically identified taxa (17 species). This discrepancy is partly attributable to a high proportion of morphologically unidentifiable immature specimens and, concurrently, to extensive cryptic diversity previously documented in *Tubifex tubifex* (Sturmbauer et al., 1999), *Lumbriculus variegatus* (Gustafsson et al., 2009), and *Limnodrilus hoffmeisteri* (Liu et al., 2017). Furthermore, genetic analysis enabled the identification of several taxa (*Tasserkidrilus kessleri*, *Rhyacodrilus* sp., Lumbriculidae sp.) that remained undetected when only morphological characteristics were used.

The *cox1* analysis results presented in Table 1 demonstrated high minimum intergroup distances (ranging from 8.7% to 23.9%) between most lineages, indicating their genetic distinctness. Particularly illustrative is the case of *Limnodrilus hoffmeisteri*, for which lineages VIIa and b, VIII, IX, and X, corresponding to those previously described in other countries (Liu et al., 2017), were identified within the studied area. A similar pattern is observed in the *T. tubifex* A–J complex, which likewise exhibits intricate intragroup and

intergroup relationships. The lineages of both species, lacking consistent morphological distinctions, likely represent cryptic species complexes identifiable solely at the molecular level, as evidenced by the high intraspecific diversity. However, confirmation of this hypothesis requires the application of an integrative approach combining molecular, morphological, and eco-geographical data. DNA barcoding proves indispensable for ecological monitoring. The detection of cryptic complexes exhibiting differential pollution sensitivity (e.g., to Cd in *T. tubifex* lineages) enhances the precision of biomonitoring (Sturmbauer et al., 1999; Gustafsson et al., 2009).

The majority of groups, including *T. tubifex* lineages A, D, J, *Tubifex newaensis*, *Spirosperma ferox*, and *Aulophorus furcatus*, are characterized by low intragroup distances (<1%) and a zero mean distance (Table 1), signifying their genetic homogeneity.

Conclusions regarding monophyly or polyphyly in our study are not possible. At this stage, the data are limited by the number of samples and genes. For certain taxa, additional sampling is required; as in certain cases, the inferred phylogeny is not supported by statistical methods (bootstrap support < 70%).

The application of molecular methods enabled us to obtain new data. All oligochaete lineages identified in our study are likely to occur in other countries, particularly within European waters. Several species, such as *Tasserkidrilus kessleri*, exhibit notable biogeographic histories. According to Timm (1989), this species was originally described from Lake Onega but also occurs in Central and Eastern Europe, including the basins of Lake Baikal, the Angara River, the Caspian Sea, and even the Laurentian Great Lakes in North America. This species has been recorded for the first time in the Komi Republic, specifically within the Vychegda River basin.

Based on comparison with GenBank, the *Dero* sp. lineage may correspond to either *D. obtusa* or *D. nivea*. Differentiation between these two species based on chaetae morphology is challenging, as they have very similar descriptions regarding the number and shape of ventral and dorsal chaetae and can be mistaken for one another (Chekanovskaya, 1962). As is known (Smith, 1985), in the case of *D. digitata* (Müller, 1774) and *D. nivea*, qualitative traits have already been shown to be unreliable due to their intra- and interspecific variability. *D. obtusa* and *D. nivea* differ in the shape of the branchial disc (Timm, 2009). However, on our slides, we were unable to examine this feature as the posterior part of the specimen was used for genetic analysis. In Russia, *D. nivea* has not been previously reported (Chekanovskaya, 1962), although it is described as cosmopolitan (Timm, 2009). Thus, at this stage, the question of identifying the *Dero* sp. remains unresolved.

Furthermore, unique genetic lineages (Lumbriculidae sp., *Rhyacodrilus* sp.) were identified in Northern European waterbodies. The absence of similar sequences in GenBank suggests their potential endemism, warranting further study.

Our results provide a foundation for establishing a *cox1* reference library for waterbodies in the European North-East of Russia, enabling rapid speci-

men oligochaetes classification for ecotoxicological studies and biodiversity assessments.

5. Conclusion

The present study demonstrated that the application of molecular genetic approaches, particularly the analysis of the mitochondrial *cox1* gene, significantly enhances our understanding of species and intraspecific structure of aquatic oligochaete communities in freshwater ecosystems of the European North-East of Russia. The results revealed pronounced cryptic diversity in several widespread taxa, such as *Tubifex tubifex* and *Limnodrilus hoffmeisteri*. Previously unrecognized genetic lineages were identified, including potentially endemic forms, highlighting the importance of an integrative approach to biodiversity assessment. Despite certain sampling limitations for some taxa, the obtained data lay the groundwork for the development of a regional reference sequence database and further taxonomic clarification of problematic groups. The identification of taxa that cannot be distinguished using morphological traits confirms the practical value of DNA barcoding for diagnostic and biomonitoring purposes, particularly in ecologically vulnerable northern regions. Promising directions for future research include expanding geographic coverage, incorporating nuclear markers, and conducting comprehensive comparisons with ecological and toxicological data, which will enable a more accurate interpretation of the ecological roles of different oligochaete lineages in freshwater ecosystem functioning.

Funding and acknowledgments

The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 24-24-00121 (<https://rscf.ru/project/24-24-00121>)

The authors thank I.O. Velegzhaninov, Senior Researcher of the Radioecology Department at the Institute of Biology, Komi Science Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, for his advisory assistance in conducting the molecular genetic analysis.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest

