


Форма «Т». Титульный лист отчета о выполнении проекта

Название проекта: Морские виды, объекты промысла и марикультуры, в условиях гибридизации и клональных раковых инфекций	Номер проекта: 19-74-20024		
	Код типа проекта: НИМУ(2019)		
	Отрасль знания: 04		
Фамилия, имя, отчество (при наличии) руководителя проекта: Стрелков Петр Петрович	Контактные телефон и e-mail руководителя проекта: +79213169430, p_strelkov@yahoo.com		
Полное и краткое название организации, через которую осуществляется финансирование проекта: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет" СПбГУ, Санкт-Петербургский государственный университет			
Наименование ОИ: Научный парк СПбГУ Научный парк СПбГУ			
Объем средств, фактически полученных от РНФ в 2021 г.: 6000 тыс. руб.	Год начала проекта: 2019	Год окончания проекта: 2022	
	Объем финансирования*, запрашиваемый на 2022 год: 6000 тыс. руб. <i>* Не может превышать объем средств, указанный на соответствующий год в соглашении между Российским научным фондом, руководителем проекта, организацией и владельцем крупного объекта научной инфраструктуры (между Российским научным фондом, руководителем проекта, организацией-владельцем крупного объекта научной инфраструктуры о предоставлении гранта на проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований) о предоставлении гранта на проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований, дополнительных соглашениях к данному соглашению (далее – соглашение).</i>		
Гарантирую, что при подготовке отчета не были нарушены авторские и иные права третьих лиц и/или имеется согласие правообладателей на представление в РНФ материалов и их использование РНФ для проведения экспертизы и для их обнародования.			
Подпись** руководителя проекта _____/П.П. Стрелков/ Подпись** руководителя организации*** _____/_____ Печать (при наличии) организации		Дата подачи отчета: 12.12.2021 г.	

** Подписи должны быть расшифрованы.

*** Либо уполномоченного представителя, действующего на основании доверенности или распорядительного документа. В случае подписания формы уполномоченным представителем организации (в т.ч. – руководителем филиала) к печатному экземпляру отчета прилагается копия распорядительного документа или доверенности, заверенная печатью организации.

Отчет о выполнении проекта
№ 19-74-20024

«Морские виды, объекты промысла и марикультуры, в условиях гибридизации и
клональных раковых инфекций»,
в 2021 году

**Номер регистрации сведений о начинаемой научно-исследовательской работе в единой государственной
информационной системе учета научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ
гражданского назначения (rosrid.ru):**

В соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 12 апреля 2013 г. № 327 «О единой государственной информационной системе учета научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ гражданского назначения».

AAAA-A19-119030690069-8

1.1. Заявленный в проекте план работы научного исследования на отчетный период

Формируется в соответствии с заявкой на участие в конкурсе.

В заявке проекта были заявлены 4 направления. Мы формулируем планы на 2021 г., отталкиваясь от исходных планов проекта и от промежуточных результатов 2019-20 гг.

Направление 1. Анализ паттернов гибридизации и интрогрессии. Мы планируем параллельно изучать три системы, каждая из которых включает популяции родительских видов (в том числе, интрогрессированные) и, в гибридных зонах, гибридов разных поколений. Это направление частично обеспечено заделами в виде коллекций и данных мониторинга гибридной зоны между *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова.

1.1. Завершить исследование гибридизации и интрогрессии у морских сельдей (*Clupea pallasii*, *C. harengus*) северо-восточной Европы по микросателлитным маркерам. Проверить гипотезу проекта о том, что различия между географическими и экологическими расами *Clupea pallasii* в регионе связаны с интрогрессивной гибридизацией этого вида с *C. harengus*.

1.2. Продолжить наблюдения за динамикой поселений «криптических» видов мидий *Mytilus edulis* и *M. trossulus* и гибридной зоны между ними в водах Кольского полуострова. Провести очередной этап мониторинга мидий вершины Кандалакшского залива. Пере-описать генетический состав поселений из точек последних генетических исследований в Кандалакшском заливе (Vainola, Strelkov 2011; Katolikova et al. 2016) и Кольском заливе (наши неопубликованные данные 2016 г., см. рис. 1.1.1.); на этих данных проверить гипотезу об экспансии *M. trossulus* в двух заливах в последние годы. Благодаря тому, что мы научились различать виды по морфологии раковин, не привлекая генетику, мы планируем разделить две научные задачи – изучения инвазивного, вредного вида *M. trossulus* в северных морях и изучения межвидовой гибридизации на примере мидий северных морей. В 2021 году мы планируем обработать и обобщить данные о биотопическом распределении *M. edulis* и *M. trossulus* в губе Тюва Кольского залива и динамике их симпатрических поселений за 2004-2018 гг., и о динамике *M. trossulus* в Кандалакшском заливе Белого моря за 1970-2020е гг.

1.3. Получить новые мультилокусные (SNP) данные для оценки степени гибридизации и разнообразия гибридных генотипов в «трехсторонней» (*M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*) гибридной зоны в Норвегии (если будет доступ к свежему материалу) и в гибридной зоне между *M. edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова. До освоения метода SNP типирования мы были ограничены в возможностях решения этих задач, потому что «малолокусные» методы (в нашем случае, 3-4 локуса) малоинформативны, а «геномные» (много десятков маркеров) слишком дороги для этого.

Мы также планируем обобщить имеющиеся богатые «малолокусные» данные по гибридизации мидий в кольской гибридной зоне, чтобы попытаться ответить на вопрос: количество гибридов в популяционных выборках строго пропорционально соотношению родительских видов в популяциях, либо есть какие-то другие факторы, регулирующие их численность?

1.4. Продолжить изучение абиотических и биотических факторов, влияющих на соотношение обилия *M. edulis* и *M. trossulus* в беломорских поселениях. В полевых условиях будут исследоваться экофизиологические показатели (рост, сила прикрепления биссуса, скорость фильтрации, гонадо-соматический индекс и т.п.) у мидий двух видов, обитающих в градиенте солености и в градиенте таксономического состава поселений (от поселений, где доминируют конспецифики, до поселений, где доминирует другой вид).

Направление 2. Популяционная транскриптомика *Macoma cf. balthica*. Мы планируем секвенировать выборки транскриптомов *Macoma* из разных популяций, в первую очередь популяций гибридных зон, чтобы получить информацию о нескольких тысячах SNP, распределенных в транскрибируемой части генома и изучить, используя эти маркеры, паттерны гибридизации и интрогрессии.

2.1. Завершить генотипирование ракушек комплекса *Limecola cf. balthica* (старое название *Macoma cf. balthica*) из гибридных зон в Европе. Провести теоретический анализ данных, включая анализы митохондриальной изменчивости и гетероплазмии, ядерно-цитоплазматического неравновесия и дифференциальной интрогрессии (разные локусы, разные гибридные зоны). Будут использоваться как классические, так и современные методы популяционной генетики, позволяющие одновременно моделировать действие интрогрессии и отбора в популяциях (Preifer et al. 2020). Для оценки масштаба интрогрессии и ее возраста будут привлечены коалесцентный анализ и моделирование (fastsimcoal2, IMa2p). Целью анализа ядерно-цитоплазматического неравновесия будет поиск ядерных локусов, ассоциированных с митохондриальными геномами двух видов, одновременно циркулирующих в популяциях гибридных зон.

Направление 3. Описание варьирования фенотипов. На трех исследуемых системах (мидии, балтийские ракушки, сельди) мы планируем оценить вклад в фенотипическую изменчивость (морфологические и морфофункциональные признаки, характеристики жизненного цикла) двух источников варьирования: (1) «таксономического сродства» (taxonomic affinity) особей, оцененного по вкладу генов родительских видов в их генотипы (как гибридов ранних поколений, так и представителей интрогрессированных популяций), и (2) ключевых экологических градиентов среды (температура, соленость, pH и прочие параметры).

3.1. Завершить статистическую обработку остеологических данных по атлантической и тихоокеанской сельди, и их «гибридных» - интрогрессированных популяций в Европе и подготовить рукопись публикации по этому материалу. Кроме того, планируется увеличить объем выборок нерестовой или посленерестовой беломорской сельди с параллельным генетическим анализом и подсчетом числа позвонков, для уточнения видопринадлежности рыб, поиска гибридов ранних поколений и оценки гибридизации.

3.2. Продолжить исследование варьирования морфологических фенотипов у гибридизующих мидий, включив в него новые выборки из аллопатрических популяций видов, из гибридной зоны в водах Кольского полуострова и, если откроют границы, из Норвегии, где сосуществуют и гибридизуют все три вида.

Направление 4. В поисках СТС. Во-первых, мы ищем СТС в российских популяциях *Bivalvia*, в первую очередь у *Mytilus*, *Mya*, *Cerastoderma* и *Macoma*, используя цитологические, гистологические и генетические подходы. Во-вторых, мы проверяем гипотезу о связи нарушений двоякого однородительского наследования мтДНК с СТС. В третьих, получив достаточный материал, мы секвенируем транскрипты больных и здоровых животных и разных тканей больных животных для сравнительного анализа их структуры и генной экспрессии, исследования филогеографии и филогении СТС.

4.1. Проверить мидий с лейкемией из Магадана и не изученных генетически мидий с лейкемией из Приморья на СТС; в случае доказательства СТС провести его молекулярно-генетическое сравнение с известными линиями СТС мидий BTN1 и BTN2. Процедура отработана на примере BTN2 из Приморья: параллельное генотипирование гемолимфы и мышечных тканей по двум мтДНК локусам и ядерному EFalpha, при необходимости, разделение аллелей методом молекулярного клонирования, сличение нуклеотидных последовательностей найденных «раковых» аллелей друг с другом и с аллелями известных линий рака.

4.2. Находка BTN2 под Находкой (Японское море) и лейкемии, пока, неизвестной этиологии, в Магадане (Охотское море; 2 236 километров по прямой от Владивостока) доказывает, что интересная с теоретической точки зрения и важная с хозяйственной точки зрения болезнь широко распространена в дальневосточных популяциях мидий. Отсюда важнейшая задача продолжить поиск лейкемии и СТС у мидий в северных и, особенно, дальневосточных морях. Мы планируем изучить цитометрически (тест на лейкемию) минимум 500 мидий из новых точек, включая новые географические популяции и популяции из разных местообитаний мидий в районе доказанного присутствия СТС. Природа болезни у больных раком мидий будет верифицирована генетически.

4.3. Продолжить отработку и имплементацию генетических экспресс-методов диагностики СТС у мидий. ПЦР-РВ с праймерами Yonemitsu et al 2019 к BTN2, пока, себя в полной мере не оправдал, из-за ложноположительных ответов. Дальнейшая отработка ПЦР-РВ будет проводиться на примере особей, изученных цитометрически. В качестве альтернативы ПЦР-РВ мы испробуем прямое секвенирование мтДНК гемолимфы и тканей ноги (т.е. тканей, в разной степени поражаемых болезнью) для регистрации гетероплазмии и «химеризма» моллюсков.

4.4. Продолжить поиск СТС у других объектов. Кроме *Mytilus*, в проекте были заявлены мия *Mya arenaria*, сердцевидка

Cerastoderma edule и балтийская ракушка *Macoma balthica* (переименована в *Limecola balthica*). Совместное с испанскими партнерами исследование *Mya arenaria* и *Cerastoderma edule* из северных морей, пока, не показало у них лейкемии (у мий нашли карциному). Это исследование не закончено, но из-за пандемии мы не хотим ничего обещать. В 2021 г. мы планируем провести, своими силами, рекогносцировочное цитометрическое исследование *Macoma balthica* и тихоокеанской *Mya arenaria* (переименована в *M. japonica*). В случае обнаружения лейкемии мы секвенируем мтДНК больных моллюсков для проверки гипотезы СТС.

4.5. Анализ транскриптомов СТС мидий. После проверки раковых мидий, добытых в 2020, на СТС, мы секвенируем транскриптомы гемолимфы (наиболее пораженной раком ткани) и мышц ноги (наименее пораженной ткани) мидий с СТС. Транскриптомы будут собраны с помощью программы Trinity для сборки транскриптомов из коротких прочтений. После выравнивания генов и построения филогенетических деревьев мы попробуем оценить дивергенцию СТС от родительского вида и приблизительное время этого события, на основе метода молекулярных часов. Для каждого транскриптома мы оценим уровень индивидуальной гетерозиготности. Последовательности кодирующих частей митохондриальных геномов будут сравнены с уже опубликованными последовательностями СТС и *Mytilus trossulus*. Также, мы исследуем уровень дифференциальной экспрессии генов с последующим анализом групп дифференциально-экспрессированных генов между нормальными и раковыми тканями.

Командировки.

Запланированы командировки для четырех участников проекта на Белое и Баренцева моря, для проведения мониторинговых исследований по проекту (мониторинг гибридных зон между *Mytilus edulis* и *M. trossulus*, лов сельди для поиска гибридов между *Clupea pallasii* и *C. harengus*, сбор *Macoma balthica* для исследования СТС).

По направлению 4 проекта (В поисках СТС) запланированы командировки в Магаданскую область, Приморский край и, по обстоятельствам, в еще один дальневосточный регион для сбора материала.

Мы бы хотели принять очное участие в научных форумах, если позволит эпидемиологическая ситуация. Пока, мы планируем принять участие в форуме Шестой международной симпозиум "Чужеродные виды в Голарктике. Борок-VI" (11–15 октября 2021 года, Ярославская область, <http://ibiw.ru/index.php?p=conf&id=1227>). Наконец, сохраняется необходимость и теоретическая возможность кратких визитов в зарубежные научные центры, для обмена материалом. Важнейшими направлениями являются Виго в Испании (совместное исследование рака у мий и церастодерм) и Норвегия (новые выборки из «трехсторонней» гибридной зоны у мидий).

1.2. Заявленные научные результаты на конец отчетного периода

Формируется в соответствии с заявкой на участие в конкурсе.

1.1. Завершено исследование гибридизации и интрогрессии у морских сельдей (*Clupea pallasii*, *C. harengus*) северо-восточной Европы по микросателлитным маркерам. На достаточном материале (минимум, 5 популяционных выборок, 120 особей, 10 локусов) проверена гипотеза проекта о том, что различия между географическими и экологическими расами *Clupea pallasii* в регионе связаны с интрогрессивной гибридизацией этого вида с *C. harengus*.

