


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 2020 г.: 6000 тыс. руб.	Год начала проекта: 2019	Год окончания проекта: 2022
	Объем финансирования, запрашиваемый на 2021 год: 6000 тыс. руб. <i>Не может превышать объем средств, указанный на соответствующий год в соглашении между Российским научным фондом, руководителем проекта, организацией и владельцем крупного объекта научной инфраструктуры (между Российским научным фондом, руководителем проекта, организацией-владельцем крупного объекта научной инфраструктуры о предоставлении гранта на проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований) о предоставлении гранта на проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований, дополнительных соглашениях к данному соглашению (далее – соглашение).</i> (для продолжающихся проектов)	
Перечень приложений к отчету	1. Копии публикаций* в соответствии с Формой 2о - 4 шт. на 0 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*** <i>** Подписи должны быть расшифрованы.</i> <i>*** 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.</i>		Дата подачи отчета: 11.12.2020 г.

<div data-bbox="159 112 766 145" data-label="Text"><p>_____/_____/_____</p></div> <div data-bbox="766 174 1177 212" data-label="Text"><p>Печать (при наличии) организации</p></div>	
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Отчет о выполнении проекта
№ 19-74-20024

«Морские виды, объекты промысла и марикультуры, в условиях гибридизации и
клональных раковых инфекций»,
в 2020 году

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

Формируется в соответствии с заявкой на участие в конкурсе.

В заявке проекта были заявлены 4 направления. Мы формулируем планы на 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 однородительского 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 криовиала 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 плоидности. 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, цитофлуорометрических, гистологических и иммуногистохимических исследований, а также для геномного исследования (п. 4.5.).

4.4. Обобщить собственные и литературные данные о нарушениях двоякого однородительского 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.

1.2. Заявленные научные результаты на конец отчетного периода

Формируется в соответствии с заявкой на участие в конкурсе.

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 у

связи между нарушениями DUI и CTC.

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

1.3. Сведения о фактическом выполнении годового плана работы

(фактически проделанная работа, до 10 стр.)

Мы работали по всем заявленным направлениям, и получили удовлетворительные результаты. На итоги повлияли следующие обстоятельства. Не было возможности провести запланированные полевые работы в мае-июне, в частности - лов сельди на нерестилищах. Полевые работы были проведены в июле-сентябре. К сожалению, в это время наши объекты были в посленерестовом состоянии. Это лишило нас возможности надежно различать расы беломорской сельди и надежно определять пол моллюсков, соответственно, судить о нарушениях у них двоякого однородительского наследования митохондрий. Имела место рассинхронизация работы коллектива из-за невозможности оперативно перевозить материалы между Владивостоком и Петербургом. Отменились поездки на научные мероприятия, которые должны были быть совмещены с переговорами с иностранными коллегами, обменом с ними коллекциями, и сбором материала. В частности, мы не смогли добыть мидий с тихоокеанского побережья Канады, болеющих линией CTC BTN1. Вместо недоступных Канадских мидий мы добыли мидий из Охотского моря, и, паче чаяния, нашли у них рак. Вышли обзор о лейкемии у двустворчатых моллюсков (Odintsova, 2020) и статьи с иностранными коллегами о вторичных контактах у амфибореальных таксонов (Laakkonen et al. 2020), о геногеографии мидий видового комплекса *Mytilus edulis* и паттернах интрогрессии (Simon et al. 2020) и гибридизации (Wenne et al. 2020) между видами. Мы также подготовили, сугубо от нашего коллектива, рукописи статей об открытии CTC у мидий из Японского моря и о теоретических подходах к определению видопринадлежности особей у криптических и гибридизующих видов в симпатрии. Этими статьями мы надеемся отчитаться в следующем году. В файле приложения к отчету находятся иллюстрации и таблицы, упоминаемые в тексте отчета. В конце приложения - скриншот кабинета В.М. Хайтова на сайте журнала с поданной еще в сентябре статьей и рукопись второй статьи.

1.1. Дополнены и обобщены данные по динамике гибридной зоной между *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в водах Кольского полуострова.

1.1.1. Мы провели очередной этап мониторинга зоны в Кольском заливе. В начале наших исследований (2000е гг.), аборигенный вид *M. edulis* доминировал в вершине залива, с одной стороны, и в предустьевых районах залива, с другой. В центральных районах доминировал инвазивный *M. trossulus*. За, без малого, 20 лет наблюдений, доля *M. trossulus* в популяциях сокращалась (рис. 1.1.1 А). Мы генотипировали новые сборы 2019 года из устья залива. Как и раньше, там доминировал *M. edulis* (рис. 1.1.1 А). В июле-августе 2020 г. мы провели масштабную «съёмку» мидий центральной и кутовой частей залива. Целью исследования было подробное картирование поселений района, где меняется доминирующий вид. Всего, было изучено 5000 мидий с 20 точек побережья. Такой объем материала удалось обработать благодаря тому, что таксономическая структура определялась не генотипированием, как раньше, а морфологическим анализом раковин моллюсков (метод, разработанный в рамках проекта). Распределение частот видов в поселениях вдоль береговой линии было аппроксимировано моделью сигмоидной (S-образной) клины в NLREG 6.5., по формуле $X = 1 / (1 + \exp [-4 (d - c) / w])$, где X – доля *M. trossulus*, d – расстояние от устья р. Тулома в самой вершине залива, c – центр клины (точка, где родительские виды соотносятся как 1:1), w – ширина клины (протяженность градиента). Регрессия хорошо описала эмпирические данные. Клина локализована в пределах акватории г. Мурманск, ее ширина - 8 км (рис. 1.1.1 Б и левое фото). Единообразный анализ данных разных периодов наблюдений дал следующие результаты: (1) при разной форме клины в 2000 г. (узкая, крутая клина) и 2006-2010 гг. (широкая, пологая) ее центр не изменился; (2) за самые последние годы, доля *M. trossulus* в заливе возросла и достигла величин, близких к таковым в начале периода наблюдений (рис. 1.1.1. В). Мы предполагаем, что центр клины стабилизирован за счет гидрологических причин (соленость, течения). В качестве вероятного фактора долгосрочной динамики таксономического состава мы рассматриваем антропогенный. После 20 лет «застоя», хозяйственная деятельность в заливе интенсифицировалась (рис. 1.1.1., правое фото). Это предопределило «триумфальное возвращение» *M. trossulus* - инвазивного оппортунистического вида, тяготеющего к нарушенным местообитаниям (Katolikova et al. 2016).

1.1.2. Проведена работа с коллекциями мидий из гидробиологических обследований губы Тюва в устье Кольского залива 2004-2018 гг. На примере массива данных 2009-10 гг. мы задались целью реконструировать таксономическую структуру поселений (*M. edulis*, *M. trossulus*) методом морфологического анализа раковин, разработанного в рамках

проекта. Используя шесть генотипированных выборок из Тювы, определили частоты морфотипов среди особей с доминированием генов *M. edulis* и *M. trossulus* в поселениях с разной таксономической структурой. Определили частоты морфотипов в 43 не-генотипированных выборках и восстановили их таксономическую структуру. Эти данные сопоставили с демографическими характеристиками поселений и с характеристиками их местообитаний. В качестве метода ординации и оценки значимости связей использовали канонический корреспондентный анализ (ССА). Результаты приведены на рис. 1.1.2.1. и рис. 1.1.2.2. Видно, что виды распределены неслучайно в географическом, экологическом пространствах и в пространстве демографических характеристик поселений.

1.2. К сожалению, по объективным причинам, запланированные полевые исследования конкурентных отношений между *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в симпатрии удалось реализовать лишь частично, причем не в полевых, как планировалось, а в аквариальных условиях. Работа проведена на базе аквариального комплекса Обсерватории экологической безопасности СПбГУ, в морских (33 ppt) термостатических (+10°C) аквариумах. В эксперименте, продолжавшемся два месяца, изучили величину прироста раковин (интегративный показатель благополучия вида, «performance») беломорских *M. edulis* и *M. trossulus* в экспериментальных плотных поселениях с доминированием разных видов. В поселениях с абсолютным доминированием *M. trossulus*, *M. edulis* росли статистически значимо хуже, чем в поселениях, где доминировали конспецифики. В тех же экспериментах, значимых различий роста *M. trossulus* не показано (рис. 1.2. и табл. 1.2.). Угнетение *M. edulis* в плотных поселениях с доминированием *M. trossulus* может объяснять успех последнего вида в ходе его экспансии, наблюдаемой в Белом море.

