

## КОЛОНИАЛЬНАЯ АСЦИДИЯ *DIDEMNUM VEXILLUM* КОТТ, 2002 – ЧУЖЕРОДНЫЙ ВИД В ЗАЛИВЕ ПЕТРА ВЕЛИКОГО (ЯПОНСКОЕ МОРЕ)

© 2016 Звягинцев А.Ю.<sup>1\*</sup>, Санамян К.Э.<sup>2\*\*</sup>, Туранов С.В.<sup>1,4\*\*\*</sup>,  
Картавцев Ю.Ф.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук

<sup>2</sup> Камчатский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Тихоокеанский институт географии Дальневосточного отделения Российской академии наук

<sup>3</sup> Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690059

<sup>4</sup> Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет, Владивосток, 690087

E-mail: \* [ayzvyagin@gmail.com](mailto:ayzvyagin@gmail.com), \*\* [ascidiacea@sanamyan.com](mailto:ascidiacea@sanamyan.com), \*\*\* [strucoal@mail.ru](mailto:strucoal@mail.ru)

Поступила в редакцию 02.08.2014

В ноябре 2013 г. в зал. Восток (зал. Петра Великого Японского моря) в обрастании экспериментальной установки по выращиванию тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus* обнаружены массовые поселения колониальной асцидии, ранее не встреченной в зал. Петра Великого. Таксономическая идентификация колониальных асцидий представляет собой большую сложность, и часто морфологические и генетические методы определения видов не дают желаемого результата. Использование в данной работе молекулярно-филогенетических методов указывает на принадлежность последовательностей нуклеотидов, полученных от трёх колоний асцидий из зал. Восток, к инвазионному виду *Didemnum vexillum* Kott, 2002. Этот вид известен как инвазионный на мидиевых и устричных плантациях в разных районах Мирового океана в разные годы.

**Ключевые слова:** асцидия, *Didemnum vexillum*, биоинвазия, чужеродный вид, залив Восток, филогенетический анализ, гаплотипы, COI.

### Введение

Антропогенное расселение видов (биологические инвазии) происходит со времён неолита вследствие снятия географических и экологических барьеров, сдерживающих естественное распространение. В ноябре 2013 г. в зал. Восток (зал. Петра Великого Японского моря) в обрастании экспериментальной установки по выращиванию тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus* обнаружены массовые поселения колониальной асцидии семейства Didemnidae. Таксономическая идентификация дидемнид представляет собой большую сложность в методологическом отношении (очень мелкие зоиды, у которых не всегда

можно исследовать необходимые для определения признаки). В плане систематики, род *Didemnum* объединяет более 200 валидных видов, различия между которыми не всегда чёткие.

Собранные в зал. Восток колонии представляли собой мясистые мягкие массы неправильной формы с дольчатыми выростами бежевого цвета. Мелкие зоиды расположены в поверхностном слое туники, где они образуют плотно организованные небольшие системы овальной или неправильной формы. Зоиды в исследованных колониях были стерильны (не содержали гонад, которые служат важнейшим признаком для определения дидемнид). Однако



**Рис. 1.** Внешний вид колониальной асцидии *Didemnum vexillum* Kott, 2002 в обрастании установок для культивирования мидии в зал. Восток Японского моря.

колонии подобной формы имеют очень немногие виды дидемнид, одним из которых является *Didemnum vexillum* Kott, 2002 (рис. 1). В колониях также были найдены личинки; их строение соответствует строению личинок названного вида. Этот вид в последние годы известен как инвазионный вид на мидиевых и устричных плантациях в разных районах Мирового океана. История его изучения весьма интересна. Впервые большая вспышка численности и рост биомассы колониальной дидемниды, предварительно определённой как *D. lutarium*, были зафиксированы в августе 2000 г. в Массачусетсе [см. Lambert, 2009]. Затем, в 2001 г. подобная вспышка тогда ещё неизвестной дидемниды была зафиксирована в Новой Зеландии, в гавани Whangamata. Внезапность появления, скорость роста и размеры колоний, которые быстро обрастали доступный субстрат, были настолько впечатляющими, что вид получил английское название Whangamata Monster. С самого начала было сделано предположение, что вид является вселенцем в Новую Зеландию. В 2002 г. он был формально описан Kott [2002] как новый под названием *Didemnum vexillum*. Kott [2002] не считала этот вид

инородным вселенцем в Новую Зеландию, так как не было никаких свидетельств, подтверждающих этот факт, а мелководная фауна дидемнид этого региона плохо известна. Подобные вспышки численности и морфологически сходные колонии были зафиксированы и во многих других регионах (включая Европу, США, Британскую Колумбию, Японию). Впоследствии Lambert [2009] опубликовала большой обзор, где показала, что во всех подобных случаях под разными названиями фигурировал один и тот же вид – *D. vexillum*. Это было показано как на морфологическом, так и на генетическом уровнях. Lambert [2009] считает, что, скорее всего, вид происходит из вод Японии, откуда он и был распространён в другие регионы мира.