1.2. Проведен этап мониторинговых наблюдений за динамикой поселений «криптических» видов мидий *Mytilus edulis* и *M. trossulus* и гибридной зоны между ними в водах Кольского полуострова. Пере-описан генетический состав поселений из точек последних генетических исследований в Кандалакшском и Кольском заливах, на этих данных проверена гипотеза об экспансии *M. trossulus* в последние годы. Обработаны и обобщены данные о биотопическом распределении *M. edulis* и *M. trossulus* в губе Тюва Кольского залива и динамике их симпатрических поселений за 2004-2018 гг., и о динамике *M. trossulus* в Кандалакшском заливе Белого моря за 1970-2020е гг.

1.3.1. Получены новые мультилокусные (SNP) данные для оценки степени гибридизации и разнообразия гибридных генотипов в «трехсторонней» (*M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*) гибридной зоны в Норвегии (если будет доступ к свежему материалу) и в гибридной зоне между *M. edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова. Мы планируем получить и проанализировать минимум 100 генотипов.

1.3.2. Проанализированы богатые «малолокусные» данные проекта по гибридизации мидий в кольской гибридной зоне, для ответа на вопрос: количество гибридов в популяционных выборках строго пропорционально соотношению родительских видов в популяциях, либо есть какие-то другие факторы, регулирующие их численность?

1.4. Изучены абиотические и биотические факторы, влияющие на соотношение обилия *M. edulis* и *M. trossulus* в беломорских поселениях. В полевых изучены экофизиологические показатели (рост, сила прикрепления биссуса, скорость фильтрации, гонадо-соматический индекс и т.п.) у мидий двух видов, обитающих в градиенте солености и в градиенте таксономического состава поселений (от поселений, где доминируют конспецифики, до поселений, где

доминирует другой вид).

2.1. Завершено генотипирование ракушек комплекса *Limecola* cf. *balthica* (старое название *Macoma* cf. *balthica*) из гибридных зон в Европе. Объем материала доведен до 130 транскриптомов минимум. Проведен теоретический анализ данных, включая анализы митохондриальной изменчивости и гетероплазмии, ядерно-цитоплазматического неравновесия и дифференциальной интрогрессии (разные локусы, разные гибридные зоны).

3.1.2. Проведено генотипирование по нескольким, минимум 4 локусам, «диагностическим» для *Clupea pallasii* и *C. harengus*, беломорских сельдей с «нестандартным» для малопозвонковой сельди числом позвонков. На этом материале проверена гипотеза о присутствии в Белом море *C. harengus* и его гибридов ранних поколений с *Clupea pallasii*.

3.2.1. Исследование варьирования морфологических фенотипов у гибридирующих мидий расширено за счет новых выборок из аллопатрических популяций видов и новых надежно генотипированных выборок из гибридной зоны в водах Кольского полуострова и, если откроют границы, из Норвегии.

4.1. Получен ответ на вопрос об этиологии лейкемии у мидий из Охотского моря. В случае, если подтвердятся предварительные данные, что это СТС, проведено его сравнение с известными линиями СТС мидий BTN1 и BTN2 по двум мтДНК локусам и ядерному E α .

4.2. Цитометрически (тест на лейкемию) изучено минимум 500 мидий из новых точек северных и дальневосточных морей, включая новые географические популяции и популяции из разных местообитаний мидий в районе доказанного присутствия СТС. Природа болезни у больных раком мидий верифицирована генетически.

4.3. Продолжен поиск генетических экспресс-методов диагностики СТС у мидий. На примере животных, изученных цитометрически, оценена пригодность ПЦР-РВ с праймерами Yonemitsu et al 2019 к линии рака BTN2 и прямое секвенирование мтДНК гемолимфы и тканей ноги для детекции гетероплазмии и «химеризма» моллюсков.

4.4. Проведено рекогносцировочное цитометрическое исследование *Macoma balthica* и тихоокеанской *Mya japonica*. В случае обнаружения лейкемии гипотеза СТС проверена секвенированием мтДНК больных моллюсков.

4.5. Секвенированы транскриптомы гемолимфы и мышц ноги минимум 5 мидий с СТС. Транскриптомы собраны с помощью программы Trinity. Получены предварительные данные об уровне дивергенции СТС от родительского вида и уровне дифференциальной экспрессии генов в нормальных и раковых тканях.

1.3. Сведения о фактическом выполнении годового плана работы

(фактически проделанная работа, до 10 стр.)

1.1. По 12 локусам типированы 134 рыбы из шести выборок представляющих беломорскую сельдь (*Clupea pallasii marisalbi*), чешско-печорскую сельдь (*C. pallasii suworowi*), атлантико-скандинавскую сельдь (*C. harengus*), фиордовые норвежские популяции Трондсхеимфиорда, Балсфиорда (разновидность, нерестящаяся на литорали) и морского озера Россфиорд («стационарная» популяция). Из статистического анализа два локуса пришлось исключить из-за нестабильной амплификации и повсеместного избытка гомозигот. Результаты комплексного анализа (рис. 1.1.1, 1.1.2 приложения) достаточно иллюстративны. Популяции Балсфиорда и Россфиорда родственны *C. pallasii*. Однако на их генофонды сильно повлияла интрогрессия генов *C. harengus* (вклад генов атлантической сельди порядка 30%). Приметы интрогрессии есть у беломорской *C. pallasii* (порядка 10% генов *C. harengus*) и у *C. harengus* Тронсхеимфиорда (порядка 5% генов *C. pallasii*). Эти результаты, в целом, согласуются с полученными ранее митохондриальными и аллозимными данными (табл. 1.1.1). Гипотеза проекта о том, что различия между географическими и сезонными расами *C. pallasii* в северо-восточной Европе связаны с интрогрессивной гибридизацией этого вида с *C. harengus*, нашла дополнительное подтверждение. Пример сельди Тронсхеимфиорда показывает, что различия между расами *C. harengus* также могут быть связаны с интрогрессивной гибридизацией с *C. pallasii*. Тем не менее, мы не вполне довольны результатами микросателлитного исследования, по причине низкой информативности индивидуальных локусов для различения видов и популяций. Во-первых, среди наших локусов не оказалось ни одного «диагностического» для видов (наиболее дифференцированным оказался Her140, 80% различий в частотах аллелей). Это тем более досадно, что мы использовали четыре локуса, рекомендованных как (почти) диагностические в пионерском сравнительном микросателлитном исследовании европейских *C. pallasii* и *C. harengus* (Semenova, Stroganov 2017). Во-вторых «гибридогенные» популяции Балсфиорда и Россфиорда не выявляются в анализе Structure как четкий отдельный кластер или кластеры (рис. 1.1.2). Мы ожидали увидеть в этих популяциях больше уникальных черт, учитывая особенности их митохондриальной изменчивости - низкое разнообразие аллелей как «атлантического», так и «тихоокеанского» происхождения. Вероятно, митохондриальная изменчивость была утеряна уже после эпизода или эпизодов гибридизации и интрогрессии. С учетом новых генетических данных пересчитаны корреляции полученных ранее морфологических расстояний (по остеологическим данным) между географическими популяциями с генетическими.

- 1.2. Исследования пространственно-временной динамики смешанных поселений мидий *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова.
- 1.2.1. Исследования в вершине Кольского залива. Объектом полевых работ были поселения мидий центральной и самой южной частей залива, где в 2020 г выявили «клинальную» - S-образную гибридную зону. Подробно картировали поселения из района геометрического центра зоны (ожидаемое соотношение *M. edulis* и *M. trossulus* 50:50). Частота *M. trossulus* (за единственным исключением, оцененная морфологически, как в Khaitov et al., 2021) в пяти литоральных выборках, собранных в пределах 1.5 км участка побережья, составила 60 - 84%. Это неожиданно на фоне в целом закономерного пространственного варьирования частот в популяциях «клины». Еще больше нарушает регулярный характер клины глубоководная выборка из реки Тулома, где доля *M. trossulus* оказалась 70% против предсказанной 0% (рис. 1.2.1А).
- 1.2.2. Исследования в Ругозерской губе Кандалакшского залива. По берегам губы описаны водоёмы, которые подвергаются сероводородному заражению (Краснова и др., 2021). В поиске «криптических» факторов, структурирующих мозаичные гибридные зоны между *M. edulis* и *M. trossulus* мы обратились к популяциям мидий этих водоемов. Мидии были обнаружены в двух сублиторальных точках, подверженных периодическому заражению: в морском озере на Зелёном мысе и в губе Лобаниха. Частота *M. trossulus* в этих поселениях составила 56% и 30% против 8% и 20% в контрольных литоральных точках, соответственно.
- 1.2.3. Биотопическое распределение *M. edulis* и *M. trossulus* в губе Тюва Кольского залива и динамика их симпатрических поселений в 2004-2018 гг. (по коллекционным сборам). Данные о пространственном и биотопическом распределении в 2009-2010 гг. вошли в отчет 2020 г. Теперь мы обобщили данные о динамике демографической и таксономической структуры поселений за 14 лет. О динамике можно судить по данным рис. 1.2.2 и рис. 1.2.3. Между 2004-2009 и 2009-2010 гг. поселения претерпели масштабные однонаправленные изменения: доля *M. trossulus* сократилась, численность молоди (мидии 2-3 лет) возросла, а численность средневозрастных (4-9 лет) моллюсков сократилась. По ряду поселений имелись сборы мидий с разных субстратов – грунта и макрофитов. Аналогичные данные имелись и по ряду поселений вершины Кольского залива. Это позволило проверить гипотезу о неслучайном распределении баренцевоморских *M. edulis* и *M. trossulus* по субстратам обитания. Как в губе Тюва, так и в Кольском заливе, на литорали частота *M. trossulus* повышена на фукоидах, а *M. edulis* - на грунте. Судя по ограниченным данным, в сублиторали различий между субстратами нет (рис. 1.2.4).
- 1.2.4. Долгосрочный мониторинг поселений вершины Кольского залива и вершины Кандалакшского залива. Собраны выборки из нескольких поселений, изученных генетически в 2010 гг. Повсеместно частота *M. trossulus* увеличилась, за исключением поселений «рефугиума» *M. edulis* в самом куту Кольского залива (рис. 1.2.1Б). Таким образом, на противоположных берегах Кольского полуострова происходит экспансия инвазивного вида *M. trossulus*. Продолжены поиск и обработка коллекций раковин мидий, собранных в вершине Кандалакшского залива в 1974 - 2002 гг. (т.е. до начала наших собственных исследований). Также собраны пробы из литоральных поселений четырех островов в самой вершине Кандалакшского залива, наблюдаемых нами регулярно с 2000х годов (рис. 1.2.5). Данные согласуются с гипотезой о появлении и экспансии *M. trossulus* в заливе в начале текущего века.
- 1.3.1. Оценка степени гибридизации и разнообразия гибридных генотипов в гибридной зоне между *M. edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова. Добыть новый материал из «трехсторонней» гибридной зоны в Норвегии не получилось из-за закрытых границ. Получены данные по двум выборкам из «Кольской» гибридной зоны – с мыса Лагерный (N=83) в геометрическом центре «клинальной» гибридной зоны в южной, опресненной, части Кольского залива (выборка LAG, местоположение указано на рис. 1.2.1. А) и из Гранитного в предустьевом районе Кольского залива (выборка GR_f, N=52). Выборки генотипировались по «таксономическим» маркерам, с высокой вероятностью различающим *M. edulis* и *M. trossulus*. LAG генотипирована методом KASP по 10 SNP, выборка Gr_f – по 14 признакам, из них шесть KASP -маркеров, четыре «традиционных» ПЦР маркера (ПЦР+рестрикция) и четыре аллозима. О генотипической структуре выборок в терминах Structure можно судить по данным рис. 1.3.1. В LAG доминирует *M. trossulus* (69 из 83 особей). Обнаружено 7 гибридных генотипов (7%), из которых 4 имеют нагрузки по Structure, ожидаемые у гибридов F1 и F2 (судя по гетерозиготности это F1), а три – у беккроссов с *M. trossulus*. Остальные генотипы – *M. edulis*. У мидий из этой выборки определялся физиологический пол, и мы обнаружили неравновесное соотношение полов: самок – 68%, самцов – 32% (отличие от ожидаемого для мидий равновесного соотношения статистически значимо, $p=0.032$, пермутационный тест Монте-Карло). Наблюдается тенденция, что самки доминируют в первую очередь среди *M. edulis*, гибридов и *M. trossulus*, в чьих генотипах есть следы интрогрессии. В выборке Gr_f, соотношение *M. edulis* и *M. trossulus* близко 1:1, на всю выборку – 1 гибрид (2%; значимо меньше чем в LAG), выглядящий как беккросс с *M. edulis*. У всех мидий из выборок определили морфотипы раковины. Среди *M. edulis* преобладают мидии с E-морфотипом, среди *M. trossulus* – с T-морфотипом. Частоты морфотипов у видовых генотипов соответствуют ранее опубликованным данным (Khaitov et al., 2021).
- 1.3.2. Паттерны гибридизации мидий *M. edulis* и *M. trossulus* в Кольской гибридной зоне. В анализе использовался весь

массив данных 2001-2019 гг. сбора, всего 97 выборок, 5506 мультилокусных аллозимных генотипов. Для количественной оценки степени гибридизации/смешения видов в выборках было использовано два индекса, базирующихся на распределении нагрузок по Structure (q -values) в рамках модели двух кластеров ($k=2$; кластеры интерпретируются как *M. edulis* и *M. trossulus*). (1). Индекс доли гибридов (Phybr) - доля особей с q в диапазоне 0.1 - 0.9. (2). Индекс генетического смешения Калиновского и Пауэлла (md) (Kalinowski, Powell, 2015; Strelkov et al. 2017); индекс варьируется от 0 (нет изменчивости q , выборка близка к гаметическому равновесию) до 1 (максимальная изменчивость q , как в двувидовых выборках без гибридов). Всего, проведено три анализа. В одном сравнивались выборки, собранные в Кольском заливе в разные годы. В другом сравнивались субвыборки мидий разных годов рождения в выборках разных лет из губы Тюва. В третьем сравнивались выборки из мест с разным соленосным режимом. Первые два анализа не выявили статистически значимых различий. На процедуре и результатах последнего анализа остановимся подробно. В качестве характеристики соленосного режима в местах сбора мидий использовали «индекс солености», учитывающий расстояние до устья ближайшей реки и площадь ее водосбора (по данным водного реестра РФ). Характер изменения индекса солености в Кольском заливе демонстрирует рис. 1.3.2. Индексы Phybr и md зависят от таксономической структуры смешанного поселения. В связи с этим в регрессионную модель была включена ковариата, характеризующая частоту *M. trossulus* в поселении (P_{tros}) и подобраны две обобщенные аддитивные модели (GAM), основанные на бета-биномиальном распределении. В обеих моделях непараметрическая сглаживающая функция описывает нелинейную связь зависимой переменной с P_{tros} (рис. 1.3.3, рис. 1.3.4). Обе модели выявляют статистически значимую связь зависимых переменных с индексом солености (табл. 1.3.1. и табл. 1.3.2). По мере увеличения солености степень гибридизации падает, будь она оценена в терминах доли гибридов Phybr, или в терминах индекса смешения md (рис. 1.3.5). То есть в районах, подвергающихся постоянному опреснению, гибридов значимо больше, чем на участках, удаленных от источников опреснения.

