

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 2019 г.: 6000 тыс. руб.	Год начала проекта: 2019	Год окончания проекта: 2022	
	Объем финансирования, запрашиваемый на 2020 год: 6000 тыс. руб. (для продолжающихся проектов)		
Перечень приложений к отчету	1. Копии публикаций* в соответствии с Формой 2о - 2 шт. на 3 стр. в 1 экз. <i>* К печатному экземпляру отчета прикладываются только копии первой (с указанием авторов) страницы и страницы со ссылкой на поддержку от РНФ.</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*** ** 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. _____/_____/_____ Печать (при наличии) организации		Дата подачи отчета: 07.12.2019 г.	

Отчет о выполнении проекта
№ 19-74-20024

«Морские виды, объекты промысла и марикультуры, в условиях гибридизации и
клональных раковых инфекций»,
в 2019 году

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

Формируется в соответствии с заявкой на участие в конкурсе.

1. Анализ данных по структуре и динамике мозаичных гибридных зон между *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова. Продолжение мониторинговых наблюдений за зонами. Обобщение заделов (см. Стр. 2 Приложения) - анализ числовых данных, построение регрессионных моделей, описывающих многолетние изменения в соотношении частот генотипов, в том числе, в отдельных генерациях. Исполнители: Католикова, Марченко, Хайтов, Стрелков
2. Отработка методики SNP-типирования мидий северных морей по таксономически-информативным маркерам для различения всех трех видов - *Mytilus edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*, и гибридов между разными видами, с использованием коллекционных выборок из разных гибридных зон (см. Стр. 1 Приложения). Новая методика должна заменить применяемую сегодня громоздкую, трудоемкую, и, теоретически, не оптимальную методику (см. ниже), основанную на анализе нескольких аллозимных маркеров и (или) маркеров ПЦР. Исполнители: Юрченко, Марченко, Головин
3. Подготовка, на основании литературных данных и имеющихся заделов, публикации с предварительным названием «Challenges with identification of *Mytilus edulis*, *M. trossulus* and their hybrids with a few molecular markers». Ежегодно, публикуется около 10 статей, в которых для различения чистопородных представителей видов мидий и межвидовых гибридов применяются генетические методы. Мы хотим проанализировать, как влияют на результаты классификации генотипов (некритический) выбор признаков для анализа и статистических методов классификации. Исполнители: Сказина, Католикова, Стрелков
4. Подготовка, на основании имеющихся заделов, публикаций с предварительными названиями «Current distribution and historical dynamics of the invasive Pacific mussel *M. trossulus* in the western White Sea» и «Geography blurs ecological and morphological phenotypes of sympatric blue mussel species *Mytilus edulis* L. and *M. trossulus* Gould». Первая работа должна закрыть вопрос о регионах, свободных от непригодного для культивирования вида *M. trossulus* (Beaumont et al. 2008), а значит, наиболее удобных для размещения хозяйств аквакультуры мидий (*M. edulis*) в Белом море. Вторая работа, также основанная на заделах, отвечает на вопрос, насколько выявленные нами морфологические и экологические различия между видами мидий в Белом море (Kotlikova et al. 2016; Khaitov et al. 2018) проявляются в других районах со-существования видов. Исполнители: Хайтов, Католикова, Марченко
5. Отработка методики морфологического анализа *Mytilus* на примере референсных выборок *M. edulis*, *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* и коллекционных выборок из разных гибридных зон (см. Стр. 2 Приложения). Проведение, с помощью методов классической и геометрической морфометрии, морфологического анализа, нацеленного на выявление признаков, наиболее информативных для дискриминации трех видов и межвидовых гибридов. Оценка степени морфологической идентичности мидий из северных морей референсным *M. edulis*, *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*. Исполнители: Католикова, Марченко, Лайус, Хайтов
6. Отработка гистологических методик диагностирования диссеминированной неоплазии (DN) и молекулярно-генетических методик диагностирования СТС у *Bivalvia* на примере дальневосточных популяций, где DN была выявлена в нашем предыдущем исследовании (Odintsova et al. 2011), и коллекционных материалов из пораженных СТС популяций Европы (см. Стр. 4 Приложения). Методы раскрыты в п. 4.А формы 4.7 проекта. Пилотное гистологическое исследование *Mytilus* spp., *Mya arenaria*, *Cerastoderma edule* и *Macoma* cf. *balthica* из Белого и Баренцева морей. Исполнители: Одинцова, Майорова, Сказина
7. Морфологический и генетический диагноз *Clupea pallasii* и *C. harengus* и их гибридов. Морфологическое сравнение *Clupea pallasii* и *C. harengus*. Обработка референсных выборок атлантической и тихоокеанской сельдей с целью выявления 5-10 контрастно различающихся признаков костных структур (в первую очередь – меристических), необходимых для дальнейшего массового анализа сельдей Северо-Восточной Европы. Морфологический и генетический анализ новых и коллекционных выборок Ивановской сельди, нацеленный на описание их

таксономической гетерогенности – наличия «чужеродных» генотипов *C. harengus* и гибридов ранних поколений между *C. pallasii* и *C. harengus*. Исполнители: Головин, Лайус

8. Секвенирование популяционных выборок транскриптомов макомы *Macoma cf. balthica* (не менее 40 индивидуальных транскриптомов), идентификация генетических вариантов, проведение популяционного анализа данных с особым вниманием к признакам гибридизации и интрогрессии между *M. b. balthica* и *M. b. rubra*. Планирование дальнейшего исследования, нацеленного на описание архитектуры гибридных роев у *Macoma*. Исполнители: Юрченко, Майорова
Запланированные командировки. Для выполнения пп. 1, 6, 7 планируются полевые работы на Белом и Баренцевом морях, 5 человек. На эти поездки в смете запланировано 100 тыс. руб. Пункт 6 (отработка гистологических и иммуноцитохимических методов определения неоплазий и СТС) будет выполняться на базе Лаборатории клеточных технологий ННЦМБ, г. Владивосток (зав. лаб. Проф. Н.А. Одинцова). Это потребует командирования в Приморье трех участников работ из Петербурга. На эти поездки в смете предусмотрено 300 тыс. руб. Наконец, мы резервируем 100 тыс. руб. на участие в научных форумах, для представления результатов работ по проекту, и посещение иностранных научных центров, для обмена опытом и пополнением коллекций, необходимых для выполнения проекта.

1.2. Заявленные научные результаты на конец отчетного периода

Формируется в соответствии с заявкой на участие в конкурсе.

Продолжены наблюдения за динамикой мозаичных гибридных зон между *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова. Методами регрессионного анализа проанализированы данные за 2001-2016 гг. Апробирована методика SNP-типирования мидий *Mytilus* из морей северо-восточной Европы по 10-30 таксономически информативным маркерам.

Подготовлены тексты публикаций, посвященных методам идентификации чистопородных особей и межвидовых гибридов в гибридных зонах между *Mytilus edulis* и *M. trossulus*, современному распределению и исторической динамике *M. trossulus* в Белом море, и степени морфологической и экологической пластичности *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в разных контактных зонах.

Отработана методика морфологического анализа *Mytilus*. Выявлены признаки, наиболее информативные для дискриминации *M. edulis*, *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*. Оценена степень морфологической идентичности мидий северных морей аллопатрическим *M. edulis*, *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*.

На примере дальневосточных популяций *Bivalvia*, в которых отмечена диссеминированная неоплазия (DN), и коллекционных материалов из пораженных СТС популяций Европы освоены и апробированы гистологические методики диагностирования DN и молекулярно-генетические методы диагностирования СТС. Получены предварительные данные о неоплазиях у *Mytilus spp.*, *Mya arenaria*, *Cerastoderma edule* and *Macoma cf. balthica* северных морей России.

Проведен сравнительный морфологический анализ референсных выборок *Clupea pallasii* и *C. harengus*. Выявлены наиболее информативные признаки для различения двух видов. Проанализирована таксономическая гетерогенность выборок беломорской ивановской сельди.

Секвенированы и проанализированы популяционные выборки транскриптомов *Macoma cf. balthica*.

1.3. Сведения о фактическом выполнении плана работы на год

(фактически проделанная работа, до 10 стр.)

Мы работали по всем заявленным направлениям, и получили по всем из них удовлетворительные результаты. На итоги повлияли следующие обстоятельства. 1. Фактически, работы начались в июне, когда появилась возможность оформлять исполнителей, выписывать командировки и оплачивать счета; товары по некоторым летним счетам до сих пор не поставлены. 2. Отдаленной целью проекта было найти, в российских популяциях, и изучить заразный рак (СТС), тем самым «присоединившись к разворачивающейся гонке по изучению СТС». На риск не найти СТС и не оправдать доверие Фонда справедливо указывали рецензенты. Вопреки опасениям, мы нашли СТС, что сместило акценты на соответствующие пункты плана работ. 3. В первый год (фактически, полгода) мы не обещали ни одной публикации. Формы отчета не позволяют в полной мере представить усилия по выполнению публикационных планов. Мы помещаем в базу публикаций препринт, депонированный на www.biorxiv.org. Идентичный манускрипт подан в *Journal of Evolutionary Biology*. Подтвердить наличие в нем ссылки на проект как источник финансирования не представляется возможным, поскольку, согласно правилам журнала, на стадии подачи финансирование не раскрывается. В Приложении мы помещаем скриншот личного кабинета Стрелкова на сайте журнала, где эта статья видна. В третьих, в Приложении, на скриншоте личного кабинета на сайте *Journal of Evolutionary Biology* видна и вторая поданная статья по

теме проекта (Cycles of trans-Arctic dispersal and vicariance, and diversification of the amphi-boreal marine fauna).

1. Продолжены наблюдения за гибридной зоной между *M. edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова. Дополнены и обобщены, в части временной динамики, данные за 15 лет исследований зоны в региональном (Кольский залив) и локальном (губа Тюва) масштабах. Располагая разновременными выборками из одних тех же поселений, а также данными о возрасте коллекционных мидий, мы оценили динамику зоны на уровне совокупностей поселений, на уровне индивидуальных поселений, и на уровне индивидуальных генераций. Для комплексного анализа был применен регрессионный анализ (GAMM). За период наблюдений, повсеместно сократилась доля *M. trossulus*, на 30-40% (рис. 1 Приложения). Динамика гибридной зоны, отчасти, обусловлена естественным отбором, действующим на бентосную стадию жизненного цикла мидий, о чем свидетельствует снижение доли генов *M. trossulus* в одних и тех же генерациях во времени. Фактор отбора, скорее, действовал эпизодически, чем монотонно. Мы предполагаем, что смертность *M. trossulus* как более холодолюбивого вида интенсифицировалась в аномально теплые зимы.

