Мы работали по всем заявленным направлениям, и получили по всем из них удовлетворительные результаты. На итоги повлияли следующие обстоятельства. Не было возможности провести запланированный лов моллюсков и сельдей в Белом море в мае-июне, в частности выполнить пункт 3.2 – провести лов весенне- и летне- нерестящихся сельдей (расы C. pallasii) на нерестилищах в Кандалакшском заливе. Работы по сбору моллюсков в Белом и Баренцевом морях были проведены в июле-сентябре. К сожалению, в это время наши объекты были в посленерестовом состоянии. Это лишило нас возможности определять пол животных, соответственно судить о нарушениях двоякого однородительского наследования (DUI) митохондрий. 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, как считается, эндемичной линией СТС BTN1. Вместо недоступных Канадских мидий мы занялись мидиями 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 СТС у мидий из Японского моря и о теоретических подходах к определению видопринадлежности особей у криптических и гибридизующих видов в симпатрии. Этими статьями мы рассчитываем отчитаться в следующем году.

1.3. На примере коллекционных сборов сельдей из норвежских фиордов Россфиорд,  Балсфиорд (согласно гипотезе, реликтовые формы Clupea pallasii), Трондхеймфиорд (локальная раса норвежской весенненерестующей C. harengus) и беломорской C. pallasii из Кагдалакшского 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 высокой изменчивостью. Комплексный анализ выявляет различия между референсной выборкой C. harengus и тремя другими выборками, что согласуется с гипотезой о видопринадлежности сельдей Россфиорда и Балсфиорда.

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 типирования моллюсков методом KASP. Выборка включала контрольных особей, независимо генотипированых авторами метода во Франции. Всего, отрабатывалось 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.

**Результаты.**

**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 инвазивный видов на земле ([http://www.issg.org/worst100\_species.html](http://www.issg.org/worst100_species.html" \t "https://mail.rambler.ru/folder/INBOX/INBOX_73595/_blank)), угрожающая северным морям России, и описана структура выборки из уникальной гибридной зоны в Норвжском море, где со-существуют и гибридизуют все три вида мидий.**

2.1. Секвенированы транскриптомы 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 особями, объем выборки, пригодной для популяционно-генетического анализа, составил 117 особей. Рис. 2.1.1 и 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, либо отношение секторов на диаграмме Structure при к=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 – гетероплазмики по митохондриям L. balthica и L. rubra в выборках из Гданьского залива и некоторых мурманских популяций.

**Результаты. По мультилокусным данным (больше тысячи несцепленных SNP маркеров, выявленных в транскриптомах) изучены паттерны гибридизации и интрогрессии 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).**

4.1. Проведены эксперименты по культивированию раковых и здоровых гемоцитов мидий, и по «заражению» культуры здоровых гемоцитов больными гемоцитами. Использованы гемоциты одной больной (№ 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 гемолимфа мидий 2020 г.с. были разбавлены 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% эмбриональной бычьей сыворотки (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 (Gerbu, 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.

**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.**

Для анализа вариации морфологических характеристик мидий, существующих в условиях гибридизации, была разработана методика описания формы раковин в соответствии с методологией геометрической морфометрии. Мы использовали мидий собранных в районе города Госейд (Gåseid, Восточная Норвегия), где были представлены моллюски, имеющие генетические маркеры, диагносцирующие все три вида мидий комплекса “Mytilus edulis”: M.edulis (Ed), M.trossulus (Tr) и M.galloprovincialis (Ga). В качестве референсных выборок были использованы мидии, собранные в регионах, где степень гибридизации с другими видами была минимальной. M.trossulus были собраны в районе г. Берген, Норвегия (далее Tr\_ref), M.edulis в районе AR ??? (Ed\_ref). Поскольку M.galloprovincialis широко распространился по всему миру, в качестве референсных были использованы мидии из трех локаций, расположенных за пределами нативного ареала вида (Средиземноморье): из района г. Циндао, Китай (Ga\_ref1), из г. Порту, Португалия (Ga\_ref2), из г. Виго, Атлантическое побережье Испании (Ga\_ref3). Всего было обработано 89 изображений моллюсков, у которых на внутренней поверхности левой створки были нанесены 14 опорных точек (landmarks), которые позволили описать форму раковины и форму системы отпечатков мышц на внутренней поверхности створок (рис. 1). После прокрустова преобразования описанных систем опорных точек, был проведен анализ главных компонент (Рис. 2). Мидии из референсных выборок достаточно хорошо разделяются в морфопространстве первых двух главных компонент, которые описывают 51.1% изменчивости формы. Первая главная компонента демонстрирует градиент формы раковины (Рис. ++) от мидий с более выпуклым брюшным краем (вершиной приподнята к дорзальной поверхности), к “клювовидной” форме, у которой брюшной край слегка вогнутый, а вершина прижата к вентральной поверхности моллюска. Вторая компонента (Рис. 3) описывает вариации в форме и положении отпечатков мышц на внутренней поверхности раковины.

Форма раковин моллюсков в референсных выборках из Европы (Tr\_ref, Ed\_ref, Ga\_ref2 и Ga\_ref3) различается достаточно хорошо (Рис. ++): все Tr\_ref находятся в пределх первого квартиля PC1; большинство Ga\_ref2 и Ga\_ref3 сконцентрировано в области четвертого квартиля PC1; форма раковины Ed\_ref занимает промежуточное положение.

Изменчивость формы раковины мидий из Гасейда (треугольные точки на рис.++), была велика и соизмерима с изменчивостью формы из разных референсных выборок, собранных в географически удаленных друг от друга регионах. Вместе с тем, в среднем, форма раковины у моллюсков разных генотипов оказалась близка к консенсусной (значения PC1 в пределах второго и третьего квартилей). Явного разделения геотипов по форме не выявляется.

Результат: Форма раковины у мидий существующих в условиях гибридизации варьирует в очень широких пределах. При этом форма раковины утрачивает видоспецифические черты, выявляемые при анализе генетически чистых популяций.

Дополнительно мы применили альтернативный подход к изучению морфологической вариации, который базируется на изучении относительных размеров отдельных параметров раковины. То есть мы рассмотрели “классические” морфометрические характеристики (McDonald et al., 1991). Для этого у 16 случайно отобранных мидий, собранных в Гасейде, были измерены 7 наиболее дифференцирующих признаков: ширина (W) и высота раковины (H), длина лигамента (lig), расстояние между передним концом отпечатка заднего ретрактора и спинным краем раковины (dpr), длина отпечатка заднего мускула ретрактора (lpr), длина замковой площадки (hp), длина отпечатка переднего мускула замыкателя (aam). Размеры этих признаков были логарифмированы и отнесены к логарифму длины раковины, как это делалось в работе McDonald et al.(1991).

Мы вычислили матрицу эвклидовых расстояний между всеми изученными мидиями, используя в качестве признаков величины Sructure score. Далее, с помощью процедуры BioEnv (Сlarke & Ainsworth, 1993) было показано, что наилучшей комбинацией морфологических признаков, дающей матрицу эвклидовых расстояний подобную матрице гентических расстояний, вявляется сочетание двух признаков: lig и hp. Оба эти признака имеют значимую корреляцию (Рис. 3) с вероятностью присутствия в геноме аллелей Ga (Structure score). Сходна система корреляций была показана и в работе McDonald et al., 1991.

В качестве маркера генотипа мы использовали Structure score, отражающие веротяность присутствия в генотипе аллелей Ga.