1.4. Обобщены данные по особенностям биотопического распределения *M. edulis* и *M. trossulus* в Кандалакшском заливе. Для 95 поселений, расположенных на всем побережье залива (рис. 1.4.1) были оценены степень прибойности, расстояние до ближайшего порта, статус порта (действует или не действует), расстояние до ближайшего источника опреснения, мощность ближайшего источника опреснения, соленость во время взятия проб и характер субстрата, на котором поселяются мидии (фукоиды или грунт). Соотношение видов в выборках предсказывалось по частотам морфотипов раковин, как в работе Khaitov et al. 2001 (Т-морфотип характерен для *M. trossulus*, Е-морфотип – для *M. edulis*). Введение всех факторов-кандидатов в одну модель позволило оценить их относительную роль в регуляции соотношения численностей видов в смешанных поселениях. В качестве переменной отклика рассматривалась доля мидий Т-морфотипа. Согласно результатам построения модели (табл. 1.4.1), частота мидий Т-морфотипа стабильно выше на фукоидах, чем на грунте, а также снижается по мере удаления от портов и с увеличением степени прибойности. Наиболее сильное влияние на соотношение видов оказывает тип субстрата и статус ближайшего порта. Анализ не показал существенного влияния солености на соотношение видов. Единственный предиктор, связанный с соленостью и оказывающий незначительное влияние на соотношение видов - это мощность источника опреснения: доля *M. trossulus* выше ближе к источникам с большой площадью водосбора.

Для объяснения полученных закономерностей были проведены полевые и лабораторные наблюдения, целью которых было оценить влияние абиотических (соленость) и биотических факторов (соотношение видов; плотность поселения) на физиологические процессы у мидий двух видов. В одном эксперименте как регистрируемый параметр выступал «индекс состояния» (condition index – отношение веса сухих тканей моллюска к его размеру) - интегральный показатель благосостояния моллюсков. Использование морфотипов мидий в качестве видовых маркеров позволило вовлечь в анализ значительный объем материал. Выяснилось, что индекс состояния зависит от соотношения видов в поселениях (табл. 1.4.2). Значения индекса снижаются с увеличением доли *M. trossulus*. Таким образом, соотношение видов в смешанном поселении оказывается важным биотическим фактором, влияющим на физиологические процессы у мидий. Это хорошо согласуется с гипотезой о межвидовой конкуренции как важном факторе, определяющем пространственную сегрегацию двух видов мидий. Механизмом конкурентных отношений теоретически может интерференция за счет прикрепления биссуса к раковинам конкурента («связывание» конкурента). В другом полевом эксперименте оценили влияние плотности поселения и соотношения видов на силу прикрепления мидий и количество выделяемых ими биссусных нитей. Эксперимент не выявил значимого влияния указанных факторов, но показал, что *M. trossulus* выделяют больше биссусных нитей и прикрепляются к субстрату сильнее, чем *M. edulis* (Рис. 1.4.2). Таким образом, полученные результаты не дают прямого ответа о роли биссусообразования в конкурентных отношениях двух видов. С другой стороны, они согласуются со знанием, что относительное обилие *M. trossulus* выше на фукоидах. Эта экологическая ниша пригодна для моллюсков, способных обеспечивать большую силу прикрепления к субстрату. В лабораторных экспериментах изучали связь между силой прикрепления мидий и соленостью (рис. 1.4.3, табл. 1.4.3). Оказалось, что сила прикрепления биссуса у мидий Т-морфотипа не зависит от солености. У мидий Е-морфотипа сила прикрепления, хотя и остается ниже, чем у мидий Т-морфотипа, увеличивается по мере возрастания солености.

Вероятно, соленость оказывает большее влияние на физиологические процессы у *M. edulis*, а значит, все-таки может влиять на соотношение *M. edulis* и *M. trossulus* в смешанных поселениях.

2.1. В результате биоинформационного анализа транскриптомов у нас оказалось 117 генотипов маком *Limecola balthica*, охарактеризованных по 1392 ядерным, несцепленным, менделирующим SNP. Сверх этого у нас есть 25 «малолокусных» генотипов, которые удалось охарактеризовать по 384 SNP. С скромными результатами генотипирования этих особей мы связываем с низким качеством материала. За единичными исключениями эти были старые сборы 1980х-2000х гг. О географии Европейских сборов можно судить по данным рис. 2.1.1. «Многолокусные» генотипы (1392 SNP) есть из всех популяций кроме Голуэй. На фоне более актуальных задач, связанных с исследованием транскриптомов трансмиссивного рака, мы решили завершить генотипирование *L. balthica*, остановившись на том, что есть.

Представление о таксономической и популяционной структуре «комплекса *L. balthica*» можно составить по данным рис. 2.1.2, где приведены результаты многомерного шкалирования (PCoA) 1392-локусных генотипов. В пространстве пяти первых координат последовательно дискриминируются *L. b. balthica* и *L. b. rubra*, *L. b. balthica* из разных географических популяций (европейская макома ближе всего к макоме из восточной Пацифики), макома Мурмана (включая Варангер-фьорд), западно- и северо-европейские *M. b. rubra*, беломорская *L. b. balthica*.

Анализ пространственных паттернов частот аллелей и генотипов по локусам, дифференцированным между европейскими популяциями (на рис. 2.1.3 для примера приведены «тепловые карты» для 25 наиболее дифференцированных локусов) позволяет говорить о следующих характерных паттернах. Большинство локусов различают «тихоокеанскую» макому *L. b. balthica*, представленную тремя географическими популяциями - Белого моря, Балтики и Мурмана, с одной стороны, и «атлантическую» *L. b. rubra*, населяющую остальные атлантические побережья Европы, с другой. Только генофонды Керети (Белое море) могут с большой натяжкой считаться «чистыми» представителями *L. b. balthica*. Во всех остальных популяциях *L. b. balthica* велика доля «атлантических» аллелей. В качестве меры этой интрогрессии по всем локусам можно использовать индексы Structure (индивидуальные или усредненные для выборок индексы q), рассчитанные в рамках модели двух кластеров. Отличия между географическими популяциями *L. b. balthica* не сводятся к различиям в уровне интрогрессии, есть различия в структуре интрогрессии. Лучше всего это заметно в мурманских популяциях, где, относительно среднего (т.е. Structure), по одним локусам «завышены» частоты «тихоокеанских» аллелей, а по другим «атлантических». При этом в Белом море и в Балтике эти же самые локусы таких эффектов, как правило, не демонстрируют. Гетерогенна и *L. b. rubra*. Отличия отчасти можно объяснить интрогрессией аллелей *L. b. balthica* по некоторым локусам в норвежские популяции, отчасти наличием «уникальных» для западно- или северо-европейских популяций *L. b. rubra* признаков. Таких «уникальных» признаков, различающих географические популяции аборигенной *L. b. rubra*, относительно много, а различающих географические популяции инвазивной *L. b. balthica* в Европе – очень мало. МтДНК демонстрирует занятный паттерн: гаплогения *L. b. balthica* фиксирована в северной Балтике и в Керети, ее частота «завышена» в Варангер-фиорде и «занижена» на Восточном Мурмане (паттерн, противоположный ядерным полиморфизмам, по которым на Восточном Мурмане заметно больше «тихоокеанских» аллелей, чем в Варангере). Ядерно-цитоплазматическим ассоциациям посвящен отдельный анализ.

Европейские популяции *L. b. balthica*, интрогрессированные генами *L. b. rubra*, представляют собой большой интерес с точки зрения изучения ядерно-цитоплазматического неравновесия, поскольку в них циркулируют атлантические и тихоокеанские митохондриальные линии с высоким уровнем дивергенции. Логично предположить, что могут существовать локальные механизмы адаптации ядерного генома ракушек к дивергированным МтДНК линиям, либо действовать негативный отбор, который отсеивает в каждом поколении маладаптивные комбинации ядерных и МтДНК генотипов. Мы оценили вклад тихоокеанских и атлантических аллелей по ядерным признакам в геномы особей (рис. 2.1.4. А), а затем контрастировали субвыборки с тихоокеанскими и атлантическими МтДНК для каждого географического региона, оценивая, есть ли связь между предковой компонентой ядерного генома и митохондриальной линией. Мы обнаружили такую связь только для Балтики. На Мурмане МтДНК линии не демонстрировали значимой связи с предковой компонентой ядерного генома (рис. 2.1.4. В). На следующем этапе анализа мы рассчитали значения F_{st} для каждого локуса внутри мурманского региона и внутри Балтики, контрастируя выборки с атлантической и тихоокеанской МтДНК линиями и обнаружили высокие значения F_{st} для многих ядерных генов, вовлеченных в митохондриальные комплексы. В то же время, они были разными для двух регионов, за одним исключением: ген, кодирующий субъединицу О митохондриальной АТФ-синтазы (ATP5O) демонстрировал высокие значения F_{st} между выборками маком с разными митохондриями и на Мурмане ($F_{st}=0.18$), и в Балтике ($F_{st}=0.23$) (рис. 2.1.5.)

3.1. Об успехах генотипирования коллекционных выборок сельди из Белого моря и других популяций сказано в п.1.1. Среди 10 ядерных локусов, которые удалось отработать, только один с натяжкой может считаться «диагностическим» для *S. pallasi* и *S. harengus*. С такими признаками мы можем различать чистопородных представителей видов

(например, в типированной беломорской выборке есть генотип атлантической сельди, рис. 1.1.2), но не можем различать межвидовых гибридов ранних поколений. Для завершения работы нам придется искать новые ядерные признаки, а также привлекать митохондриальное генотипирование.

Из-за того, что в 2020 году провести лов беломорской сельди на нерестилищах не удалось из-за карантина, мы провели эту работу в 2021. Материал собран в нерестовый период в апреле-мае 2021 г в районе массового нереста сельди в окрестностях поселка Чупа (Кандалакшский залив). Лов производился двумя заколами - ловушками с двумя крыльями 30 м длиной, 5 м высотой и с кольцами («бочкой») в середине, установленными перпендикулярно берегу (рис. 3.1.1). У пойманных рыб производили промеры длины тела (общая, стандартная и промысловая), а также взвешивали (общая масса и масса без внутренностей), отбирали отоиды или чешую для определения возраста, определяли стадию зрелости гонад (согласно Сакун и Буцкая, 1963), подсчитывали число позвонков, отбирали ткани для генетического анализа. У большинства особей (n=305) были заморожены головы для возможности проведения углубленного морфологического анализа. Распределение исследованных беломорских сельдей 2021 г. сбора по длине (n=342), числу позвонков (n=360) и стадии зрелости гонад (n=330) приведено на рис. 3.1.2.

3.2. Форма раковины симпатрических мидий *Mytilus edulis* и *M. trossulus* из Гранитного (Мурман; видопринадлежность определена генетически, см. 1.3) была описана методами геометрической морфометрии по 14 опорным точкам. Ординация 51 изученных мидий в осях главных компонент, характеризующих морфопространство, не выявило разделения видовых генотипов. Таким образом, видоопределение мидий по форме раковины невозможно. Гипотеза Бюмона и соавторов (Beaumont et al. 2008) о разной геометрии раковин видов для мурманских мидий не подтвердилась.

4.1. Диагностика трансмиссивного рака у всех 10 мидий с анеуплоидными гемоцитами, найденных в сборах 2020 года из Охотского моря (всего было изучено 218 особей) была проведена с помощью разработанного нами экспресс-теста. Экспресс-тест включает прямое секвенирование ПЦР-продукта и последующий визуальный анализ хроматограмм фрагмента локуса COI из тканей ноги и гемолимфы мидий. Экспресс-тест выявил гетероплазмия у всех раковых мидий, кроме M1-96 и M1-167. У M1-42 и M1-162 найдены «дополнительные» аллели линии рака BTN2 COI-1. У M1-3, M1-105, M1-111 - аллели линии BTN2 COI-2. Западно-тихоокеанские генотипы BTN2 были нами ранее охарактеризованы на примере сборов из бухты Гайдамак Японского моря (Skazina et al, 2021). Сверх этого, у трех мидий (M1-25, M1-95, M2-22) найдена аллель COI-U1, отличающаяся на 1 нуклеотидную замену от аллели COI-U, характерной для BTN1 из восточной Пацифики (Metzger et al, 2016, Yonemitsu et al. 2019). Отсутствие дополнительных аллелей у M1-96 и M1-167 может быть связано с тем, что они болели не-трансмиссивным раком. Для подтверждения результатов экспресс теста и для последующего сравнения с известными линиями BTN по COI, CR и EF1a мы выбрали четыре мидии M1-162, M1-105, M1-95 и M2-22. Параллельное генотипирование тканей с применением молекулярного клонирования по трем диагностическим локусам COI, CR и EF1a полностью подтвердило результаты экспресс-теста у этих мидий. Более подробно это исследование описано в препринте статьи, поданной в журнал (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.07.471395v1>).

4.2. Цитометрический тест на лейкемию проведен у мидий из новых выборок из Баренцева, Белого и Дальневосточных морей (карта на рис. 4.2.1). Исследование проводилось, как и в прошлом году, параллельно в Петербурге и во Владивостоке. Во Владивостоке было изучено 268 мидий, собранных в Охотском море в окрестностях Магадана и 200 мидий из бухты Витязь Японского моря. В Петербурге было изучено 572 мидии, из них 148 из Белого моря (Лувеньга, Лобаниха, Онежская губа, Нёнокса), 222 из Баренцева моря (Чалмпушка, Росляково, Белокаменка, Ура-Губа) и 182 с побережья Юго-Восточной Камчатки (устье Авачи, остров Старичков, бухта Вестник) и с Командорских островов и 20 из залива Шелехова Охотского моря (Эвенск). Для мидий с анеуплоидией, изученных в Петербурге, проведен экспресс-тест для диагностики трансмиссивного рака (прямое секвенирование ПЦР-продукта и последующий визуальный анализ хроматограмм фрагмента локуса COI из тканей ноги и гемолимфы мидий - см. п. 4.1.). Природа болезни мидий с анеуплоидией, идентифицированных во Владивостоке, пока, не верифицирована генетически.