Целью настоящей работы было уточнение с помощью молекулярно-генетического анализа видовой принадлежности обнаруженной авторами асцидии.

#### Материал и методы

Образцы ткани колониальной асцидии были собраны из трёх точек на установках марикультуры в акватории зал. Восток (табл. 1) и зафиксированы

Таблица 1. Информация о материале, задействованном в настоящей работе

№	Видовое название	Номер образца / гаплотипа	Номер доступа в Genbank (NCBI)	Номер гаплотипа в настоящей работе / филогенетический кластер	Место сбора образца	Источник
1	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_736	EU419401	Нар 1/B	Ise Bay, Japan 1 (34°54'N, 136°36'E)	Stefaniak et al., 2009
2	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_715	EU419402	Нар 1/B	Coast Guard floats, Newcastle, NH 1 (43°04.3'N, 70°42.6'W)	Stefaniak et al., 2009
3	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_694	EU419403	Нар 1/B	Floats, Concarneau, France 1 (47°52.2'N, 3°54.9'W)	Stefaniak et al., 2009
4	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_742	EU419405	Нар 1/B	Mussel lines, South Island, New Zealand 1 (41°16.1'S, 174°0.2'E)	Stefaniak et al., 2009
5	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_689	EU419409	Нар 1/B	Floats, Le Havre, France 1 (49°29.3'N, 0°5.6'E)	Stefaniak et al., 2009
6	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_714	EU419410	Нар 1/B	Sandwich tide pool, MA 2 (41°46.4'N, 70°29.4'W)	Stefaniak et al., 2009
7	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_716	EU419411	Нар 1/B	Coast Guard floats, Newcastle, NH 2 (43°04.3'N, 70°42.6'W)	Stefaniak et al., 2009
8	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_731	EU419414	Нар 1/B	Spuds Marina floats, Bodega Bay, CA 1 (38°19.8'N, 123°03.5'W)	Stefaniak et al., 2009
9	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_697	EU419415	Нар 1/B	The Netherlands 1 (51°44.4'N, 3°49.9'E)	Stefaniak et al., 2009
10	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_698	EU419416	Нар 1/B	Malahide Harbor floats, Dublin, Ireland 1 (53°26'N, 6°9'W)	Stefaniak et al., 2009
11	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_700	EU419417	Нар 1/B	Georges Bank 6 (41°59.3'N, 67°20.9'W)	Stefaniak et al., 2009
12	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_718	EU419418	Нар 1/B	Ocean Pt., Boothbay, ME 1 (43°48.9'N, 69°35.8'W)	Stefaniak et al., 2009
13	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_723	EU419419	Нар 1/B	Taylor Shellfish lines, Dabob Bay, WA 1 (47°49.1'N, 122°49.5'W)	Stefaniak et al., 2009
14	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_724	EU419420	Нар 1/B	Taylor Shellfish lines, Dabob Bay, WA 1 (47°49.1'N, 122°49.5'W)	Stefaniak et al., 2009
15	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_743	EU419421	Нар 1/B	Pilings, South Island, New Zealand 2 (41°16'S, 174°00'E)	Stefaniak et al., 2009
16	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_732	EU419422	Нар 2/B	Spuds Marina floats, Bodega Bay, CA 2 (38°19.8'N, 123°03.5'W)	Stefaniak et al., 2009
17	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_692	EU419423	Нар 3/B	Floats, Brest, France 1 (48°23.4'N, 4°25.5'W)	Stefaniak et al., 2009
18	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_693	EU419424	Нар 3/B	Floats, Brest, France 1 (48°23.4'N, 4°25.5'W)	Stefaniak et al., 2009
19	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_695	EU419425	Нар 1/B	Floats, Concarneau, France 2 (47°52.2'N, 3°54.9'W)	Stefaniak et al., 2009
20	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_690	EU419426	Нар 4/B	Floats, Le Havre, France 2 (49°29.3'N, 0°5.6'E)	Stefaniak et al., 2009
21	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_691	EU419427	Нар 4/B	Subtidal, Le Havre, France 3 (49°29.3'N, 0°5.6'E)	Stefaniak et al., 2009
22	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_744	EU419428	Нар 1/B	Pilings, Port Shakespeare, New Zealand 3 (41°16'S, 174°00'E)	Stefaniak et al., 2009
23	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_745	EU419429	Нар 2/B	Steel Mariner hull, New Zealand 4 (41°16.4'S, 174°00.4'E)	Stefaniak et al., 2009
24	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_696	EU419430	Нар 1/B	Floats, Perros-Guirec, France 1 (48°48.3'N, 3°26.5'W)	Stefaniak et al., 2009
25	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_730	EU419431	Нар 1/B	Cass Marina floats, Sausalito, CA 3 (37°51.8'N, 122°29.1'W)	Stefaniak et al., 2009