2. Однонуклеотидные маркеры (SNP) разработаны и применены для изучения, методами популяционной геномики, явления интрогрессии на примере мидий (см. публикации проекта). В одной работе проведено сравнение генофондов популяций гибридирующих видов на разном удалении от гибридных зон. Поскольку *M. edulis* вступает в контакт с каждым из двух других видов неоднократно в разных районах, это позволило изучить последствия гибридизации между одними и теми же видами в нескольких повторностях, и оценить степень «предсказуемости» интрогрессии. В другой работе изучены генофонды интродуцированных популяций *M. galloprovincialis* из портовых районов восточной Атлантики, которые существуют в окружении *M. edulis*, и гибридируют с ней. Опять же, эксперимент по гибридизации повторяется неоднократно в разных портах. Мы инвестировали в эти работы с французскими коллегами референсные выборки всех трех эволюционных линий мидий из северной Европы (*M. edulis*, *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*) из наших коллекций. Перечислим результаты, касающиеся наших выборок, тем более что они мало акцентированы в выводах публикаций. В наших руках сборы из уникальной популяции Гасейда (Норвегия), сформированной всеми тремя видами и их гибридами. Что *M. trossulus*, что *M. edulis* северных морей России – «американцы», они генетически ближе популяциям западной, а не восточной Атлантики. Генофонды инвазивной *M. galloprovincialis* из северной Европы настолько сильно «загрязнены» генами *M. edulis*, что их можно считать гибридными линиями. Гибридная зона между *M. edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова очень молода, в генофондах гибридирующих популяций (еще) нет примет недавней интрогрессии. Сравнение SNP генотипов мидий из наших выборок с их генотипами по нескольким маркерам, которые мы традиционно используем, показало следующее. Мы надежно различаем генотипы *M. trossulus*, *M. edulis* и их гибридов в водах Кольского полуострова, но не можем надежно различать категории гибридов. Мы также не можем надежно отличать *M. galloprovincialis* и гибридов с этим видом от остальных генотипов.

Доступная нам батарея из 212 SNP маркеров, отобранных по геномным данным (51,878 качественных SNP в 1269 контигах размером несколько kb из Fraïsse et al. 2016) и протестированных в экспериментальных скрещиваниях (сегрегация у гибридов разных поколений, Simon et al. 2018), имеет следующие характеристики: Маркеры дифференцированы между известными 8 географическими популяциями (эволюционными линиями) мидий трех видов в северном полушарии (разные би-аллельные маркеры различают разные популяции), и, в совокупности, позволяют с высокой надежностью определять принадлежность особей к каждой из этих линий; Частоты генотипов в равновесии по ХВ в референсных «чистых» популяциях; Маркеры не сцеплены. Имея в руках первичные данные опубликованных работ, мы отобрали для своих целей 20 признаков, адаптированных для типирования методом KASP (конкурентной аллель-специфичной ПЦР), из них по 5 признаков с надежностью >90% отличают каждый из трех видов (*M. edulis*, *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*) от двух остальных, а оставшиеся 5 полиморфны у *M. trossulus*. По задумке, по 15 «таксономическим» признакам мы сможем отличать «чистопородных» представителей трех видов и всевозможных гибридов ранних поколений даже в «трехвидовых» гибридных зонах, например, в Гасейде. Полиморфные признаки могут пригодиться для выявления СТС мидий, имеющего «видовой» генотип *M. trossulus*, у *M. trossulus*.

При апробации методики на базе Научного парка СПбГУ в качестве тестовой выборки использовались мидии с известными генотипами. По результатам типирования (рис. 2 Приложения) более 95% особей классифицировались в соответствии с ожидаемым. Таким образом, мы можем проводить SNP типирование мидий на своей базе.

3. Когда виды, например мидии, вступают в интрогрессивную гибридизацию, в контактных зонах можно ожидать встретить разных гибридов, не только первого поколения. Геномные данные по *Mytilus* (Fraïsse et al 2016, Simon et al 2019) свидетельствуют: для видов *Mytilus* нет «диагностических» - фиксированных по разным аллелям у разных видов, локусов. Потому что если виды вступают в интрогрессивную гибридизацию, то, со временем, контактирующие популяции «замусориваются» чужеродными аллелями, в том числе по «таксономическим» локусам. Тем не менее, ежегодно публикуется по десятку работ, где мидий из контактных зон классифицируют на «чистопородных» представителей видов и гибридов по одному-трем локусам, интерпретируя гомозиготы по конспецифичным аллелям как «чистопородных», остальных как гибридов. Можно предположить, что при таком подходе некоторых гибридов принимают за «чистопородных», и наоборот. Вопросы: какова погрешность «малолокусных» методов, как она влияет на

выводы, как откалибровать методы, чтобы учесть «полу-диагностичность» признаков. Для ответа на эти вопросы мы запланировали следующие процедуры: 1. Обобщить доступные данные по структуре выборок из гибридных зон между *M. edulis* и *M. trossulus* по самым часто используемым маркерам; 2. Используя эмпирические выборки, типированные по всем маркерам, и «reference-free» популяционно-генетические методы, оценить частоты аллелей в гибридизующих популяциях; 3. Используя симулированные выборки, имитирующие природные, формально оценить эффективность «малолокусных» методов. Работа начерно готова, однако остается одна проблема. Анализ показывает, что разные контактные зоны радикально различаются по степени гибридизации/смешения и локус-специфической интрогрессии (рис. 3 Приложения). Значит ли это, что мы должны провести трудоемкую процедуру 3 для всех зон, чтобы дать их исследователям практические рекомендации, или достаточно проиллюстрировать подход на примере избранной зоны?

4.1. Заявленной целью работы было выяснить, насколько выявленные ранее морфологические и экологические различия между симпатрическими мидиями *M. trossulus* и *M. edulis* в Белом море (Katolikova et al. 2016) проявляются в других районах сосуществования видов. Под экологическими различиями в первую очередь понимали приуроченность к разным субстратам (в Белом море *M. trossulus* чаще встречается на водорослях, а *M. edulis* на грунте). Под морфологическими различиями - наличие у большинства *M. trossulus* «язычка» призматического слоя под лигаментом (Т-морфотип) и его отсутствие у большинства *M. edulis* (Е-морфотип). Под «другими районами» в первую очередь понимали баренцевоморское побережье Кольского полуострова.

Мы провели морфологический анализ большого массива данных из Белого и Баренцева морей (50 выборок из разных мест и местообитаний, 2800 генотипированных особей), ограниченных коллекций из западной Атлантики, Шотландии, Балтики и западной Норвегии, и на этом материале отработали статистическую процедуру диагностики объектов (мидий двух видов) по бинарному полу-диагностическому маркеру (Т/Е морфотипы). При моделировании мы учитывали, что определение видов по таким маркерам является вероятностным и зависит от таксономического состава поселений. В опресненных местообитаниях Баренцева моря (соленость $\leq 25\text{‰}$), как и в опресненном Белом море, различия в частотах морфотипов составляют 65%, что позволяет А) надежно предсказывать таксономический состав поселений мидий, и Б) определять таксономическую принадлежность особей в смешанных поселениях с вероятностью до 75%. В полносоленых местообитаниях Баренцева моря различия в частотах морфотипов ниже, порядка 30%, что делает признак малоинформативным (рис. 4.1 и табл. 4.1 Приложения). Анализ коллекций из «заморских» гибридных зон показал, что перспективы использования признака для идентификации *M. edulis* и *M. trossulus* есть в Америке и Шотландии, но не в Балтике и Норвегии. Экологических различий мидий (приуроченности к разным субстратам) в Баренцевом море не обнаружено. Планируя в ближайшее время завершить работу, мы А) договорились о передаче нам для морфологического исследования и включения в работу богатого материала по западной Атлантике из исследования Kingston et al. 2017 (400 SNP-типированных мидий) и Б) решили перенести акценты в работе с частной задачи видоопределения мидий на методические вопросы диагностики таксонов по полудиagnostическим признакам, поскольку такие признаки широко используют ученые для различения гибридизующих видов, подвидов, многих «криптических» видов.

4.2. Дополнены и обобщены данные по современному распределению и исторической динамике *M. trossulus* и *M. edulis* в Кандалахском заливе Белого моря. Для картирования современного распределения обследовали 120 участков залива (рис. 4.2.1А). На каждом участке по стандартной методике отобрали пробы мидий, у которых определили морфотип (всего обработано 46660 моллюсков). На каждом участке, используя регрессионные модели, описанные в п. 4.1, оценили частоту *M. trossulus* и *M. edulis* и, с помощью двумерной аддитивной модели (GAM), аппроксимировали распределение на всю акваторию залива (рис. рис. 4.2.1В Приложения). Анализ показал, что «чистые» поселения *M. edulis* приурочены к северо-восточному побережью. Максимальная концентрация *M. trossulus* отмечена в самом куту залива, однако отдельные «пятна» этого вида встречены и в других частях акватории. Места концентрации *M. trossulus*, в целом, характеризуются пониженной соленостью, низкой прибойностью и наличием близ расположенных портов. Мы провели регрессионный анализ, в котором зависимой переменной была частота *M. trossulus*, а предикторами - соленость, расстояния до устья ближайшей реки и до ближайшего порта, и степень открытости акватории для волнового воздействия. Анализ выявил статистически значимую связь частоты *M. trossulus* с расстоянием до ближайшего порта и с расстоянием до устья ближайшей реки: по мере удаления от устьев рек или от акваторий портов доля *M. trossulus* сокращается.

Для изучения исторической динамики обработаны коллекции раковин 1970х-2010х гг. сбора. В целом, обилие *M. trossulus* в современных сборах выше, чем в коллекционных (рис. 4.2.2 Приложения). Лучше всего эту тенденцию иллюстрируют данные по четырем участкам плановых наблюдений в вершине залива. Результаты анализа современного распределения и исторической динамики мидий согласуются с гипотезой о недавнем вселении *M. trossulus* в Белое море морским транспортом (Vainola, Strelkov 2011). Вероятно, устья рек, как места свободные от конкурирующего нативного вида (*M. edulis*), служат «рефугиумами» для вида-вселенца.