1.3. Оработаны методы микросателлитного типирования сельди и SNP типирования мидий.

1.3.1. На примере коллекционных сборов сельдей из норвежских фиордов Россфиорд, Балсфиорд (согласно гипотезе, реликтовые формы *Clupea pallasii* интрогрессированные генами *C. harengus*), Трондхеймфиорд (локальная раса норвежской весенненерестующей *C. harengus*) и беломорской *C. pallasii* из Кандалакшского залива отработаны методы микросателлитного генотипирования по 10 локусам. По пяти локусам получены популяционные данные. Рис. 1.3.1 позволяет судить о сходстве/различиях между выборками по этим признакам. Есть изменчивость в группировке выборок по разным локусам, что отчасти может быть связано с небольшим объемом материала и высоким полиморфизмом. Комплексный анализ выявляет различия между референсной выборкой *C. harengus* и тремя другими выборками, что согласуется с гипотезой о видопринадлежности сельдей Россфиорда и Балсфиорда.

1.3.2. На примере выборки мидий из популяции Гасейд, где, согласно предварительным данным, намешаны гены сразу трех видов (*M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*, Simon et al. 2019, см. публикации проекта) отработаны методы SNP-типирования моллюсков методом KASP. Выборка включала контрольных особей, независимо генотипированных авторами метода во Франции. Всего, отработывалось 15 биаллельных маркеров, из которых 5 отличают *M. edulis*, 5 - *M. trossulus* и 5 - *M. galloprovincialis*. Генотипирование было успешным в 99% экспериментов. Разночтения в результатах, полученных в разных лабораториях, были 5%, что соответствует заявленной погрешности KASP. Рис. 1.3.2 позволяет судить о структуре выборки Гасейд, которую мы интерпретируем как результат гибридизации и смещения трех линий мидий - *M. edulis*, *M. trossulus* и особой «гибридогенной» линии *M. galloprovincialis*, характеризующейся повышенной частотой интрогрессированных генов *M. edulis*.

2.1. Секвенированы транскрипты *Macoma petalum* («аутгруппа» для изучения комплекса *M. balthica*, недавно переименованного в *Limecola balthica*) и *L. cf. balthica* из Владивостока, Баренцева и Балтийского морей. Вместе с изученными ранее транскриптами, объем выборки, пригодной для популяционно-генетического анализа, составил 117 особей. Рис. 2.1.1 и рис. 2.1.2 позволяют судить о паттернах гибридизации между тихоокеанским - инвазивным видом *L. balthica* и аборигенным атлантическим *L. rubra* в трех районах Атлантики, где обнаружен *L. balthica* (гены этого вида) и его гибридизация с *L. rubra*. Это Балтийское море, ЮВ Баренцева моря (в нашем материале – Мурман) и Белое море. Если сравнивать изменчивость по вкладу «тихоокеанских» и «атлантических» генов в генотипы (положение точек относительно PC1 на графиках ординации на рис. 2.1.1, либо отношение секторов на диаграмме Structure при $k=2$ на рис. 2.1.2) внутри и между выборок из разных пространственных выделов, то выявляются следующие тенденции. В Балтике, по мере продвижения от Датских проливов к северной части моря снижается вклад «атлантических» генов (с 60 % до 30% по Structure) и митохондрий в выборках, и снижается межиндивидуальная изменчивость внутри выборок. Сходная тенденция выявляется на Мурмане, при сравнении выборок с западного (средний вклад по Structure 75%) и восточного (65%) районов побережья (без учета популяции морского изолята оз. Могильного, где низка доля «атлантических» генов, 46%, и фиксированы «тихоокеанские» митохондрии). В популяциях разных заливов Белого моря частоты «атлантических» генов варьируются от 5% до 95% при минимальной межиндивидуальной изменчивости.

Сверх этого выявляются различия между популяциями трех морей, напрямую не сводимые к соотношению «атлантических» и «тихоокеанских» генов в генотипах. Особенно оригинальны мурманские популяции. Другой важный результат – гетероплазмиды по митохондриям *L. balthica* и *L. rubra* в выборках из Гданьского залива и некоторых мурманских популяций.

3.1. Для изучения остеологической изменчивости двух видов сельди, атлантической (*Clupea harengus*) и тихоокеанской (*C. pallasii*), и их «гибридных» - интрогрессированных популяций в Европе, был проведен анализ 9 выборок общим объемом 293 особей, включая выборки исходных видов – атлантической (Норвежское море) и тихоокеанской (Охотское море) и выборки из норвежских фьордов Россфьорд и Балсфьорд и из Белого моря (рис. 3.1.1., табл. 3.1). Между выборками были рассчитаны генетические дистанции, пропорциональные вкладу тихоокеанских генов в их генофонды, по собственным и литературным данным (табл. 3.1). Для анализа использовали 10 остеологических меристических признаков, представляющих собой число пор на семи костях черепа (*articulare*, *dentale*, *hyomandibulare*, *maxillare*, *mesethmoideum*, *parasphenoideum*, и *praeoperculum*) (рис. 3.1.2.). Изучены две характеристики морфологической изменчивости: средние значения признаков и флуктуирующая асимметрия (ФА). ФА – ненаправленные отклонения от полной симметрии, являющиеся показателем стабильности развития. Средние значения меристических признаков обнаруживают связь с генетическими дистанциями. Это проявляется в том, что атлантическая сельдь занимает наиболее обособленное положение по отношению к остальным выборкам, а "гибридная" форма из Россфьорда занимает промежуточное положение между атлантической сельдью и остальными (рис. 3.1.3.). Среди остальных, генетически более сходных друг с другом форм, связи между морфологическими и генетическими дистанциями не обнаружено. Видимо, в данном случае вариация средних значений морфологических признаков является, в первую очередь, результатом локальных адаптаций. Показано, что изученные признаки образуют несколько групп, отличающихся паттернами морфологической изменчивости. Атлантическая сельдь отличается от остальных большим числом пор на *hyomandibulare* и *maxillare* (рис. 3.1.4.). Выделены признаки, характерные для беломорских сельдей, по которым они отличаются от всех других популяций – в частности, большим числом пор на наружных внутренних поверхностях *articulare* и *dentale*, и на *parasphenoideum*. Атлантическая сельдь, напротив, имеет наименьшее число пор на этих костях. Число пор на *parasphenoideum* показывает наиболее высокую корреляцию с генетическими характеристиками выборок (рис. 3.1.5.). При анализе флуктуирующей асимметрии мы не отметили повышенного уровня ФА у рыб из «гибридных популяций» по сравнению с родительскими формами, которого можно было бы ожидать в случае нарушения генетической коадаптации у гибридов (рис. 3.1.6.). При этом, одна из гибридных популяций (Балсфьорд) показывала достоверное более высокую ФА, чем две выборки беломорской сельди. Среди беломорских сельдей также наблюдается гетерогенность по уровню ФА (рис. 3.1.6.).

3.2. В связи с пандемией не удалось собрать планируемого материала по сельдям с нерестилищ в Белом море весной с одновременным анализом числа позвонков и взятием генетических проб. 54 особи были добыты и проанализированы в летний период. Из них, 6 имели от 56 до 58 позвонков и, соответственно, относятся к многопозвонковой сельди, а остальные – 55 (максимальное для беломорской сельди, 10 штук) и менее позвонков и формально являются малопозвонковой (беломорской) сельдью. У всех особей взяты пробы для генетического анализа, который к моменту отчета не завершен.