26	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_737	EU419434	Hap 3/B	Otsuchi Bay, Marine Lab, Japan 2 (39°21.2'N, 141°55.1'W)	Stefaniak et al., 2009
27	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_738	EU419435	Hap 3/B	Otsuchi Bay, Marine Lab, Japan 2 (39°21.2'N, 141°55.1'W)	Stefaniak et al., 2009
28	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_720	EU419436	Hap 4/B	Des Moines Marina, WA 1 (47°23.8'N, 122°19.8'W)	Stefaniak et al., 2009
29	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_725	EU419439	Hap 1/B	Taylor Shellfish lines, Totten Inlet, WA 1	Stefaniak et al., 2009
30	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_734	EU419441	Hap 3/B	Oyster farm, Cortes Island, BC, Canada 2 (49°12'N, 125°52'W)	Stefaniak et al., 2009
31	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_702	EU419442	Hap 1/B	Bushy Rock, Groton, CT 1 (41°18.9'N, 72°03.2'W)	Stefaniak et al., 2009
32	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_703	EU419443	Hap 1/B	Bushy Rock, Groton, CT 1 (41°18.9'N, 72°03.2'W)	Stefaniak et al., 2009
33	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_704	EU419444	Hap 1/B	Bushy Rock, Groton, CT 1 (41°18.9'N, 72°03.2'W)	Stefaniak et al., 2009
34	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_705	EU419445	Hap 1/B	Bushy Rock, Groton, CT 1 (41°18.9'N, 72°03.2'W)	Stefaniak et al., 2009
35	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_706	EU419446	Hap 1/B	Bushy Rock, Groton, CT 1 (41°18.9'N, 72°03.2'W)	Stefaniak et al., 2009
36	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_707	EU419447	Hap 1/B	Bushy Rock, Groton, CT 1 (41°18.9'N, 72°03.2'W)	Stefaniak et al., 2009
37	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_710	EU419449	Hap 1/B	Bushy Rock, Groton, CT 1 (41°18.9'N, 72°03.2'W)	Stefaniak et al., 2009
38	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_699	EU419450	Hap 2/B	Georges Bank 5 (41°55.4'N, 67°17.6'W)	Stefaniak et al., 2009
39	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_719	EU419451	Hap 1/B	Marry Island, Damariscotta River, ME 1 (43°57.5'N, 69°34.6'W)	Stefaniak et al., 2009
40	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_717	EU419452	Hap 1/B	Mass. Maritime Academy floats 1 (41°44.9'N, 70°37.6'W)	Stefaniak et al., 2009
41	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_711	EU419453	Hap 1/B	Bushy Rock, Groton, CT 10 (41°18.9'N, 72°03.2'W)	Stefaniak et al., 2009
42	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_712	EU419454	Hap 1/B	Latimer Ledge, CT 1 (41°18.2'N, 71°54.6'W)	Stefaniak et al., 2009
43	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_713	EU419455	Hap 1/B	Latimer Ledge, CT 1 (41°18.2'N, 71°54.6'W)	Stefaniak et al., 2009
44	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_739	EU419457	Hap 4/B	Asamushi, Japan 1 (40°53.5'N, 140°51.6'E)	Stefaniak et al., 2009
45	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_740	EU419458	Hap 5/B	Asamushi, Japan 1 (40°53.5'N, 140°51.6'E)	Stefaniak et al., 2009
46	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH_UROCH_741	EU419459	Hap 6/B	Asamushi, Japan 1 (40°53.5'N, 140°51.6'E)	Stefaniak et al., 2009
47	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH.UROCH.763	EU742662	Hap 1/B	Transect 6, Appledore Island, ME 1 (42°59.4'N, 70°37.1'W)	Stefaniak et al., 2009
48	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH.UROCH.752	EU742664	Hap 2/B	Georges Bank DLWR 05008 sta. 508108 (41°57.7'N, 67°25.6'W)	Stefaniak et al., 2009
49	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH.UROCH.755	EU742666	Hap 3/B	Georges Bank 10 (41°55.5'N, 67°31.0'W)	Stefaniak et al., 2009
50	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH.UROCH.756	EU742667	Hap 1/B	Asamushi, Japan 4 (40°53.5'N, 140°51.6'E)	Stefaniak et al., 2009
51	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH.UROCH.757	EU742668	Hap 7/A	Misaki MBS dock, Japan 1 (35°09.5'N, 139°36.7'W)	Stefaniak et al., 2009
52	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH.UROCH.758	EU742669	Hap 8/A	Misaki MBS dock, Japan 1 (35°09.5'N, 139°36.7'W)	Stefaniak et al., 2009
53	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH.UROCH.759	EU742670	Hap 7/A	Misaki MBS dock, Japan 1 (35°09.5'N, 139°36.7'W)	Stefaniak et al., 2009
54	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH.UROCH.760	EU742671	Hap 7/A	Misaki MBS dock, Japan 1 (35°09.5'N, 139°36.7'W)	Stefaniak et al., 2009
55	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH.UROCH.761	EU742672	Hap 7/A	Misaki MBS dock, Japan 1 (35°09.5'N, 139°36.7'W)	Stefaniak et al., 2009
56	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH.UROCH.762	EU742673	Hap 7/A	Misaki MBS dock, Japan 1 (35°09.5'N, 139°36.7'W)	Stefaniak et al., 2009
57	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH.UROCH.767	EU742674	Hap 1/B	Millstone Powerplant quarry, Niantic, CT 4 (41°18.4'N, 72°09.9'W)	Stefaniak et al., 2009
58	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH.UROCH.765	EU742676	Hap 1/B	Wharf Piles, Port Nelson, New Zealand 1 (41°15.5'S, 173°16.6'E)	Stefaniak et al., 2009