References

- Baturina M. 2007. Oligochaeta of the Pechora River Basin, Russia. *Acta Hydrobiologica Sinica* 31: 36-46.
- Baturina M.A. 2022. Community structure of oligochaetes (Annelida: Oligochaeta) of the Vychegda River in the zone of influence of wastewater from pulp and paper production. *Contemporary Problems of Ecology* 15 (6): 693-706. DOI: [10.1134/S1995425522060038](https://doi.org/10.1134/S1995425522060038)
- Baturina M.A., Fefilova E.B. 2021. Estimating the biodiversity level of the Pechora River Delta freshwater ecosystems by the structure of bottom communities of Cladocera, Copepoda, and Oligochaeta. *Inland Water Biology* 14(6): 709-721. DOI: [10.1134/S199508292106002X](https://doi.org/10.1134/S199508292106002X)
- Chekanovskaya O.V. 1962. *Vodnye maloshchetinkovy chervi fauny SSSR* [Aquatic oligochaete worms of fauna of the USSR]. Moscow-Leningrad: The USSR Academy of Sciences. (in Russian)
- Erséus Ch., Klinth M., Martinsson S. 2023. Etablering av bibliotek av DNA-streckkoder från svenska gördelmaskar (Annelida). Stockholm: Naturvårdsverket.
- Folmer O., Black M., Hoeh W. et al. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- Gustafsson D., Price D., Erséus C. 2009. Genetic variation in the popular lab worm *Lumbriculus variegatus* (Annelida: Clitellata: Lumbriculidae) reveals cryptic speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51 (2): 182-189. DOI: [10.1016/j.ympev.2008.12.016](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.12.016)
- Kimura M. 1980. A Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120. DOI: [10.1007/BF01731581](https://doi.org/10.1007/BF01731581)
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549. DOI: [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096)
- Kvist S., Sarkar I.N., Erséus C. 2010. Genetic variation and phylogeny of the cosmopolitan marine genus *Tubificoides* (Annelida: Clitellata: Naididae: Tubificinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 687-702. DOI: [10.1016/j.ympev.2010.08.018](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.08.018) PMID: 20801225
- Lafont M., Jézéquel C., Vivier A. et al. 2010. Refinement of biomonitoring of urban water courses by combining descriptive and ecohydrological approaches. *Ecohydrology and Hydrobiology* 10: 3-11. DOI: [10.2478/v10104-009-0047-3](https://doi.org/10.2478/v10104-009-0047-3)
- Lafont M., Tixier G., Marsalek J. et al. 2012. From research to operational biomonitoring of freshwaters: a suggested conceptual framework and practical solutions. *Ecohydrology and Hydrobiology* 12: 9-20. DOI: [10.2478/v10104-012-0004-4](https://doi.org/10.2478/v10104-012-0004-4)
- Leveque Ch., Balian E.V., Martens K. 2005. An assessment of animal species diversity in continental waters. *Hydrobiologia* 542: 39-67. DOI: [10.1007/s10750-004-5522-7](https://doi.org/10.1007/s10750-004-5522-7)
- Liu Y., Fend S.V., Martinsson S. et al. 2017. Extensive cryptic diversity in the cosmopolitan sludge worm *Limnodrilus hoffmeisteri* (Clitellata, Naididae). *Organisms, Diversity and Evolution* 17: 477-495. DOI: [10.1007/s13127-016-0317-z](https://doi.org/10.1007/s13127-016-0317-z)
- Martinsson S., Achurra A.M., Svensson M. et al. 2013. Integrative taxonomy of the freshwater worm *Rhyacodrilus falciformis* s.l. (Clitellata: Naididae), with the description of a new species. *Zoologica Scripta* 42(6):612-622. DOI: [10.1111/zsc.12032](https://doi.org/10.1111/zsc.12032)
- Nei M., Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. et al. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28: 1166-1167. DOI: [10.1093/bioinformatics/bts091](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091)
- Popchenko V.I. 1988. *Aquatic Oligochaeta of the Northern Europe*. Leningrad: Nauka. (in Russian)
- Prosser S. 2013. A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Molecular Ecology Resources* 13: 1151-1155. DOI: [10.1111/1755-0998.12132](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12132)
- Rodriguez P., Reynoldson T.B. 2011. *The pollution biology of aquatic oligochaetes*. Dordrecht: Springer Science + Business Media
- Rougerie R., Decaëns T., Deharveng L. et al. 2009. DNA barcodes for soil animal taxonomy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44: 789-801. DOI: [10.1590/S0100-204X2009000800002](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000800002)
- Sievers F., Wilm A., Dineen D.G. et al. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence

alignments using Clustal Omega. Molecular Systems Biology 7: 539. DOI: [10.1038/msb.2011.75](https://doi.org/10.1038/msb.2011.75)

Smith M.E. 1985. Setal Morphology and Its Intraspecific Variation in *Derodigitata* and *Deronivea* (Oligochaeta: Naididae). Transactions of the American Microscopical Society 104 (1): 45-51.

Sturmbauer Ch., Opadiya G.B., Niederstatter H. et al. 1999. Mitochondrial DNA reveals cryptic oligochaete species differing in cadmium resistance. Molecular Biology and Evolution 16(7): 967-974.

Timm T. 1989. *Tasserkidrilus acäpillatus* (Finogenova, 1972) in lake Peipsi, with a revision of the genus *Tasserkidrilus* Holmquist, 1985 (Oligochaeta, Tubificidae). Proceedings of the Academy of Sciences of the Estonian SSR. Biology 38 (1): 52-60. DOI: [10.3176/biol.1989.1.08](https://doi.org/10.3176/biol.1989.1.08)

Timm T. 2009. A guide to the freshwater Oligochaeta and Polychaeta of Northern and Central Europe. Lauterbornia 66: 1-235.

Timm T. 2017. Aquatic microdrile Oligochaeta (Annelida, Clitellata): New nominal taxa and combinations since 1984. Zootaxa 4282 (3): 401-452. DOI: [10.11646/zootaxa.4282.3.1](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4282.3.1)

Vivien R., Tixier G., Lafont M. 2014. Use of oligochaete communities for assessing the quality of sediments in watercourses of the Geneva area and Artois-Picardie basin (France): proposition of heavy metal toxicity thresholds. Ecohydrology and Hydrobiology 14: 142-51. DOI: [10.1016/j.ecohyd.2014.03.003](https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2014.03.003)

Vivien R., Wyler S., Lafont M. et al. 2015. Molecular barcoding of aquatic oligochaetes: implications for biomon-

itoring. PLOS One 10 (4): e0125485. DOI: [10.1371/journal.pone.0125485](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125485)

Vivien R., Holzmann M., Werner I. et al. 2017. Cytochrome c oxidase barcodes for aquatic oligochaete identification: development of a Swiss reference database. PeerJ Life and Environment 5: e4122(2) DOI: [10.7717/peerj.4122](https://doi.org/10.7717/peerj.4122)

