

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ ОСВЕЩЕНИЯ НА НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЫШЕЧНОГО РОСТА МОЛОДИ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (*SALMO SALAR* L.) В УСЛОВИЯХ ЕГО ИСКУССТВЕННОГО ВОСПРОИЗВОДСТВА

© 2022 г. Н. С. Шульгина^а, *, М. В. Кузнецова^а, Н. Н. Немова^а

^аИнститут биологии – обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ

“Карельский научный центр Российской академии наук”, ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

*e-mail: Shulgina28@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

Исследовали влияние двух световых режимов – 16С:8Т (16 ч свет : 8 ч темнота) и круглосуточного (24 ч свет : 0 ч темнота), на темпы роста и уровень экспрессии генов миогенных регуляторных факторов (*Myf5*, *MyoG*, *MyoD1a*, *MyoD1b*, *MyoD1c*), тяжелой цепи миозина (*MyHC*) и паралога миостатина (*MSTN1a* и *MSTN1b*) в мышцах двухлеток атлантического лосося, выращенных в течение 3.5 месяцев (с июля по октябрь) в условиях рыбоводного завода. Контрольная группа состояла из двухлеток лосося, выращиваемых в бассейнах того же завода по стандартной технологии без дополнительного освещения. Несмотря на то, что на конец эксперимента достоверных различий по массе между исследуемыми группами рыб выявлено не было, дополнительное освещение положительно повлияло на продолжительность и интенсивность роста рыб в осенний период при снижении температуры воды. Уровни экспрессии генов *MyHC*, *MyoG*, паралога *MyoD1* и *MSTN1b* были достоверно выше у рыб из экспериментальных групп с дополнительным освещением по сравнению с таковыми у особей в контрольной группе в осенний период. Выявленные межгрупповые различия в одновременной экспрессии исследуемых генов указывают на различия в механизмах регуляции мышечного роста у рыб в зависимости от условий освещения. Установлены закономерности в сезонной динамике уровней экспрессии генов, регулирующих мышечный рост, схожие для групп двухлеток лосося, содержащихся при разных условиях освещения.

Ключевые слова: атлантический лосось, экспрессия миогенных регуляторных факторов, рост, режимы фотопериода

DOI: 10.31857/S0475145022060088

ВВЕДЕНИЕ

Фотопериод является одним из важнейших абиотических факторов, определяющих рост и развитие многих видов живых организмов, в том числе и рыб. Под воздействием света у рыб происходят изменения в работе нейроэндокринной системы, что, в свою очередь, регулирует сроки наступления полового созревания и сезонный характер соматического роста. Так, было показано, что скорость процессов гиперплазии (увеличение количества) и гипертрофии (увеличение размера) мышечных волокон у атлантического лосося снижается в зимние месяцы, когда у рыб снижается аппетит из-за воздействия низких температур и коротких световых дней (Johnston et al., 2003, 2006). Напротив, использование непрерывного освещения в зимние месяцы при искусственном

выращивании атлантического лосося (*Salmo salar* L.) способствует ускорению темпов роста рыб (Nordgarden et al., 2003; Oppedal et al., 2003). В предыдущих исследованиях, проведенных нами на сеголетках и двухлетках атлантического лосося, содержащихся в условиях искусственного воспроизводства, было показано положительное воздействие круглосуточного освещения на темпы роста молоди рыб, что способствовало их более продолжительному росту в осенний период в отличие от особей из контрольных групп без дополнительного освещения (Churova et al., 2020; Shulgina et al., 2021). Помимо стимуляции роста, многие исследования показали, что воздействие удлиненного фотопериода эффективно подавляет раннее половое созревание у лососевых (Guerrero-Tortolero, Bromage, 2008),

что широко используется в аквакультурном разведении лосося (Good et al., 2016).