3.3. На примере полиморфной выборки мидий из Гасейд, где намешаны гены сразу трех видов (*M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*), оценен вклад в фенотипическую изменчивость популяции «таксономического сродства» особей. Для анализа вариации морфологических характеристик гибридирующих мидий разработана методика описания формы раковин методом геометрической морфометрии. Помимо выборки из Гасейд, в анализ включены референсы «чистопородных» *M. edulis* (Ed_ref) и *M. trossulus* (Tr_ref) из Норвегии и *M. galloprovincialis* из Циндао (Ga_ref1), Порту (Ga_ref2) и Виги (Ga_ref3). Мидии из Гасейд классифицированы на 6 категорий по вкладу генов разных видов, как на рис. 1.3.2. Всего, обработано 89 изображений внутренних поверхностей левых створок раковин. Для описания формы раковины и отпечатков мускулов выбраны 14 опорных точек (рис. 3.3.1.). После прокрустового преобразования систем точек, проведен анализ главных компонент (рис. 3.3.3. А). Мидии из референсных выборок неплохо разделяются в морфопространстве первых двух главных компонент. Первая компонента отражает градиент формы раковины от мидий с более выпуклым брюшным краем (вершина приподнята к дорзальной поверхности) к «клювовидной» форме, у которой брюшной край слегка вогнутый, а вершина прижата к вентральной поверхности. Вторая компонента (рис. 3.3.3. В) отражает вариации в форме и положении отпечатков мускулов. Форма раковин в референсных выборках из Европы различается достаточно хорошо (рис. 3.3.3 С). Все Tr_ref находятся в пределах первого квартиля PC1 (имеют более выпуклый брюшной край). Большинство Ga_ref2 и Ga_ref3 попадают в четвертый квартиль PC1 (имеют более выраженную «клювовидную» форму). Форма раковины Ed_ref занимает промежуточное положение. Изменчивость

раковины мидий из Гасейд велика и соизмерима с изменчивостью во всем материале. Форма раковины разных генотипов оказалась близка к консенсусной (рис. 3.3.3. D). Иными словами, различий между генотипами по форме раковин в Гасейде не выявлено. Дополнительно, на примере 16 случайно отобранных мидий из Гасейд, мы рассмотрели комплекс из 7 “классических” морфометрических характеристик раковин (McDonald et al., 1991), описывающих размеры разных структур. Размеры признаков были логарифмированы и отнесены к логарифму длины раковины. Для поиска признаков и их комбинаций, лучше всего различающих генотипы, использовали процедуру BioEnv (Clarke & Ainsworth, 1993). Признаки относительного размера замковой площадки и длины лигамента имеют значимую корреляцию с вероятностью присутствия в генотипе аллелей *M. galloprovincialis* и лучше всего дискриминируют этот вид (рис. 3.3.2.).

4.1. Проведены эксперименты по культивированию раковых и здоровых гемоцитов мидий, и по «заражению» культуры здоровых гемоцитов больными гемоцитами. Использованы гемоциты одной больной лейкемией (№ 54) и одной здоровой (№ 19) мидий 2019 года сбора (г.с.) и четырех здоровых мидий 2020 г.с. В 2020 мидий собрали перед началом эксперимента. Гемоциты мидий 2019 г.с. были заморожены в 7.5% диметилсульфоксиде (ДМСО) трехступенчатым способом (Odintsova et al. 2017) и 10 месяцев хранились в дьюаре с жидким азотом. Для получения культуры, пробы гемолимфы 2020 г.с. разбавили стерильным раствором искусственной морской воды без кальция и магния с добавлением стерильного раствора 0.3 М ЭДТА (рН 7.8) и гентамицина (50 мг/мл, Россия). Суспензию центрифугировали трижды, в 15 мл-пробирках 10 мин при 600 g на центрифуге Allegra-200 (США), промывая осадок искусственной морской водой с гентамицином. После этого осадок ресуспендировали в стерильной морской воде, содержащей гентамицин и 2% эмбриональную бычью сыворотку (Gibco, США). Полученные суспензии (0.45 мл; концентрация 0.67 млн клеток в миллилитре) поместили в лунки планшета для культивирования. Через сутки среду полностью сменили. Извлеченные из азота гемоциты мидий № 54 (113 тыс клеток на мл) и № 19 (44 тыс клеток на мл) разморозили и промыли, а затем добавили к культуре по 100 мкл в две разные лунки, в остальные лунки добавили стерильную морскую воду. Также, размороженные гемоциты помещали в отдельные лунки, чтобы оценить, как они перенесли заморозку: часть гемоцитов больной мидии распласталась на пластике, а часть агрегировала, - поведение, ожидаемое для гемоцитов раковых мидий. Просмотр лунок на контаминацию проводили ежедневно. Эксперимент остановили через 5 суток, когда была обнаружена бактериальная контаминация. Содержание ДНК в клетках до и после культивирования оценивали с помощью проточного цитометра CytoFLEX (Beckman-Coulter, США). Использовали флуоресцентный краситель DAPI (Gerb, Германия). Существенных отличий в распределении содержания ДНК в культивируемых гемоцитах в контроле и после добавления гемоцитов от мидий №19 и №54 обнаружено не было (см. рис. 4.1.1 и 4.1.2). Формулируя планы, мы подчеркивали, что эксперименты по культивированию гемоцитов - поисковая работа, потому что неизвестно, как будут себя вести в культуре гемоциты. Важнейший результат эксперимента: после 10 месяцев криохранения здоровые и неопластические гемоциты сохраняют жизнеспособность и адаптируются к условиям культуры .

4.2. Освоена методика диагностики инфекционного рака мидий линии BTN2 (Yonemitsu et al 2019) с помощью ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-PB) с праймерами к аллелям ядерного локуса EFalpha и митохондриального CR. Оценена надежность методики. Для отработки методики массовой диагностики СТС использованы праймеры, специфичные к раковым аллелям ядерных и митохондриальных локусов линии BTN2 из работы Yonemitsu et al, 2019. В экспериментах, в качестве контролей использованы мидии 2019 г. сбора из Приморья, у которых ранее нами была показана (положительные контроли) либо не показана инфекция BTN2. На первом этапе были подобраны условия и реактивы ПЦР. Удалось достичь специфичной амплификации раковых аллелей EFalpha в положительных контролях и отсутствия амплификации у здоровых особей (рис. 4.2. а). На следующем этапе были проанализированы образцы тканей мидий из новых и коллекционных (см. п. 4.4.1.) сборов мидий из Баренцева и Охотского морей (всего 208 моллюсков). У 11 особей выявлен положительный сигнал в ходе ПЦР-PB (рис. 4.2. b), однако, прямое секвенирование не выявило у этих мидий раковых аллелей BTN2. Наличие ложноположительных результатов обосновывает необходимость дальнейшего совершенствования методики.

4.3. Диагностика лейкемии (диссеминированной неоплазии) проведена для новых выборок мидий из Чили, Белого, Баренцева и Дальневосточных морей России. Получены новые данные о распространении болезни, собраны коллекции для дальнейших исследований. Материал (образцы гемолимфы, ноги и гонады) мидий и церастодерм собран в Белом и Баренцевом морях, но не проанализирован. Это связано с тем, что мы рассчитывали провести исследование в рамках сотрудничества с иностранными коллегами, что было невозможно в условиях закрытых границ. Исследование мидий велось параллельно на двух базах, во Владивостоке и Петербурге. Всего, мы изучили цитометрически 459 мидий (180 во Владивостоке, остальные в Петербурге) из окрестностей Магадана Охотского моря, 340 из бухты Гайдамак

Японского моря (все во Владивостоке), где мы обнаружили BTN2 в 2019, 55 из Белого моря, 20 из Баренцева моря и 52 из Пунта-Аренаса, Магелланов пролив (все в Петербурге). Из Чили мидий нам привезли участники российской антарктической экспедиции. Параллельно с методом проточной цитометрии, позволяющим диагностировать лейкемию, все "Петербургские" образцы гемолимфы из Охотского моря была исследована с помощью ПЦР в режиме реального времени с праймерами, специфичными к аллелям BTN2 (см. п. 4.2). К сожалению, по объективным обстоятельствам, своевременное генотипирование и проверка на СТС материала, полученного во Владивостоке, на базе Научного парка СПбГУ было невозможно. С помощью проточной цитометрии обнаружили анеуплоидные гемоциты в гемолимфе 9 мидий из Магадана (рис. 4.3.) и 6 из бухты Гайдамак. Диссеминированная неоплазия была подтверждена у этих особей и при исследовании гемоцитов иммуноцитохимическими методами (рис. 4.3.). Как уже упоминалось, ПЦР в режиме реального времени с ДНК из гемолимфы особей из Баренцева и Охотского моря не выявила аллелей BTN2 (см. п. 4.2). Однако, мтДНК секвенирование «раковой» мидии из Магадана показало у нее генетический химеризм и «дополнительные» аллели мтДНК, представляющие F-мтДНК *M. trossulus* (как у BTN1) и ничуть не похожие на «рекомбинантные» гаплотипы BTN2 из Владивостока. Гемолимфа и контрольные ткани от каждой болеющей раком мидии из Охотского и Японского моря зафиксированы для дальнейших молекулярно-генетических исследований, в частности, в тризоле для изучения транскриптомов.