Vivien R., Apothéloz-perret-Gentil L., Pawlowski J. et al. 2019. Testing different (e)DNA metabarcoding approaches to assess aquatic oligochaete diversity and the biological quality of sediments. Ecological Indicators 106: 105453. DOI: [10.1016/j.ecolind.2019.105453](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105453)

Vivien R., Martinez M.C., Lafont M. et al. 2020. Effect thresholds of metals in stream sediments based on in situ oligochaete communities. Environments 7 (4): 1-15. DOI: [10.3390/environments7040031](https://doi.org/10.3390/environments7040031)

Vivien R., Apothéloz-perret-Gentil L., Pawlowski J. et al. 2020. High-throughput DNA barcoding of oligochaetes for abundance-based indices to assess the biological quality of sediments in streams and lakes. Scientific Reports 10: 1-9. DOI: [10.1038/s41598-020-58703-2](https://doi.org/10.1038/s41598-020-58703-2)

Zhou T., Jiang W., Wang H. et al. 2021. DNA barcoding of Naididae (Annelida, Oligochaeta), based on cytochrome C oxidase gene and ITS2 region in China. Biodiversity Data Journal 9: e73556. DOI: [10.3897/BDJ.9.e73556](https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e73556)

Zinchenko T.D., Gladyshev M.I., Makhutova O.N. et al. 2014. Saline rivers provide arid landscapes with a considerable amount of biochemically valuable production of chironomid (Diptera) larvae. Hydrobiologia 722: 115-128. DOI: [10.1007/s10750-013-1684-5](https://doi.org/10.1007/s10750-013-1684-5)

Первые результаты ДНК-баркодирования пресноводных олигохет (Annelida, Oligochaeta) Европейского Северо-Востока России



Батурина М.А.¹, Голубев М.А.^{1,2}, Бакашкина А.С.^{1,2}, Марченко Ю.В.^{1,2}

¹ Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, 28 ул. Коммунистическая, 167982 Сыктывкар, Россия

² ФГБОУ ВО «Сыктывкарский государственный университет имени Питирима Сорокина», Октябрьский проспект, 55, 167001, Сыктывкар, Россия

АННОТАЦИЯ. Олигохеты, обитающие в пресных водоёмах, рассматриваются как перспективные индикаторы экологического состояния водных экосистем, но их традиционная идентификация на основе морфологических признаков часто затруднительна. Использование молекулярных методов, в частности последовательностей нуклеотидов фрагмента гена первой субъединицы цитохром-оксидазы (*cox1*) митохондриальной ДНК, позволяет повысить точность определения видовой принадлежности и расширить представление о генетическом разнообразии олигохет. В представленной работе приведены первые результаты анализа генетической структуры водных олигохет (Annelida, Clitellata) из ряда водоёмов Европейского Северо-Востока России. Обнаружено несоответствие между морфологической (17 видов) и молекулярной (26 генетических групп) дифференциацией таксонов. Для видов *Tubifex tubifex* (Müller, 1774) и *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparède, 1862 зафиксировано значительное криптическое разнообразие, проявляющееся в разделении на 11 генетических линий с внутривидовыми расстояниями по *cox1* до 26.1%. Для бассейна р. Вычегда впервые отмечено присутствие *Tasserkidrilus kessleri* (Hrabě, 1962), идентифицированного молекулярными методами. Полученные данные подтверждают эффективность интегрированного подхода в исследованиях биоразнообразия северных пресноводных экосистем и формируют основу для создания региональной библиотеки эталонных ДНК-последовательностей.

Ключевые слова: пресноводные олигохеты, баркодирование ДНК, *cox1*, Европейский Северо-Восток России

Для цитирования: Батурина М.А., Голубев М.А., Бакашкина А.С., Марченко Ю.В. Первые результаты ДНК-баркодирования пресноводных олигохет (Annelida, Oligochaeta) Европейского Северо-Востока России // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 4. - С. 414-427. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-4-414

1. Введение

Пресноводные олигохеты (Annelida: Oligochaeta) благодаря высокой чувствительности к различным типам антропогенного воздействия широко используются в экологическом мониторинге водных экосистем (Rodriguez and Reynoldson, 2011; Lafont et al., 2010; 2012; Vivien et al., 2014).

Особую значимость в этом контексте представляет изучение водоемов Европейского Северо-Востока России – обширного региона, характеризующегося разнообразием природных условий и наличием уникальных водных экосистем. Несмотря на относительную удаленность от крупных промышленных центров, на многие участки водосборов продолжают оказывать влияние локальные и

региональные формы хозяйственной деятельности, включая вырубку лесов, добычу полезных ископаемых, сброс сточных вод и изменение гидрологического режима. Применение молекулярных методов идентификации представляет собой перспективный инструмент для инвентаризации биоразнообразия и мониторинга состояния водных экосистем региона.

Особое внимание уделяется семейству Naididae – наиболее разнообразной и экологически значимой группе (Timm, 2017), представители которой широко распространены в пресноводных экосистемах по всему миру, включая водоемы Европейского Северо-Востока России (Попченко, 1988; Батурина, 2007; 2022; Батурина and Fefilova, 2021). Высокая экологическая пластичность Naididae, включая различную степень толерантно-

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: baturina@ib.komisc.ru (М.А. Батурина)

Поступила: 23 июля 2025; **Принята:** 15 августа 2025;

Опубликована online: 31 августа 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



сти к загрязнению, делает их важными объектами для биоиндикации. Следовательно, разработка надежных методов их молекулярной идентификации является ключевой задачей для совершенствования программ экологического мониторинга (Lafont et al., 2010; 2012; Vivien et al., 2020a; 2019; 2020b).

Широкое использование олигохет в рутинной экологической оценке часто ограничивается трудностями их точной идентификации до уровня вида на основе морфологических признаков (Leveque et al., 2005), что снижает точность биоиндикационных оценок (Vivien et al., 2017). Прогресс в решении этой проблемы стал возможен благодаря внедрению методов ДНК-штрихкодирования, в первую очередь на основе анализа митохондриального гена цитохром-с-оксидазы I (*cox1*). Сравнение стандартных участков ДНК с референсными библиотеками позволит проводить быструю и точную видовую идентификацию, независимо от состояния особей, преодолевая ограничения традиционных морфологических подходов (Rougerie et al., 2009; Kvist et al., 2010; Martinsson et al., 2013).