Несмотря на обширные сведения о влиянии фотопериода на рост и репродуктивный статус рыб, на сегодняшний день не так много исследований, посвященных выяснению молекулярных механизмов, лежащих в основе пластичности роста, связанной с адаптацией к воздействию дополнительного освещения. Тем не менее, было высказано предположение, что сигнальные пути, регулирующие пролиферацию и дифференцировку миогенных клеток-предшественников, ответственных за формирование мышечных волокон, чувствительны к воздействию факторов окружающей среды (Johnston et al., 2003). Так, в ряде работ было показано, что изменение таких факторов, как температура, питание и фотопериод, влияет на экспрессию генов, кодирующих белки – миогенные регуляторные факторы (МРФ), которые регулируют миогенез и рост мышц у рыб (Johnston, 2006; Chapalamadugu et al., 2009; Nagasawa et al., 2012). Результаты проведенных нами ранее исследований выявили вариации уровней экспрессии генов мышечных белков у разновозрастной молоди лосося связанные с воздействием на рыб дополнительного искусственного освещения разной продолжительности (Churova et al., 2020; Shulgina et al., 2021). Было высказано предположение, что существуют различия в механизмах регуляции мышечного роста у рыб в зависимости от условий освещения.

Изменение экспрессии ряда генов миогенных регуляторных факторов, так называемых транскрипционных факторов регуляции миогенеза семейства bHLH – *MyoD*, *Myf5*, *миогенина (MyoG)* и *MRF4*, играет ключевую роль в процессе формирования и роста мышечных волокон на протяжении всего жизненного цикла рыб (Watabe, 2001). На начальных этапах миогенеза высокая экспрессия *MyoD* и *Myf5* активирует миобласты, что способствует их пролиферации и последующей гиперплазии мышечных клеток. Экспрессия *миогенина* и *MRF4* наиболее выражена на стадии дифференцировки миобластов и связана с гипертрофией мышечных волокон, когда мышечные трубки сливаются с образованием новых миофибрилл (Johansen, Overturf, 2005). Последовательная экспрессия миогенных регуляторных факторов приводит к экспрессии генов структурных мышечных белков, в том числе гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*). Тяжелая цепь миозина – важный функциональный и структурный домен молекулы наиболее распространенного мышечного белка миозина и, как следствие, экспрессия *MyHC* является одним из ключевых факторов, определяющих развитие скелетных мышц (Ahammad et al., 2019). Кроме того, в регуляции развития и роста мышечных волокон участвует член суперсемейства трансформирующих факторов роста β (*TGF β*) –

миостатин, который специфически продуцируется в скелетных мышцах и ингибирует пролиферацию и дифференцировку миобластов, в том числе за счет подавления экспрессии генов МРФ (Thomas et al., 2000; Østbye et al., 2007).

Изучение характера экспрессии вышеперечисленных генов в мышцах рыб, выращенных в условиях варибельности внешних факторов – фотопериода и температуры среды, позволит охарактеризовать молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляции мышечного роста рыб и, как следствие, их темпов роста, при адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. Эти данные могут иметь значение для разработки научно-обоснованных подходов при использовании дополнительного освещения на рыбоводных заводах и предприятиях аквакультуры с целью улучшения роста и повышения жизнеспособности выращиваемой молоди атлантического лосося.

В связи с вышесказанным была проведена настоящая работа с целью оценить характер экспрессии генов, контролирующих развитие и рост мышц, и темпы роста у двухлеток атлантического лосося, содержащихся при воздействии искусственного освещения разной продолжительности – 16-ти часового и круглосуточного (24 часа), в условиях рыбоводного завода в летне-осенний период. Исследование было направлено на выявление изменений темпов роста и уровней экспрессии генов миогенных регуляторных факторов (*Myf5*, *MyoG*, паралога *MyoD1: MyoD1a*, *MyoD1b* и *MyoD1c*), паралога *миостатина: MSTN1a* и *MSTN1b*, а также тяжелой цепи миозина (*MyHC*), у молоди лосося в зависимости от воздействия на рыб разных режимов освещения и сезонных колебаний условий выращивания (главным образом, температуры воды).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Описание эксперимента

Эксперимент по влиянию двух световых режимов – 16С:8Т (16 ч свет : 8 ч темнота) и круглосуточного 24С:0Т (24 ч свет : 0 ч темнота), на рост и экспрессию генов, регулирующих миогенез, у двухлеток (1+) атлантического лосося (*Salmo salar* L.), проводился на Выгском рыбоводном заводе (пос. Сосновец, Беломорский район, Россия, 64°25' с.ш. и 34°28' в.д.). Молодь лосося, содержащаяся на Выгском рыбзаводе, была искусственно выведена из икры, полученной от диких производителей, и подрошена до двухлетнего возраста, после чего был поставлен эксперимент. Продолжительность эксперимента составила 3.5 мес. – с 9 июля по 26 октября. Рыба содержалась в бассейнах размером 2 × 2 метра и объемом воды 720 л. Водоснабжение бассейнов было проточным с использованием воды, поступающей с Маткожнен-



Рис. 1. Температура воды в период с июля по октябрь.