4.3. Оработана методика экспресс-теста для диагностики BTN2 у мидий с помощью ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-PV): протестированы различные условия (температурный режим, концентрация реагентов) ПЦР с праймерами, специфичными для раковой аллели EF1a-H. Для отработки методики была использована тестовая выборка с положительными и отрицательными контролями (наличие/отсутствие BTN2 подтверждено генетически) из Японского моря. ПЦР-PV с обновленным протоколом была проведена для трех выборок из Магадана (M1.1, M2, M3) и для выборок из Баренцева моря, собранных в 2020 году (Чалмпушка, Росляково, Грязная, Ретинское, Дровяное). Так же были подобраны праймеры и условия для амплификации специфичной BTN1 аллели EF1a-S. В этом случае тестовой выборкой послужили образцы тканей мидий из Магаданских выборок M1 и M2 (см. п. 4.1), у которых мы уже верифицировали линию BTN1. ПЦР-PV с разработанными нами праймерами для EF1a-S аллели BTN1 были также протестированы на пяти баренцевоморских выборках 2020 года сбора и трех магаданских выборках.

4.4. Проведено цитометрическое исследование гемолимфы маком (*Limecola balthica*) из трех выборок 2021 года

сбора: из Кольского залива Баренцева моря (Северное Нагорное, Мурманск, N=50), из Японского моря (залив Петра Великого, N=51) и из Охотского моря (бухта Нагаева, N=50). Были изготовлены гистологические препараты тканей этих моллюсков. Проведено цитометрическое исследование гемолимфы мий (*Mya japonica*) из двух выборок из Охотского моря (бухта Нагаева, литораль, N=50) и Японского моря (залив Восток, сублитораль, N=50).

Для двух маком из Печенги (Варангерфьорд, Баренцево море), у которых по транскриптомным данным была обнаружена гетероплазмия мтДНК (отчет 2020 г.) проведено прямое секвенирование фрагментов митохондриальных локусов COI и COIII. Проведен сравнительный анализ полученных последовательностей с депонированными в генбанке NCBI.

4.5. Секвенировали 20 транскриптомов тканей мидий *Mytilus trossulus* из дальневосточных морей. У семи мидий (шесть болеющих трансмиссивным раком и одной контрольной) изучили образцы мышц ноги и гемолимфы, еще у шести (пяти болеющих трансмиссивным раком и одной болеющей нетрансмиссивным раком) только гемолимфы. Первоначально планировали делать *de novo* транскриптомную сборку, но в базе данных NCBI появился высококачественный геном *M. edulis* хромосомного уровня (GCA_019925415.1). Мидии обладают сложным, богатым повторами высокогетерозиготным геномом. Поэтому для выравнивания ридов мы отдали предпочтение высококачественному геному близкого вида. С помощью алгоритма STAR получили, в среднем, 60% уникально картированных ридов; около 20 % ридов имели неуникальное картирование. Тип ткани (мышцы, гемолимфа) может влиять на результаты экспрессионного анализа. Разное соотношение раковых и хозяйских клеток в образце должно влиять на результаты как экспрессионного, так и популяционно-генетического анализов. Действительно, сравнив уровень экспрессии между образцами мы обнаружили четкие различия между тканями ноги и гемолимфой (рис. 4.5.1 А,В). Также видно, что образцы гемолимфы распадаются по уровню экспрессии на два кластера, один из которых ближе к кластеру, куда попадают образцы мышц ноги (рис. 4.5.1 С,Д). В этот ближайший к «мышечному» кластер попадают образцы гемолимфы животных без трансмиссивного рака и часть мидий с BTN2.

Полиморфизмы выявили с помощью bcftools. После строгой фильтрации генотипов осталось 17480 высококачественных несцепленных локусов. Генетические различия между образцами визуализировали с помощью компонентного анализа (PCA) и ADMIXTURE. PCA хорошо дискриминирует образцы гемолимфы с BTN2 по первой компоненте, а с BTN1 по второй (Рис. 4.5.2 А). Пускай «раковые» генотипы группируются отдельно от здоровых или мало пораженных раком тканей, их уровень дивергенции друг от друга и от контролей невелик на фоне геномного разнообразия самих мидий. Кластеризация ADMIXTURE выявила сходные паттерны, в частности четкие отличия образцов гемолимфы мидий с разными линиями BTN («Healthy samples» на Рис. 4.5.2 В). В то же время, видна примесь раковых генотипов в тканях мышц ноги «раковых» мидий, обусловленная инфильтрацией неопластических клеток.

Все планируемые на год работы выполнены полностью:

да

1.4. Сведения о достигнутых конкретных научных результатах в отчетном году

(до 5 стр.)

1.1. По 10 микросателлитным локусам успешно типированы 134 рыб из шести выборок представляющих беломорскую сельдь, чешско-печорскую сельдь, атланти-скандинавскую сельдь, оригинальные популяции Трондсхеимфиорда, Балсфиорда и морского озера Россфиорд. Полученные результаты в целом согласуются с полученными ранее митохондриальными и аллозимными данными и подтверждают гипотезу о том, что генетические различия между этими расами связаны с интрогрессивной гибридизацией между *C. pallasii* и *C. harengus* (рис. 1.1.1, 1.1.2 приложения). Результаты сопоставления морфологических расстояний (по остеологическим данным, см. отчет 2020 г.) между географическими популяциями с генетическими следующие: (1) Длина тела рыб в популяциях, после исключения атлантической сельди, уменьшается с уменьшением доли тихоокеанских генов; (2) После устранения влияния длины тела комплексный анализ десяти меристических признаков показывает, что атлантическая сельдь занимает наиболее обособленное положение, а ближе всего к ней находится популяция Россфиорда, содержащая, по разным оценкам (см. табл. 1.1.1) 50-80% тихоокеанских генов; (3) Наблюдается согласованная вариация числа пор различных признаков между популяциями, т.е. в одних популяциях число пор систематически выше, чем в других. Эта пористость не показывает никакой связи с генетикой; (4) После устранения различий между выборками по пористости, популяции показывают корреляцию морфологических расстояний с генетическими. Эта корреляция исчезает после исключения из анализа атлантической сельди. Таким образом, ассоциация между генетическими и морфологическими расстояниями связана не с пористостью, а с остаточной вариацией после удаления различий в пористости; (5) Исследованные популяции гетерогенны по уровню флуктуирующей асимметрии, но эта гетерогенность не обнаруживает явных связей генетической конституцией.

1.2. Проанализированы новые и коллекционные сборы мидий из вод Кольского полуострова. Получены новые данные о пространственно-временной динамике смешанных поселений мидий *Mytilus edulis* и *M. trossulus*. Благодаря опубликованию методики определения видов по морфотипам раковин (Khaitov et al. 2021), о соотношении видов в выборках (индекс P_{tros} – доля *M. trossulus*) судили по морфологическим данным, а не генетическим, как раньше.

1.2.1. Дополнены сборы из района «клинальной» гибридной зоны в вершине Кольского залива. Показана повышенная изменчивость P_{tros} в геометрическом центре клины. Впервые изучена сублиторальная банка в реке Тулома – вероятно, самое пресноводное поселение мидий в регионе. Там доминирует *M. trossulus*, что контрастирует с сопредельными районами залива, где абсолютно доминирует *M. edulis* (рис. 1.2.1). Таким образом, в картине распределения видов в вершине залива комбинируются элементы клинальности и мозаичности.

1.2.2. На примере популяций мидий из беломорских меромиктических водоемов убедились, что сероводородное заражение (шире – эвтрофикация) может быть еще одним фактором, определяющим мозаичность в распределении *M. edulis* и *M. trossulus*. В двух изученных водоемах была повышена частота второго вида. Это перспективный результат, поскольку выявленные нам факторы (см. ниже) определяют только часть пространственной изменчивости.

1.2.3. Обработаны обширные коллекционные данные по биотопическому распределению *M. edulis* и *M. trossulus* в губе Тюва Кольского залива и динамике их симпатрических поселений в 2004–2018 гг. Показано, что в период между 2004–2009 и 2009–2010 гг. поселения претерпели однонаправленные изменения: доля *M. trossulus* существенно сократилась, численность молодежи возросла, а численность средневозрастных моллюсков сократилась (рис. 1.2.2, рис. 1.2.3.). За такими изменениями должны стоять факторы, действующие в масштабе всей губы, например климатические. Благодаря тому, что по ряду поселений Тювы и других районов залива имелись сборы мидий с грунта и макрофитов, удалось доказать неслучайное распределение видов мидий по этим субстратам. Как и в Белом море (Katolikova et al. 2016), на литорали частота *M. trossulus* повышена на водорослях (рис. 1.2.4).

1.2.4. Дополнены данные исследования многолетней (с 1970х гг) динамики видов в вершине Кандалакшского залива. Новые данные полностью согласуются с гипотезой о появлении там «в уловимых количествах» инвазивного *M. trossulus* в начале текущего века и его последующей масштабной экспансии. Переизучив несколько поселений из Кандалакшского и Кольского заливов, изученных генетически в прошлом десятилетии, мы убедились что доля *M. trossulus* там выросла (рис. 1.2.1Б).

1.3.1. Получены мультилокусные (SNP) данные по двум выборкам мидий из гибридной зоны между *M. edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова, позволяющие надежно судить о доле гибридов в выборках и их разнообразии (рис. 1.3.1). Выборки, представляющие поселения из районов постоянного и периодического распреснения, различались по доле гибридов (7% и 2%, соответственно). Гибриды классифицированы как F1 и беккроссы. Кроме очевидных гибридов, у части особей были «чужеродные» – интрогрессированные аллели. В выборке, для мидий из которой был определен пол, соотношение полов было 2F:1M, причем наблюдалась тенденция, что самки доминируют в первую очередь среди *M. edulis*, гибридов и *M. trossulus*, в чьих генотипах есть следы интрогрессии (рис. 1.3.1). Это перспективный результат. Считается, что у мидий (*M. edulis*) равновесное соотношение полов. Неравновесное соотношение полов в гибридных зонах можно ожидать у животных с хромосомным определением пола. У мидий нет половых хромосом, однако, как у животных с двояким однородительским наследованием митохондрий, есть полоспецифичные мтДНК.

1.3.2. Обобщены данные по генотипической структуре выборок из гибридной зоны между *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в водах Мурмана. На обширном материале показана отрицательная связь между степенью гибридизации (в терминах доли гибридов и степени «бимодальности» в распределении частот генотипов) и соленостью. В районах, подвергающихся постоянному опреснению, гибридов значимо больше, чем на участках, удаленных от источников опреснения (табл. 1.3.1, табл. 1.3.2, рис. 1.3.5). Известно, что разные географические гибридные зоны у мидий различаются по степени гибридизации/смешения. Например, гибридов между *M. edulis* и *M. trossulus* много в Балтике и мало в Белом и Баренцевом морях (Wenne et al. 2020, Khaitov et al. 2021). Экологически обусловленные различия внутри одной гибридной зоны показаны впервые.

1.4. Выявлены абиотические и биотические факторы, влияющие на соотношение *M. edulis* и *M. trossulus* в беломорских поселениях. Наиболее сильное влияние на соотношение видов в смешанных поселениях оказывает тип субстрата (литоральные водоросли либо грунт), расстояние до ближайшего порта и активность работы порта. Прямой связи между соленостью воды и соотношением видов не найдено (рис. 1.4.1, табл. 1.4.1). Экспериментально показано, что соотношение видов в смешанном поселении является важным биотическим фактором, влияющим на физиологические процессы у мидий (чем меньше доля *M. trossulus* в поселении, тем выше у моллюсков значения индекса отношения веса сухих тканей к размеру раковины) (табл. 1.4.2). Также выяснили, что *M. trossulus* выделяют больше биссусных нитей и прикрепляются к субстрату сильнее, чем *M. edulis* (рис. 1.4.2). Это согласуется со знанием, что относительное обилие *M. trossulus* выше на фукоидах. Эта экологическая ниша пригодна для моллюсков, способных обеспечивать большую силу прикрепления к субстрату.

2.1. За три года мы получили 117 генотипов маком *Limecola balthica*, охарактеризованных по 1392 ядерным, не сцепленным, менделирующим SNP. Сверх этого у нас есть 25 «малолокусных» генотипов, охарактеризованных по 384 SNP. «Малолокусные» генотипы можно использовать для пространственного картирования *L. b. balthica* и *L. b. rubra*. Методы ординации и кластеризации «многолокусных» генотипов позволяют дискриминировать *L. b. balthica* и *L. b. rubra*. *L. b. balthica* из разных регионов, включая популяции Мурмана, Белого и Балтийского морей, а также западно- и северо-европейских *M. b. rubra* (рис. 2.1.2). В Европе, большинство информативных локусов различают «тихоокеанскую» макому *L. b. balthica*, представленную тремя географическими популяциями - Белого моря, Балтики и Мурмана, с одной стороны, и «атлантическую» *L. b. rubra*, населяющую остальные атлантические побережья Европы, с другой. Отличия между европейскими популяциями *L. b. balthica* связаны, во-первых, с разным уровнем интрогрессии генов *M. b. rubra*, в частности митохондрий, во-вторых, со структурой интрогрессии (рис. 2.1.3). Последнее лучше всего заметно в самых дифференцированных мурманских популяциях, где по одним локусам непропорционально «завышены» частоты «тихоокеанских» аллелей, а по другим «атлантических». Гетерогенна и *L. b. rubra*. Отличия отчасти можно объяснить интрогрессией аллелей *L. b. balthica* по некоторым локусам в норвежские популяции, отчасти «наличием «уникальных» для западно- или северо-европейских популяций *L. b. rubra* признаков. Сравнив ядерные генотипы маком с мтДНК разных линий (*L. b. balthica*, *L. b. rubra*) из интрогрессированных популяций Балтики и Мурмана, выяснили, что максимальные F_{st} наблюдаются для ядерных локусов, вовлеченных в митохондриальные комплексы. Из них только ген, кодирующий субъединицу О митохондриальной АТФ-синтазы (ATP5O) демонстрировал высокие значения F_{st} и для Мурмана ($F_{st}=0.18$), и для Балтики ($F_{st}=0.23$) (рис. 2.1.5).