5. Попытки отработать универсальную методику морфологического анализа «криптических» видов *Mytilus*

предпринимались неоднократно (Seed 1972, 1974, Золотарев, Шyrova 1991, McDonald et al 1991, Mallet, Carver 1995, Innes, Bates 1999, Kartavtsev et al. 2005, Katolikova et al. 2016). Анализ литературы позволил выявить 6 конхологических признаков, лучше всего различающих *M. edulis*, *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* из аллопатрических популяций: высота раковины, ширина раковины, длина переднего аддуктора, длина зубной пластинки, расстояние между передним концом заднего ретрактора и дорсальным краем раковины, индекс Z - степени развития «язычка» призматического слоя под лигаментом (рассчитывается как отношение расстояния от переднего края раковины до начала «язычка» призматического слоя под лигаментом к длине лигамента). Признаки были верифицированы на выборках мидий из аллопатрических популяций трех видов.

Отработка морфологического анализа мидий из районов симпатрии, где морфологические различия между видами могут скрадываться из-за гибридизации и единообразных условий обитания, проводилась на генотипированном материале из ЛохЭтив, Шотландия (N=120), и Гасейд, Норвегия (N=29). Шотландская выборка состояла из *M. edulis*, *M. trossulus* и их гибридов, а норвежская, в основном, из гибридов, в генотипах которых в разных пропорциях смешаны гены всех трех видов. Для ответа на вопрос, возможна ли морфологическая дискриминация генотипов в смешанных популяциях, был проведен следующий анализ. Морфологические параметры, а также длина раковины были измерены у всех особей в выборке; Значения параметров были стандартизованы путем логарифмирования и деления на логарифм длины раковины; Структура морфологических данных была проанализирована методом анализа главных компонент и дискриминантного анализа.

Согласно полученным результатам, использование комплекса из 6 признаков для мидий в симпатрии: (1) Позволяет правильно диагностировать видопринадлежность «чистопородных» мидий в 70% случаев; (2) Наиболее эффективно для дискриминации *M. galloprovincialis* – подобных мидий («чистопородных» и гибридов с аллелями *M. galloprovincialis*); Наибольший вклад в дискриминацию вносят признаки индекс Z, длина переднего аддуктора и высота раковины.

6. Для диагностики диссеминированной неоплазии у *Bivalvia* традиционно применяются два подхода, один основан на изучении непосредственно гемоцитов, другой – гистологических срезов, на которых можно найти раковые клетки. Мы применили оба подхода.

6.1. Для диагностики неоплазии у митилид, гемоциты разных видов (мидия Грэй *Crenomytilus grayanus*, модиолус *Modiolus nipponicus*, мидия *M. trossulus* из двух районов Японского моря, мидии *M. edulis* и *M. trossulus* из Белого и Баренцева морей) исследовались на проточном цитометре и на гистологических препаратах. Гемолимфа забиралась шприцом из заднего аддуктора. Цитометрическое измерение проведено на 405 nm лазере. В большинстве экспериментов оценено около 10,000 событий. Файлы, полученные в программном обеспечении CytExpert Software, обработаны с помощью Kaluza Software v.1.5a (Beckman-Coulter). Для изучения морфологии живых гемоцитов, каплю гемолимфы, нанесенную на поверхность пластиковой чашки, анализировали под инвертированным микроскопом CX41 (Olympus, 400×увеличение). Мазки гемоцитов также окрашивали гематоксилином-эозином и исследовали с помощью инвертированного микроскопа. Препараты избранных образцов окрашивали флюоресцентными красителями DAPI (красит ДНК) и фаллоидином (красит цитоскелет) для изучения с помощью конфокальной микроскопии.

У всех тестируемых мидий из Белого и Баренцева морей (N=110), мидий Грэй и модиолусов нарушений в морфологии и поведении гемоцитов не обнаружено. Среди дальневосточных *M. trossulus* обнаружено только несколько экземпляров (все - из загрязненного района под Находкой) с аномальными гемоцитами (рис. 9 Приложения). У этих мидий было несколько популяций гемоцитов с различной ploидностью, 6-40% гемоцитов имели повышенную ploидность и увеличенные плеоморфные ядра в 4-5 раз крупнее ядер нормальных гемоцитов, гемоциты имели необычный цитоскелет (конфокальная микроскопия), не распластывались ни на стекле, ни на пластике, и, в отличие от нормальных гемоцитов, легко откреплялись от поверхности покровных стекол при иммунохимических окрасках. Многие характеристики этих гемоцитов совпадают с таковыми болеющих заразным раком мидий из Британской Колумбии (González-Tizón et al 2000; Vassilenko, Baldwin 2013, 2014; Metzger et al 2016), за исключением полного отсутствия митотической активности в аномальных гемоцитах наших мидий. Возможно, это связано с тем, что нам встретились мидии только на поздних стадиях развития болезни. Показано, что на поздних стадиях уровень митотической активности раковых гемоцитов мидий значительно ниже, чем на начальных (Sunila, 1991). Для найденных нами больных мидий была проверена гипотеза CTC (п. 9).

Вышеизложенные результаты получены на базе Лаборатории клеточных технологий ннцмб дво ран. Разработанная во Владивостоке методика диагностики неоплазии *Mytilus* методом проточной цитофлюориметрии успешно апробирована на базе Научного парка СПбГУ. Дополнительно изучено 225 мидий из Баренцева (N=79), Норвежского (N=86), Черного (N=20) морей и вод Шотландии (N=40). Аномальных гемоцитов у изученных моллюсков не обнаружено.

6.2. Совместно с Антонио Виллальба (Центр Морских Исследований CIMA, Испания) опробованы гистологические методы выявления диссеминированной неоплазии на примере *Mytilus* spp. (N=56), *Mya arenaria* (N=60) и *Cerastoderma edule* (N=28) из Белого и Баренцева морей. Из фиксированных тканей жабр и гонад изготовлены постоянные препараты, окрашенные гематоксилином-эозином. Животных с симптомами диссеминированной неоплазии не найдено.

Однако у *Mya arenaria* обнаружено другое раковое заболевание – карцинома. Карцинома характеризуется повышенной пролиферацией жаберного эпителия. Это заболевание было ранее описано у *M. arenaria* с побережий Америки (Barry et al, 1971). На наших препаратах тканей *Mya*, страдающих карциномой, видны раковые клетки, содержащие крупные ацидофильные включения, не описанные ранее для этого заболевания и свидетельствующие о присутствии вирусной инфекции. Связь между вирусной инфекцией и карциномой требует дальнейшего исследования. Неожиданным, но перспективным результатом была находка гермафродитов у мидий из гибридной зоны между *M. edulis* и *M. trossulus*. Этот результат согласуется с недавно опубликованными данными о нарушениях механизмов определения пола у мидий при межвидовой гибридизации. Нарушения проявляются, в том числе, в гермафродитизме гибридов (Kenchington et al, 2019).

7. Получены референсные выборки атлантической сельди *Clupea harengus* из Атлантики и тихоокеанской сельди *C. pallasii* из Пацифики. Выборка атлантической сельди (50 экз.) выловлена в Норвежском море весной 2019 г и принадлежит к наиболее многочисленной популяции вида – атлантико-скандинавской весеннерестящейся сельди. Эта выборка получена от коллег из института морских исследований г. Бергена (Норвегия). Выборка тихоокеанской сельди (32 экз.) получена от рыбопромысловой компании Витязь-Авто, рыбы выловлены в летний период 2019 г в юго-восточной части Охотского моря.

Для предварительного анализа из каждой выборки было выбрано по 10 экземпляров. Сельди были изучены согласно ранее использованной методике (Lajus 2001). По результатам, было отобрано десять признаков для дальнейшего анализа (рис. 7). Для анализа использованы кости *Articulare*, *Dentale*, *Quadratum*, *Hyomandibulare*, *Parasphenoideum*. Результаты анализа показывают, что для ряда признаков (1,2,6,7 на рис.7 Приложения) различия между средними двух форм высоко достоверны ($p < 0,0001$). При этом интересно, что среднее для атлантической сельди выше для 9 признаков из 10. Ранее данные признаки не использовались для сравнения этих двух видов сельдей, хотя систематика сельдей исследована очень детально, и для этого привлекались многие морфологические признаки. Между видами имеются и заметные различия по уровню флуктуирующей асимметрии (ФА), эти различия статистически достоверны ($p < 0.05$) в двух случаях. При этом, ФА по 7 признакам из 10 выше у тихоокеанской сельди.

Таким образом, в результате работ 2019 г удалось показать, что референсные выборки родительских видов, в соответствие с нашими ожиданиями, заметно отличаются по средним значениям нескольких морфологических признаков и по уровню флуктуирующей асимметрии. Эти признаки, следовательно, являются перспективными для изучения фенотипического эффекта гибридизации, на средние значения признаков и на уровень стабильности развития.