59	<i>Didemnum vexillum</i>	RMNH.UROCH.766	EU742677	Hap 1/B	Picton, New Zealand A (41°17.1'S, 174°0.5'E)	Stefaniak et al., 2009
60	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_2	JF738057	Hap 4/B	Shizugawa Bay, Japan (38°38.4'N, 141°27.2'E)	Smith et al., 2012
61	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_3	JF738058	Hap 1/B	Ise Bay, Japan (34°29.0'N, 136°52.3'E)	Smith et al., 2012
62	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_3	JF738058	Hap 1/B	Shizugawa Bay, Japan (38°38.4'N, 141°27.2'E)	Smith et al., 2012
63	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_3	JF738058	Hap 1/B	Marlborough Sounds, NZ (41°08.4'S, 173°59.11'E)	Smith et al., 2012
64	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_3	JF738058	Hap 1/B	Wellington, NZ (41°17.0'S, 174°46.4'E)	Smith et al., 2012
65	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_3	JF738058	Hap 1/B	Nelson, NZ (41°15.2'S, 173°16.3'E)	Smith et al., 2012
66	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_3	JF738058	Hap 1/B	Whangamata Harbour, NZ (37°12.0'S, 175°52.4'E)	Smith et al., 2012
67	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_3	JF738058	Hap 1/B	Lyttelton, NZ (43°36.2'S, 172°43.0'E)	Smith et al., 2012
68	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_5	JF738059	Hap 3/B	Shizugawa Bay, Japan (38°38.4'N, 141°27.2'E)	Smith et al., 2012
69	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_5	JF738059	Hap 3/B	Marlborough Sounds, NZ (41°08.4'S, 173°59.11'E)	Smith et al., 2012
70	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_6	JF738060	Hap 3/B	Shizugawa Bay, Japan (38°38.4'N, 141°27.2'E)	Smith et al., 2012
71	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_9	JF738061	Hap 7/A	Sagami Bay, Japan (35°09.3'N, 139°36.4'W)	Smith et al., 2012
72	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_10	JF738062	Hap 8/A	Sagami Bay, Japan (35°09.3'N, 139°36.4'W)	Smith et al., 2012
73	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_11	JF738063	Hap 9/A	Izu Peninsula, Japan (34°39.6'N, 138°56.2'W)	Smith et al., 2012
74	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_12	JF738064	Hap 10/A	Izu Peninsula, Japan (34°39.6'N, 138°56.2'W)	Smith et al., 2012
75	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_13	JF738065	Hap 11/A	Ise Bay, Japan (34°29.0'N, 136°52.3'E)	Smith et al., 2012
76	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_14	JF738066	Hap 12/A	Sagami Bay, Japan (35°09.5'N, 139°36.7'W)	Smith et al., 2012
77	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_14	JF738066	Hap 12/A	Izu Peninsula, Japan (34°39.6'N, 138°56.2'W)	Smith et al., 2012
78	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_15	JF738067	Hap 13/A	Izu Peninsula, Japan (34°39.6'N, 138°56.2'W)	Smith et al., 2012
79	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_16	JF738068	Hap 14/A	Shizugawa Bay, Japan (38°38.4'N, 141°27.2'E)	Smith et al., 2012
80	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_17	JF738069	Hap 15/A	Ise Bay, Japan (34°29.0'N, 136°52.3'E)	Smith et al., 2012
81	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_1	JQ663509	Hap 16/B	Bigelow Lab, Boothbay harbor dock, ME 1 (43°50.4'N, 69°38.9'W)	Stefaniak et al., 2012
82	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_1	JQ663509	Hap 16/B	Darling Marine Lab dock, ME 10 (43°56.1'N, 69°34.9'W)	Stefaniak et al., 2012
83	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_7	JQ663510	Hap 5/B	Asamushi MRC rocks, Japan 6 (40°54.172'N, 140°51.318'E)	Stefaniak et al., 2012
84	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_8	JQ663511	Hap 6/B	Usujiri Fisheries Station, Japan 3 (41°56.155'N, 140°56.887'E)	Stefaniak et al., 2012
85	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_18	JQ663512	Hap 17/A	Asamushi MRC rocks, Japan 3 (40°54.172'N, 140°51.318'E)	Stefaniak et al., 2012
86	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_19	JQ663513	Hap 18/A	Asamushi MRC rocks, Japan 3 (40°54.172'N, 140°51.318'E)	Stefaniak et al., 2012
87	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_20	JQ663514	Hap 19/A	Misaki MBS float 2, Japan 3 (35°09.456'N, 139°36.728'E)	Stefaniak et al., 2012
88	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_21	JQ663515	Hap 8/A	Misaki Marine Lab dock, Japan 1 (35°09.456'N, 139°36.728'E)	Stefaniak et al., 2012
89	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_22	JQ663516	Hap 20/B	Usujiri Fisheries Station, Japan 2 (41°56.155'N, 140°56.887'E)	Stefaniak et al., 2012
90	<i>Didemnum vexillum</i>	haplotype_23	JQ663517	Hap 21/C	Usujiri Fisheries Station, Japan 8 (41°56.155'N, 140°56.887'E)	Stefaniak et al., 2012
91	<i>Didemnum vexillum</i>	DVII	KM036505	Hap 3/B	Японское море, залив Восток, бухта Тихая заводь (42°53.625'N, 132°43.701'E)	Оригинальные данные