ского водохранилища (река Нижний Выг) со скоростью потока 60 л мин^{-1} . В связи с этим исследование проводилось при естественной сезонной динамике температуры воды, которая является оптимальной для роста и развития молоди атлантического лосося. Колебания температуры за период исследования составили: в июле $14.8\text{--}19.9^\circ\text{C}$, в августе $18.2\text{--}13.8^\circ\text{C}$, в сентябре $13.8\text{--}9.8^\circ\text{C}$, в октябре $9.8\text{--}2.4^\circ\text{C}$ (рис. 1).

Для каждой группы рыб было отведено по два бассейна. Одна группа (№ 1) была контрольной — без дополнительного освещения. Рыбы в контрольной группе содержались в бассейнах при естественном освещении, поступающем из окон, в течение июля и первой половины августа, при этом интенсивность освещения у поверхности воды составляла 12 люкс днем и 2 люкс ночью. Со второй половины августа в цехе, где располагались бассейны, было включено освещение с 5-ти вечера до 8-ми ч утра на 1 мес. Лампы располагались по бокам на стенах здания. Интенсивность освещения на поверхности воды в центральной части бассейнов составляла 10 люкс днем и 8 люкс ночью. Затем, начиная с 10 сентября, свет был включен постоянно, при этом интенсивность освещения у поверхности воды была неравномерной, 8 люкс в центральной части бассейнов. Во второй группе (№ 2) соблюдался режим освещения $16\text{C}:8\text{T}$ (16 ч свет, 8 — темнота). Поддержание цикла свет-темнота в течение суток происходило автоматически с помощью розеток-таймеров (Feron TM-50). В третьей группе (№ 3) освещение было круглосуточным $24\text{C}:0\text{T}$ (24 ч). Экспери-

ментальные бассейны (группы 2 и 3) были оборудованы двумя светодиодными светильниками (Aquaelleddy smart LED sunny, 6W, 6500K), расположенными на стенках бассейнов по диагонали друг к другу, и накрыты черной, не пропускающей свет, пленкой. Интенсивность освещения составляла 760 люкс на поверхности воды под светодиодными светильниками и 400 люкс вокруг них, 45 люкс на противоположной стороне от светильников и 70 люкс в центральной части бассейна.

Все остальные условия содержания рыб во всех бассейнах каждой группы были одинаковыми: плотность посадки (≈ 1245 особей на бассейн), режим кормления и корм, профилактические меры и уход за бассейнами. Рыбу кормили коммерческим кормом Biomar Inicio 917 (Biomar, Дания) в соответствии с рекомендациями рыбоводного завода, которые зависели от колебаний температуры воды. Рыбу кормили с помощью автоматических кормушек в следующем режиме: каждые 20–30 с с 6-ти ч утра до 22 ч вечера в июле и августе, затем каждые 40–45 с с 9-ти ч утра до 18-ти ч вечера в сентябре и октябре.

В начале исследования рыбы в каждом бассейне (в количестве 160 особей/бассейн) были помечены с помощью чипов (Felixcan SL, Испания). Для этого рыбы были усыплены при помощи гвоздичного масла. После измерения массы и длины (по Смитту) тела, рыбе вводили чип с индивидуальным номером. Чипировали особей среднего размера в пределах массы 7–14 г. Средняя масса рыб, отобранных в начале эксперимента (9 июля), в каждом бассейне была одинаковой

Таблица 1. Размерно-весовые характеристики особей атлантического лосося, взятых на молекулярно-генетический анализ