Для ряда регионов на сегодняшний день уже создаются ДНК-референсные базы олигохет, например, Швейцария (Vivien et al., 2017), Швеция (Erséus et al., 2023), Китай (Zhou et al., 2021). Для других территорий, включая Россию, такие ресурсы все еще крайне ограничены. Учитывая региональную специфику видового состава северных водоемов, создание полноценных региональных библиотек ДНК-штрихкодов весьма актуально. Это определяет необходимость проведения первичных исследований, направленных на идентификацию видового разнообразия олигохет с применением современных генетических методов. Такие данные критически важны как для фундаментального понимания биологического разнообразия региона, так и для разработки эффективных инструментов экологического мониторинга.

Целью данного исследования является представление первых данных ДНК-штрихкодирования пресноводных олигохет (Annelida: Oligochaeta) Европейского Северо-Востока России.

2. Материалы и методы

Характерной чертой ландшафтов территории европейского Севера является большая насыщенность водами (Попченко, 1988). Основным объемом образцов получен нами из бассейна р. Вычегда (Рис. 1). Река Вычегда, крупнейший левый приток Северной Двины (бассейн Белого моря), течет в таежной зоне Европейского Северо-Востока России, на территории Республики Коми и Архангельской области. Её общая длина – 1130 км, площадь водосбора – 121 тыс. км². Средняя густота речной сети – 0,62 км/км². Общая площадь бассейна составляет 122 770 км², а географические координаты охватывают широты от 59°55' до 64°30' с.ш. и долготы от 46°30' до 55°30' в.д. Образцы олигохет собирались в мае-июле 2021-2024 г. в водоемах различного типа и в основном русле реки. Дополнительно, несколько проб было отобрано из р. Северная Двина (61°17'6" с.ш.; 46°38'9" в.д.) в июле 2024 г. и водоемов Полярного Урала (66°48'25" с. ш.; 65°48'12" в.д.) в июле 2023 г.

Пробы олигохет отбирали гидробиологическим скребком (Zinchenko et al., 2014) на гравийных или песчаных грунтах. Собранные экземпляры фиксировали в 96 % спирте. Морфологический анализ проводили с использованием «Аппаратно-программного комплекса микроскопии и микроанализа (MCView)» (LOMO-Microsystems, Россия) и микроскопа «Nexscope NIB950FL-DIC v2» (Novel Optics, Китай). Образцы олигохет были идентифицированы до самого низкого уровня (вид, если возможно), на основе существующих определительных ключей (Чекановская, 1962; Timm, 2009) в соответствии с современной классификацией. Эталонные образцы хранятся в коллекции Института биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар.

Молекулярно-генетический анализ 151 образца олигохет проводили на основе последовательности нуклеотидов фрагмента гена первой субъединицы цитохромоксидазы (*cox1*) митохондриальной ДНК. Последние 10-15 сегментов червя помещали в 10 мкл 6 % раствора Chelex 100, добавляли протеиназу-К и инкубировали в течение 30 мин при 55 °С, затем в течение 15 мин при 99 °С.



Рис.1. Карта-схема отбора проб. Серым отмечены места отбора проб.

Амплификацию и секвенирование фрагментов *cox1* проводили в ЦКП «Молекулярная биология» Института биологии Коми НЦ УрО РАН, часть образцов ДНК секвенировали в ООО «Синтол» (Москва). Для амплификации использовали готовую смесь для ПЦР ScreenMix HS (Евроген, Россия), универсальные для всех Metazoa праймеры (Folmer et al., 1994; Prosser, 2013) и термоциклер T100 (BioRad, США). Реакцию проводили в следующем режиме: начальная денатурация – 5 мин при 94 °C, следующие четыре цикла по схеме: 90 °C (30 с), 45 °C (60 с), 72 °C (90 с); затем 30 циклов по схеме: 90 °C (30 с), 55 °C (45 с), 72 °C (60 с); конечная элонгация – 5 мин при 72 °C. Первичная обработка молекулярно-генетических данных проводилась с помощью программного пакета Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью алгоритма ClustalO (Sievers et al., 2011). Полученные в нашем исследовании последовательности *cox1* сравнивались с последовательностями GenBank (NCBI). В случае неидентифицированных последовательностей осуществляли дополнительный поиск с помощью инструмента BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Все последовательности зарегистрированы в международной базе молекулярных данных GenBank.

Филогенетическое древо с расчетом бутстреп-поддержек узлов ветвления (750 репликаций) строилось по алгоритму максимального правдоподобия с применением рассчитанной оптимальной модели – GTR + G + I в программном обеспечении MEGA X (Nei and Kumar, 2000; Kumar et al., 2018). Генетические дистанции рассчитывались также в программном обеспечении MEGA X с применением двухпараметрической модели Кимуры K2P (Kimura, 1980) с целью сравнения с опубликованными ранее (Vivien et al., 2015; Vivien et al., 2017; Liu et al., 2017; Zhou et al., 2021).

Для выделения границ видов использовали алгоритмы иерархической кластеризации ASAP и ABGD (<https://spartexplorer.mnhn.fr>) со стандартными настройками. Финальная редакция филогенетического дерева осуществлялась в ITOI (<https://itol.embl.de>). Образцы, относящиеся к одной генетической группе, были сведены вместе. На проиллюстрированных деревьях показаны значения бутстреп-поддержки выше 70%.

3. Результаты

Всего был секвенирован 151 образец олигохет из водоемов различного типа: малые озера; малые, средние, крупные реки. Согласно морфологическому анализу образцы принадлежали к двум семействам: 149 образцов к сем. Naididae (11 – п/сем. Naidinae, 138 – п/сем. Tubificinae), 2 – к сем. Lumbriculidae (Таблица 1). Всего идентифицировано 17 видов. Наиболее многочисленно были представлены: *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparède, 1862 – 73 особей; *Tubifex tubifex* (Müller, 1774) – 34 особи; *Limnodrilus udekemianus* Claparède, 1862 – 8 особей. (Таблица 1).