92	<i>Didemnum vexillum</i>	DVI2	КМ036506	Нар 3/В	Японское море, залив Восток, бухта Тихая заводь (42°53.625'N, 132°43.701'E)	Оригинальные данные
93	<i>Didemnum vexillum</i>	DVI3	КМ036507	Нар 22/В	Японское море, залив Восток, бухта Тихая заводь (42°53.625'N, 132°43.701'E)	Оригинальные данные
94	<i>Didemnum</i> sp.	RMNH.UROCH.747	EU419407	-	Subtidal, Doubtful Sound, New Zealand (45°16.8'S, 169°00'E)	Stefaniak et al., 2009
95	<i>Didemnum</i> sp.	RMNH.UROCH.748	EU419408	-	Subtidal, Doubtful Sound, New Zealand (45°16.8'S, 169°00'E)	Stefaniak et al., 2009
96	<i>Didemnum albidum</i>	RMNH.UROCH.750	EU419432	-	Georges Bank, USA (42°07.1'N, 66°44.8'W)	Stefaniak et al., 2009
97	<i>Didemnum albidum</i>	RMNH.UROCH.751	EU419456	-	Georges Bank, USA (42°07.1'N, 66°44.8'W)	Stefaniak et al., 2009
98	<i>Didemnum psammathodes</i>	RMNH.UROCH.746	EU742661	-	Bocas del Toro, Panama (9°21'N, 82°12'W)	Stefaniak et al., 2009
99	<i>Didemnum psammathodes</i>	strain_sri1	JN624758	-	-	GeneBank, NCBI

**Таблица 2.** Значения дивергенции (K2P, %) между последовательностями нуклеотидов гена *Co-1* асцидий рода *Didemnum* в группах сравнения

Группа сравнения	Кластер А	Кластер В	Кластер С	<i>Didemnum albidum</i>	<i>Didemnum psammatode</i>
<i>D. vexillum</i> , кластер А	–				
<i>D. vexillum</i> , кластер В	4.31	–			
<i>D. vexillum</i> , кластер С	5.05	6.04	–		
<i>Didemnum albidum</i>	30.21	31.57	31.86	–	
<i>Didemnum psammatode</i>	10.47	11.28	11.61	32.35	–
<i>Didemnum sp.</i>	16.42	17.11	17.61	33.10	19.97