Дата	Режим освещения	<i>n</i> , шт	Средняя масса, г	Средняя длина (АС), см
09 июля	Контроль	7	10.21 ± 0.70	9.94 ± 0.17
	16С:8Т	7	10.04 ± 0.66	9.59 ± 0.18
	24С:0Т	7	10.10 ± 0.61	9.73 ± 0.22
08 августа	Контроль	8	20.75 ± 1.33	11.45 ± 0.26
	16С:8Т	8	17.60 ± 1.14	11.04 ± 0.19
	24С:0Т	8	19.46 ± 1.30	11.36 ± 0.21
05 сентября	Контроль	8	27.04 ± 1.45	13.06 ± 0.29
	16С:8Т	8	26.58 ± 2.17	13.03 ± 0.37
	24С:0Т	8	26.80 ± 1.94	13.08 ± 0.31
05 октября	Контроль	10	28.52 ± 2.02	13.69 ± 0.36
	16С:8Т	10	26.23 ± 1.25	13.05 ± 0.25
	24С:0Т	10	28.78 ± 1.88	13.83 ± 0.33
26 октября	Контроль	7	29.37 ± 2.87	13.74 ± 0.55
	16С:8Т	7	26.57 ± 2.40	13.90 ± 0.41
	24С:0Т	7	29.26 ± 2.48	13.74 ± 0.35

и составила 10.20 ± 0.13 г (группа 1 – контроль), 10.25 ± 0.15 г (группа 2 – 16С:8Т), 10.16 ± 0.15 г (группа 3 – 24С:0Т). Далее раз в месяц в день отбора проб (8 августа, 5 сентября, 5 октября, 26 октября) проводили замеры 30–40 чипированных рыб из каждой исследуемой группы. В дальнейшем эти данные использовали для расчета прироста массы и темпов роста рыб. Удельный темп роста определяли как $УТР (\% \cdot \text{день}^{-1}) = [(\ln \text{конечный вес} - \ln \text{начальный вес}) / n \text{ дней}] \times 100$.

Образцы эпаксиальных (белых) мышц для молекулярно-генетического анализа отбирали у рыб после измерения их массы и длины тела в начале эксперимента (9 июля) и затем каждый месяц (8 августа, 5 сентября, 5 октября, 26 октября). Образцы замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до начала анализа. Размерно-весовые характеристики рыб, взятых на анализ, представлены в виде $M \pm SE$ в табл. 1.

Экспрессия исследуемых генов

Тотальная РНК была выделена из образцов эпаксиальных (белых) скелетных мышц рыб с использованием набора “RNA-extract”, аналога TRIzol (Евроген, Россия), в соответствии с протоколом производителя. Затем суммарную РНК обрабатывали ДНКазой (Силекс, Россия). Целостность и качество РНК оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и спектрофотометрически при коэффициенте поглощения 260/280 нм (Nano-Photometer C40-Touch, Implen, Германия). РНК подвергали обратной транскрипции с использо-

ванием MMLV-обратной транскриптазы и случайных гексонуклеотидов (Евроген, Россия). В дальнейшем синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Уровень экспрессии мРНК исследуемых генов определяли методом ПЦР-РВ (Зорина, 2012). Анализ проводили с использованием системы CFX96 Touch system (BioRad, США). Праймеры для гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*), референсного гена (фактора элонгации-1 (*Ef-1 α*)), генов миогенных регуляторных факторов (*миогенина* (*MyoG*), паралога *MyoD1* (*MyoD1a*, *MyoD1b*, *MyoD1c*), *Myf5*), а также паралога *миостатина* (*MSTN1a* и *MSTN1b*), подбирали с помощью программы Nucleotide BLAST. Праймеры были синтезированы компанией “Евроген” (Россия). Последовательности праймеров приведены в табл. 2. Амплификацию 2 мкл кДНК (разведение 1 : 5) проводили с использованием 5 мкл набора “5 \times Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I” (Евроген, Россия). Протокол ПЦР был следующим: денатурация ДНК в течение 5 минут при 95°C ; повторяющиеся циклы (42): денатурация ДНК в течение 20 с при 95°C , отжиг праймеров в течение 30 с при 60°C и элонгация ДНК в течение 30 с при 72°C . Каждый образец был загружен в трех повторностях на одной планшете. Специфичность реакции ПЦР и присутствие димеров праймеров проверяли по кривым плавления, полученным в соответствии с протоколом диссоциации от 65°C до 97°C . Стандартные кривые, соответствующие

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, используемые для амплификации в ПЦР-РВ