Внутривидовые дистанции для изученных образцов сильно варьировали. Для видов *T. tubifex* (до 26.1 %), *L. hoffmeisteri* (до 25.7 %), *L. udekemianus* (до 13.5 %) выявлены наиболее высокие дистанции. Наименьшие дистанции (менее 1 %) отмечены для видов *Tasserkidrilus kessleri* (Hrabě, 1962) (0.3 %) и *Potamothrinx hammoniensis* (Michaelson, 1901) (0.7 %).

По результатам разделения набора данных алгоритмом ASAP (151 образец, 17 видов) было выделено 26 устойчивых генетических групп. Делимитация алгоритмом ABGD приводит к завышенным, по нашему мнению результатам, выделяя 34 группы в этом же наборе данных. Поэтому далее результаты обсуждаются, опираясь на ASAP (Таблица 1, Рис. 2). Так, в сравнении с морфологическим описанием, для *T. tubifex* получено 6 групп (A, B, C, D, E, J), для *L. hoffmeisteri* – 5 групп (VII а и b, VIII, IX, X). Остальные образцы разделились на 15 групп, соответствующих морфологическому описанию, что показано на Рис. 2.

Из 26 генетических групп, установленных для изученных водоемов на территории Европейского Северо-Востока России, все присутствовали в базе данных NCBI Genbank из других стран. За исключением двух видов: *Oligochaeta* sp., который по результатам BLAST анализа может быть отнесен к сем. Lumbriculida, и *Naididae* sp., который наиболее сходен с *Rhyacodrilus* sp. (GenBank: PP137071, Швеция). Два вида (*Dero* sp. и *Tasserkidrilus kessleri*) определены только молекулярным методом. Вид *Dero* sp. идентичен с *Dero nivea* Aiyer, 1929 (GenBank: PP136348, Швеция) и *Dero obtusa* Udekem, 1855 (GenBank: AF534838, США). Незрелые особи *Tubificinae* sp. с волосными щетинками идентифицированы как *Tasserkidrilus kessleri*, образцы соответствовали *T. kessleri* (GenBank: PP137164, Нидерланды).

Для выделенных генетических групп минимальные межгрупповые генетические дистанции варьировали от 8.7 % до 23.9 % (Таблица 1), демонстрируя высокий уровень генетической дифференциации.

Максимальные внутригрупповые дистанции (Таблица 1) изменялись от 0.0 % до 16.4 %. У большинства значения максимального внутригруппового расстояния составляли менее 1%, включая такие таксоны как *T. tubifex* линии A, D, J, *Tubifex newaensis* (Michaelson, 1903), *Spirosperma ferox* Eisen, 1879, *Aulophorus furcatus* (Oken, 1815). Наибольшие значения отмечались для *L. hoffmeisteri* линии VIII, IX и *L. udekemianus* и коррелировали со средними внутригрупповыми дистанциями (Таблица 1).

4. Обсуждение

Настоящее исследование подтверждает эффективность использования митохондриального гена *cox1* в качестве стандартного маркера для ДНК-штрихкодирования водных олигохет. Применение метода ASAP позволило выделить 26 генетических групп, что превышает количество таксонов, определенных морфологически (17 видов). Это расхождение объясняется, с одной стороны, высокой долей

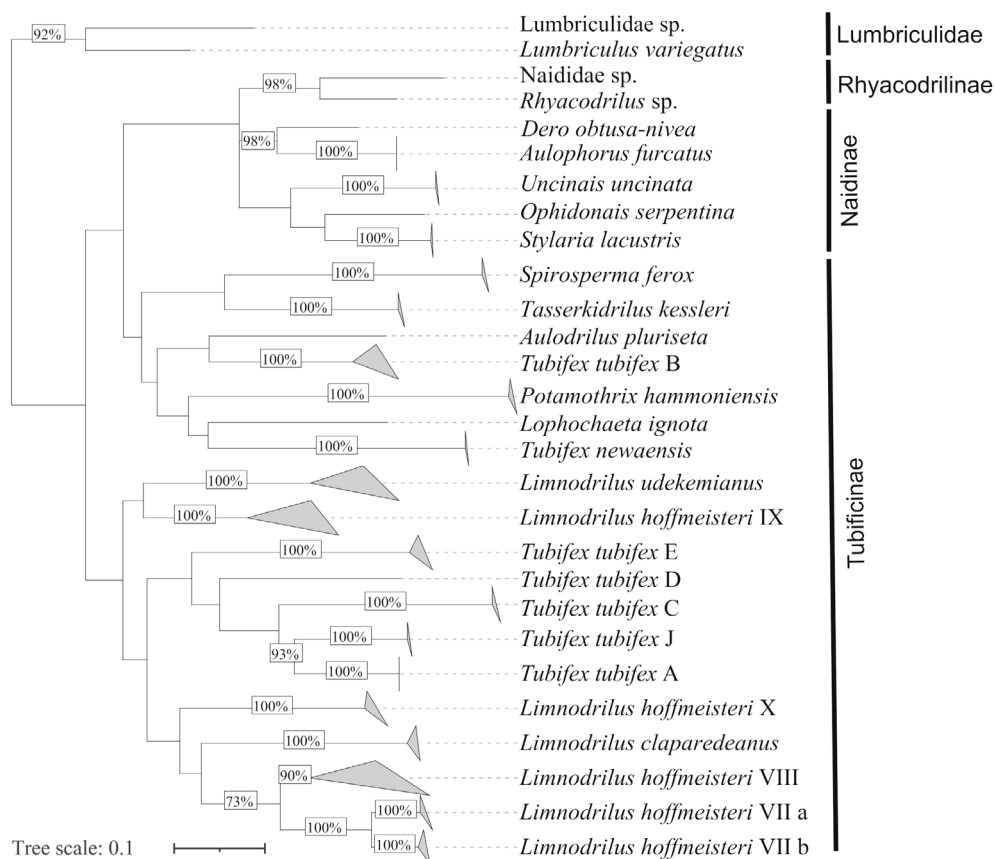


Рис.2. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, на основе последовательностей гена *cox1*. Дерево показывает последовательности, разделенные ASAP. Последовательности каждой группы (табл. 1) объединены в треугольники, при этом, чем больше площадь треугольника, тем выше внутригрупповые дистанции. Цифрами указаны бустреп-поддержки более 70 %.