4.4.1. Обобщены собственные и литературные данные о нарушениях двоякого однородительского наследования (DUI) митохондрий (мтДНК) у гибридизующих мидий *Mytilus edulis* и *M. trossulus*. Собственные данные: 396 особей из Шотландии (выборки LE, PL), Норвегии (GA, AR, BE), российских Белого (CH) и Японского (J) моря. Ткани гонад генотипированы по четырем таксономически информативным (различают *M. trossulus*, с одной стороны, и *M. edulis* и *M. galloprovincialis*, с другой) ядерным локусам и по кодирующему мтДНК локусу 16s. 16s генотипирование позволяет определять видо- и «поло-принадлежность» мтДНК. Напоминаем, что у самок в норме ожидается только F-мтДНК (гомоплазмия), у самцов - F-мтДНК и M-мтДНК (гетероплазмия). У особей из LE, GA, AR, CH, J гистологически определен физиологический пол. Мидии из других выборок оказались неполовозрелыми либо в посленерестовом состоянии. Мидии с нарушениями DUI типированы по локусу EF1alpha на наличие аллелей линии СТС BTN2. Ядерная изменчивость проанализирована с помощью алгоритма STRUCTURE в рамках модели двух видов. Мидии с вкладом генов от одного вида более чем 90% классифицированы как чистопородные *M. edulis* или *M. trossulus*, остальные как гибриды. В GA могут присутствовать генотипы или гены *M. galloprovincialis*, не отличимые от *M. edulis* по изученным признакам. В анализ включены данные аналогичных исследований мидий из Новой Шотландии в Канаде (Saavedra et al, 1996), из Бергена в Норвегии (Smietanka & Burzynski, 2017) и с японского острова Хоккайдо (Brannock et al, 2013). Последняя выборка представляет гибридную зону между *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*. В графической форме, результаты приведены на рис. 4.4.1. Во всех исследованных нами популяциях идентифицированы и *M. edulis*, и *M. trossulus*, и гибриды. мтДНК интрогрессия незначительна (у чистопородных, как правило, митохондрии своего вида). Гибридов по мтДНК идентифицировать нельзя. Наблюдается неплохое согласие между физиологическим полом и «митохондриальным полом» (всего, 6,5% нарушений DUI). Аномальные мтДНК генотипы: 8 гетероплазмичных самок с F-мтДНК и M-мтДНК, 1 самка с F-мтДНК от двух видов, 1 триплазмичный самец с M-мтДНК от двух видов сразу. Против ожиданий, не все особи с аномальными генотипами были гибридами. У мидий с аномальными мтДНК генотипами (все – из Европы), аллелей BTN2 не выявлено. В литературе доминирует точка зрения, что мтДНК генотипирование не информативно для определения пола и вида симпатрических мидий из-за интрогрессии и нарушений DUI, связанных с межвидовой гибридизацией (напр. в Балтике, Zbawicka et al. 2014, в Бергене, Smietanka & Burzynski, 2017 и на Хоккайдо, Brannock et al, 2013, см. также рис. 4.4.1.). В нашем богатом материале мы не видим ни масштабной интрогрессии, ни масштабных нарушений DUI. МтДНК генотипирование по кодирующим локусам – валидный метод определения пола и вида у мидий в океанических (не балтийских) популяциях *Mytilus edulis* и *M. trossulus*.

4.4.2. Нуклеотидные последовательности митохондриального фрагмента 16S-CR 620 п.н. здоровых мидий и мидий, инфицированных BTN2, из модельной для изучения СТС дальневосточной популяции были проанализированы на предмет точек рекомбинации в программе RDP4 (Martin et al, 2015). В гемолимфе мидий *M. trossulus*, инфицированных BTN2 в Японском море, подтверждено наличие «дополнительных» - раковых рекомбинантных митохондриальных геномов, схожих с ранее описанными для BTN2 в Европе и Аргентине (Yonemitsu et al, 2020). Кодирующие части митохондриальных геномов BTN2 соответствуют женской, а большая часть контрольных регионов – мужской мтДНК (рис. 4.2.2.).

4.5. У 7 моллюсков с лейкемией из Приморья и 6 из Магадана выделены ДНК и РНК из гемолимфы и из контрольных тканей для дальнейшего исследования.

Все планируемые на год работы выполнены полностью:

да

1.4. Сведения о достигнутых конкретных научных результатах в отчетном году

(до 5 стр.)

1.1. Проведен очередной этап мониторинга гибридной зоны между мидиями *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в Кольском заливе, также обработаны коллекционные сборы мидий 2009-10 гг. сбора. Если в северной части залива виды формируют мозаичную зону, то в южной - типичную клинальную зону, шириной 8 км. Это на порядок меньше величины потенциальной популяционной дисперсии у мидий. Вслед за классиками (Harrison 1993; Arnold, 1997) мы рассматривали клинальную и мозаичную зоны как альтернативные фундаментальные сущности и задавались вопросом: «может ли гибридная зона быть выражена в пространственном масштабе, меньшем, чем масштаб популяционной дисперсии гибридирующих видов?» (см. заявку Проекта). Теперь мы знаем, что, в зависимости от экологических условий, одни и те же генофонды могут формировать как мозаичные, так и клинальные зоны, в масштабе, меньшем, чем масштаб потенциальной популяционной дисперсии видов.

1.2. В аквариальных условиях изучены конкурентные отношения между *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в симпатрии. Показано угнетение *M. edulis* в плотных поселениях *M. trossulus*, что может объяснять успех последнего вида в ходе его экспансии, наблюдаемой в Белом и Баренцевом морях.

1.3. Освоены методы микросателлитного анализа морских сельдей (*Clupea pallasii*, *C. harengus*) и SNP-типирования мидий. Популяции сельдей норвежских фиордов Россфиорд и Балсфиорд оказались сходны с беломорской сельдью (*C. pallasii*), а не обычной норвежской *C. harengus*. Это согласуется с гипотезой о том, что сельди Россфиорда и Балсфиорда - реликтовые формы тихоокеанской сельди *C. pallasii*. По 19 маркерам, включая 15 однонуклеотидных, отработаны методы молекулярной идентификации всех трех видов мидий, встречающихся в северной Атлантике (*Mytilus edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*) и межвидовых гибридов. На этих данных охарактеризована своеобразная «арктическая» линия *M. galloprovincialis* (одного из важнейших инвазивных видов на земле (http://www.issg.org/worst100_species.html), угрожающая северным морям России, и описана структура выборки из уникальной гибридной зоны в Норвежском море, где гибридируют все три вида мидий.

2.1. По мультилокусным данным (больше тысячи несцепленных SNP маркеров, выявленных в транскриптомах) изучены пространственные паттерны гибридизации в двух географически удаленных гибридных зонах между *Limecola balthica* и *L. rubra* в Балтийском и в Баренцевом морях. Результаты согласуются с нашей моделью, постулированной ранее: гибридные рои (низкая межиндивидуальная изменчивость по доле генов двух видов, слабый отбор против рекомбинантных генотипов) с повышенной частотой генов *L. balthica*, с одной стороны, и чистопородные популяции *L. rubra*, с другой, разделены гибридными зонами (высокая межиндивидуальная изменчивость, сильный отбор).

3.1., 3.2. Изучена остеологическая изменчивость двух видов сельди, атлантической и тихоокеанской, и их интрогрессированных - «гибридных» популяций в Европе. Средние значения меристических признаков обнаруживают связь с генетическими особенностями популяций. Атлантическая сельдь занимает наиболее обособленное положение по отношению к остальным выборкам, а гибридная форма из Россфиорда занимает промежуточное положение между атлантической сельдью и популяциями с доминированием генов *C. pallasii*. При анализе флуктуирующей асимметрии не отмечено повышенного уровня изменчивости у рыб из «гибридных популяций», которого можно было бы ожидать в случае нарушения генетической коадаптации у гибридов.

3.3. На примере полиморфной выборки мидий из Гасейд, где намешаны гены сразу трех видов (*Mytilus edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*), оценен вклад в фенотипическую изменчивость популяции «таксономического сродства» особей. Показано, что форма раковины у мидий в условиях гибридизации варьируется в широких пределах и утрачивает видоспецифические черты, выявляемые при анализе «чистых» популяций. Форма раковины, как таковая, не может являться инструментом идентификации видовых генотипов в изученной гибридной зоне. Однако отдельные морфометрические признаки могут быть использованы для вероятностной диагностики. В Гасейд *M. galloprovincialis* имеют, по сравнению с *M. edulis*, более узкую замковую площадку и более вытянутый относительно длины раковин лигамент.