8. В текущем году мы дополнительно секвенировали 49 транскриптомов *M. balthica* на секвенаторе Illumina HiSeq 4000 на базе Научного парка СПбГУ, в дополнении к 22 изученным ранее. Выборки, 2-6 особей каждая, охватывали почти весь ареал вида и представляли популяции из бассейнов Тихого, Северного Ледовитого и Атлантического океанов. Риды были выровнены на ранее опубликованный транскриптом вида (Yurchenko et al 2018). Был проведен поиск полиморфных генетических вариантов и первичный анализ популяционной структуры. После тщательной фильтрации мы выявили 7542 полиморфных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), которые могут использоваться для популяционно-генетических исследований. Дополнительно, благодаря высокой экспрессии митохондриальных генов, мы восстановили около 70% длины митохондриального генома и идентифицировали однонуклеотидные замены в этих участках. Построенное по митохондриальным геномам филогенетическое дерево (Рис. 8 А) демонстрирует наличие двух глубоких эволюционных линий, представляющих тихоокеанскую *M. balthica balthica* (все макомы из Тихого океана, западной Атлантики, часть маком из Балтийского, Баренцева и Белого морей) и атлантическую *M. b. rubra* (все макомы из западноевропейских популяций, часть маком из Балтийского, Баренцева и Белого морей). При этом наблюдается филогеографическая структура внутри каждой из двух глобальных гаплогрупп. Внутри тихоокеанской линии выделяется загадочный субкластер, объединяющий гаплотипы из Магадана и из Квебека в западной Атлантике, а внутри атлантической линии - субкластер гаплотипов из западной Европы. Кластеризация особей по аутосомным локусам в программе ADMIXTURE (Рис. 8 Б) в первую очередь выявляет тихоокеанский и атлантический (под)виды (анализы с числом кластеров K от 2 до 4 на рисунке), а также широкие зоны интрогрессии между ними в Баренцевом, Белом и Балтийском морях. Уровень генетического «смешения», или интрогрессии, варьируется от 35% тихоокеанских аллелей у маком в Каттегате до 95% в Хельсинки (Финский залив). В Европе, «чистыми» от тихоокеанских аллелей оказались выборки из Луары, Шельды, норвежского Тромсе и Мезенского залива Белого моря. Таким образом, мы наблюдаем не классическую гибридную зону – узкую, с четкими границами, а минимум две (Балтика, с одной стороны, Баренцево и Белое моря, с другой) широкие зоны с уникальными чертами в каждой из них. Эти зоны структурированы. Генотипы из некоторых популяций внутри зон группируются в четкие кластеры как по результатам ADMIXTURE ($K=9$), так и по результатам анализа главных компонент (Рис. 8 В,Г), который разделяет особей, прежде всего, по степени вклада тихоокеанских и атлантических генов в генотипы.

Проведя анализ ограниченных данных, мы, во-первых, убедились в эффективности секвенирования транскриптомов

для анализа популяционной структуры, как дешевой альтернативы геномному секвенированию (геном *M. balthica* еще не собран и не аннотирован). Во-вторых, на геномном уровне подтвердили старые аллозимные данные (Strelkov et al. 2008) о сущности популяций маком северных морей Европы и России как протяженного, сложно структурированного «гибридного роя».

9. Проверка гипотезы СТС для мидий Японского моря. Известно два генетических подхода, позволяющих диагностировать СТС. Первый основан на поиске «химеризма» (т.е. повышенной гетерозиготности/ гетероплазмии). Поскольку СТС имеет свой (как правило, полиплоидный) генотип, в пораженных тканях генотипирование выявляет более двух аллелей по ядерным маркерам и более одного митохондриального гаплотипа; в тканях с высокой и низкой степенью поражения доминируют генотипы рака и хозяина, соответственно. Второй подход основан на идентификации уникальных аллелей, маркирующих клональные линии СТС. На сегодняшний день описаны две линии СТС *Mytilus*, BTN1 (Metzger et al 2016) и BTN2 (Yonemitsu et al 2019), каждая из которых маркирована своей парой уникальных аллелей локуса EFalpha.

Из гемоцитов и других тканей (мантия, нога) больных диссеминированной неоплазией и контрольных здоровых мидий из Японского моря была выделена ДНК, проведены амплификация и секвенирование ПЦР-продуктов двух фрагментов: митохондриального гена цитохромоксидазы I (COI) и интрона ядерного гена EFalpha. На рис. 9, для примера, представлены хроматограммы COI из гемоцитов и из мантии двух здоровых особей (J17 и J38) и одной больной (J54). На сиквенсах из гемоцитов J54 сигнал детектируется от двух разных молекул COI, а из мантии только от одной. В тканях здоровых мидий гетероплазмии не обнаружено. Хроматограммы, полученные при секвенировании EFalpha из разных тканей показали наличие у части здоровых и у всех больных особей смеси из молекул, отличающихся по размеру на 2-10 нуклеотидов. По результатам клонирования ПЦР-продуктов EFalpha у каждой из четырех мидий, болеющих диссеминированной неоплазией, выявлено 3-4 аллели, из них 2 характерные для раковой линии BTN2 (Yonemitsu et al 2019). Другие аллели больных мидий и у здоровых особей (1-2 аллели на генотип), очевидно, представляют собой полиморфизм самих мидий.

Все планируемые на год работы выполнены полностью:

да

1.4. Сведения о достигнутых конкретных научных результатах в отчетном году

(до 5 стр.)

1. Проведены наблюдения за гибридной зоной между *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова. Дополнены и обобщены, в части временной динамики, данные за 15 лет исследований зоны в региональном (Кольский залив) и локальном (губа Тюва) масштабах. Показано, что за период наблюдений, повсеместно сократилась доля *M. trossulus*, на 30-40%. Динамика отчасти, обусловлена естественным отбором, действующим на бентосную стадию жизненного цикла мидий, о чем свидетельствует снижение доли генов *M. trossulus* в одних и тех же генерациях во времени.

2. В совместных с французскими коллегами работах изучена, методами популяционной геномики, интрогрессия на примере мидий. В одной работе проведено сравнение генофондов популяций гибридирующих видов на разном удалении от гибридных зон. В другой работе изучены генофонды интродуцированных «портовых» популяций средиземноморской мидии *M. galloprovincialis*, которые существуют в окружении *M. edulis*, и гибридируют с ней. В независимых природных экспериментах по гибридизации между одними и теми же видами паттерны интрогрессии, в первую очередь, связаны не с экологическими условиями, а с тем, какие эволюционные линии видов гибридируют. Если одни и те же, то паттерны будут сходными. Если разные, то паттерны будут разными. В гибридных зонах, за редким исключением, разные локусы интрогрессируют сходным образом. Гетерогенность интрогрессии становится очевидной по мере удаления от гибридных зон. Гетероспецифичные аллели по некоторым локусам глубоко проникают вглубь ареалов. Для объяснения таких «комет интрогрессии» обычно привлекают гипотезу адаптивной интрогрессии. Теория гибридных зон, однако, предлагает и другие объяснения.

Методика SNP-типирования мидий, примененная в исследованиях международного коллектива, успешно апробирована на базе Научного парка СПбГУ. Мы можем проводить SNP типирование мидий на своей базе.

3. В исследованиях мидий из гибридных зон, особей обычно классифицируют на «чистопородных» представителей видов и гибридов по одному-трем стандартным «диагностическим» локусам, интерпретируя гомозиготы по конспецифичным аллелям как «чистопородных», остальных как гибридов. Этот подход предполагает, что гибридизация

не идет дальше первого поколения, а интрогрессией по «диагностическим» локусам можно пренебречь. Мы обобщили доступные данные по структуре выборок из гибридных зон между *M. edulis* и *M. trossulus* по самым часто используемым маркерам и, используя выборки, типированные по всем маркерам и «reference-free» популяционно-генетические методы, предсказали частоты аллелей в гибридизующих популяциях. Анализ показал, что разные гибридные зоны радикально различаются по степени гибридизации/ смешения и локус-специфической интрогрессии. Универсальных «малолокусных» методов быть не может, потому что «диагностических» локусов нет. Для некоторых гибридных зон «малолокусные» методы не применимы, из-за беккроссинга.

4.1. Мы провели анализ большого массива данных из Белого и Баренцева морей, а также ограниченных коллекций из западной Атлантики, Шотландии, Балтики и западной Норвегии, и на этом материале отработали статистическую процедуру диагностики объектов (гибридизующих мидий двух видов, *M. edulis* и *M. trossulus*) по бинарному полу-диагностическому маркеру (Т или Е морфотипы раковины). При моделировании мы учитывали, что определение видов по таким маркерам является вероятностным и зависит от таксономического состава поселений. В опресненных местообитаниях Баренцева моря, как и в опресненном Белом море, различия в частотах морфотипов между видами составляют 65%, что позволяет надежно предсказывать таксономический состав поселений мидий, и определять таксономическую принадлежность особей в смешанных поселениях с вероятностью до 75%. В полносолёных местообитаниях Баренцева моря различия в частотах морфотипов ниже, что делает признак малоинформативным. Анализ коллекций из «заморских» популяций показал, что перспективы использования признака для идентификации *M. edulis* и *M. trossulus* есть в Америке и Шотландии, но не в Балтике и Норвегии.

4.2. Дополнены и обобщены данные по современному распределению и исторической динамике *M. trossulus* и *M. edulis* в Кандакшском заливе Белого моря. Максимальная концентрация инвазивного вида *M. trossulus* отмечена в куту залива, однако отдельные «пятна» этого вида встречаются и в других частях акватории. Мы провели регрессионный анализ, в котором зависимой переменной была частота *M. trossulus* на участках побережья, а предикторами - солёность, расстояния до устья ближайшей реки и до ближайшего порта, и степень открытости акватории для волнового воздействия. Анализ выявил статистически значимую связь частоты *M. trossulus* с расстоянием до ближайшего порта и с расстоянием до устья ближайшей реки: по мере удаления от устьев рек или от акваторий портов доля *M. trossulus* сокращается. Для изучения исторической динамики обработаны коллекции раковин 1970х-2010х гг. сбора. В целом, обилие *M. trossulus* в современных сборах выше, чем в коллекционных. Результаты анализа современного распределения и исторической динамики мидий согласуются с гипотезой о недавнем вселении *M. trossulus* в Белое море морским транспортом. Вероятно, устья рек, как места свободные от конкурирующего нативного вида (т.е. *M. edulis*), служат «рефугиумами» для вида-вселенца.

5. Анализ литературы позволил выявить 6 конхологических признаков, лучше всего различающих *M. edulis*, *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* из аллопатрических популяций. Отработана методика морфологического анализа мидий из районов симпатрии, где морфологические различия между видами скрадываются из-за гибридизации и единообразных условий обитания. Показано, что использование комплекса из 6 признаков позволяет правильно диагностировать видопринадлежность мидий, в среднем, в 70% случаев и наиболее эффективно для дискриминации *M. galloprovincialis*-подобных мидий («чистопородных» и гибридов с аллелями *M. galloprovincialis*).

6.1. Гистологические методы выявления диссеминированной неоплазии отработаны на примере *Mytilus* spp., *Mya arenaria* и *Cerastoderma edule* из Белого и Баренцева морей. Животных с симптомами диссеминированной неоплазии не найдено. Однако у *Mya arenaria* обнаружено другое раковое заболевание – карцинома, характеризующееся повышенной пролиферацией жаберного эпителия.