незрелых особей, морфологически неидентифицируемых, а с другой – широким распространением криптического разнообразия, ранее отмеченного у *Tubifex tubifex* (Sturmbauer et al., 1999), *Lumbriculus variegatus* (Müller, 1774) (Gustafsson et al., 2009) и *Limnodrilus hoffmeisteri* (Liu et al., 2017). Кроме того, генетический анализ позволил идентифицировать ряд видов (*Tasserkidrilus kessleri*, *Rhyacodrilus* sp., *Lumbriculidae* sp.), которые остались необнаруженными при использовании только морфологических признаков.

Результаты анализа *cox1*, представленные в таблице 1, продемонстрировали высокие минимальные межгрупповые расстояния (от 8.7 % до 23.9 %) между большинством линий, что указывает на их генетическую обособленность. Особенно показателен пример *L. hoffmeisteri* для которого в исследованных водоемах выделены линии VII а и b, VIII, IX, X, соответствующие описанным ранее в других регионах (Liu et al., 2017). Сходная ситуация наблюдается в комплексе *T. tubifex* A–J, который так же демонстрирует сложные внутригрупповые и межгрупповые отношения. Линии обоих видов, не имеющие устойчивых морфологических различий, скорее всего, представляют собой комплексы криптических видов с высоким внутривидовым расстоянием, идентифицируемые только на моле-

кулярном уровне. Однако для подтверждения этой гипотезы требуется применение интегративного подхода, сочетающего молекулярные, морфологические и эколого-географические данные. С практической точки зрения, ДНК-штрихкодирование оказывается незаменимым инструментом в экологическом мониторинге. Обнаружение криптических комплексов с различной чувствительностью к загрязнению (например, по Cd у линий *T. tubifex*) позволяет повысить точность биоиндикации (Sturmbauer et al., 1999; Gustafsson et al., 2009).

Большинство групп, в том числе *T. tubifex* линии A, D, J, *T. newaensis*, *S. ferox* и *A. furcatus*, характеризуются низкими внутригрупповыми расстояниями (<1%) и нулевым средним расстоянием (Таблица 1), что означает их генетическую однородность.

Выводы о монофилии или полифилии в нашем исследовании невозможны. На данный момент знания ограничены числом образцов и генов. Для некоторых таксонов необходима дополнительная выборка, так как в отдельных случаях установленная филогения не поддерживается статистическими методами (бустреп-поддержки < 70 %).

Применение молекулярных методов позволило получить новые таксономические данные. Все выявленные в нашем исследовании линии оли-

Таблица 1. Генетические группы, полученные в результате алгоритма ASAP. Для каждой группы указаны количество экземпляров, максимальная внутригрупповая изменчивость и минимальная межгрупповая изменчивость *cox1*.

Таксон	Число образцов	Максимальная внутригрупповая изменчивость <i>cox1</i> (%)	Средняя внутригрупповая изменчивость <i>cox1</i> (%)	Минимальная межгрупповая изменчивость <i>cox1</i> (%)	Номер в Genbank
<i>Tubifex tubifex</i> A	4	0.0	0.0	14.7	PV167186, PV168425, PV168432, PV583595
<i>Tubifex tubifex</i> B	13	5.5	2.9	21.9	PV167187, PV168422, PV168423, PV168427-PV168429, PV168430, PV168433, PV168436, PV168437, PV583594, PV943483, PV943484
<i>Tubifex tubifex</i> C	5	0.9	8.6	19.1	PV167192, PV168419, PV168420, PV168421, PV168435
<i>Tubifex tubifex</i> D	1	0.0	0.0	20.0	PV168434
<i>Tubifex tubifex</i> E	7	3.1	1.6	21.3	PV167185, PV167193, PV167194, PV168424, PV168426, PV168431, PV168438
<i>Tubifex tubifex</i> J	4	0.5	0.3	14.7	PV167188-PV167191
<i>Tubifex newaensis</i>	3	0.4	0.2	23.1	PV688125, PV939129, PV939130
<i>Lophochaeta ignota</i>	1	0.0	0.0	21.9	PV939125
<i>Tasserkidrilus kessleri</i>	3	0.5	0.3	21.9	PV939131-PV939133
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> VII a	47	1.5	0.1	8.7	PQ656725-PQ656728, PQ656730, PQ656732-PQ656734, PQ656737, PQ656738, PQ656740, PQ656742, PQ656764-PQ656767, PQ656769, PQ656770, PQ656772-PQ656784, PQ656786-PQ656790, PQ656793, PQ658046-PQ658051, PQ658053-PQ658055, PV939138, PV939139
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> VII b	9	1.7	0.6	8.7	PQ656723, PQ656731, PQ656771, PQ656785, PQ658052, PV939134-PV939137
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> VIII	7	16.4	10.6	17.5	PQ656735, PQ656739, PQ656791, PQ656792, PV939140, PV939141, PV943482
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> IX	5	11.9	5.1	20.7	PQ656724, PQ656729, PQ656741, PQ656763, PV939142
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> X	5	2.8	1.2	20.9	PV939143-PV939147
<i>Limnodrilus claparèdeanus</i>	5	2.2	1.6	21.1	PV939148-PV939152
<i>Limnodrilus udekemianus</i>	8	13.5	9.7	21.9	PQ656736, PQ656762, PQ656768, PV939153-PV939157
<i>Spirosperma ferox</i>	2	0.7	0.7	23.9	PV939158, PV939159
<i>Potamothenrix hammoniensis</i>	6	1.2	0.7	23.5	PV939160-PV939165
<i>Aulodrilus plurisetus</i>	1	0.0	0.0	22.2	PV939127
<i>Rhyacodrilus</i> sp.	1	0.0	0.0	18.9	PV943480
<i>Naididae</i> sp.	1	0.0	0.0	19.3	PV943481
<i>Aulophorus fuscatus</i>	3	0.0	0.0	13.4	PV939166-PV939168
<i>Dero obtusa-nivea</i>	1	0.0	0.0	13.4	PV939124
<i>Stylaria lacustris</i>	2	0.3	0.3	14.8	PV939169, PV939170
<i>Uncinatis uncinata</i>	4	0.3	0.2	15.0	PV939171-PV939174
<i>Ophidonais serpentina</i>	1	0.0	0.0	14.8	PV939128
<i>Lumbriculidae</i> sp.	1	0.0	0.0	23.3	PV939123
<i>Lumbriculus variegatus</i>	1	0.0	0.0	19.7	PV939126

гохет, вероятно, присутствуют и в других странах, в частности, на территории Европы. Ряд видов, таких как *T. kessleri*, имеет интересную биогеографическую историю. Согласно Timm (1989), этот вид описан из Онежского озера, но также встречается в Центральной и Восточной Европе, включая Байкал, Ангару, Каспий и даже Великие озёра в Северной Америке. В Республике Коми, в частности в бассейне р. Вычегда вид отмечен впервые.