4.1. Проверена гипотеза индукции анеуплоидии в гемоцитах мидий за счет инкубации аномальных (опухолевых) гемоцитов с нормальными гемоцитами здоровых мидий. За пять суток культивирования индукции не произошло. В ходе экспериментов показано, что после 10 месяцев криохранения здоровые и неопластические гемоциты сохраняют жизнеспособность и адаптируются к условиям культуры.

4.2. Освоена методика диагностики инфекционного рака мидий линии BTN2 с помощью qPCR, предложенная Yonemitsu et al 2019. Оценена надежность методики. Наличие ложноположительных результатов обосновывает необходимость дальнейшего совершенствования метода.

4.3. Проведена диагностика лейкемии мидий в обширном материале из Дальневосточных морей России, а также в небольшом материале из северных морей России и из Чили. Выявлены мидии с лейкемией в Охотском и Японском морях. В Охотском море болезнь отмечена впервые. Пополнены коллекции гемолимфы и тканей «раковых» мидий для дальнейших исследований. Митохондриальное секвенирование «раковой» мидии из Охотского моря показал у нее генетический химеризм и «дополнительные» аллели мтДНК, представляющие F-мтДНК *M. trossulus* (как у BTN1) и ничуть не похожие на «рекомбинантные» гаплотипы BTN2 из Владивостока.

4.4.1. Обобщены собственные и литературные данные о нарушениях двоякого однородительского наследования (DUI) мтДНК у гибридирующих мидий *Mytilus edulis* и *M. trossulus*. В литературе доминирует точка зрения, что мтДНК генотипирование не информативно для определения пола и вида симпатрических мидий, из-за интрогрессии и нарушений DUI, связанных с межвидовой гибридизацией. В своем богатом материале мы не увидели ни масштабной интрогрессии, ни масштабных нарушений DUI. МтДНК генотипирование по кодирующим локусам – валидный метод определения пола и вида у мидий в океанических (не балтийских) популяциях *M. edulis* и *M. trossulus*.

4.4.2. Кодирующие части митохондриальных геномов BTN2 соответствуют женской, а большая часть контрольных регионов – мужской мтДНК. Такие молекулы могут возникать только в результате рекомбинации между F-мтДНК и M-мтДНК. Поскольку M-мтДНК в норме присутствует в только герминативной ткани самцов (Cao et al. 2004), наличие у BTN2 фрагмента M-мтДНК может указывать на пол «пациента зеро» - особи, у которой возник заразный рак, и на ткань происхождения раковых клеток.

4.5. У 7 моллюсков с лейкемией из Приморья и 6 из Магадана выделены ДНК и РНК из гемолимфы и из контрольных тканей для дальнейшего исследования.

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. Проведен очередной этап мониторинга гибридной зоны между мидиями *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в Кольском заливе, также обработаны коллекционные сборы мидий 2009-10 гг. сбора. Если в северной части залива виды формируют мозаичную зону, то в южной – типичную клинальную зону, шириной 8 км. Это на порядок меньше величины потенциальной популяционной дисперсии у мидий. Вслед за классиками (Harrison 1993; Arnold, 1997) мы рассматривали клинальную и мозаичную зоны как альтернативные фундаментальные сущности и задавались вопросом: «может ли гибридная зона быть выражена в пространственном масштабе, меньшем, чем масштаб популяционной дисперсии гибридирующих видов?». Теперь мы знаем, что, в зависимости от экологических условий, одни и те же генофонды могут формировать как мозаичные, так и клинальные зоны, в масштабе, меньшем, чем масштаб потенциальной популяционной дисперсии видов.

2. В аквариальных условиях изучены конкурентные отношения между *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в симпатрии. Показано угнетение *M. edulis* в плотных поселениях *M. trossulus*, что может объяснять успех последнего вида в ходе его экспансии, наблюдаемой в Белом море в последние десятилетия.

3. Отработаны методы микросателлитного анализа морских сельдей (*Clupea pallasii*, *C. harengus*) и SNP-типирования мидий. Популяции сельдей норвежских фиордов Россфиорд и Балсфиорд оказались сходны с беломорской сельдью (*C. pallasii*), а не обычной норвежской *C. harengus*. Это согласуется с гипотезой о том, что сельди Россфиорда и Балсфиорда – реликтовые формы тихоокеанской сельди *C. pallasii*. По 19 маркерам, включая 15 однонуклеотидных, отработаны методы молекулярной идентификации всех трех видов мидий, встречающихся в северной Атлантике (*Mytilus edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*) и межвидовых гибридов. Охарактеризована своеобразная «арктическая» линия *M. galloprovincialis* (одного из важнейших инвазивных видов на земле, угрожающая северным морям России), и описана структура выборки из уникальной гибридной зоны в Норвежском море, где со-существуют и гибридизуют все три вида мидий.

4. По мультилокусным данным (больше тысячи несцепленных SNP маркеров, выявленных в транскриптомах) изучены пространственные паттерны гибридизации в двух географически удаленных гибридных зонах между *Limecola balthica* и *L. rubra* в Балтийском и в Баренцевом морях. Результаты согласуются с нашей моделью, постулированной ранее: гибридные рои (низкая межиндивидуальная изменчивость по доле генов двух видов, слабый отбор против рекомбинантных генотипов) с повышенной частотой генов *L. balthica*, с одной стороны, и чистопородные популяции *L. rubra*, с другой, разделены гибридными зонами (высокая межиндивидуальная изменчивость, сильный отбор).

5. Изучена остеологическая изменчивость двух видов сельди, атлантической и тихоокеанской, и их

интрогрессированных - «гибридных» популяций в Европе. Средние значения меристических признаков обнаруживают связь с генетическими особенностями популяций. Атлантическая сельдь занимает наиболее обособленное положение по отношению к остальным выборкам, а гибридная форма из Россфьорда занимает промежуточное положение между атлантической сельдью и популяциями с доминированием генов *C. pallasii*. При анализе флуктуирующей асимметрии не отмечено повышенного уровня изменчивости у рыб из «гибридных популяций», которого можно было бы ожидать в случае нарушения генетической коадаптации у гибридов.

6. На примере полиморфной выборки мидий из Норвегии, где намешаны гены сразу трех видов (*Mytilus edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*), оценен вклад в фенотипическую изменчивость популяции «таксономического сродства» особей. Показано, что форма раковины у мидий в условиях гибридизации варьируется в широких пределах и утрачивает видоспецифические черты, выявляемые при анализе «чистых» популяций.

7. Проверена гипотеза индукции анеуплоидии в гемоцитах мидий за счет инкубации аномальных (опухолевых) гемоцитов с нормальными гемоцитами здоровых мидий. За пять суток культивирования индукции не произошло. В ходе экспериментов показано, что после 10 месяцев криохранения здоровые и неопластические гемоциты сохраняют жизнеспособность и адаптируются к условиям культуры.

8. Освоена методика диагностики инфекционного рака мидий линии BTN2 с помощью qPCR, предложенная Yonemitsu et al 2019. Оценена надежность методики. Наличие ложноположительных результатов обосновывает необходимость дальнейшего совершенствования метода.

9. Обобщены собственные и литературные данные о нарушениях двоякого однородительского наследования (DUI) митохондрий (мтДНК) у гибридизующих мидий *Mytilus edulis* и *M. trossulus*. В литературе доминирует точка зрения, что мтДНК генотипирование не информативно для определения пола и вида симпатрических мидий, из-за интрогрессии и нарушений DUI, связанных с межвидовой гибридизацией. В своем материале мы не увидели ни масштабной интрогрессии, ни масштабных нарушений DUI. МтДНК генотипирование по кодирующим локусам – валидный метод определения пола и вида у мидий в океанических (не балтийских) популяциях *M. edulis* и *M. trossulus*.

10. Кодирующие части митохондриальных геномов линии СТС мидий BTN2 соответствуют женской, а большая часть контрольных регионов – мужской мтДНК. Такие молекулы могут возникать только в результате рекомбинации между F-мтДНК и M-мтДНК. Поскольку M-мтДНК в норме присутствует в только герминативной ткани самцов (Cao et al. 2004), наличие у BTN2 фрагмента M-мтДНК может указывать на пол «пациента зеро» - особи, у которой возник заразный рак, и на ткань происхождения раковых клеток.

11. Получены образцы гемолимфы и контрольных тканей мидий с лейкемией для геномного исследования.