6.2. Цитлфлюориметрические методы выявления диссеминированной неоплазии отработаны на примере мидий Грея, модиолусов и мидий. Среди дальневосточных *M. trossulus* обнаружено несколько экземпляров с аномальными гемоцитами. У этих мидий было несколько популяций гемоцитов с различной ploidy, гемоциты повышенной ploidy имели увеличенные ядра и необычный цитоскелет, не распластывались на стекле и на пластике, и, в отличие от нормальных гемоцитов, легко откреплялись от поверхности покровных стекол при иммунохимических окрасках. Характеристики этих гемоцитов совпадают с таковыми болеющих заразным раком (СТС) мидий из Британской Колумбии.

7. Морфологический анализ выборок атлантической сельди *Clupea harengus* из Атлантики и тихоокеанской сельди *C. pallasii* из Пацифики показал, что эти виды отличаются по средним значениям ряда признаков, а также по уровню

флуктуирующей асимметрии. Отобраны признаки для исследования фенотипического эффекта гибридизации на средние значения признаков и на уровень стабильности развития.

8. Секвенировали 49 транскриптомов *Macoma balthica*, в дополнении к 22 изученным ранее. Выборки охватывали почти весь ареал вида. Риды были выровнены на ранее опубликованный транскриптом вида. Провели поиск полиморфных генетических вариантов и первичный анализ популяционной структуры. Всего, выявили 7542 полиморфных однонуклеотидных полиморфизмов, которые могут использоваться для популяционно-генетических исследований. Дополнительно, восстановили около 70% длины митохондриального генома. Анализ ядерных и митохондриальных данных выявляет тихоокеанский и атлантический (под)виды, и широкие зоны интрогрессии между ними в Баренцевом, Белом и Балтийском морях. Уровень генетического смешения, или интрогрессии, варьируется от 35% до 95% в разных популяциях. Таким образом, у маком мы наблюдаем не классическую гибридную зону (узкую, с четкими границами), а минимум две (Балтика, с одной стороны, Баренцево и Белое моря, с другой) широкие зоны с уникальными чертами в каждой из них. Эти зоны структурированы. Генотипы из некоторых популяций внутри зон группируются в четкие кластеры. Полученные данные хорошо согласуются с выводами старых аллозимных исследованиях о сущности популяций маком северных морей Европы и России как протяженного, сложно структурированного «гибридного роя».

9. По результатам секвенирования митохондриального локуса у каждой из дальневосточных мидий, болеющих диссеминированной неоплазией, найдена гетероплазмия в пораженных раком тканях. По результатам клонирования ПЦР-продуктов локуса EFalpha у этих мидий выявлено 3-4 аллели (против 1-2 ожидаемых в диплоидном генотипе), из них 2 характерные для раковой линии BTN2 (Yonemitsu et al 2019).

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. Проведены наблюдения за гибридной зоной между *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова. Дополнены и обобщены, в части временной динамики, данные за 15 лет исследований зоны в региональном и локальном масштабах. Показано, что за период наблюдений повсеместно сократилась доля *M. trossulus*, на 30-40%. Динамика, отчасти, обусловлена естественным отбором, действующим на бентосную стадию жизненного цикла мидий, о чем свидетельствует снижение доли генов *M. trossulus* в одних и тех же генерациях во времени.

2. В совместных с французскими коллегами работах изучена, методами популяционной геномики, интрогрессия на примере мидий. В независимых природных экспериментах по гибридизации между одними и теми же видами паттерны интрогрессии, в первую очередь, связаны не с экологическими условиями, а с тем, какие эволюционные линии видов гибридизуют. Если одни и те же линии, то паттерны будут сходными. Если разные линии, то паттерны будут разными. В гибридных зонах, за редким исключением, разные локусы интрогрессируют сходным образом. Гетерогенность интрогрессии становится очевидной по мере удаления от гибридных зон. Гетероспецифичные аллели по некоторым локусам глубоко проникают вглубь ареалов. Для объяснения таких «комет интрогрессии» обычно привлекают гипотезу адаптивной интрогрессии. Теория гибридных зон, однако, предлагает и другие объяснения. Методика SNP-типирования мидий, примененная в этих исследованиях, успешно апробирована на базе Научного парка СПбГУ. Мы можем проводить SNP типирование мидий на своей базе.

3. В исследованиях мидий из гибридных зон, особей обычно классифицируют на «чистопородных» представителей видов и гибридов по одному-трем «диагностическим» локусам, интерпретируя гомозиготы по конспецифичным аллелям как «чистопородных», остальных как гибридов. Этот подход предполагает, что гибридизация не идет дальше первого поколения, а интрогрессией по «диагностическим» локусам можно пренебречь. Мы обобщили доступные данные по структуре выборок из гибридных зон между *M. edulis* и *M. trossulus* по самым часто используемым маркерам. Используя выборки, типированные по всем маркерам и «reference-free» популяционно-генетические методы, мы предсказали частоты аллелей в гибридизующих популяциях. Оказалось, что разные гибридные зоны радикально различаются по степени гибридизации/ смешения и локус-специфической интрогрессии. Универсальных «малолокусных» методов быть не может, потому что «диагностических» маркеров нет. Для некоторых гибридных зон «малолокусные» методы не применимы, из-за беккроссинга.

4.1 Мы провели анализ большого массива данных из Белого и Баренцева морей и на этом материале отработали статистическую процедуру диагностики объектов (гибридизующих мидий двух видов, *M. edulis* и *M. trossulus*) по

бинарному полу-диагностическому конхологическому маркеру. При моделировании мы учитывали, что определение видов по таким маркерам является вероятностным и зависит от таксономического состава поселений. Методические приемы работы с полудиagnostическими признаками будут востребованы, поскольку такие признаки широко используют ученые для различения гибридирующих видов, подвидов, многих «криптических» видов.

4.2. Дополнены и обобщены данные по современному распределению и исторической динамике *M. trossulus* и *M. edulis* в Кандалакшском заливе Белого моря. Отдельные «пятна» инвазивного вида *M. trossulus* встречены в разных частях акватории. Есть статистически значимая связь частоты *M. trossulus* с расстоянием до ближайшего порта и с расстоянием до устья ближайшей реки: по мере удаления от устьев рек или от акваторий портов доля *M. trossulus* сокращается. Для изучения исторической динамики обработаны коллекции раковин 1970х-2010х гг. сбора. Обилие *M. trossulus* в современных сборах выше, чем в коллекционных. Результаты исследования согласуются с гипотезой о недавнем вселении *M. trossulus* в Белое море морским транспортом. Вероятно, устья рек, как места свободные от конкурирующего нативного вида (т.е. *M. edulis*), служат «рефугиумами» для вида-вселенца.

5. Отработана методика морфологического анализа мидий разных видов из районов симпатрии, где морфологические различия между видами скрадываются из-за гибридизации и единообразных условий обитания. Показано, что использование комплекса из 6 стандартных признаков наиболее эффективно для дискриминации *M. galloprovincialis*–подобных мидий («чистопородных» и гибридов с аллелями *M. galloprovincialis*).

6. Отработаны гистологические и цитфлюориметрические методы выявления диссеминированной неоплазии у *Bivalvia*.

Среди дальневосточных *M. trossulus* обнаружено несколько экземпляров с аномальными гемоцитами (гемоциты имеют повышенную плоидность, увеличенные ядра и необычный цитоскелет, не расплаываются на стекле и на пластике, легко открепляются от покровных стекол при иммунохимических окрасках). Характеристики этих гемоцитов совпадают с таковыми болеющих заразным раком (СТС) мидий из Британской Колумбии. У *Mya arenaria* из Белого и Баренцева морей обнаружено другое раковое заболевание – карцинома, характеризующееся повышенной пролиферацией жаберного эпителия.

7. Морфологический анализ выборок атлантической сельди *Clupea harengus* из Атлантики и тихоокеанской сельди *C. pallasii* из Пацифики показал различия между видами по средним значениям ряда признаков, а также по уровню флуктуирующей асимметрии. Отобраны признаки для исследования фенотипического эффекта гибридизации на средние значения признаков и на уровень стабильности развития.

8. Секвенировали 49 транскриптомов *Musca balthica*, в дополнении к 22 изученным ранее. Выборки охватывали почти весь ареал вида. Риды были выровнены на ранее опубликованный транскриптом вида. Провели поиск полиморфных генетических вариантов и первичный анализ популяционной структуры. Всего, выявили 7542 полиморфных однонуклеотидных полиморфизмов, которые могут использоваться для популяционно-генетических исследований. Дополнительно, восстановили около 70% длины митохондриального генома. Анализ ядерных и митохондриальных данных выявляет тихоокеанский и атлантический (под)виды, и широкие зоны интрогрессии между ними в Баренцевом, Белом и Балтийском морях. Уровень генетического смешения, или интрогрессии, варьируется от 35% до 95% в разных популяциях. Таким образом, у маком мы наблюдаем не классическую гибридную зону (узкую, с четкими границами), а минимум две (Балтика, с одной стороны, Баренцево и Белое моря, с другой) широкие зоны с уникальными чертами в каждой из них. Эти зоны структурированы. Генотипы из некоторых популяций внутри зон группируются в четкие кластеры.

Полученные данные хорошо согласуются с выводами старых аллозимных исследованиях о сущности популяций маком северных морей Европы и России как протяженного, сложно структурированного «гибридного роя».

9. По результатам секвенирования митохондриального локуса у каждой из дальневосточных мидий, болеющих диссеминированной неоплазией, найдена гетероплазмия в пораженных раком тканях. По результатам клонирования ПЦР-продуктов локуса *EFA* у этих мидий выявлено 3-4 аллели (против 1-2 ожидаемых в диплоидном генотипе), из них 2 характерные для раковой линии BTN2.

на английском языке

1. Observations of the hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. trossulus* in the waters of the Kola Peninsula were conducted. The data obtained during 15 years of studies of this zone at the regional and the local scale were supplemented and generalized in respect of temporal dynamics. The proportion of *M. trossulus* has decreased everywhere, by 30-40% during the study period. This dynamics is partly due to natural selection, which acts upon the benthic stage of the mussel life cycle, as evidenced by a decreasing proportion of *M. trossulus* genes in the same generations with time.

2. In collaboration with the French colleagues, introgression in mussels was studied with the help of population genomics tools. Independent natural experiments on hybridization between the same species showed that introgression patterns were primarily associated with the evolutionary lineages of the hybridizing species rather than with the environmental conditions.