Также, по результатам сравнения с Genbank, линия *Dero* sp. может соответствовать как *D. obtusa* так и *D. nivea*. Дифференциация этих двух видов на основе морфологии щетинок затруднена, так как они имеют очень сходное описание по числу и форме брюшных и спинных щетинок и могут быть приняты один за другого (Чекановская, 1962). Как известно (Smith, 1985) в случае с *D. digitata* (Müller, 1774) и *D. nivea* уже показано, что качественные признаки могут быть ненадежными из-за их внутри- и межвидовой изменчивости. *D. obtusa* и *D. nivea* отличаются формой жаберного диска (Timm, 2009). Однако на наших препаратах, мы не могли его рассмотреть, так как задняя часть образца использована для генетического анализа. В России ранее *D. nivea* не указывалась (Чекановская, 1962), хотя описывается как космополит (Timm, 2009). Таким образом, на данном этапе вопрос с идентификацией *Dero* sp. остается открытым.

Помимо этого, среди арктических водоемов получены уникальные генетические линии (*Lumbriculidae* sp., *Rhyacodrilus* sp.), аналоги которых не встречены в Genbank, что может указывать на их эндемичность и требует дальнейших исследований.

Полученные нами результаты могут быть основой для создания референсной библиотеки *cox1* из водоемов Европейского Северо-Востока России и в дальнейшем использоваться для быстрой классификации Oligochaeta в рамках экотоксикологических исследований и оценки биоразнообразия.

5. Заключение

Проведённое исследование продемонстрировало, что применение молекулярно-генетических подходов, в частности анализа митохондриального гена *cox1*, позволяет существенно расширить представления о видовой и внутривидовой структуре сообществ водных олигохет в пресноводных экосистемах Европейского Северо-Востока России. Результаты выявили выраженное криптическое разнообразие у ряда широко распространённых таксонов, таких как *Tubifex tubifex* и *Limnodrilus hoffmeisteri*. Зафиксировано наличие ранее неучтённых генетических линий, в том числе потенциально эндемичных форм, что подчёркивает важность комплексного подхода к оценке биоразнообразия. Несмотря на некоторую ограниченность выборки для ряда видов, полученные данные закладывают основу для создания региональной референсной базы последовательностей и дальнейшей систематизации проблемных групп. Выявление таксонов, не поддающихся морфологической идентифика-

ции, подтверждает практическую ценность ДНК-штрихкодирования для задач диагностики и биомониторинга, особенно в экологически уязвимых северных регионах. Перспективным направлением дальнейших исследований является расширение географического охвата, включение ядерных маркеров, а также проведение комплексных сравнений с экологическими и токсикологическими данными, что позволит более точно интерпретировать роль различных линий олигохет в функционировании водных экосистем.

Источники финансирования и благодарности

Исследование выполнено в рамках гранта РНФ 24-24-00121 (<https://rscf.ru/project/24-24-00121>)

Авторы благодарят к.б.н. Велегжанинова И.О., с.н.с. отдела радиоэкологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН за консультативную помощь при проведении молекулярно-генетического анализа.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Список литературы

- Baturina M. 2007. Oligochaeta of the Pechora River Basin, Russia. *Acta Hydrobiologica Sinica* 31: 36-46.
- Baturina M.A., Fefilova E.B. 2021. Estimating the biodiversity level of the Pechora River Delta freshwater ecosystems by the structure of bottom communities of Cladocera, Copepoda, and Oligochaeta. *Inland Water Biology* 14(6): 709-721. DOI: [10.1134/S199508292106002X](https://doi.org/10.1134/S199508292106002X)
- Erséus Ch., Klinth M., Martinsson S. 2023. Etablering av bibliotek av DNA-streckkoder från svenska gördelmaskar (Annelida). Stockholm: Naturvårdsverket.
- Folmer O., Black M., Hoeh W. et al. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- Gustafsson D., Price D., Erséus C. 2009. Genetic variation in the popular lab worm *Lumbriculus variegatus* (Annelida: Clitellata: Lumbriculidae) reveals cryptic speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51 (2): 182-189. DOI: [10.1016/j.ympev.2008.12.016](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.12.016)
- Kimura M. 1980. A Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120. DOI: [10.1007/BF01731581](https://doi.org/10.1007/BF01731581)
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549. DOI: [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096)
- Kvist S., Sarkar I.N., Erséus C. 2010. Genetic variation and phylogeny of the cosmopolitan marine genus *Tubificoides* (Annelida: Clitellata: Naididae: Tubificinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 687-702. DOI: [10.1016/j.ympev.2010.08.018](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.08.018) PMID: 20801225
- Lafont M., Jézéquel C., Vivier A. et al. 2010. Refinement of biomonitoring of urban water courses by combining descriptive and ecohydrological approaches. *Ecohydrology and Hydrobiology* 10: 3-11. DOI: [10.2478/v10104-009-0047-3](https://doi.org/10.2478/v10104-009-0047-3)