на английском языке

1. The next planned stage of the monitoring of the hybrid zone between mussels *Mytilus edulis* and *M. trossulus* in the Kola Bay was conducted, and the collections of mussels made in 2009-10 were processed. While in the northern part of the Kola Bay these species form a mosaic zone, in the southern part they form a typical cline zone 8 km wide. This is an order of magnitude less than the potential value of population dispersion in mussels. Following the classical authors (Harrison 1993; Arnold, 1997), we considered the cline and the mosaic zone as alternative fundamental entities. The question we asked was “Can a hybrid zone be expressed at a smaller spatial scale than that of the population dispersion of the hybridizing species?”. Now we know that depending on the ecological conditions the same gene pools can form both the mosaic and the cline zone at a scale which is less than the scale of the population dispersion of the species.

2. Competitive relationships between *Mytilus edulis* and *M. trossulus* in sympatry were studied under experimental conditions in aquaria. It was shown that *M. edulis* is depressed in dense settlements of *M. trossulus*. This observation may explain the success of the latter species during its ongoing expansion in the White Sea in the recent decades.

3. The techniques of microsatellite analysis of herrings (*Clupea pallasii*, *C. harengus*) and SNP typing of mussels were worked out. Herring populations from the Norwegian fiords Rosfjord and Balsfjord were found to be similar to the White Sea herring (*C. pallasii*) rather than the common Norwegian *C. harengus*. This finding agrees with the hypothesis that the herrings of Rosfjord and Balsfjord are relic forms of the Pacific herring *C. pallasii*. The techniques of molecular identification of all the three mussel species from Northern Atlantic (*Mytilus edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*) and interspecies hybrids were worked out for 19 markers, including 15 single-nucleotide ones. We characterized a peculiar “Arctic” lineage of *M. galloprovincialis* (one of the most important invasive species on Earth), which is a threat to northern Russian seas. The structure of a sample from a unique hybrid zone in the Norwegian Sea, where all the three mussel species coexist and hybridize, was described.

4. Based on multilocus data (more than a thousand of unlinked SNP markers revealed in transcriptomes), spatial patterns of hybridization in two geographically remote hybrid zones between *Limecola balthica* and *L. rubra* in the Baltic and the Barents Sea were studied. The results agree with our earlier model: hybrid swarms (low variability between individuals by the proportion of genes of the two species, weak selection against recombinant genotypes) with an increased frequency of *L.*

balthica genes on the one hand and purebred populations of *L. rubra* on the other hand are separated by hybrid zones (high variability between individuals, strong selection).

5. Osteological variability of two herring species, the Atlantic and the Pacific, and that of their introgressed ("hybrid") populations in Europe was studied. Average values of meristic characters are found to be associated with the genetic features of the populations. The Atlantic herring occupies the most isolated position in relation to the other samples, while the hybrid form from Rosfjord occupies an intermediate position between the Atlantic herring and the populations with the dominance of *C. pallasii* genes. Analysing the fluctuating asymmetry, we did not note any increase in the level of variability in fish from "hybrid populations", which might have been expected in case of disruption of genetic coadaptation in the hybrids.

6. Based on the evidence from a polymorphic sample of mussels from Norway, where the genes of three species (*Mytilus edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*) are mixed, the contribution of the "taxonomic affinity" of individuals into the phenotypic variability of the population was assessed. It was shown that the shape of mussel shells under conditions of hybridization varies in a broad range, losing the species-specific traits revealed during an analysis of "purebred" populations.

7. We tested the hypothesis of induction of aneuploidy in mussel hemocytes by incubating anomalous (neoplastic) hemocytes with normal hemocytes of healthy mussels. No induction was recorded after five days of the cultivation. We showed experimentally that healthy and neoplastic hemocytes remained viable after 10 months of cryostorage, and could adapt to the culture conditions.

8. The diagnostics technique of BTN2 lineage of clonally transmissible cancer in mussels with the use of qPCR, suggested by Yonemitsu et al. 2019, was mastered and its reliability was assessed. False positives were registered, which shows that the technique has to be further improved.

9. We generalized our own and literature data on the disruptions of doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondria (mtDNA) in hybridizing mussels *Mytilus edulis* and *M. trossulus*. A viewpoint is prevalent in the literature that mtDNA genotyping is uninformative for determination of sex and species of sympatric mussels because of introgression and DUI disruption associated with interspecies hybridization. In our material we did not note either any large-scale introgression or any large-scale DUI disruptions. MtDNA genotyping by coding loci is a valid method for determination of sex and species in mussels from oceanic (not Baltic) populations of *M. edulis* and *M. trossulus*.

10. Coding parts of mitochondrial genomes of BTN2 lineage of mussel CTC correspond to the female mtDNA, while most of the control regions correspond to the male mtDNA. These molecules may arise only as a result of recombination between F-mtDNA and M-mtDNA. Since M-mtDNA is normally present only in the germinal tissue of males (Cao et al. 2004), the presence of M-mtDNA fragment in BTN2 may point to the sex of the "patient zero" (the first individual to have the cancer) and the tissue where the cancerous cells originated.

11. Samples of the hemolymph and the control tissues of mussels with CTC were obtained to be used in a genomic study.

1.6. Файл с дополнительными материалами

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

скачать...

1.7. Перечень публикаций за год по результатам проекта

(добавляются из списка публикаций, зарегистрированных участниками проекта)

1. Венне Р., Збавичка М., Бач Л., Стрелков П., Ганцевич М., Куклинский П., Киевский Т., Макдональд Дж. Х., Сундсасен К.К., Арнаси М., Лиен С., Каасик А., Херкул К., Котта Й. (Wenne R., Zbawicka M., Bach L., Strelkov P., Gantsevich M., Kukliński P., Kijewski T., McDonald J.H., Sundsaasen K.K., Árnýasi M., Lien S., Kaasik A., Herkül K., Kotta J.) **Trans-Atlantic Distribution and Introgression as Inferred from Single Nucleotide Polymorphism: Mussels *Mytilus* and Environmental Factors** Genes (2020 г.)

2. Лааконен Х.М., Хардман М., Стрелков П., Вайнола Р. (Laakkonen H.M., Hardman M., Strelkov P., Väinölä R.) **Cycles of trans-Arctic dispersal and vicariance, and diversification of the amphi-boreal marine fauna** Journal of Evolutionary Biology (2020 г.)

3. Одинцова Н.А. (Odintsova N.A.) **Leukemia-Like Cancer in Bivalves** Russian Journal of Marine Biology (2020 г.)

4. Симон А., Фрауссе К., Эль Айяри Т., Лиотар-Хаг К., Стрелков П., Велч Д.Д., Биерне Н. (Simon A., Fraïsse C., El Ayari T., Liautard-Haag C., Strelkov P., Welch J.J., Bierne N.) **How do species barriers decay? Concordance and local introgression in mosaic hybrid zones of mussels** Journal of Evolutionary Biology (2020 г.)

1.8. В 2020 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	2020 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		3

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	2019-2020 годы	
		план	факт
Количество публикаций по проекту членов научного коллектива в рецензируемых российских и зарубежных научных изданиях, индексируемых в базах данных «Сеть науки» (Web of Science Core Collection) или «Скопус» (SCOPUS)	Ед.	4	9
в том числе в изданиях, входящих в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору JCR Science Edition или JCR Social Sciences Edition, по SJR (принадлежность издания к Q1 в Scopus определяется по базе данных http://www.scimagojr.com/)	Ед.		4
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.		8

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 успели принять участие в одной конференции, Беломорская студенческая научная сессия СПбГУ– 2020, с стендовым докладом Марченко Ю. Т., Хайтов В. М., Католикова М. В., Стрелков П. П.