If the lineages are the same, the patterns will be similar. If the lineages are different, the patterns will be different, too. With rare exceptions, different loci introgress in hybrid zones in a similar manner. The heterogeneity of the introgression becomes evident with the increasing distance from the hybrid zones. Heterospecific alleles by some loci penetrate deep into the distribution areas. Such “introgression comets” are usually explained with the help of the adaptive introgression hypothesis. However, the theory of hybrid zones may come up with several other explanations.

The technique of SNP typing of mussels used in these studies was successfully tested in the Research Park of the St Petersburg State University. Now we can perform SNP typing of mussels ourselves.

Mussels from hybrid zones are usually classified into “purebreds” and hybrids by 1-3 “diagnostic” loci, with the individuals homozygous by conspecific alleles considered as “purebreds” and the rest as hybrids. This approach assumes that hybridization does not proceed further than the first generation and that introgression by “diagnostic” loci can be disregarded. We generalized the available data on the structure of samples from hybrid zones between *M. edulis* и *M. trossulus* by the most common markers. Using the samples typed by all the markers and “reference-free” populational genetics methods, we forecasted the frequencies of alleles in hybridizing populations. Different hybrid zones turned out to be dramatically different in the degree of hybridization/mixing and locus-specific introgression. There can be no universal methods based only on a few loci because there are no “diagnostic” markers. For some hybrid zones the methods based on a few loci are inapplicable because of backcrossing.

We analysed a large bulk of data on the White and the Barents Sea and, using this material, perfected the statistical procedure of diagnosing the objects (hybridizing mussels of two species, *M. edulis* and *M. trossulus*) based on a binary semi-diagnostic conchological marker. When modelling, we took into account that species identification based on these markers is probabilistic and depends on the taxonomic composition of the settlements. Techniques involving semi-diagnostic characters are likely to be in much demand since such characters are broadly used for delimitation of hybridizing species, subspecies and numerous “cryptic” species.

The data on modern distribution and historical dynamics of *M. trossulus* and *M. edulis* in the Kandalaksha Bay of the White Sea were supplemented and generalized. Separate “spots” of the invasive species *M. trossulus* were found in different parts of this water area. There is a statistically significant connection between the frequency of *M. trossulus* and the distance to the nearest port as well as the distance to the mouth of the nearest river: the proportion of *M. trossulus* decreased with the increasing distance from the rivers mouths or ports. For the study of historical dynamics, the shell collections made in 1970s-2010s were processed. The abundance of *M. trossulus* in modern samples is higher than in the collections. The results of this study agree with the hypothesis that *M. trossulus* has invaded the White Sea recently, with maritime transport. River mouths, being free of the competing native species (i.e. *M. edulis*), seems to serve as “refugia” for the invader.

We worked out a technique of morphological analysis of different mussel species from sympatric areas, where morphological differences between species become less noticeable because of hybridization and uniform environmental conditions. The use of a complex of 6 standard characters was shown to be the most effective for the discrimination of *M. galloprovincialis*-like mussels (“purebred” as well as hybrids containing *M. galloprovincialis* alleles).

Histological and cytofluorimetric techniques of revealing disseminated neoplasia in *Bivalvia* were worked out.

Several individuals of *M. trossulus* from the Far East were found to have anomalous hemocytes. These hemocytes have an increased ploidy, enlarged nuclei and an unusual cytoskeleton; they do not sprawl on glass or plastic and easily detach from cover slips during immunochemical staining. These characteristics coincide with those of hemocytes of mussels with transmissible cancer (CTC) from British Columbia. Another cancer, a carcinoma characterised by an enhanced proliferation of gill epithelium, was found in *Mya arenaria* from the White and the Barents Sea.

Morphological analysis of samples of Atlantic herring *Clupea harengus* from the Atlantic and the Pacific herring *C. pallasii* from the Pacific demonstrated that these species were different in the average values of several characters and in the level of fluctuating asymmetry. Characters for the study of phenotypic effect of hybridization on the average values of characters and the level of developmental stability were selected.

We sequenced 49 transcriptomes of *Macoma balthica*, in addition to 22 transcriptomes studied earlier. The collections span almost the entire distribution of this species. The reads were aligned to an earlier published transcriptome of *Macoma balthica*. Altogether, we revealed 7542 polymorphic single-nucleotide polymorphisms, which can be used for population-genetics studies. Additionally, we reconstructed ca. 70% of the mitochondrial genome length. The analysis of nuclear and mitochondrial data revealed the Pacific and the Atlantic (sub)species, and broad introgression zones between them in the Barents, the White and the Baltic Sea. The level of genetic mixing, or introgression, varies from 35% to 95% in different populations. Thus, we observed that species of baltic clams form not the classical hybrid zone but at least two broad zones (the Baltic on the one hand and the Barents and the White Sea on the other hand), with unique features within each. These zones are structured. Genotypes from some populations within the zones group into distinct clusters. The obtained data agree well with the conclusions of earlier, allozyme studies that *macoma* populations in the northern European and Russian seas are essentially an extended “hybrid swarm” with a complex structure.

Mitochondrial locus sequencing showed that each of the Far East mussels with disseminated neoplasia had heteroplasmy in the cancer-affected tissues. Based on the results in cloning PCR-products of EFalpha locus, these mussels were found to have 3-4 alleles (as compared with 1-2 alleles expected in a diploid genotype), 2 of them being characteristic for cancer lineage BTN2.

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 зарегистрированных участниками проекта публикаций)

1. Симон А., Арбиол К., Нильсен Э.Е., Кусто Д., Фраиссе К., Суссарелу Р., Буржо Т., Бернар И., Колен Д.В.П., Лами Д-Б., Роберт С., Сказина М., Стрелков П., Кейрога Х., Кансио И., Велч Д.Д., Виард Ф., Биерне Н. (Simon A., Arbiol K., Nielsen E.E., Couteau J., Sussarellu R., Burgeot T., Bernard I., Coolen J.W.P., Lamy J-B., Robert S., Skazina M., Strelkov P., Queiroga H., Cancio I., Welch J.J., Viard F., Bierne N.) **Replicated anthropogenic hybridisations reveal parallel patterns of admixture in marine mussels** Evolutionary applications (2019 г.)

2. Симон А., Фраиссе К., Эль-Айяри Т., Лиотар-Гаага, Стрелков П., Велч Д.Д., Биерне Н. (Simon A., Fraïsse C., El Ayari T., Liautard-Haag C., Strelkov P., Welch J.J., Bierne N.) **Local introgression at two spatial scales in mosaic hybrid zones of mussels** bioRxiv (2019 г.)

1.8. В 2019 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	2019 год	
		план	факт
Число членов научного коллектива	человек	10	10
Число исследователей в возрасте до 39 лет (включительно) среди членов научного коллектива	человек	5	5
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 год	
		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.	0	2
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 определяется по базе данных http://www.scimagojr.com/)	Ед.		1
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.		0

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)

Мы участвовали с устными докладами в трех форумах: Third International Symposium AMMR 2019. Advances in Marine Mussel Research в Падье, Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics в Владивостоке и Russia-China Bilateral Workshop «Marine Biodiversity for a Healthy Ocean – Biodiversity, Functional Groups & Ocean Health» в Владивостоке

Устный доклад Католиковой М. Katolikova M., Strelkov P. A farewell to allozymes: reanalysis of the classical dataset on blue mussels (McDonald, Seed, Koehn 1991) In: Ballarin, L; Rosani, U; Venier, P. Third International Symposium AMMR 2019. Advances in Marine Mussel Research, August, 26–28, 2019, Palazzo Grassi, Chioggia, Italy. Invertebrate Survival Journal, [S.L.], p. 193, nov. 2019. ISSN 1824-307X. doi: <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v0i0.189-208>.

Устный доклад Хайтова В. Khaitov V., Katolikova M., Zaichikova A., Safonov P., Korotkova T., Martchenko Y., Strelkov P. Analyses of distribution and long-term dynamics of sympatric mussels *Mytilus edulis* and *M. trossulus* in the White Sea using the semi-diagnostic conchological marker // In: Ballarin, L; Rosani, U; Venier, P. Third International Symposium AMMR 2019. Advances in Marine Mussel Research, August, 26–28, 2019, Palazzo Grassi, Chioggia, Italy. Invertebrate Survival Journal, [S.L.], p. 194, nov. 2019. ISSN 1824-307X. doi: <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v0i0.189-208>.

Устный доклад Стрелкова П. Strelkov P., Skazina M., Katolikova M., Gagarina A., Ivanova A., Vainola R. Variable patterns of hybridization and locus-specific introgression in hybrid zones of *Mytilus edulis* and *M. trossulus* assessed by the traditional set of markers// In: Ballarin, L; Rosani, U; Venier, P. Third International Symposium AMMR 2019. Advances in Marine Mussel Research, August, 26–28, 2019, Palazzo Grassi, Chioggia, Italy. Invertebrate Survival Journal, [S.L.], p. 192, nov. 2019. ISSN 1824-307X. doi: <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v0i0.189-208>.

Устный доклад Марченко Ю. Marchenko Ju.T., Khaitov V.M., Katolikova M.V., Strelkov P.P. *Mytilus edulis* and *M.trossulus* identification using conchological characters in oceanic and estuarine habitats, the Kola peninsula (White and Barents Seas) // Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium, Vladivostok, Vostok Marine Biological Station, September 8–13, 2019: Program & Abstracts. Vladivostok, 2019. p.39.

Устный доклад Майоровой М. Maiorova M.A., Ivanova A.V., Skazina M.A., Strelkov P.P., Odintsova N.A. A search of mollusks from some Russian seas (Sea of Japan, White Sea and Barents Sea) with abnormal hemocytes // Russia-China Bilateral Workshop «Marine Biodiversity for a Healthy Ocean – Biodiversity, Functional Groups & Ocean Health» (October 10–11, 2019, Vladivostok, Russia). P. 33.

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:

Нет

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

Нет

Основные исполнители проекта в 2019 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.