- Lafont M., Tixier G., Marsalek J. et al. 2012. From research to operational biomonitoring of freshwaters: a suggested conceptual framework and practical solutions. *Ecohydrology and Hydrobiology* 12: 9-20. DOI: [10.2478/v10104-012-0004-4](https://doi.org/10.2478/v10104-012-0004-4)
- Leveque Ch., Balian E.V., Martens K. 2005. An assessment of animal species diversity in continental waters. *Hydrobiologia* 542: 39-67. DOI: [10.1007/s10750-004-5522-7](https://doi.org/10.1007/s10750-004-5522-7)
- Liu Y., Fend S.V., Martinsson S. et al. 2017. Extensive cryptic diversity in the cosmopolitan sludge worm *Limnodrilus hoffmeisteri* (Clitellata, Naididae). *Organisms, Diversity and Evolution* 17: 477-495. DOI: [10.1007/s13127-016-0317-z](https://doi.org/10.1007/s13127-016-0317-z)
- Martinsson S., Achurra A.M., Svensson M. et al. 2013. Integrative taxonomy of the freshwater worm *Rhyacodrilus falciformis* s.l. (Clitellata: Naididae), with the description of a new species. *Zoologica Scripta* 42(6):612-622. DOI: [10.1111/zsc.12032](https://doi.org/10.1111/zsc.12032)
- Nei M., Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. et al. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28: 1166-1167. DOI: [10.1093/bioinformatics/bts091](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091)
- Prosser S. 2013. A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Molecular Ecology Resources* 13: 1151-1155. DOI: [10.1111/1755-0998.12132](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12132)
- Rodriguez P., Reynoldson T.B. 2011. *The pollution biology of aquatic oligochaetes*. Dordrecht: Springer Science + Business Media
- Rougerie R., Decaëns T., Deharveng L. et al. 2009. DNA barcodes for soil animal taxonomy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44: 789-801. DOI: [10.1590/S0100-204X2009000800002](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000800002)
- Sievers F., Wilm A., Dineen D.G. et al. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7: 539. DOI: [10.1038/msb.2011.75](https://doi.org/10.1038/msb.2011.75)
- Smith M.E. 1985. Setal Morphology and Its Intraspecific Variation in *Derodigitata* and *Deronivea* (Oligochaeta: Naididae). *Transactions of the American Microscopical Society* 104 (1): 45-51.
- Sturmbauer Ch., Opadiya G.B., Niederstatter H. et al. 1999. Mitochondrial DNA reveals cryptic oligochaete species differing in cadmium resistance. *Molecular Biology and Evolution* 16(7): 967-974.
- Timm T. 1989. *Tasserkidrilus acäpillatus* (Finogenova, 1972) in lake Peipsi, with a revision of the genus *Tasserkidrilus* Holmquist, 1985 (Oligochaeta, Tubificidae). *Proceedings of the Academy of Sciences of the Estonian SSR. Biology* 38 (1): 52-60. DOI: [10.3176/biol.1989.1.08](https://doi.org/10.3176/biol.1989.1.08)
- Timm T. 2009. A guide to the freshwater Oligochaeta and Polychaeta of Northern and Central Europe. *Lauterbornia* 66: 1-235.
- Timm T. 2017. Aquatic microdrile Oligochaeta (Annelida, Clitellata): New nominal taxa and combinations since 1984. *Zootaxa* 4282 (3): 401-452. DOI: [10.11646/zootaxa.4282.3.1](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4282.3.1)
- Vivien R., Tixier G., Lafont M. 2014. Use of oligochaete communities for assessing the quality of sediments in watercourses of the Geneva area and Artois-Picardie basin (France): proposition of heavy metal toxicity thresholds. *Ecohydrology and Hydrobiology* 14: 142-51. DOI: [10.1016/j.ecohyd.2014.03.003](https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2014.03.003)
- Vivien R., Wyler S., Lafont M. et al. 2015. Molecular barcoding of aquatic oligochaetes: implications for biomonitoring. *PLOS One* 10 (4): e0125485. DOI: [10.1371/journal.pone.0125485](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125485)
- Vivien R., Holzmann M., Werner I. et al. 2017. Cytochrome c oxidase barcodes for aquatic oligochaete identification: development of a Swiss reference database. *PeerJ Life and Environment* 5: e4122(2) DOI: [10.7717/peerj.4122](https://doi.org/10.7717/peerj.4122)
- Vivien R., Apothéloz-perret-Gentil L., Pawlowski J. et al. 2019. Testing different (e)DNA metabarcoding approaches to assess aquatic oligochaete diversity and the biological quality of sediments. *Ecological Indicators* 106: 105453. DOI: [10.1016/j.ecolind.2019.105453](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105453)
- Vivien R., Martinez M.C., Lafont M. et al. 2020. Effect thresholds of metals in stream sediments based on in situ oligochaete communities. *Environments* 7 (4): 1-15. DOI: [10.3390/environments7040031](https://doi.org/10.3390/environments7040031)
- Vivien R., Apothéloz-perret-Gentil L., Pawlowski J. et al. 2020. High-throughput DNA barcoding of oligochaetes for abundance-based indices to assess the biological quality of sediments in streams and lakes. *Scientific Reports* 10: 1-9. DOI: [10.1038/s41598-020-58703-2](https://doi.org/10.1038/s41598-020-58703-2)
- Zhou T., Jiang W., Wang H. et al. 2021. DNA barcoding of Naididae (Annelida, Oligochaeta), based on cytochrome C oxidase gene and ITS2 region in China. *Biodiversity Data Journal* 9: e73556. DOI: [10.3897/BDJ.9.e73556](https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e73556)
- Zinchenko T.D., Gladyshev M.I., Makhutova O.N. et al. 2014. Saline rivers provide arid landscapes with a considerable amount of biochemically valuable production of chironomid (Diptera) larvae. *Hydrobiologia* 722: 115-128. DOI: [10.1007/s10750-013-1684-5](https://doi.org/10.1007/s10750-013-1684-5)
- Батурина М.А. 2022. Структура сообществ малощетинковых червей (Annelida: Oligochaeta) р.Вычегда в зоне влияния очищенных сточных вод ЦБК. *Сибирский экологический журнал* 6: 693-706. DOI: [10.15372/SEJ20220606](https://doi.org/10.15372/SEJ20220606)
- Попченко В.И. 1988. Водные малощетинковые черви (*Oligochaeta limnicola*) Севера Европы. Ленинград: Наука.
- Чекановская О.В. 1962. Водные малощетинковые черви фауны СССР. Москва; Ленинград: Наука.