"Оценка простого морфологического маркера для идентификации гибридирующих мидий *Mytilus edulis* L. и *M. trossulus* Gould". Материалы конференции: <http://mbs.spbu.ru/wp-content/uploads/2019/10/%D0%A1%D0%B1%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%B8%D0%BA-%D1%82%D0%B5%D0%B7%D0%B8%D1%81%D0%BE%D0%B2-WSSS-2020.pdf>

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 2020 г.:

Лайус Дмитрий Людвигович

Одинцова Нэлия Адольфовна

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

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

«Организация будет являться основным местом работы: да»

да

Информация о владельце ОИ

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

<http://researchpark.spbu.ru>

перечень услуг: <https://researchpark.spbu.ru/research-park/services>

перечень оборудования: <https://researchpark.spbu.ru/oborudovanie>

Указанный сайт содержит утвержденные в установленном порядке владельцем ОИ:

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

да

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

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

да

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

да

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

Приказ от 17.01.2020 № 193/1 «Об утверждении перечня и стоимости услуг»

ссылка: https://researchpark.spbu.ru/images/docs/prikaz_uslugi_vnutr_2020.pdf

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

перечень услуг: <https://researchpark.spbu.ru/research-park/services> перечень оборудования:

<https://researchpark.spbu.ru/oborudovanie>

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

формально, мы получили результаты по всем пунктам Плана. Однако, не все пункты были выполнены в заявленном объеме. Что не сделали, и почему, подробно разъяснено в "Сведениях о фактическом выполнении годового плана работы". По пунктам Плана: 1.2. Не проведены полевые исследования конкурентных отношений между мидиями *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в симпатрии. Вместо этого проведены исследования в аквариальных условиях, по сокращенной программе; 4.3. Мии и Церастодермы для изучения рака собраны, но не проанализированы. Не получен материал для изучения СТС из Испании и Канады. Вместо этого мы собрали и обработали цитометрически (тест на лейкемию) больше мидий (свыше 1000) из морей России, чем смогли бы в других условиях; 3.2. Не собран материал по сельдям с нерестилищ в Белом море весной. Вместо этого он собран летом, с потерей информации о времени размножения рыб.

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

формально, мы получили результаты по всем пунктам Плана. По пунктам Плана: 1.2. Вместо полевых исследований конкурентных отношений между мидиями *Mytilus edulis* и *M. trossulus* в симпатрии проведены исследования в аквариальных условиях; 4.3. Вместо запланированных исследований мий, церастодерм и мидий из зарубежных популяций мы собрали и обработали цитометрически (тест на лейкемию) больше мидий (свыше 1000), чем смогли бы в других условиях; 3.2. Вместо лова сельдей на нерестилищах весной, материал собран летом.

Настоящим подтверждаю:

- самостоятельность и авторство текста отчета о выполнении проекта;
- при обнародовании результатов, полученных в рамках поддержанного РНФ проекта, научный коллектив ссылался на получение финансовой поддержки проекта от РНФ и на организацию, на базе которой выполнялось исследование, на организацию - владельца ОИ (при необходимости);
- согласие с опубликованием РНФ сведений из отчета о выполнении проекта, в том числе в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»;
- проект не имеет других источников финансирования;
- проект не является аналогичным**** по содержанию проекту, одновременно финансируемому из других источников.

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

Подпись руководителя проекта _____/П.П. Стрелков/

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

«Морские виды, объекты промысла и марикультуры, в условиях гибридизации и
клональных раковых инфекций»,
в 2020 году

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

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

Указывается в случае официального принятия к публикации в последующих изданиях, положительного решения о регистрации исключительных прав.

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

1

2.1. Авторы публикации

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

на русском языке: Венне Р., Збавичка М., Бач Л., Стрелков П., Ганцевич М., Куклинский П., Киевский Т., Макдональд Дж. Х., Сундсасен К.К., Арнаси М., Лиен С., Каасик А., Херкул К., Котта Й.

на английском языке: Wenne R., Zbawicka M., Bach L., Strelkov P., Gantsevich M., Kukliński P., Kijewski T., McDonald J.H., Sundsaasen K.K., Árnýasi M., Lien S., Kaasik A., Herkül K., Kotta J.

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

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

2.2. Название публикации

Trans-Atlantic Distribution and Introgression as Inferred from Single Nucleotide Polymorphism: Mussels Mytilus and Environmental Factors

2.3. Год публикации

2020

2.4. Ключевые слова

Mytilus, SNP, molecular population genetics, North Atlantic, environmental variables

2.5. Вид публикации

статья

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

Genes

ISSN (при наличии): 2073-4425

e-ISSN (при наличии): ---

ISBN (при наличии): ---

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

11, 530

Месяц и год публикации: 05.2020

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

<https://www.mdpi.com/2073-4425/11/5/530>

2.8. DOI (при наличии)

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

Для принятых к публикации материалов п. 2.7 не заполняется.

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

2.10. Издание индексируется базой данных Web of Science Core Collection

да

2.11. Импакт-фактор издания

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

3.759

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

да

2.12. Издание индексируется базой данных Scopus

да

2.13. Издание индексируется базой данных РИНЦ

да

2.14. Публикация аффилирована с организацией:

да

2.15. В публикации:

В качестве источника финансирования исследования указан грант Российского научного фонда:

да

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

да

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

Иностранные соавторы указали свои источники финансирования. В тексте публикации указано что делал участник проекта: собирал материал, писал текст статьи. Соответственно планирование исследования, лабораторный и статистический анализы выполнялись не за счет гранта Фонда.

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: Лааконен Х.М., Хардман М., Стрелков П., Вайнола Р.

на английском языке: Laakkonen H.M., Hardman M., Strelkov P., Väinölä R.

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

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

2.2. Название публикации

Cycles of trans-Arctic dispersal and vicariance, and diversification of the amphi-boreal marine fauna

2.3. Год публикации

2020

2.4. Ключевые слова

North Atlantic, North Pacific, phylogeography, secondary contact, speciation, vicariance

2.5. Вид публикации

статья

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

Journal of Evolutionary Biology

ISSN (при наличии): 1010-061X

e-ISSN (при наличии): ---

ISBN (при наличии): ---

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

Месяц и год публикации: 07.2020

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

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jeb.13674>

2.8. DOI (при наличии)

<https://doi.org/10.1111/jeb.13674>

Accession Number WoS (при наличии): ---

Scopus EID (при наличии): ---

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

Для принятых к публикации материалов п. 2.7 не заполняется.

Письмо из редакции или издательства с извещением об официальном принятии рукописи к публикации: [скачать](#)

В формате pdf, до 3 Мб, в том числе электронное письмо.

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).

2.74

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

да

2.12. Издание индексируется базой данных Scopus

да

2.13. Издание индексируется базой данных РИНЦ

да

2.14. Публикация аффилирована с организацией:

да

2.15. В публикации:

В качестве источника финансирования исследования указан грант Российского научного фонда:

да

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

да

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

иностранцы соавторы указали свои иностранные источники финансирования. В тексте публикации не отражено за счет каких источников выполнялись отдельные работы, потому что такие правила журнала. Участник проекта участвовал в сборе материала, стат. обработке данных, написании статьи. Соответственно, лабораторные анализы проводились не за счет данного гранта Фонда.

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: Одинцова Н.А.

на английском языке: Odintsova N.A.

WoS Researcher ID (при наличии): ---

Scopus AuthorID (при наличии): <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=7004314550>

2.2. Название публикации

Leukemia-Like Cancer in Bivalves

2.3. Год публикации

2020

2.4. Ключевые слова

bivalves, hemocytes, horizontal transfer, retrotransposons, malignant leukemia

2.5. Вид публикации

статья

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

Russian Journal of Marine Biology

ISSN (при наличии): 1063-0740

e-ISSN (при наличии): 1573-9457

ISBN (при наличии): ---

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

Vol. 46, No. 2, pp. 59–67

Месяц и год публикации: 05.2020

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

<https://link.springer.com/article/10.1134/S1063074020020078>

2.8. DOI (при наличии)

<https://doi.org/10.1134/S1063074020020078>

Accession Number WoS (при наличии): ---

Scopus EID (при наличии): ---

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

Для принятых к публикации материалов п. 2.7 не заполняется.

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

2.10. Издание индексируется базой данных Web of Science Core Collection

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).

0.411

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

нет

2.12. Издание индексируется базой данных Scopus

да

2.13. Издание индексируется базой данных РИНЦ

да

2.14. Публикация аффилирована с организацией:

да

2.15. В публикации:

В качестве источника финансирования исследования указан грант Российского научного фонда:

да

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

нет

2.16. Файл с текстом публикации

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

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-Хаг К., 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): <https://publons.com/researcher/D-1606-2013>

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

2.2. Название публикации

How do species barriers decay? Concordance and local introgression in mosaic hybrid zones of mussels

2.3. Год публикации

2020

2.4. Ключевые слова

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

2.5. Вид публикации

статья

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

Journal of Evolutionary Biology

ISSN (при наличии): 1010-061X

e-ISSN (при наличии): ---

ISBN (при наличии): ---

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

Месяц и год публикации: 10.2020

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

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jeb.13709>

2.8. DOI (при наличии)

<https://doi.org/10.1111/jeb.13709>

Accession Number WoS (при наличии): ---

Scopus EID (при наличии): ---

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

Для принятых к публикации материалов п. 2.7 не заполняется.