3.1. Об успехах генотипирования коллекционных выборок сельди из Белого моря и других популяций сказано в п.1.1. Для продолжения исследования таксономической и генетической гетерогенности беломорской сельди нам придется отработать больше признаков. Большинство сельдей из новых сборов в Белом море особей относятся к медленнорастущей форме беломорской сельди. Особи крупнее 21-22 см, скорее всего, относятся к быстрорастущей форме. Подавляющее большинство рыб принадлежит к малопозвонковой сельди *C. pallassii*, у беломорского подвида которого число позвонков варьируется от 50 до 56. Однако некоторое число особей относятся к многопозвонковой сельди *C. harengus*, число позвонков которой варьируется от 56 до 59 (рис. 3.1.2). Особи с 56 позвонками теоретически могут принадлежать как мало-, так и к многопозвонковой сельди. Важно отметить, что две особи с 58 позвонками имели гонады на 5 стадии, т.е. в нерестовом состоянии. Если генетический и более подробный морфологический анализы подтвердят видовую принадлежность этих особей к *C. harengus*, то можно будет говорить о том, что многопозвонковая сельдь нерестится в Белом море вместе с беломорскими сельдями, что чревато межвидовой гибридизацией. В выборке, теоретически, могут быть гибриды, например среди особей с 56 позвонками. Одна особь, не показанная на рисунке 3.1.2, имела 44 позвонка. Эта уникальная рыба не имела других заметных морфологических нарушений. Насколько нам известно, таких рыб никто никогда не наблюдал.

3.2. Сравнительный анализ формы раковины у *Mytilus edulis* и *M. trossulus* из Гранитного (мидии, определенные генетически, см. 1.3.) методами геометрической морфометрии не выявил никаких различий между видами (рис. 3.2). В отличие от третьего представителя рода в Европе – *M. galloprovincialis* (отчет 2020 г.), *M. edulis* и *M. trossulus* из северных популяций по форме раковин не отличаются.

4.1. В небольшой выборке из Охотского моря найдены мидии, пораженные обеими линиями трансмиссивного рака - BTN1 и BTN2 (у BTN2 присутствуют минимум два клон, маркированные разными мтДНК), а также мидии, предположительно больные не-трансмиссивным раком. BTN1 – линия трансмиссивного рака, которую ранее находили только в Британской Колумбии (Metzger, 2016). До нас, никто не находил BTN1 и BTN2 в одной популяции. До нас, никто не находил трансмиссивную неоплазию в субарктических широтах. Более подробно результаты исследования изложены в препринте статьи (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.07.471395v1>).

4.2. Среди мидий, исследованных цитометрически во Владивостоке, обнаружено 11 мидий с анеуплоидией из охотоморских сборов. Среди мидий, исследованных в Петербурге, обнаружено 18 особей с анеуплоидией: 16 с Камчатки (три из Авачинской бухты, четыре с острова Старичкова и девять из бухты Вестник) и два из Эвенска Охотского моря (см. карту на рис. 4.2.1). По результатам экспресс-теста (анализ локуса COI, см. п. 4.1) трансмиссивный рак подтвержден для всех мидий с анеуплоидией, кроме четырех из бухты Вестник. Частоты генотипов рака в выборках следующие. Авачинская бухта - 1 BTN1, 1 BTN2 (COI-1), 1 BTN2 (COI-2), о. Старичков - 3 BTN1, 1 BTN2 (COI-2), б. Вестник - 2 BTN1, 3 BTN2 (COI-1), Эвенск - 1 BTN1, 1 BTN2 (COI-1). Таким образом, получены новые знания о географии трансмиссивной неоплазии мидий, свидетельствующие о широком распространении обеих эволюционных линий болезни в морях Дальнего Востока.

4.3. Нам удалось усовершенствовать ПЦР-РВ для диагностики BTN2: нет ложноположительных результатов; среди образцов из Магадана мы идентифицировали BTN2 у двух особей, «просмотренных» цитометрически, но для которых диагноз подтвердился секвенированием фрагмента EF1a. Мы планируем проверить эти образцы на генетический химеризм по двум другим диагностическим локусам. Интересный результат мы получили с праймерами к EF1a-S аллели

BTN1. Специфический сигнал был зарегистрирован в ходе ПЦР-РВ у 3 мидий из Чалмпушки и одной из Грязной (Кольский залив Баренцева моря) (см. карту на рис. 4.2.1). Для этих мидий предварительно подтверждено наличие BTN1 секвенированием COI.

При отработке теста на химеризм удалось выявить двойные пики на хроматограммах фрагментов COI у большинства мидий, имеющих не менее 24% анеуплоидных клеток в гемолимфе. Это свидетельствует о наличии второй аллели в ПЦР-продуктах. Раковые аллели хорошо читались у гетероплазмичных особей. Не смотря на то, что тест не выявляет мидий с низкой степенью зараженности, его можно применять для массового скрининга при поиске новых популяций моллюсков, страдающих трансмиссивным раком. Кроме того, данный тест можно применять для поиска СТС у других животных, так как праймеры к COI являются универсальными. Более подробно эти результаты изложены в препринте статьи (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.07.471395v1>).

4.4. Анеуплоидия по результатам цитометрии была выявлена у одной макомы *Limescola* из Кольского залива Баренцева моря среди 51 изученных (рис. 4.4.1.а). Гистологические данные свидетельствуют в пользу диссеминированной неоплазии у этой макомы: на препаратах была выявлена инфильтрация неопластических гемоцитов в ткани (рис. 4.4.1.б). Однако, предварительное митохондриальное генотипирование не показало химеризма, соответственно не подтвердило трансмиссивный рак. Среди изученных мидий *Mya* не было обнаружено ни одного моллюска с анеуплоидными клетками в гемолимфе.

У одной из двух маком из Печенги по результатам прямого секвенирования подтверждена гетероплазмия по COI, при этом гетероплазмия по COIII не детектируется. Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей COI с коллекцией генбанка NCBI показал, что одна из аллелей гетероплазмичной макомы является гаплотипом *L. b. balthica*, другая - *L. b. rubra*. Найденный гаплотип *L. b. rubra* характерен для западноевропейских, но не северо-европейских популяций макомы (Nikula et al. 2007; рис. 4.4.2).

4.5. Секвенировали транскрипты гемолимфы (у части особей - гемолимфы и мышц ноги) 11 мидий с трансмиссивным раком (BTN1, BTN2), мидий с нетрансмиссивным раком и контрольной здоровой мидии. Прочтения выравнивали на референсный геном. Сравнили образцы по уровню экспрессии, который оказался разным в тканях ноги и в гемолимфе. Различия между образцами пораженной BTN гемолимфы, вероятно, определяются различиями в доле здоровых клеток. Выявили 17480 высококачественных несцепленных маркеров SNP. По этим маркерам, геномы двух линий трансмиссивного рака хорошо отличаются друг от друга и от геномов мидий-хозяев, хотя уровень дивергенции линий BTN на фоне высокого полиморфизма хозяев не велик. Полученные данные свидетельствуют об эффективности выбранного подхода для генетической характеристики линий трансмиссивного рака и для поиска транскриптомных различий между раковыми и здоровыми клетками на уровне генов сигнальных путей. При продолжении исследования нужно не гнаться за увеличением числа мидий с BTN, а (а) выбирать максимально зараженных особей, (б) увеличить число здоровых контролей, (в) изучать как гемолимфу, так и «контрольные», менее пораженные болезнью, мышечные ткани.

Общие итоги. Мы работали по всем направлениям. Основные усилия были направлены на изучение трансмиссивного рака мидий (BTN), потому что это интересно и конъюнктурно. Вышедшая в марте статья про находку BTN у дальневосточных мидий (Skazina et al. 2021) к декабрю собрала четыре цитирования и была отрекомендована, с помощью пресс-службы СПбГУ, на сайтах РНФ и СПбГУ. Оттуда новость была ретранслирована множеством СМИ, включая два федеральных телеканала, с потерей связей с первоисточником и, отчасти, здравым смыслом. Был отклик и на популярную статью по теме (<https://biomolecula.ru/articles/sindrom-karpentera-bessmertnye-linii-transmissivnogo-raka-meniiaut-svoikh-smertnykh-khoziaev>), к написанию которой нас подтолкнул один из рецензентов. Главные итоги работ 2021 г по "раковому" направлению следующие. 1. Мы нашли популяции мидий, в которых сосуществуют обе известные эволюционные линии BTN и предположительно не-трансмиссивная лейкемия. Это в будущем позволит надежно сравнить этиологически разные формы болезни. Насколько нам известно, никто больше не встречал более чем одной формы рака в одной и той же популяции. Мы поспешили обнародовать этот результат: (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.07.471395v1>). 2. Мы получили предварительные данные в пользу того, что BTN есть в популяциях мидий вод Кольского полуострова. Это те самые популяции, в которых много лет назад мы нашли «необъяснимых» генетических «химер». Это впоследствии позволило нам раньше других уверовать в трансмиссивный рак. Химеры действительно существуют, и они, с большой долей вероятности, проявление BTN. В рамках второго, «гибридного», направления мы смогли: (А) Оформить, на 27 журнальных страницах плюс 8 электронных приложений, первую часть многопланового исследования гибридирующих мидий. Работа (Khaitov et al. 2021), в которую мы инвестировали сравнительные генетические и морфологические данные по разным гибридным зонам, представлена как презентация формальной процедуры идентификации таксонов, не полностью дискретных морфологически (подвиды, гибридирующие виды, многие криптические виды); (2) Закончить географическое исследование сельди. Генофонды «экзотических» разновидностей сельдей из разных Норвежских фиордов,

действительно, представляют собой смесь генов двух видов, в разных пропорциях; (3) Провести очередной этап многолетнего исследования гибридизующих мидий в водах Кольского полуострова. Фактически мы завершили ту часть исследования, которая касается пространственно-временной динамики видов. Однако, остались не до конца познанные гибриды; (4) Закончить биоинформационный анализ и начерно провести популяционно-генетический анализ транскриптомных данных по макомам комплекса *Limecola balthica*, в частности описать паттерны интрогрессии в разных контактных зонах между атлантическими и тихоокеанскими линиями ракушек в Европе. Закрытые из-за пандемии границы затруднили обмен материалами с зарубежными партнерами и отрезали нас от некоторых объектов исследования (напр., «трехсторонней» гибридной зоны у мидий в Норвегии). Это не критично для выполнения проекта.

Все запланированные в отчетном году научные результаты достигнуты:

да

1.5. Описание выполненных в отчетном году работ и полученных научных результатов для публикации на сайте РНФ

на русском языке (до 3 страниц текста, также указываются ссылки на информационные ресурсы в сети Интернет (url-адреса), посвященные проекту)

(1) Исследования трансмиссивного рака. На примере мидий *Mytilus* Японского моря мы отработали методику диагностики диссеминированной неоплазии (DN) и трансмиссивной неоплазии *Mytilus* (BTN) (Skazina et al. 2021). Используя эти методические заделы, мы провели диагностику DN и BTN в обширном материале из дальневосточных морей России. Почти во всех выборках мы нашли рак. Из двух эволюционных линий BTN в дальневосточных морях встречаются обе, причем в одних и тех же популяциях, в одном случае вместе с нетрансмиссивной неоплазией. Используя собранные коллекции раковых образцов, мы разработали экспресс тесты на BTN, основанные на а) детекции митохондриальной гетероплазмии методом прямого секвенирования COI из гемолимфы и мышечной ткани особей, б) детекции уникальных для каждой из двух линий рака аллелей ядерного локуса EF1a в гемолимфе с помощью ПЦР в режиме реального времени. Мы также секвенировали первые транскрипты BTN двух линий и нетрансмиссивного рака. Поиск трансмиссивного рака у другого моллюска – макомы *Limecola* (=Macoma) *balthica*, пока, не дал однозначных результатов. У единственной найденной макомы с DN не удалось показать гетероплазмину, ожидаемую при трансмиссивном раке.

(2) Исследования паттернов гибридизации и интрогрессии у маком комплекса *Limecola balthica*, мидий комплекса *Mytilus edulis* и морских сельдей *Clupea* spp. в Европе. В каждом случае аборигенный атлантический вид или подвид гибридизует с инвазивным тихоокеанским видом. *Clupea* spp. Завершено микросателлитное генотипирование выборок сельди из северо-восточной Европы. Результаты подтверждают гипотезу проекта о том, что различия между географическими и сезонными расами тихоокеанской *C. pallasii* в северо-восточной Европе связаны с интрогрессивной гибридизацией этого вида с атлантической *C. harengus*. Популяции Балсфиорда и Россфиорда родственны *C. pallasii*. Однако на их генофонды сильно повлияла интрогрессия генов *C. harengus* (вклад генов атлантической сельди порядка 30%). Приметы интрогрессии есть у беломорской *C. pallasii* (порядка 10% генов *C. harengus*) и у *C. harengus* Тронсхеимфиорда (порядка 5% генов *C. pallasii*). Из-за того, что в 2020 году провести лов беломорской сельди (*C. pallasii*) на нерестилищах не удалось из-за карантина, мы провели эту работу в 2021. Подавляющее большинство пойманных рыб принадлежит к *C. pallasii*. Однако некоторое число особей относятся к *C. harengus*, среди них из них есть особи в нерестовом состоянии. Это указывает на возможность межвидовой гибридизации. Морфологически, гибридов идентифицировать невозможно. Гипотеза будет проверена генетически.

Limecola balthica. В результате трехлетних усилий по нас оказалось 117 генотипов маком *L. balthica*, охарактеризованных по 1392 ядерным, несцепленным, менделирующим SNP и митохондриальным геномам. Генетические отличия между европейскими популяциями тихоокеанской *L. b. balthica* связаны, во-первых, с разным уровнем интрогрессии генов *M. b. rubra* во-вторых, со структурой интрогрессии. Лучше всего это заметно в популяциях Мурмана, где по одним локусам «завышены» частоты «тихоокеанских» аллелей, а по другим «атлантических». Европейские популяции *L. b. balthica*, интрогрессированные генами *L. b. rubra*, представляют интерес с точки зрения изучения ядерно-цитоплазматического неравновесия, поскольку в них циркулируют атлантические и тихоокеанские митохондриальные линии с высоким уровнем дивергенции. Внутри этих популяций, выборки с атлантической и тихоокеанской МтДНК линиями различаются по частотам ядерных генов, вовлеченных в митохондриальные комплексы. Но только для гена, кодирующего субъединицу О митохондриальной АТФ-синтазы (ATP5O), различия видны во всех изученных популяциях.