в 95%-м этиловом спирте. Тотальная ДНК была выделена из образцов посредством высокотемпературного щелочного лизиса [Montero-Pau et al., 2008]. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для амплификации фрагмента митохондриального гена *Co-1* была получена в реакционной смеси объемом 10 мкл. В её состав входили 6.4 мкл деионизированной H<sub>2</sub>O, 0.5 мкл 10 мкМ смеси динуклеотидтрифосфатов (dNTPs), 1 мкл 10× ПЦР буфера (Evrogen), 0.4 мкл 50 мкМ MgCl<sub>2</sub>, 0.3 мкл 10 мкМ раствора прямого и обратного праймеров, 0.1 мкл Taq полимеразы (Evrogen), а также 1 мкл раствора тотальной ДНК из образцов тканей асцидий. Последовательности праймеров (Tun\_forward, Tun\_reverse2), необходимых для получения участка гена *Co-1*, а также температурный алгоритм ПЦР заимствованы из работы Stefaniak et al. [2009]. Проверка качества полученных фрагментов была выполнена посредством электрофореза в 1%-м агарозном геле (Helicon) с последующей экспозицией в растворе бромидистого этидия и визуализацией под ультрафиолетовым светом.

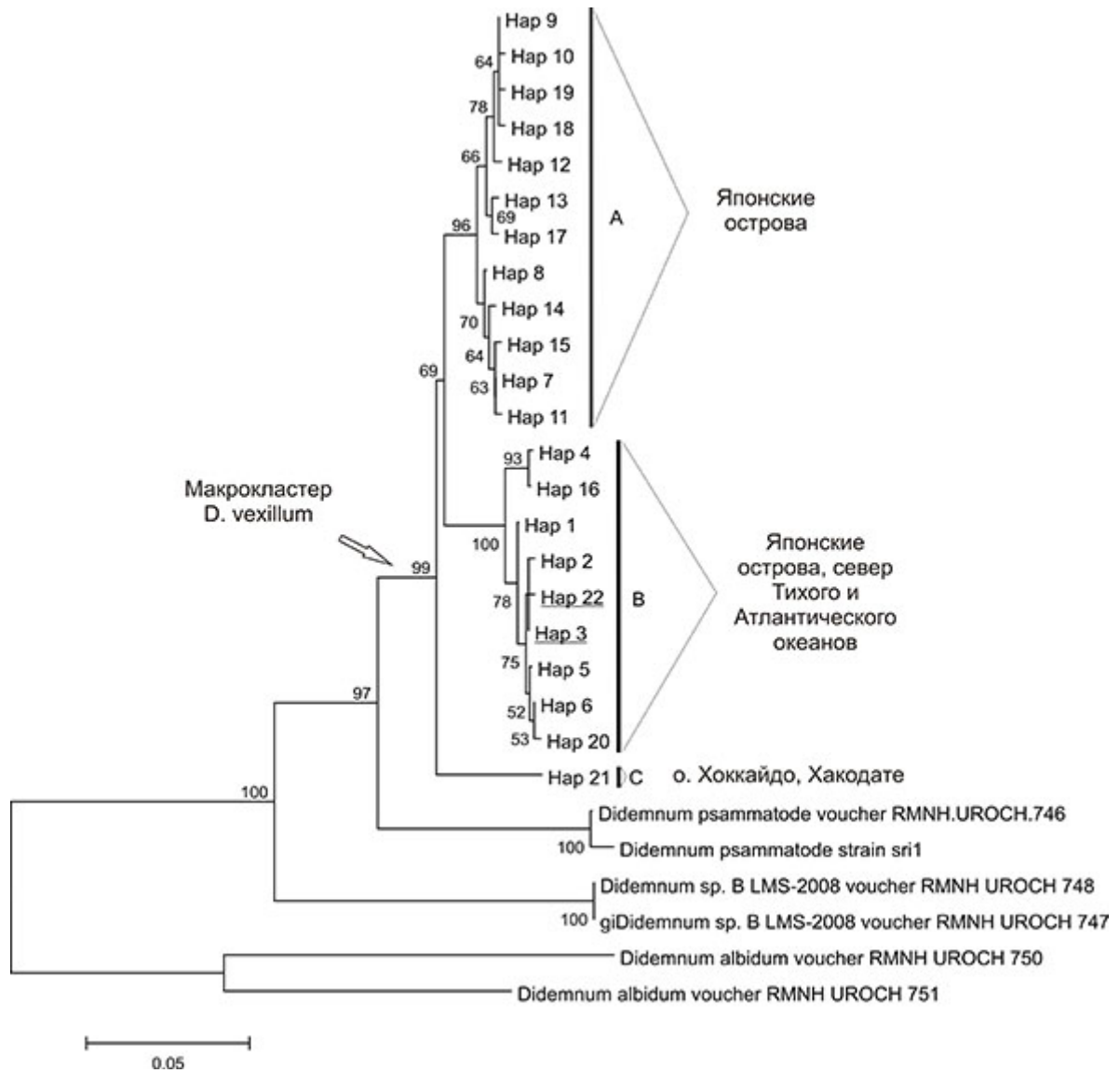
Секвенирование ампликонов было выполнено с применением набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc.) и праймеров, задействованных при ПЦР. Капиллярный электрофорез фрагментов был проведён на базе секвенатора ABI Prism DNA sequencer в ИБМ ДВО РАН. Сборку консенсусных последовательностей проводили в программе ChromasPro 1.34 [ChromasPro,

2015]. Выравнивание, верификация рамки считывания и филогенетический анализ осуществлены с привлечением опубликованных ранее по теме работы последовательностей в программном пакете MEGA 5 [Tamura et al., 2011]. Номера доступа последовательностей, места сбора с координатами оригинальных и заимствованных из генного банка образцов приведены в таблице 1.