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

2.10. Издание индексируется базой данных Web of Science Core Collection

да

2.11. Импакт-фактор издания

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

2.7

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

да

2.12. Издание индексируется базой данных Scopus

да

2.13. Издание индексируется базой данных РИНЦ

да

2.14. Публикация аффилирована с организацией:

да

2.15. В публикации:

В качестве источника финансирования исследования указан грант Российского научного фонда:

да

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

да

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

Иностранные соавторы указали свои иностранные источники финансирования. В тексте публикации не отражено за счет каких источников выполнялись отдельные работы, потому что такие правила журнала. Участник проекта участвовал в сборе материала и его генотипировании.

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 РФ; размер до 3 Мб в формате pdf)

Подпись руководителя проекта _____/П.П. Стрелков/

План работы на 2021 год и ожидаемые результаты по проекту
№ 19-74-20024

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

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

3.1. План работы на 2021 год

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.4. Продолжить поиск СТС у других объектов. Кроме *Mytilus*, в проекте были заявлены мия *Mya arenaria*, сердцевидка *Cerastoderma edule* и балтийская ракушка *Macoma balthica* (переименована в *Limecola balthica*). Совместное с испанскими партнерами исследование *Mya arenaria* и *Cerastoderma edule* из северных морей, пока, не показало у них лейкемии (у мии нашли карциному). Это исследование не закончено, но из-за пандемии мы не хотим ничего обещать. В 2021 г. мы планируем провести, своими силами, рекогносцировочное цитометрическое исследование *Macoma balthica* и тихоокеанской *Mya arenaria* (переименована в *M. japonica*). В случае обнаружения лейкемии мы секвенируем мтДНК

больных моллюсков для проверки гипотезы СТС.

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

Командировки.

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

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

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

3.2. Ожидаемые в конце 2021 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. Завершено исследование гибридизации и интрогрессии у морских сельдей (*Clupea pallasii*, *C. harengus*) северо-восточной Европы по микросателлитным маркерам. На достаточном материале (минимум, 5 популяционных выборок, 120 особей, 10 локусов) проверена гипотеза проекта о том, что различия между географическими и экологическими расами *Clupea pallasii* в регионе связаны с интрогрессивной гибридизацией этого вида с *C. harengus*.

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

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

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

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

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

- 3.1.2. Проведено генотипирование по нескольким, минимум 4 локусам, «диагностическим» для *Clupea pallasii* и *C. harengus*, беломорских сельдей с «нестандартным» для малопозвонковой сельди числом позвонков. На этом материале проверена гипотеза о присутствии в Белом море *C. harengus* и его гибридов ранних поколений с *Clupea pallasii*.
- 3.2.1. Исследование варьирования морфологических фенотипов у гибридирующих мидий расширено за счет новых выборок из аллопатрических популяций видов и новых надежно генотипированных выборок из гибридной зоны в водах Кольского полуострова и, если откроют границы, из Норвегии.
- 4.1. Получен ответ на вопрос об этиологии лейкемии у мидий из Охотского моря. В случае, если подтвердятся предварительные данные, что это СТС, проведено его сравнение с известными линиями СТС мидий BTN1 и BTN2 по двум мтДНК локусам и ядерному EFalpha.
- 4.2. Цитометрически (тест на лейкемию) изучено минимум 500 мидий из новых точек северных и дальневосточных морей, включая новые географические популяции и популяции из разных местообитаний мидий в районе доказанного присутствия СТС. Природа болезни у больных раком мидий верифицирована генетически.
- 4.3. Продолжен поиск генетических экспресс-методов диагностики СТС у мидий. На примере животных, изученных цитометрически, оценена пригодность ПЦР-РВ с праймерами Yonemitsu et al 2019 к линии рака BTN2 и прямое секвенирование мтДНК гемолимфы и тканей ноги для детекции гетероплазмии и «химеризма» моллюсков.
- 4.4. Проведено рекогносцировочное цитометрическое исследование *Macoma balthica* и тихоокеанской *Mya japonica*. В случае обнаружения лейкемии гипотеза СТС проверена секвенированием мтДНК больных моллюсков.
- 4.5. Секвенированы транскриптомы гемолимфы и мышц ноги минимум 5 мидий с СТС. Транскриптомы собраны с помощью программы Trinity. Получены предварительные данные об уровне дивергенции СТС от родительского вида и уровне дифференциальной экспрессии генов в нормальных и раковых тканях.

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 2021 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»),	2700
	в том числе:	
	вознаграждение членов научного коллектива – исследователей в возрасте до 39 лет (включительно) Имеет информационный характер.	1550
	Вознаграждение лиц категории «вспомогательный персонал» (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды)	500
	Оплата ² отпусков и выплаты компенсаций за неиспользованные отпуска лицам, являвшимся членами научного коллектива или лицами категории «вспомогательный персонал» (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды), оплата недоимки ³ по страховым взносам ² Указывается для лиц, которые не будут привлекаться в планируемом периоде к реализации проекта. ³ Возникшей по действующему грантовому соглашению.	0
1	Итого вознаграждение (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды)	3200
2	Оплата научно-исследовательских работ сторонних организаций (помимо владельца ОИ), направленных на выполнение научного проекта Не более 15 процентов от суммы гранта. Оплата работ и услуг организаций, предоставивших в соответствии с пунктом 2.4.4 соглашения софинансирование, не допускается.	0
3	Расходы на приобретение оборудования и иного имущества, необходимых для проведения научного исследования (включая обучение работников, монтажные, пуско-наладочные и ремонтные ⁴ работы) ⁴ Не связанные с осуществлением текущей деятельности организации.	75
4	Расходы на приобретение материалов и комплектующих для проведения научного исследования	525
5	Иные расходы для целей выполнения проекта	400
6	Оплата ⁵ работ (услуг), выполняемых (оказываемых) владельцем ОИ в целях реализации Проекта ⁵ Не более 20 процентов от суммы гранта.	1200
7	Накладные расходы организации Не могут превышать значений, предусмотренных соглашением.	600

4.2. Расшифровка планируемых расходов

№
п.п.

Направления расходования средств гранта, расшифровка

1 Итого вознаграждение (с учетом страховых взносов 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, 150000 руб

Майорова Мария Андреевна, 200000 руб

Католикова Марина Викторовна, 150000 руб

Головин Павел Валерьевич, 200000 руб
Марченко Юлия Тиграновна, 450000 руб
Сказина Мария Александровна, 550000 руб
Стрелков Петр Петрович, 250000 руб
Одинцова Нелия Адольфовна, 250000 руб
Лайус Дмитрий Людвигович, 250000 руб
Хайтов Вадим Михайлович, 250000 руб
Вспомогательный персонал, 500000 руб

- 2 Оплата научно-исследовательских работ сторонних организаций (помимо владельца ОИ), направленных на выполнение научного проекта

(приводится перечень планируемых договоров (счетов) со сторонними организациями с указанием предмета и суммы каждого договора)
нет расходов

- 3 Расходы на приобретение оборудования и иного имущества, необходимых для проведения научного исследования (включая обучение работников, монтажные, пуско-наладочные и ремонтные работы)

(представляется перечень планируемых к закупке оборудования и иного имущества, необходимых для проведения научного исследования)

Оборудование на 75000 руб.:

1. Камера для вертикального электрофореза (1 шт) 50 000 руб.

2. Дозатор механический одноканальный (2 шт) 25 000 руб.

Расходные материалы на 350000 руб.:

1. Реактивы для выделения тотальной ДНК на 104 000 руб.

Набор для выделения ДНК Qiagen (250 образцов, 1 уп), 70 000 руб,

Набор для выделения ДНК ExtractDNA (100 образцов, 3 уп) 34 000 руб

2. Материалы для выделения РНК и синтеза кДНК на 62 920 руб.

Набор для синтеза кДНК Mint-2, Евроген (20 р-й, 4 упаковки) 47 400 руб;

Реагент ExtractRNA (100 образцов, 4 упаковки) 15 520 руб.

3. Реактивы для ПЦР на 163500 руб.

Олигонуклеотиды, 100 000 руб.

Набор Encyclo Plus PCR (200 р-й, 5 упаковок) 19 500 руб.

Tersus-полимераза (1000 р-й, 2 упаковки) 44 000 руб.

4. Общелабораторные расходные материалы на 97 580 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)

оплата публикаций в журналах с открытым доступом: 200000 руб.

командировочные расходы: 200000 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