Mytilus. Благодаря опубликованию методики морфологического определения «криптических» видов мидий *M. edulis* и *M. trossulus* (Khaitov et al. 2021; работа представлена не как частное исследование мидий, а как формальная процедура

идентификации не полностью дискретных морфологически таксонов), мы смогли интерпретировать таксономическую структуру новых и коллекционных выборок мидий без трудоемкого генотипирования. Обработан большой массив данных по пространственному, в частности биотопическому распределению видов, а также по их временной динамике в Кандакшском и Кольском заливах. В последние годы повсеместно происходит экспансия инвазивного (тихоокеанского) *M. trossulus*. Генотипировав две выборки из смешанных поселений по большой батарее диагностических маркеров, мы впервые надежно оценили разнообразие немногочисленных (2% и 7% от выборок) межвидовых гибридов, представленных F1 и беккроссами. Анализ солидных аллозимных данных по гибридизующим мидиям в Баренцевом море (97 выборок, 5506 генотипов) принес следующий результат. Доля гибридов в поселениях этой гибридной зоны связана с соленостью. В районах, подвергающихся постоянному опреснению, гибридов значимо больше, чем на участках, удаленных от источников опреснения. Даже в строго-«бимодальных» гибридных зонах гибридизация регулируется не только пост-зиготическими, но и пре-зиготическими (экологическими) механизмами.

на английском языке

Transmissible cancer research. We refined the methodology of diagnosing disseminated neoplasia (DN) and bivalve transmissible neoplasia (BTN) on *Mytilus* mussels from the Sea of Japan (Skazina et al. 2021). Using this methodological groundwork, we diagnosed DN and BTN in extensive material from the seas of the Russian Far East. Cancer was found in almost all samples. Both known evolutionary lineages of BTN occur in the Far Eastern seas; moreover, they occur in the same populations, often together with non-transmissible neoplasia. Using the collections of cancer samples, we developed rapid tests for BTN based on a) detection of mitochondrial heteroplasmy by direct COI sequencing from the hemolymph and the muscle tissue, and b) detection of alleles of the EF1a nuclear locus, which are unique in each of the two cancer lineages, in the hemolymph using real-time PCR. We also sequenced the first transcriptomes of BTN of the two lineages and of the non-transmissible cancer. The search for a transmissible cancer in another bivalve, the Baltic macoma *Limecola (=Macoma) balthica*, has yielded equivocal results. The only macoma individual with DN found in our study did not appear to have heteroplasmy expected in case of transmissible cancer.

Studies on hybridisation and introgression patterns in the macoma clams of the *Limecola balthica* complex, the mussels of the *Mytilus edulis* complex and the sea herring *Clupea* spp. in Europe. In each case, a native Atlantic species or subspecies hybridises with an invasive Pacific species.

Clupea spp. Microsatellite genotyping of herring samples from North-Eastern Europe has been completed. The results support the project hypothesis that the differences between geographical and seasonal races of Pacific *C. pallasii* in North-Eastern Europe are associated with introgressive hybridisation of this species with the Atlantic *C. harengus*. The Balsfjord and Rosfjord populations are related to *C. pallasii*. However, their gene pools have been strongly influenced by introgression of *C. harengus* genes, the contribution of the Atlantic herring genes being about 30%. There are also signs of introgression in *C. pallasii* from the White Sea (about 10% of *C. harengus* genes) and in *C. harengus* from Tronsheimfjord (about 5% of *C. pallasii* genes). Since it was impossible to catch White Sea herring (*C. pallasii*) in the spawning grounds in 2020 due to the Covid-related quarantine measures, we carried out this work in 2021. Most of the fish belonged to *C. pallasii*, but a few individuals, including some spawners, belonged to *C. harengus*. These findings indicate the possibility of interspecific hybridization. Morphologically, the hybrids cannot be distinguished. The hypothesis will be tested genetically.

Limecola balthica. After three years of strenuous efforts, we have at our disposal 117 genotypes of macomas *L. balthica* characterized by 1,392 nuclear, non-linked, Mendelian SNPs and mitochondrial genomes. The genetic differences between European populations of the Pacific *L. b. balthica* are associated, firstly, with the different levels of introgression of *M. b. rubra* genes and, secondly, with the introgression pattern. This is best seen in the Murman populations, where the frequencies of "Pacific" alleles are greater for some loci and the frequencies of "Atlantic" alleles are greater for some other loci. European populations of *L. b. balthica* introgressed with *L. b. rubra* genes are interesting for the study of nuclear-cytoplasmic disequilibrium, because Atlantic and Pacific mitochondrial lineages with high levels of divergence circulate in them. Within these populations, samples with the Atlantic and the Pacific mtDNA lineages differ by the frequencies of particular nuclear genes involved in mitochondrial complexes. However, the differences are stable only for the gene encoding subunit O of the mitochondrial ATP synthase (ATP5O).

1.6. Файл с дополнительными материалами

(при необходимости представления экспертному совету РНФ дополнительных графических материалов к отчету по проекту, файл размером до 3 Мб в формате pdf)
скачать...

1.7. Перечень публикаций за год по результатам проекта

(добавляются из списка публикаций, зарегистрированных участниками проекта)

1. Сказина М.А., Одинцова Н.А., Майорова М.А., Иванова А.В., Вайнола Р., Стрелков П. (Skazina M., Odintsova N., Maiorova M., Ivanova A., Väinölä R., Strelkov P.) **First description of a widespread Mytilus trossulus-derived bivalve transmissible cancer lineage in M. trossulus itself** Scientific reports (2021 г.)

2. Хайтов В.М., Марченко Ю.Т., Католикова М.В., Вайнола Р., Кингстон С.Е., Карлон Д.Б., Ганцевич М., Стрелков П. (Khaitov V., Marchenko J., Katolikova M., Väinölä R., Kingston S.E., Carlon D.B., Gantsevich M., Strelkov P.) **Species identification based on a semi-diagnostic marker: Evaluation of a simple conchological test for distinguishing blue mussels Mytilus edulis L. and M. trossulus Gould** PLoS ONE (2021 г.)

1.8. В 2021 году возникли исключительные права на результаты интеллектуальной деятельности (РИД), созданные при выполнении проекта:

Нет

1.9. Показатели реализации проекта

Показатели кадрового состава научного коллектива (рассчитываются как округленное до целого отношение суммы количества месяцев, в которых действовали в отчетном периоде в отношении членов научного коллектива приказы о составе научного коллектива, к количеству месяцев, в которых действовало в отчетном периоде соглашение)

Плановые значения указываются только для показателей, предусмотренных соглашением.

Показатели	Единица измерения	2021 год	
		план	факт
Число членов научного коллектива	человек	10	9
Число исследователей в возрасте до 39 лет (включительно) среди членов научного коллектива	человек	5	5
Число аспирантов (интернов, ординаторов, адъюнктов) очной формы обучения среди членов научного коллектива	человек		1
Количество лиц категории «Вспомогательный персонал»	человек		2

Публикационные показатели реализации проекта (значения показателей формируются автоматически на основе данных, представленных в форме 2о (накопительным итогом). Показатели публикационной активности приводятся в отношении публикаций, имеющих соответствующую ссылку на поддержку Российского научного фонда и на организацию (в последнем случае – за исключением публикаций, созданных в рамках оказания услуг сторонними организациями).

Плановые значения указываются только для показателей, предусмотренных соглашением.

Публикационные показатели реализации проекта (нарастающим итогом, за исключением показателя «Число цитирований...»)	Единица измерения	2019-2021 годы	
		план	факт
Количество публикаций по проекту членов научного коллектива в рецензируемых российских и зарубежных научных изданиях, индексируемых в базах данных «Сеть науки» (Web of Science Core Collection) или «Скопус» (SCOPUS)	Ед.	7	13
в том числе в изданиях, входящих в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору JCR Science Edition или JCR Social Sciences Edition, по SJR (принадлежность издания к Q1 в Scopus определяется по базе данных http://www.scimagojr.com/)	Ед.		6
Число цитирований публикаций членов научного коллектива в научных журналах, индексируемых в международной базе данных «Сеть науки» (Web of Science Core Collection) в отчетном году	Ед.		46

1.10. Информация о представлении достигнутых научных результатов на научных мероприятиях (конференциях, симпозиумах и пр.)

(в том числе форма представления – приглашенный доклад, устное выступление, стендовый доклад)

(1) Diagnostics of bivalve transmissible neoplasia in *Mytilus trossulus* by Illumina amplicon sequencing. Skazina, M., Maiorova, M., Odintsova, N. & Strelkov, P., 2021, Bioinformatics: From Algorithms to Applications : Conference proceedings. СПб, стр. 56-57 (12-15 июля 2021, <https://biata2021.spbu.ru/>, устное выступление, докладчик Сказина М.А., онлайн)

(2) Bivalve transmissible neoplasias in Russian Far east populations of *Mytilus trossulus*. Skazina, M. A., Odintsova, N. A., Maiorova, M. A., Dolganova, I. A., Regel, K. V. & Strelkov, P. P., 2021, Invasion of Alien Species in Holarctic. Borok-VI: Sixth International Symposium: Book of abstracts. стр. 211 (11-15 октября 2021, <http://www.sevin.ru/asholarctic/index.html>, устное выступление, докладчик Стрелков П.П., онлайн)

(3) Invasive Pacific mussel *Mytilus trossulus* in the Barents Sea: distribution, decadal scale dynamics, hybridization with aboriginal *Mytilus edulis*. Marchenko, J. T., Katolikova, M. V., Khaitov, V. M. & Strelkov, P. P., 2021, Invasion of Alien Species in Holarctic. Borok-VI: Sixth International Symposium: Book of abstracts. стр. 144 (11-15 октября 2021, <http://www.sevin.ru/asholarctic/index.html>, устное выступление, докладчик Марченко Ю.Т., онлайн)

(4) Taxonomic and population structuring of blue mussels *Mytilus* in a small subarctic inlet (Tyuva Inlet, Kola Bay, the Barents Sea). Марченко, Ю.Т., 2021, XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2021" - МГУ, Москва (12-23 апреля 2021, https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2021/data/21879/126910_uid142103_report.pdf, устное выступление, докладчик Марченко Ю.Т., онлайн)

1.11. Все публикации, информация о которых представлена в пункте 1.9, имеют указание на получение финансовой поддержки от Фонда:

да

1.12. Информация (при наличии) о публикациях в СМИ, посвященных результатам проекта, с упоминанием Фонда:

Да

1.12.1 Наименование СМИ

<https://biomolecula.ru/>

Заголовок (название)

Синдром Карпентера: бессмертные линии трансмиссивного рака меняют своих смертных хозяев

Выходные данные публикации о проекте

1.12.2 Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии)

<https://biomolecula.ru/articles/sindrom-karpentera-bessmertnye-linii-transmissivnogo-raka-menaiut-svoikh-smertnykh-khoziaev>

1.12.1 Наименование СМИ

www.spbu.ru

Заголовок (название)

Биологи СПбГУ обнаружили заразную форму рака у дальневосточных мидий

Выходные данные публикации о проекте

1.12.2 Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии)

<https://spbu.ru/news-events/novosti/biologi-spbgu-obnaruzhili-zaraznuyu-formu-raka-u-dalnevostochnykh-midiy>

1.12.1 Наименование СМИ

<https://www.rscf.ru>

Заголовок (название)

Биологи СПбГУ обнаружили заразную форму рака у дальневосточных мидий

Выходные данные публикации о проекте

1.12.2 Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии)

<https://www.rscf.ru/news/presidential-program/zaraznuya-formu-raka-u-dalnevostochnykh-midiy/>

1.13. Изменялся ли в отчетном периоде состав основных исполнителей проекта?

Нет

Основные исполнители проекта в 2021 г.:

Лайус Дмитрий Людвигович

Одинцова Нэлия Адольфовна

(в случаях изменения состава основных исполнителей проекта, указанных в заявке на участие в конкурсе, в составе отчета представляются сведения об исключении членов научного коллектива из состава основных исполнителей и о новых основных исполнителях проекта в соответствии с формой 2 приложения № 1 к конкурсной документации о проведении конкурса)

Форма трудового договора с руководителем проекта соответствует указанной в исходной заявке на участие в конкурсе (п. 2.16 Формы 2):

«Организация будет являться основным местом работы: да»

да

Информация о владельце ОИ

1.14. Официальный сайт ОИ (страница ОИ на официальном сайте владельца ОИ)

<http://researchpark.spbu.ru>

Указанный сайт содержит утвержденные в установленном порядке владельцем ОИ:

- перечень оборудования ОИ, содержащий наименование и основные характеристики приборов;
- перечень применяемых ОИ методик измерений;
- перечень выполняемых ОИ типовых работ и (или) оказываемых услуг с указанием единицы измерения выполняемой работы и (или) оказываемой услуги, их стоимости в рублях или порядка определения их стоимости;
- регламент доступа к оборудованию ОИ, предусматривающий порядок выполнения работ и оказания услуг для проведения научных исследований, а также осуществления экспериментальных разработок в интересах третьих лиц; условия допуска к работе на оборудовании ОИ.

да

1.15. В случае необходимости владельцем ОИ вносились изменения в регламент доступа к оборудованию ОИ, исключающие дополнительный отбор для целей реализации проекта. В согласованный с руководителем проекта срок¹ определялся руководителем проекта перечень работ (услуг), которые ОИ предоставлял в целях реализации проекта в соответствии с планом работ научного исследования, их объем, стоимость и сроки выполнения (оказания). В согласованные с Руководителем проекта сроки выполнялись данные работы, оказывались услуги.

¹ Не превышающий срок, установленный в регламенте доступа к оборудованию ОИ.