Филогенетический анализ был проведён на основе гаплотипов, полученных из совокупного набора последовательностей в программе DNASP v5.1 [Librado, Rozas, 2009]. В качестве внешней группы в анализ были добавлены 3 близких вида асцидий: *D. psammatode*, *D. sp.* и *D. albidum* (табл. 1). Консенсусное филогенетическое дерево ближайшего соседства (рис. 2) было получено из объединённого набора последовательностей на основе 1000 реплик бутстрепа и коррекции генетических расстояний по двухпараметрической модели Кимуры [Kimura, 1980], которая также была использована для расчёта значений дивергенции между группами сравнения (табл. 2).

### Результаты и обсуждение

Длина полученных после выравнивания последовательностей (536 п.о.) оказалась несколько меньше стандартной длины участков гена *Co-1*, применяемых для идентификации *D. vexillum* (586 п.о.). Уменьшение количества анализируемых сайтов ожидаемо привело к уменьшению



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево ближайшего соседства представителей колониальных асцидий рода *Didemnum*, сконструированное на основе нуклеотидных последовательностей гена *Co-1*. Цифрами напротив узлов приведены оценки бутстреп-теста устойчивости топологии. В кластере В подчеркнуты названия гаплотипов, найденных при анализе оригинальной выборки. Слева внизу – масштаб для длин ветвей; указан в заменах нуклеотидов на позицию.

полиморфизма и, как следствие, количества гаплотипов. Согласно литературным данным, их количество при учёте всех накопленных к настоящему моменту последовательностей достигает 23. При этом максимальное нуклеотидное разнообразие и максимальное количество уникальных гаплотипов сконцентрировано в колониях асцидий из акватории Японских островов. Общее число гаплотипов, найденных нами, не превышает 22. Среди последовательностей,

полученных для образцов из изученной выборки в зал. Восток обнаружено 2 гаплотипа (табл. 1). Необходимо отметить, что в данной выборке нет уникальных гаплотипов *D. vexillum*, обычно выделяемых в пределах акваторий Японских островов.

Филогенетический анализ показывает (рис. 2), что гаплотипы *D. vexillum* выделяются в отдельный макрокластер, с подразделением на три самостоятельных кластера. Базальный (обозначен буквой С) представлен



уникальным гаплотипом из акватории близ Хакодате (юго-западная оконечность о. Хоккайдо). Кластер А содержит гаплотипы, в большинстве уникальные, также объединённые общей географической принадлежностью образцов – побережье Японских островов, как с тихоокеанской стороны, так и со стороны Японского моря. Кластер В объединяет географически наиболее широко распространённые гаплотипы, среди которых уникальными являются три: 16 (Бутбей Харбор), 20 (Хакодате) и 22 (залив Восток Японского моря). Оба гаплотипа из нашей выборки попадают в кластер В, показывая тем самым большую генетическую близость к широко распространённым гаплотипам *D. vexillum*.

Несмотря на сложную структуру внутривидовых отношений, вероятно, отражающую высокую изменчивость инвазионной колониальной асцидии, монофилетичность всех выявленных гаплотипов указывает на отношение их к одному таксону. Внутривидовая изменчивость, обусловленная дивергенцией по заменам нуклеотидов между группами А, В и С внутри макрокластера *D. vexillum* (4.31–6.04%), много меньше в сравнении со значениями дивергенции между последовательностями разных видов рода *Didemnum* (межвидовой диапазон составляет от 10.47 до 33.1%) (табл. 2). Всё это указывает на принадлежность последовательностей, полученных от трёх колоний асцидий из зал. Восток, к инвазионному виду *D. vexillum*. Таким образом, можно констатировать наличие на коллекторах марикультуры в зал. Восток Японского моря вида *D. vexillum*, однозначно идентифицированного при помощи молекулярно-генетического маркера – последовательности нуклеотидов гена *Co-1*.