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

Настоящим подтверждаю:

- самостоятельность и авторство текста отчета о выполнении проекта;
- что при обнародовании результатов, полученных в рамках реализации поддержанного РНФ проекта, научный коллектив ссылался на получение финансовой поддержки проекта от РНФ и на организацию, на базе которой выполнялось исследование;
- что согласен с опубликованием РНФ сведений из отчета о выполнении проекта, в том числе в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»;
- что проект не имеет других источников финансирования;
- что 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 2019 году

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

(заполняется отдельно на каждую публикацию, для формирования п.1.7. отчета)

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: Симон А., Арбои К., Нильсен Э.Е., Кусто Д., Фраиссе К., Суссарелу Р., Бурго Т., Бернар И., Колен Д.В.П., Лами Д.-Б., Роберт С., Сказина М., Стрелков П., Кейрога Х., Кансио И., Велч Д.Д., Виард Ф., Биерне Н.

на английском языке: Simon A., Arbiol K., Nielsen E.E., Couteau J., Sussarellu R., Burgeot T., Bernard I., Coolen J.W.P., Lamy J-B., Robert S., Skazina M., Strelkov P., Queiroga H., Cancio I., Welch J.J., Viard F., Bierne N.

WoS Researcher ID (при наличии): J-8690-2013

Scopus AuthorID (при наличии): ---

2.2. Название публикации

Replicated anthropogenic hybridisations reveal parallel patterns of admixture in marine mussels

2.3. Год публикации

2019

2.4. Ключевые слова

admixture, benthic-pelagic species, biological introductions, clines, ports, secondary contact

2.5. Вид публикации

статья

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

Evolutionary applications

ISSN (при наличии): ---

e-ISSN (при наличии): 1752-4571

ISBN (при наличии): ---

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

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

Месяц и год публикации: 11.2019

Адрес полнотекстовой электронной версии публикации (URL) в открытом источнике (при наличии):

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.12879>

2.8. DOI (при наличии)

<https://doi.org/10.1111/eva.12879>

Accession Number WoS (при наличии): ---

Scopus EID (при наличии): ---

2.9. Принята к публикации (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 о 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).

5.038

2.12. Издание индексируется базой данных Scopus

да

2.13. Издание индексируется базой данных РИНЦ

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 гранта данного Фонда):

Указано, что работа Сказиной поддержана РНФ. Работа заключалась 1) в генотипировании коллекций *Mytilus* из Северной Европы с целью выявления референсной выборки инвазивной линии средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* для дальнейшего геномного исследования, 2) в работе над популяционно-генетическими данными исследования и рукописью публикации. Работа иностранных соавторов поддерживалась иностранными фондами.

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)

скачать

2.1. Авторы публикации

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

на русском языке: Симон А., Фраиссе К., Эль-Айяри Т., Лиотар-Гаага, Стрелков П., Велч Д.Д., Биерне Н.

на английском языке: Simon A., Fraïsse C., El Ayari T., Liautard-Haag C., Strelkov P., Welch J.J., Bierne N.

WoS Researcher ID (при наличии): D-1606-2013

Scopus AuthorID (при наличии): 6701567237

2.2. Название публикации

2.3. Год публикации

2019

2.4. Ключевые слова

Hybrid zones, local introgression, genomic clines, secondary contact, Mytilus

2.5. Вид публикации

иное

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

bioRxiv

ISSN (при наличии): ---

e-ISSN (при наличии): ---

ISBN (при наличии): ---

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

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

Месяц и год публикации: 10.2019

Адрес полнотекстовой электронной версии публикации (URL) в открытом источнике (при наличии):

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/818559v1>

2.8. DOI (при наличии)

<http://dx.doi.org/10.1101/818559>

Accession Number WoS (при наличии): ---

Scopus EID (при наличии): ---

2.9. Принята к публикации (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 о принятии рукописи к публикации: ---

2.10. Издание индексируется базой данных Web of Science Core Collection

нет

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).

2.12. Издание индексируется базой данных Scopus

нет

2.13. Издание индексируется базой данных РИНЦ

нет

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 гранта данного Фонда):

РНФ указан как источник поддержки Стрелкова. Его работа заключалась в выборе коллекционных референсных выборок *Mytilus edulis* и *M. trossulus* из Северной Европы для геномного исследования, участии в обработке популяционно-генетических данных и работе с текстом публикации. Расходы по генотипированию и биоинформационному анализу данных, и работа французских и английского соавторов поддержана европейскими фондами и программами.

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)

скачать

Подпись руководителя проекта _____/П.П. Стрелков/

План работы на 2020 год и ожидаемые результаты по проекту
№ 19-74-20024

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

3.1. План работы на 2020 год

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

В заявке проекта были заявлены 4 направления. Мы формулируем планы на 2020 г., отталкиваясь от исходных планов проекта и от промежуточных результатов 2019 г.

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. Работа над массивами данных - материалами исследований, посвященных методам идентификации гибридизующих мидий *M. edulis* и *M. trossulus* и их гибридов с помощью морфологического маркера и «малолокусных» генетических методов, а также по распределению и исторической динамике видов в Белом море. Продолжение мониторинговых наблюдений за гибридной зоной между *M. edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова. Анализ данных по пространственной динамике зоны с использованием теоретических моделей гибридных зон и мощи регрессионного анализа.

1.2. Изучение абиотических и биотических факторов, влияющих на соотношение обилий *M. edulis* и *M. trossulus* в беломорских поселениях. Будут исследоваться экофизиологические показатели (рост, сила прикрепления биссуса, скорость фильтрации, гонадо-соматический индекс и т.п.) у мидий двух видов, обитающих в градиенте абиотических условий (от опресненных акваторий до местообитаний с нормальной соленостью) и в градиенте биотического окружения (от поселений, где доминируют конспецифики, до поселений, где доминирует другой вид).

1.3. Отработка микросателлитного типирования сельди и SNP типирования мидий. Материалом микросателлитного исследования будут коллекционные сборы интрогрессированных («гибридных») сельдей норвежских фиордов вместе с референсными выборками европейских *Clupea pallasii* и *C. harengus*. Основным объектом SNP исследования мидий *Mytilus* spp. будет выборка Гасейд. Эти задачи комплементарны задачам 3.1 и 3.3.

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. Имея географические референсы - по несколько штук транскриптомов из 18 разных популяций, мы планируем перейти к целенаправленному изучению двух независимых гибридных зон между *M. balthica balthica* и *M. b. rubra* в Балтийском и в Баренцевом морях, увеличив объем материала из каждой зоны минимум до 40 штук. Материал будет скомпонован таким образом, чтобы иметь возможность описать пространственную структуру 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. Продолжение исследования морфологической изменчивости сельдей с использованием отработанной в 2019 методики. Во-первых, планируется расширить выборки референсных форм (атлантической *Clupea harengus* и тихоокеанской *C. pallasii*), до 30 экземпляров каждая. Во-вторых, изучить выборку «гибридных» сельдей из Балсфьорда, а также беломорских сельдей и чешско-печорских сельдей. На этом материале будет оценен эффект интрогрессии в Балсфьорде на средние значения и уровень флуктуирующей асимметрии избранных морфологических признаков.

3.2. Провести лов сельди во время нереста в Кандалакшском заливе Белого моря, чтобы собрать выборки егорьевской и

ивановской сельдей (расы *C. pallasii*). У пойманной сельди будет производиться анализ гонад и подсчет позвонков для того, чтобы выявить *Clupea harengus* и потенциальных гибридов между *C. harengus* и *C. pallasii* (у них ожидается большее число позвонков, чем у типичных беломорских сельдей). Видопринадлежность и гибридный статус особей будут верифицированы генетически (методы см. 1.4).

3.3. Планируется: увеличить объем генотипированной выборки мидий из Гасейд в части количества особей и количества признаков в анализе (см. п. 1.4); Провести морфологический анализ раковин мидий из Гасейд, используя отработанную методику («классический» набор признаков, используемых для различения *M. edulis*, *M. trossulus* *M. galloprovincialis*) и методы геометрической морфометрии; На этом материале оценить вклад в фенотипическую изменчивость «трехвидовой» популяции «таксономического сродства» (*taxonomic affinity* – вклада генов разных видов в генотипы) особей.

Направление 4. В поисках СТС. Во-первых, мы ищем СТС в российских популяциях *Bivalvia*, в первую очередь *Mytilus*, *Mya*, *Cerastoderma* и *Macoma*, используя цитологические, гистологические и генетические подходы. Во-вторых, мы проверяем гипотезу о связи нарушений двоякого одnorodительского наследования мтДНК с СТС. В третьих, получив достаточных 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. Планируются эксперименты по культивированию больных (раковых) и здоровых гемоцитов мидий и по «заражению» культуры здоровых гемоцитов больными гемоцитами. Будут получены гемоциты от контрольных мидий *M. trossulus* с экспериментальных коллекторов на МБС Восток и введены в культуру с предварительным анализом на проточном цитометре. После культивирования в течение 1 суток будет произведена смена среды, а потом разморожена криовials с гемоцитами больной лейкемией мидии (J54), в 2-3 лунки добавлены больные гемоциты, в такое же количество лунок добавлены контрольные гемоциты. Все добавленные гемоциты будут тестированы на цитометре. Примерно через 7-10 дней культивирования гемоциты будут собраны и изучены на проточном цитометре. В случае «заражения» мы ожидаем появления в популяции здоровых гемоцитов, культивированных вместе с больными, пиков высокой ploидности. Такие эксперименты ранее не проводились, единственное исключение – работы по заражению герпес-подобным вирусом в культуре гемоцитов крабов (*Odintsova et al.*, 2015; *Ryazanova et al.*, 2015). Это поисковая работа, потому что как будут себя вести в культуре гемоциты моллюсков – неизвестно.

4.2. Планируется отработка генетических методик массовой диагностики СТС. Для этого, в первую очередь, будут использоваться специфичные qPCR праймеры к аллелям EFalpha раковой линии BTN2 (методика, предложенная *Yonemitsu et al* 2019). Материалом послужат образцы ДНК из разных тканей коллекционных мидий (коллекции будут пополнены, см. 4.3), а в качестве положительного контроля будут использованы образцы из Японского моря, где нами обнаружен СТС линии BTN2.