да

1.16. Перечень работ (услуг), которые ОИ предоставлял в целях реализации проекта соответствует перечню выполняемых ОИ типовых работ и (или) оказываемых услуг, указанных на официальном сайте ОИ (странице ОИ на официальном сайте владельца ОИ), а их стоимость – единицам измерения выполняемой работы и (или) оказываемой услуги, их стоимости в рублях или порядка определения их стоимости, размещенных на указанном сайте:

да

Реквизиты локального акта организации-владельца ОИ с указанием перечня выполняемых ОИ типовых работ и (или) оказываемых услуг; единиц измерения выполняемых работ и (или) оказываемых услуг, их стоимости в рублях или порядка определения их стоимости:

Приказ 488/1 от 25.01.2021 "об утверждении перечня и стоимости услуг"

Ссылка на страницу в сети «Интернет» с указанием перечня выполняемых ОИ типовых работ и (или) оказываемых услуг; единиц измерения выполняемых работ и (или) оказываемых услуг, их стоимости в рублях или порядка определения их стоимости:

https://researchpark.spbu.ru/images/docs/prikaz_vnutr_polz.pdf; <https://researchpark.spbu.ru/home/main-docs-rus>

1.17. Перечень работ из Плана научного исследования, которые не были выполнены в связи с объективными обстоятельствами (описание работы из Плана научного исследования, подробное пояснение о приведших к невыполнению обстоятельств):

-

Перечень работ, которые были выполнены досрочно взамен невыполненных в связи с объективными обстоятельствами (описание работы из Плана научного исследования):

-

Настоящим подтверждаю:

- самостоятельность и авторство текста отчета о выполнении проекта;
- при обнародовании результатов, полученных в рамках поддержанного РНФ проекта, научный коллектив

ссылался на получение финансовой поддержки проекта от РНФ и на организацию, на базе которой выполнялось исследование, на организацию - владельца ОИ (при необходимости);

- согласие с опубликованием РНФ сведений из отчета о выполнении проекта, в том числе в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»;
- проект не имеет других источников финансирования;
- проект не является аналогичным**** по содержанию проекту, одновременно финансируемому из других источников.

**** Проекты, аналогичные по целям, задачам, объектам, предметам и методам исследований, а также ожидаемым результатам. Экспертиза на совпадение проводится экспертным советом Фонда.

Подпись руководителя проекта _____/П.П. Стрелков/

Сведения о публикациях по результатам проекта
№ 19-74-20024

«Морские виды, объекты промысла и марикультуры, в условиях гибридизации и
клональных раковых инфекций»,
в 2021 году

Приводится в отношении публикаций, имеющих соответствующую ссылку на поддержку РФФ.

(заполняется отдельно на каждую публикацию, для формирования п.1.7. отчета)
Указывается в случае официального принятия к публикации в последующих изданиях,
положительного решения о регистрации исключительных прав.

В карточке публикации все данные приводятся на языке и в форме, используемой базами данных «Сеть науки» (Web of Science Core Collection), «Скопус» (Scopus) и/или РИНЦ, каждая статья упоминается только один раз (независимо от языков опубликования).

1

2.1. Авторы публикации

Указываются в порядке, приведенном в публикации в формате Фамилия И.О., Фамилия2 И2.О2., ...

на русском языке: Сказина М.А., Одинцова Н.А., Майорова М.А., Иванова А.В., Вайнола Р., Стрелков П.

на английском языке: Skazina M., Odintsova N., Maiorova M., Ivanova A., Väinölä R., Strelkov P.

WoS Researcher ID (при наличии): <https://publons.com/researcher/D-1606-2013>

Scopus AuthorID (при наличии): <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorid=6701567237>

ORCID (при наличии): <https://orcid.org/0000-0002-6030-7034>

В состав авторов публикации входит аспирант(ы) (интерн, ординатор, адъюнкт) очной формы обучения:
нет

2.2. Название публикации

First description of a widespread Mytilus trossulus-derived bivalve transmissible cancer lineage in M. trossulus itself

2.3. Год публикации

2021

2.4. Ключевые слова

bivalve transmissible neoplasia, Mytilus trossulus, Northwest Pacific, hemocytology, flow cytometry, genotyping, EF1α, mtDNA

2.5. Вид публикации

статья

2.6. Название издания (для монографий также указываются название издательства, город)

Scientific reports

ISSN (при наличии): 2045-2322

e-ISSN (при наличии): ---

ISBN (при наличии): ---

Издание входит в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору JCR Science Edition, JCR Social Sciences Edition, по SJR (принадлежность издания к Q1 в Scopus определяется по базе данных <http://www.scimagojr.com/>):

да

2.7. Выходные данные публикации (номер, том, выпуск, страницы, реквизиты документа о регистрации исключительных прав)

т. 11, N 5809, C.1-13

Месяц и год публикации: 03.2021

Адрес полнотекстовой электронной версии публикации (URL) в открытом источнике (*при наличии*):
<https://www.nature.com/articles/s41598-021-85098-5>

2.8. DOI (*при наличии*)

<https://doi.org/s41598-021-85098-5>

Accession Number WoS (*при наличии*): ---

Scopus EID (*при наличии*): ---

2.9. Принята в печать (указывается в случае официального принятия к публикации в последующих изданиях, положительного решения о регистрации исключительных прав)

Для принятых к публикации материалов п. 2.7 не заполняется.

Письмо из редакции или издательства с извещением об официальном принятии рукописи к публикации: ---

2.10. Издание индексируется базой данных Web of Science Core Collection

да

2.11. Импакт-фактор издания

По JCR Science Edition или JCR Social Sciences Edition, для Scopus – CiteScore (при отсутствии индексирования в Web of Science Core Collection).

4.379

2.12. Издание индексируется базой данных Scopus

да

2.13. Издание индексируется базой данных РИНЦ

да

2.14. Публикация аффилирована с организацией:

да

2.15. В публикации:

В качестве источника финансирования исследования указан грант Российского научного фонда:

да

Указаны иные источники финансирования (в том числе указаны несколько грантов Российского научного фонда), помимо данного гранта Российского научного фонда, и ссылки, при необходимости, на владельца ОИ, а также на организации, предоставившие в соответствии с пунктом 2.4.4 грантового соглашения софинансирование:

нет

2.16. Файл с текстом публикации

(для материалов в открытом доступе можно не размещать; для монографий представляются отдельные страницы с выходными данными и информацией о поддержке РНФ; размер до 3 Мб в формате pdf)

2.1. Авторы публикации

Указываются в порядке, приведенном в публикации в формате Фамилия И.О., Фамилия2 И2.О2., ...

на русском языке: Хайтов В.М., Марченко Ю.Т., Католикова М.В., Вайнола Р., Кингстон С.Е., Карлон Д.Б., Ганцевич М., Стрелков П.

на английском языке: Khaitov V., Marchenko J., Katolikova M., Väinölä R., Kingston S.E., Carlon D.B., Gantsevich M., Strelkov P.

WoS Researcher ID (*при наличии*): <https://publons.com/researcher/D-1606-2013>

Scopus AuthorID (*при наличии*): <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorid=6701567237>

ORCID (*при наличии*): <https://orcid.org/0000-0002-6030-7034>

В состав авторов публикации входит аспирант(ы) (интерн, ординатор, адъюнкт) очной формы обучения:

да

2.2. Название публикации

Species identification based on a semi-diagnostic marker: Evaluation of a simple conchological test for distinguishing blue mussels *Mytilus edulis* L. and *M. trossulus* Gould

2.3. Год публикации

2021

2.4. Ключевые слова

cryptic species, *Mytilus* spp., taxa identification, semi-dignostic markers, statistical evaluation of taxonomic test

2.5. Вид публикации

статья

2.6. Название издания (для монографий также указываются название издательства, город)

PLoS ONE

ISSN (при наличии): 1932-6203

e-ISSN (при наличии): ---

ISBN (при наличии): ---

Издание входит в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору JCR Science Edition, JCR Social Sciences Edition, по SJR (принадлежность издания к Q1 в Scopus определяется по базе данных <http://www.scimagojr.com/>):

да

2.7. Выходные данные публикации (номер, том, выпуск, страницы, реквизиты документа о регистрации исключительных прав)

16(7): e0249587, 27 страниц

Месяц и год публикации: 07.2021

Адрес полнотекстовой электронной версии публикации (URL) в открытом источнике (при наличии):
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0249587>

2.8. DOI (при наличии)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249587.g001>

Accession Number WoS (при наличии): ---

Scopus EID (при наличии): ---

2.9. Принята в печать (указывается в случае официального принятия к публикации в последующих изданиях, положительного решения о регистрации исключительных прав)

Для принятых к публикации материалов п. 2.7 не заполняется.

Письмо из редакции или издательства с извещением об официальном принятии рукописи к публикации: ---

2.10. Издание индексируется базой данных Web of Science Core Collection

да

2.11. Импакт-фактор издания

По JCR Science Edition или JCR Social Sciences Edition, для Scopus – CiteScore (при отсутствии индексирования в Web of Science Core Collection).

3

2.12. Издание индексируется базой данных Scopus

да

2.13. Издание индексируется базой данных РИНЦ

да

2.14. Публикация аффилирована с организацией:

да

2.15. В публикации:

В качестве источника финансирования исследования указан грант Российского научного фонда:

да

Указаны иные источники финансирования (в том числе указаны несколько грантов Российского научного фонда), помимо данного гранта Российского научного фонда, и ссылки, при необходимости, на владельца ОИ, а также на организации, предоставившие в соответствии с пунктом 2.4.4 грантового соглашения софинансирование:

да

Пояснения о том, какие работы выполнялись не за счет данного гранта Фонда, как это отражено в публикации (в случаях, если в тексте публикации не отражено за счет каких источников выполнялись отдельные работы – пояснения о причинах отсутствия такой информации и о том, какие работы выполнялись не за счет данного гранта Фонда):

Американские соавторы указали свои американские источники финансирования. Они собрали из своих популяций и генотипировали 428 мидий из 4304 мидий, использованных в работе.

2.16. Файл с текстом публикации

(для материалов в открытом доступе можно не размещать; для монографий представляются отдельные страницы с выходными данными и информацией о поддержке РНФ; размер до 3 Мб в формате pdf)

Подпись руководителя проекта _____/П.П. Стрелков/

План работы на 2022 год и ожидаемые результаты по проекту № 19-74-20024

«Морские виды, объекты промысла и марикультуры, в условиях гибридизации и клональных раковых инфекций»

(представляется для проектов, работа над которыми в соответствии с исходной заявкой на участие в конкурсе должна быть продолжена в следующем году)

3.1. План работы на 2022 год

(в том числе указываются запланированные командировки по проекту), до 5 стр.

Направление 1. Анализ паттернов гибридизации и интрогрессии.

1.1. Продолжить наблюдения за динамикой «криптических» видов мидий *Mytilus edulis* и *M. trossulus* и гибридной зоны между ними в водах Кольского полуострова.

1.1.1 Динамика видов. В Белом море продолжить наблюдения за таксономической структурой четырех мониторинговых поселений в вершине Кандалакшского залива и переписать состав поселений из точек генетических исследований 2000-2010 гг., не изученных в 2021 году. Завершить анализ данных о распределении видов в водах Кандалакшского залива, выявить средовые факторы, регулирующие таксономический состав смешанных поселений. В Баренцевом море продолжить подробное картирование распределения видов в южной части Кольского залива. Завершить анализ данных о биотопическом распределении *M. edulis* и *M. trossulus* в губе Тюва Кольского залива, динамике их симпатрических поселений за 2004-2018 гг. и динамике популяций мидий района Тювы за все время научных исследований (1930-2010 гг.). Проанализировать богатые «малолокусные» (аллозимные) данные проекта по Кольской гибридной зоне для ответа на вопрос: как менялась, за годы исследований, генотипическая структура отдельных генераций мидий в разных точках залива.

1.1.2 Анализ паттернов гибридизации. Увеличить объем мультилокусных (KASP) данных о генотипической структуре выборок из гибридных зон. Выборки должны удовлетворять следующим критериям: быть смешанными (*M. edulis*, *M. trossulus*), представлять контрастные местообитания; также желательно, чтобы у животных был известен пол.

1.2 Проверить гипотезы о заходах атлантической сельди *C. harengus* в Белое море и ее гибридизации с беломорской сельдью *C. pallasii* в настоящее время.

На примере коллекционных сборов сельди из разных географических популяций и сборов нерестящейся беломорской сельди 2021 года отработать новые ядерные и митохондриальные маркеры, информативные для различения *C. pallasii* и *C. harengus*. Генотипировать сельдей с разным числом позвонков из сборов 2021 г., проверить таксономический статус рыб с повышенным числом позвонков, убедиться в наличии/отсутствии в сборах генотипов *C. harengus* и межвидовых гибридов ранних поколений.

Направление 2. Популяционная транскриптомика *Limecola (Macoma) balthica*.

2.1. Завершить анализ данных по популяционной структуре *L. balthica*, ядерно-цитоплазматическому неравновесию и интрогрессии в европейских популяциях, на генофонды которых повлияла гибридизация между двумя эволюционными линиями ракушки.

Направление 3. Описание варьирования фенотипов.

3.1. Для *Clupea* из разных европейских популяций, проанализировать связь между генетическим и морфологическим дистанциями с использованием вновь полученных генетических данных. Для беломорских сельдей 2021 г. сбора, если подтвердится их таксономическая гетерогенность, провести подробный морфологический сравнительный анализ генотипов по комплексу меристических признаков, описывающих костные структуры. На всех накопленных по сельди данных провести следующий анализ: разделить общую внутривидовую фенотипическую изменчивость остеологических признаков на факториальный (обусловленный генотипической гетерогенностью и разнообразием условий среды) и стохастический компонент (обусловленный нестабильностью развития), путем использования данных по флуктуирующей асимметрии, и тестировать гипотезу проекта о том, что у гибридов факториальный компонент выше из-за их более высокого генетического разнообразия.

Направление 4. В поисках СТС.

4.1 Продолжение исследования разнообразия и паттернов распределения трансмиссивного рака в популяциях мидий *Mytilus* северных и дальневосточных морей России с использованием цитологических и генетических методов диагностики рака. Главные направления работ будут следующие. 4.1.1. Обработать богатые коллекционные сборы 2021 г. из окрестностей Магадана Охотского моря (карта на рис. 4.2.1). 4.1.2. Провести исследование, подобное

Магаданскому, нацеленное на поиск “очагов” рака в Кольском заливе Баренцева моря, где по нашим предварительным данным, есть трансмиссивный рак. 4.1.3. Продолжить поиск трансмиссивного рака в других морях, в первую очередь Белого моря.