Выделение трёх подкластеров в составе видового макрокластера *D. vexillum* – «классическая» структура внутривидовой филогении, выявляемой

на основе фрагмента митохондриального гена *Co-1* [Stefaniak et al., 2009; Smith et al., 2012; Stefaniak et al., 2012]. Данная особенность филогенетической структуры не является основанием к выделению новой таксономической группировки, но определяет отношения гаплотипов асцидии с разной способностью к расселению в новые биотопы. Так, предполагается, что кластер В (настоящей работы) состоит из наиболее приспособленных к инвазионности колоний [Smith et al., 2012]. В то же время анализ фрагментов ядерного генома не выявляет подобной подразделённости [Stefaniak et al., 2009, 2012], что оставляет открытым вопрос о молекулярных механизмах, способствующих успешному расселению и пластичности данной колониальной асцидии.

#### Благодарности

Авторы выражают благодарность сотруднику ИБМ ДВО РАН к. б. н. С.Л. Кондрашёву за предоставление материала – пробы колониальных асцидий с мидиевых установок в зал. Восток. Анализ ДНК-идентификации производился за счёт поддержки Дальневосточного Федерального Университета грантом РФФИ (соглашение № 14-50-00034). Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Федерального агентства научных организаций 15-И-6-012 по программе «Дальний Восток».

#### Литература

- ChromasPro version 1.7.7 Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia. 2015 // (ChromasPro. <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). Проверено 29.03.2016.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // Journal of molecular evolution. 1980. V. 16. № 2. P. 111–120.
- Kott P. A complex didemnid ascidian from Whangamata, New Zealand // Journal of

- the Marine Biological Association of the UK. 2002. V. 82. № 4. P. 625–628.
- Lambert G. Adventures of a sea squirt sleuth: unraveling the identity of *Didemnum vexillum*, a global ascidian invader // Aquatic Invasions. 2009. V. 4. № 1. P. 5–28.
- Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452.
- Montero-Pau J., Gómez A., Muñoz J. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs // Limnology and Oceanography: Methods. 2008. V. 8. № 6. P. 218–222.
- Smith K.F., Stefaniak L., Saito Y., Gemmill C.E.C., Cary S.C., Fidler A. Increased inter-colony fusion rates are associated with reduced COI haplotype diversity in an invasive colonial ascidian *Didemnum vexillum* // PloS one. 2012. V. 7. № 1. P. e30473 // (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0030473>). Проверено 29.03.2016.
- Stefaniak L., Lambert G., Gittenberger A., Zhang H., Lin S., Whitlatch R.B. Genetic conspecificity of worldwide populations of *Didemnum vexillum* Kott, 2002 // Aquatic Invasions. 2009. V. 4. № 1. P. 29–44.
- Stefaniak L., Zhang H., Gittenberger A., Smith K., Holsinger K., Lin S., Whitlatch R.B. Determining the native region of the putatively invasive ascidian *Didemnum vexillum* Kott, 2002 // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2012. V. 422. P. 64–71.
- 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 // Molecular Biology and Evolution. 2011. V. 28. № 10. P. 2731–2739.

**COLONIAL ASCIDIA  
*DIDEMNUM VEXILLUM* KOTT, 2002  
IS AN ALIEN SPECIES IN PETER  
THE GREAT BAY (THE SEA OF JAPAN)**

© 2016 Zvyagintsev A.Yu.<sup>1\*</sup>, Sanamyan K.E.<sup>2\*\*</sup>, Turanov S.V.<sup>1,4\*\*\*</sup>,  
Kartavtsev Yu.F.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Establishment of Science, A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences

<sup>2</sup> Kamchatka Affiliated Branch of the Federal State Budgetary Establishment of Science, the Pacific Ocean Institute of Geography of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences

<sup>3</sup> Far-Eastern Federal University, Vladivostok, 690059

<sup>4</sup> Far-Eastern State Technical Fishery University, Vladivostok, 690087

E-mail: \* [ayzvyagin@gmail.com](mailto:ayzvyagin@gmail.com), \*\* [ascidiacea@sanamyan.com](mailto:ascidiacea@sanamyan.com), \*\*\* [strucoal@mail.ru](mailto:strucoal@mail.ru)

In November 2013 in Vostok Bay (Peter the Great Bay, the Sea of Japan), in the fouling of experimental installation of the *Mytilus trossulus* mussel culture, the mass settlements of colonial ascidia not previously observed in Peter the Great Bay were registered. The taxonomic identification of colonial ascidia is rather complicated, and frequently the morphological and genetic methods of the species determination don't give a clear result. The usage of molecular-phylogenetic methods allowed us to indicate the sequences of nucleotides obtained from 3 colonies of ascidia from the Vostok Bay as inherent to the invasive species *Didemnum vexillum* Kott, 2002. This species is known as an invader in aquaculture settlements of mussels and oysters in the various regions of the World Ocean in different years.

**Key words:** ascidia, *Didemnum vexillum*, bioinvasion, alien species, Vostok Bay, phylogenetic analysis, haplotypes, COI.