4.3. Будут продолжены поиски СТС *Bivalvia* в морях России и мира, география поиска будет расширена. Основным объектом будут мидии, дополнительными мии *Mya arenaria* и церастодермы *Cerastoderma edule*. Учитывая низкий уровень фонового заражения (например, СТС отмечен у 5 из 938 изученных *M. edulis* из западной Европы в работе *Yonemitsu et al* 2019), мы продолжим поиск и в Белом и Баренцевом морях, пускай в ограниченном материале из этих морей СТС мы, пока, не нашли. Мы будем искать новые зараженные популяции в Дальневосточных морях, где мы уже нашли СТС. Наконец, в рамках совместных работ с иностранными учеными (см. командировки), мы попробуем добыть референсы СТС из южной Европы (СТС *C. edule*) и Британской Колумбии (BTN1 *Mytilus*). Гемолимфа и ткани моллюсков будут зафиксированы для молекулярно-генетических, цитофлюорометрических, гистологических и иммуногистохимических исследований, а также для геномного исследования (п. 4.5.).

4.4. Обобщить собственные и литературные данные о нарушениях двоякого одnorodительского наследования (DUI) митохондрий у *Mytilus* (проявляется в т.ч. в гетероплазмии самок, гомоплазмии самцов, повышенной гетероплазмии, рекомбинации мужских и женских молекул в области контрольного региона). Проверить, на примере СТС из Японского моря, гипотезу о наличии у СТС BTN2 рекомбинантных митохондрий (*Yonemitsu et al* 2019), сравнив контрольные регионы митохондрий СТС с таковыми у гомоплазмичных самцов. Провести тестирование мидий с аномальными генотипами из наших коллекций на наличие BTN2 (методы как в п. 4.2 и (или) молекулярное клонирование EFalpha). Обсудить гипотезы о связи между нарушениями DUI с межвидовой гибридизацией и с инфекцией СТС.

4.5. Найдя моллюсков с СТС, выделить ДНК и РНК из гемолимфы и контрольных тканей для дальнейшего исследования геномов и транскриптомов СТС. Если позволит время, начать генотипирование.

Командировки.

Запланировано участие Сказиной М.А. в конференции «ICMBO 2020: International Conference on Marine Biology and Oceanography», Ванкувер, Канада, 23-24.09 с докладом по теме проекта. Поездку на конференцию предполагается

совместить со сбором мидий в популяциях, пораженных СТС (BTN1), чтобы их использовать в качестве положительного контроля в дальнейших исследованиях. Есть предварительная договоренность с Василенко (K. Vassilenko), одной из первооткрывательниц СТС у канадских мидий (Vassilenko, Baldwin 2013, 2014) о консультировании Сказиной, помощи в сборе материала, и дальнейшем сотрудничестве. Двухнедельная командировка обойдется в 200000 рублей.

Запланирована поездка Сказиной М.А. в Университет Виго для консультаций с Антонио Виллальба о программе развивающегося научного сотрудничества (см. п. 6.2. раздела 1.3 Сведения о фактическом выполнении плана работы на год) и для сбора референсной выборки Cerastoderma из популяции, страдающей СТС, для использования в качестве положительного контроля в исследованиях сердцевидок российских морей. 40000 рублей.

Запланировано участие Марченко Ю.Т. и Католиковой М.В. в симпозиуме EMBS: 55 European Marine Biology Symposium, Гдыня, Польша, с докладами по теме проекта. Поездку на конференцию предполагается совместить с переговорами с польскими коллегами о возможности добычи живых моллюсков из сублиторальных популяций Гданьского залива. 100000 рублей.

Запланированы экспедиционные работы на Белом и Баренцевом морях всех 8 участников – сотрудников СПбГУ для сбора сельдей и моллюсков, согласно планам полевых исследований. 100000 рублей.

3.2. Ожидаемые в конце 2020 года конкретные научные результаты

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

1.1. Дополнены и обобщены данные по динамике гибридной зоной между *M. edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова. Проведен анализ данных по пространственной динамике зоны с использованием теоретических моделей гибридных зон и методов регрессионного анализа.

1.2. Изучены экофизиологические показатели у *M. edulis* и *M. trossulus*, обитающих в градиенте абиотических условий (от опресненных акваторий до местообитаний с нормальной соленостью) и в градиенте биотического окружения. На этом материале выявлены физиологические параметры, позволяющие оценивать performance – “степень благополучия” мидий разных видов в смешанных поселениях, и роль абиотических факторов и внутри- и межвидовой конкуренции в формировании смешанных поселений *M. edulis* и *M. trossulus*.

1.3. На примере коллекционных сборов сельдей норвежских фиордов и референсных выборок европейских *Clupea pallasii* и *C. harengus* отработаны методы микросателлитного генотипирования, на примере мидий *Mytilus* spp. из Гасейд отработаны методы SNP типирования. Представлены предварительные данные о генотипической структуре выборок сельдей норвежских фиордов и мидий Гасейда.

2.1. Секвенированы транскриптомы *M. balthica* из гибридных зон в Балтийском и в Баренцевом морях. Получены предварительные данные о геномной архитектуре зон и об их пространственной структуре.

3.1. Изучена морфологическая изменчивость сельдей Балсфьорда, беломорской и чешско-печорских сельдей в сравнении с референсными выборками атлантической сельди *Clupea harengus* из Атлантики и тихоокеанской сельди *C. pallasii* из Пацифики. На этом материале оценен эффект интрогрессии в гибридных популяциях.

3.2. Добыты новые выборки нерестующей сельди Кандалакшского залива Белого моря. У рыб проведен анализ гонад и подсчитаны позвонки. По числу позвонков проведен поиск *Clupea harengus* и потенциальных гибридов между *C. harengus* и *C. pallasii*. Выводы морфологической работы проверены мультилокусным генотипированием.

3.3. На примере выборки мидий из Гасейд, сформированной *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* и их гибридами, оценен вклад в фенотипическую изменчивость популяции «таксономического сродства» особей.

4.1. Проведены эксперименты по культивированию раковых и здоровых гемоцитов мидий, и по «заражению» культуры здоровых гемоцитов больными гемоцитами. Проверена гипотеза об индукции анеуплоидии у здоровых гемоцитов больными в культуре.

4.2. Освоена методика диагностики инфекционного рака (Yonemitsu et al 2019) с помощью qPCR праймеров к аллелям EFalpha. Оценена надежность методики.

4.3. Диагностика СТС проведена для новых выборок мидий, мий и церастодерм из Белого и Баренцева морей, а также мидий из Дальневосточных морей России. Получены новые данные о распространении СТС, собраны коллекции для дальнейших исследований.

4.4. Обобщены собственные и литературные данные о нарушениях двоякого однородительского наследования (DUI) митохондрий у *Mytilus*. Проанализированы контрольные регионы митохондрий BTN2 из Японского моря. Мидии с аномальными генотипами из наших коллекций проверены на наличие BTN2. На этом материале проверить гипотезу о связи между нарушениями DUI и СТС.

4.5. У моллюсков с СТС выделены ДНК и РНК из гемолимфы и контрольных тканей для дальнейшего исследования

геномов и транскриптомов СТС.

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 2020 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 во внебюджетные фонды, без лиц категории «вспомогательный персонал»),	2459
	в том числе:	
	вознаграждение членов научного коллектива – исследователей в возрасте до 39 лет (включительно) Имеет информационный характер.	1422
	Вознаграждение лиц категории «вспомогательный персонал» (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды)	390
	Оплата отпусков и выплаты компенсаций за неиспользованные отпуска лицам, являвшимся членами научного коллектива или лицами категории «вспомогательный персонал» в предыдущем отчетном периоде и не принимавшим участие в реализации проекта в данном отчетном периоде (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды)	0
1	Итого вознаграждение (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды)	2849
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 ² работы) ² Не связанные с осуществлением текущей деятельности организации.	140
4	Расходы на приобретение материалов и комплектующих для проведения научного исследования	650
5	Иные расходы для целей выполнения проекта	561
6	Оплата работ (услуг), выполняемых (оказываемых) владельцем ОИ в целях реализации Проекта 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

- Итого вознаграждение (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды)
(указывается общая сумма вознаграждения, включая установленные трудовым законодательством Российской Федерации гарантии, отчисления по страховым взносам на обязательное пенсионное страхование, на обязательное медицинское страхование, на обязательное социальное страхование на случай временной нетрудоспособности и в связи с материнством, на обязательное социальное страхование от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний)
Иванова Ангелина Витальевна, 187488 руб
Майорова Мария Андреевна, 187488 руб
Католикова Марина Викторовна, 312480 руб
Головин Павел Валерьевич, 187488 руб
Марченко Юлия Тиграновна, 312480 руб

Сказина Мария Александровна, 546840 руб
Стрелков Петр Петрович, 187488 руб
Одинцова Нелия Адольфовна, 187488 руб
Лайус Дмитрий Людвигович, 187488 руб
Хайтов Вадим Михайлович, 162750 руб
Вспомогательный персонал, 390600 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) не предусмотрена
- 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. Оборудование для экспедиционных работ, 140 000 руб.
Динамометр, 40 000 руб (для определения силы прикрепления мидий к субстрату)
Микроскоп, 100 000 руб
 2. Реактивы и расходные материалы для генотипирования KASP с помощью ПЦР в реальном времени, 100 000 руб
 3. Реактивы для выделения тотальной и плазмидной ДНК, 77 000 руб
Набор для выделения ДНК (250 образцов), 70 000 руб,
Набор для выделения плазмидной ДНК, 2 уп, 7 000 руб
 4. Реактивы для ПЦР, ПЦР в режиме реального времени и рестрикционного анализа, 220 000 руб
Олигонуклеотиды, 150 000 руб,
Эндонуклеазы рестрикции, 20 000 руб,
50X SYBR Green I для ПЦР-PB, 8 000 руб
SNPdetect полимеразы, 42 000 руб
 5. Материалы для выделения РНК и синтеза кДНК, 94250 руб
Набор для синтеза кДНК Mint-2, Евроген, SK005, 35 550 руб,
Набор Encyclo Plus PCR kit, Евроген, PK101, 11 700 руб,
Рестриктаза SfiI, NEB, R0123S, 7 000 руб,
Ингибитор рибонуклеаз Ribolock, TS, 8 000 руб,
RNAlater, 32 000 руб
 6. Реактивы для аллозимного анализа, 50 000 руб
 7. Общелабораторные расходные материалы, 107 750 руб
- 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)
 1. Командировочные расходы, 440 000 руб
 2. Услуги по опубликованию статьей с открытым доступом, 120 720 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