4.2 Отработка секвенирования фрагментов диагностических для трансмиссивного рака мидий локусов (EF1a, COI, CR) с помощью секвенирования следующего поколения (NGS) на системе высокопроизводительного полногеномного секвенирования MiSeq Sequencing System на базе РЦ “Биобанк” СПбГУ. По задумке, данный подход должен заменить, как более точный, метод молекулярного клонирования, которое сейчас применяется для идентификации нуклеотидных последовательностей раковых и хозяйских аллелей, находящихся в смеси в ПЦР-продукте. Потребуется подбор специфичных праймеров для амплификации фрагментов не более 500 п.н. локусов, а также биоинформационного алгоритма обработки полученных данных.

4.3 Определение круга генотипов хозяев трансмиссивного рака в гибридной зоне между *M. edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова (Кольский залив, Белое море). Родительский вид для всех известных линий рака - *M. trossulus*, его генотип родственен этому виду. В Кольской гибридной зоне мы имеем смесь генотипов *M. edulis*, *M. trossulus* и разнообразных гибридов, причем генофонды родительских видов несут следы интрогрессии, в частности митохондриальной. “Разглядеть” на фоне *M. trossulus*-подобного генотипа рака генотип *M. edulis*, тем более гибрида, и формально его описать - сложная задача. Один из подходов, предложенный Hammel et al. 2001 основан на генотипировании тканей раковых мидий по батареям таксономически-информативных маркеров SNP методом аллель специфичной ПЦР (KASP). KASP (полу)количественно определяет соотношение аллелей в тканях, что теоретически должно позволять отличать гетерозигот (соотношение 1:1) от химер (соотношение иное). Мы в первую очередь попробуем применить этот подход.

4.4 Провести, методами цитологии и гистологии, сравнительное исследование диссеминированной неоплазии у мидий, инфицированных разными генетическими линиями трансмиссивного рака (BTN1, BTN2, не-трансмиссивный рак) из популяций мидий дальневосточных морей, где разные формы рака встречаются вместе.

4.5. В 2020 году нами была предпринята попытка создания культуры неопластических клеток мидий, однако она не увенчалась успехом. Мы планируем продолжить эксперименты по культивированию раковых гемоцитов мидий, используя разные клоны трансмиссивного рака и методические заделы прошлых исследований (Walker et al. 2009, Odintsova et al. 2017; работы по проекту 2020 г.).

4.6. Продолжить поиск диссеминированной неоплазии и трансмиссивного рака у маком *Limecola balthica* в Баренцевом море методами проточной цитометрии и анализа митохондриальной гетероплазии. Методы генотипирования придется совершенствовать (добиваться стабильной амплификации полиморфного COIII), а маком искать крупных (>1.5 см), поскольку у мелких сложно брать гемолимфу.

4.7. Провести поиск наиболее зараженных раком мидий, секвенировать транскрипты гемолимфы и мышц ноги этих мидий (не менее пяти раковых мидий), а также контрольных здоровых мидий. Провести анализ дифференциальной экспрессии и выявить генные пути, наиболее отличающиеся между пораженными раком и здоровыми тканями. Определить на основе транскриптомных данных ядерные локусы, дифференцированные между разными линиями рака и его хозяевами мидиями.

Командировки. Запланированы командировки на Белое и Баренцево моря для сбора материала для пяти участников проекта. Мы также планируем принять очное участие в IV международной конференции «Современные проблемы биологической эволюции» 18-21 октября 2022 г. в Государственном Дарвиновском музее и, если позволит эпидемиологическая ситуация, в перенесенном с 2021 на 2022 г. International Symposium on Advances in Marine Mussel Research в Снопте (Польша).

3.2. Ожидаемые в конце 2022 года конкретные научные результаты

(форма изложения должна дать возможность провести экспертизу результатов и оценить степень выполнения заявленного в проекте плана работы), до 5 стр.

Направление 1. Анализ паттернов гибридизации и интрогрессии.

1.1. *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова

1.1.1. Динамика видов. В Белом море получены данные о таксономической структуре четырех мониторинговых поселений в вершине Кандалакшского залива и пере-описан генетический состав поселений из точек генетических исследований 2000-2010 гг. В Баренцевом море детализировано распределение видов в южной части Кольского залива.

Завершены анализы двух массивов данных: (1) По распределению видов в водах Кандалакшского залива в связи с градиентами основных факторов среды, (2) По биотопическому распределению видов в губе Тюва Кольского залива,

динамике их симпатрических поселений за 2004-2018 гг. и динамике популяций мидий района Тювы за все время научных исследований (1930-2010 гг.).

Проанализированы богатые «малолокусные» (аллозимные) данные проекта по Кольской гибридной зоне, для ответа на вопрос: как менялась, за годы исследований, генотипическая структура отдельных генераций мидий в разных точках залива.

1.1.2. Увеличен объем мультилокусных (KASP) данных о генотипической структуре выборок из гибридных зон (минимум 200 генотипов). В выборках из контрастных местообитаний оценены частоты гибридов, их разнообразие, а также связь между генотипом и полом мидий.

1.2. Проверены гипотезы о заходах атлантической сельди *Clupea harengus* в Белое море и ее гибридизации с беломорской сельдью *C. pallasii* в настоящее время. На примере коллекционных сборов сельди из разных географических популяций и сборов нерестящейся беломорской сельди 2021 года отработаны новые ядерные и митохондриальные маркеры, информативные для различения *C. pallasii* и *C. harengus*. Генотипированы сельди с разным числом позвонков из сборов 2021 г., проверены гипотезы о наличии в сборах генотипов *C. harengus* и межвидовых гибридов ранних поколений.

Направление 2. Популяционная транскриптомика макомы *Limecola (Macoma) balthica*.

2.1. Завершен анализ популяционной структуры *L. balthica*, ядерно-цитоплазматического неравновесия и интрогрессии в европейских популяциях, на генофонды которых повлияла гибридизация между двумя эволюционными линиями ракушки (по имеющимся данным).

Направление 3. Описание варьирования фенотипов.

3.1. Для *Clupea* из разных европейских популяций проанализированы связи между генетическим и морфологическим дистанциями с использованием вновь полученных генетических данных. Для беломорских сельдей 2021 г. сбора, если подтвердится их таксономическая гетерогенность (п. 1.2), проведен подробный морфологический сравнительный анализ разных генотипов по комплексу меристических признаков, описывающих костные структуры. На всех накопленных по сельди данных проведен анализ вклада факториального и стохастического компонентов в общую внутривидовую фенотипическую изменчивость остеологических признаков и проверена гипотеза проекта о том, что у гибридов факториальный компонент выше из-за их более высокого генетического разнообразия.

Направление 4. В поисках СТС.

4.1. Получены новые данные по распространению и разнообразию трансмиссивного рака *Mytilus* в морях России. По свежим и коллекционным сборам проведен поиск «очагов» рака путем подробного картирования инфекции в популяциях мидий окрестностей Магадана в Охотском море и Мурманска в Баренцевом море.

4.2. На коллекционных и свежих сборах апробирована перспективная методика различения раковых и хозяйских аллелей у мидий, инфицированных трансмиссивным раком, с помощью секвенирования следующего поколения (NGS) на MiSeq Sequencing System. Результаты сопоставлены с таковыми, полученными традиционным методом молекулярного клонирования. В случае удачи, уточнено разнообразие генотипов рака по ядерным и митохондриальным маркерам внутри и между инфицированными мидиями, в том числе из разных географических популяций.

4.3. Апробированы подходы, в первую очередь с использованием метода аллель специфичной ПЦР (KASP), к определению видового генотипа инфицированных трансмиссивным раком мидий из гибридной зоны между *M. edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова. Проверена гипотеза о заражении раком, эндемичным для инвазивного *M. trossulus*, атлантического вида *M. edulis*, а также гибридов между *M. edulis* и *M. trossulus*.

4.4. Проведено сравнительное цитологическое и гистологическое исследование двух эволюционных линий трансмиссивных неоплазий мидий на примере дальневосточных популяций мидий, где эти линии встречаются вместе.

4.5. Проведен новый эксперимент по культивированию раковых гемоцитов мидий с использованием разных клонов трансмиссивного рака и подходов, наработанных в предыдущих экспериментах (Walker et al. 2009; Odintsova et al. 2017; работы по проекту 2020 г.).

4.6. Методами проточной цитометрии и анализа митохондриальной гетероплазмы изучены новые макомы *L. balthica* из баренцевоморских популяций, где отмечали диссеминированную неоплазию и «химеризм» по транскриптомным данным. Сделаны предварительные выводы о наличии/отсутствии СТС у ракушки.

4.7. Секвенированы транскриптомы гемолимфы и мышц ноги сильно зараженных BTN мидий (не менее пяти мидий) и контрольных здоровых мидий из тех же популяций. Проведен анализ дифференциальной экспрессии, выявлены генные пути, наиболее отличающиеся между пораженными раком и здоровыми тканями. На основе транскриптомных данных выявлены ядерные локусы, наиболее дифференцированные между разными линиями рака и его хозяевами мидиями.

3.3. Файл с дополнительной информацией (при необходимости)

С графиками, фотографиями, рисунками и иной информацией о содержании проекта. В формате pdf, размером до 3 Мб.

Подпись руководителя проекта _____/П.П. Стрелков/

Запрашиваемое финансирование по проекту № 19-74-20024

«Морские виды, объекты промысла и марикультуры, в условиях гибридизации и клональных раковых инфекций», на 2022 год

4.1. Планируемые расходы по проекту за счет средств, предоставляемых Фондом на следующий год (тыс. руб.)

Без учета неиспользованного остатка средств гранта предыдущих лет на начало планируемого года.

№ п.п.	Направления расходования средств гранта	Сумма расходов (тыс. руб.)
	ВСЕГО	6000
	Вознаграждение членов научного коллектива (с учетом страховых взносов, налогов (при наличии), без лиц категории «вспомогательный персонал»),	2700
	в том числе:	
	вознаграждение членов научного коллектива – исследователей в возрасте до 39 лет (включительно) Имеет информационный характер.	1750
	Вознаграждение лиц категории «вспомогательный персонал» (с учетом страховых взносов, налогов (при наличии))	600
	Оплата ² отпусков и выплаты компенсаций за неиспользованные отпуска лицам, являвшимся членами научного коллектива или лицами категории «вспомогательный персонал» (с учетом страховых взносов, налогов (при наличии)), оплата недоимки ³ по страховым взносам ² Указывается для лиц, которые не будут привлекаться в планируемом периоде к реализации проекта. ³ Возникшей по действующему грантовому соглашению.	0
1	Итого вознаграждение (с учетом страховых взносов, налогов (при наличии))	3300
2	Оплата научно-исследовательских работ сторонних организаций (помимо владельца ОИ), направленных на выполнение научного проекта Не более 15 процентов от суммы гранта. Оплата работ и услуг организаций, предоставивших в соответствии с пунктом 2.4.4 соглашения софинансирование, не допускается.	0
3	Расходы на приобретение оборудования и иного имущества, необходимых для проведения научного исследования (включая обучение работников, монтажные, пуско-наладочные и ремонтные ⁴ работы) ⁴ Не связанные с осуществлением текущей деятельности организации.	30
4	Расходы на приобретение материалов и комплектующих для проведения научного исследования	500
5	Иные расходы для целей выполнения проекта	370
6	Оплата ⁵ работ (услуг), выполняемых (оказываемых) владельцем ОИ в целях реализации Проекта ⁵ Не более 20 процентов от суммы гранта.	1200
7	Накладные расходы организации Не могут превышать значений, предусмотренных соглашением.	600

4.2. Расшифровка планируемых расходов

№ п.п. Направления расходования средств гранта, расшифровка

1 Итого вознаграждение (с учетом страховых взносов, налогов (при наличии))

(указывается общая сумма вознаграждения с учетом страховых взносов, налогов (при наличии))

Майорова Мария Андреевна, 250000 руб

Пономарцев Никита Вячеславович, 300000 руб

Марченко Юлия Тиграновна, 500000 руб

Сказина Мария Александровна, 600000 руб

Стрелков Петр Петрович, 300000 руб

Одинцова Нелия Адольфовна, 250000 руб
Лайус Дмитрий Людвигович, 250000 руб
Хайтов Вадим Михайлович, 250000 руб
Вспомогательный персонал, 600000 руб

- 2 Оплата научно-исследовательских работ сторонних организаций (помимо владельца ОИ), направленных на выполнение научного проекта
(приводится перечень планируемых договоров (счетов) со сторонними организациями с указанием предмета и суммы каждого договора)
нет расходов
- 3 Расходы на приобретение оборудования и иного имущества, необходимых для проведения научного исследования (включая обучение работников, монтажные, пуско-наладочные и ремонтные работы)
(представляется перечень планируемых к закупке оборудования и иного имущества, необходимых для проведения научного исследования)
 1. Реактивы для выделения тотальной ДНК 52 000 руб.
Набор для выделения ДНК GeneJet, Thermo (250 образцов, 1 уп), 52 000 руб,
 2. Материалы для выделения РНК и синтеза кДНК 26 000 руб.
Набор для синтеза кДНК Mint-2, Евроген (20 р-й, 2 упаковки) 26 000 руб.
 3. Реактивы для KASP типирования 120 000 руб.
KASP V4.0 2X Master Mix 96/384, Std Rox (5000 реакций, 25 мл) 120 000 руб.
 4. Морозильная камера для хранения коллекций 30 000 руб.
 5. Общелабораторные расходные материалы 52 000 руб.
 6. Реактивы для секвенирования на Illumina 220 000 руб.
Набор MiSeq Reagent Kit v3, 2x300 (1 уп), 220 000 руб.
(цены декабря 2021)
- 5 Иные расходы для целей выполнения проекта
(приводится классификация иных затрат на цели выполнения проекта, в том числе - расходы на командировки, связанные с выполнением проекта или представлением результатов проекта, оплату услуг связи, транспортных услуг, иное; расходы не расшифровываются)
оплата публикаций в журналах с открытым доступом: 200000 руб.
командировочные расходы: 170000 руб.

Подпись руководителя проекта _____/П.П. Стрелков/

Подпись руководителя организации (уполномоченного представителя, действующего на основании доверенности или распорядительного документа), **печать** (при ее наличии) **организации.**

В случае подписания формы уполномоченным представителем организации (в т.ч. – руководителем филиала) к печатному экземпляру отчета прилагается копия распорядительного документа или доверенности, заверенная печатью организации).

_____/_____
М.П.

Изменения в составе участников

Лайус Дмитрий Людвигович
Одинцова Нэлия Адольфовна