Ген	Последовательность 5'–3'	Размер ампликона, п.о.	Номер в GenBank
<i>EF-1a</i>	F: TTGCTGGTGGTGTGGTGAG R: AAACGCTTCTGGCTGTAGGG	154	AF321836.1
<i>MyoG</i>	F: GTGGAGATCCTGAGGAGTGCC R: CTCACCTCGACGACGAGACC	147	DQ452070
<i>MyoD1a</i>	F: TGGACTGCCTATCAAACATCC R: TCTCACTCGCTATGGAACC	123	AJ557148
<i>MyoD1b</i>	F: ATTTCTGTTCCCTGTCCACCTCTG R: ATGTGTTCTGTTCTTCTGTAATGG	152	AJ557150
<i>MyoD1c</i>	F: ACGGCGAAAATACTACTACCCTTC R: TAGCTGCTTCGTCTTGCGGA	133	DQ366709.1
<i>Myf5</i>	F: ACGCCATCCAGTACATCGAG R: AGTCAACCATGCTGTCGGAG	132	DQ452070
<i>MyHC</i>	F: TCTCATCCATAGACGCCATC R: AGTTGACTGCCAAGAAGAGG	159	DN164736
<i>MSTN1a</i>	F: GATTACACGCCATCAAGTCC R: CTCATCCTTATTGTCATCTCC	159	AJ344158
<i>MSTN1b</i>	F: TCTGAGTTTTATGGTTGCTTTCGG R: TTGTGACTTGATGGCGTGAATC	151	NM_001123634.1

Последовательности прямого (F) и обратного (R) праймеров (5'–3'), п.о. – пары оснований; *EF-1a* – фактор элонгации 1a (референсный ген); *Myf5* – фактор миогенеза 5; *MyoD1* – фактор детерминации миообластов 1; *MyoG* – миогенин; *MyHC* – тяжелая цепь миозина; *MSTN* – миостатин.

пятикратной серии разведений смеси кДНК всех образцов, позволили рассчитать эффективность ПЦР. Относительные уровни экспрессии исследуемых генов определяли методом порогового цикла (Ct) и нормализовали по уровню экспрессии референсного гена фактора элонгации (*Ef-1a*) с использованием метода $2^{-\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Данные выражали в единицах относительной экспрессии мРНК исследуемого гена.

Полученные данные были обработаны общепринятыми методами вариационной статистики (Ивантер, Коросов, 2010). Данные были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилкса. Многофакторный дисперсионный анализ MANOVA был применен для оценки степени влияния факторов (дополнительного освещения и даты отбора проб) на уровни экспрессии исследуемых генов. Для сравнения выборок по исследуемым показателям использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, различия оценивали по критериям Манна–Уитни и Тьюки. Различия считали достоверными при $p < 0.05$ (Коросов, Горбач, 2007). Для изучения взаимосвязи между значениями экспрессии генов использовался корреляционный анализ Пирсона. Для изучения взаимосвязи между уровнем экспрессии генов и размерами особей, а также между уровнем экспрессии генов и

темпами роста рыб, использовался регрессионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Масса и темпы роста рыб

Согласно результатам проведенного исследования прирост по массе двухлеток лосося за июль–октябрь составил 19.7 ± 1.5 г в 1 группе (контроль), 17.6 ± 1.3 г во 2 группе (16С:8Т) и 18.2 ± 1.1 г в 3 группе (24С:0Т). На конец эксперимента достоверных отличий по массе особей между группами, выращенными в разных условиях освещения, установлено не было. Тем не менее, двухлетки лосося из контрольной группы (1), содержащиеся без дополнительного освещения, были больше по массе по сравнению с особями из двух других групп – с режимами освещения 16С:8Т (2) и 24С:0Т (3), в августе и начале сентября (рис. 2, $p < 0.05$) (частично данные опубликованы Nemova et al., 2020). Установленные различия между группами наблюдались также и по удельным темпам роста (УТР) в августе (рис. 3, $p < 0.05$). Кроме того, в начале эксперимента масса и темпы роста у рыб во 2 группе с режимом 16С:8Т были ниже в сравнении с таковыми у рыб из группы с круглосуточным освещением (3) ($p < 0.05$). Можно предположить, что относительно более низкие значения массы и УТР у рыб из групп с дополни-

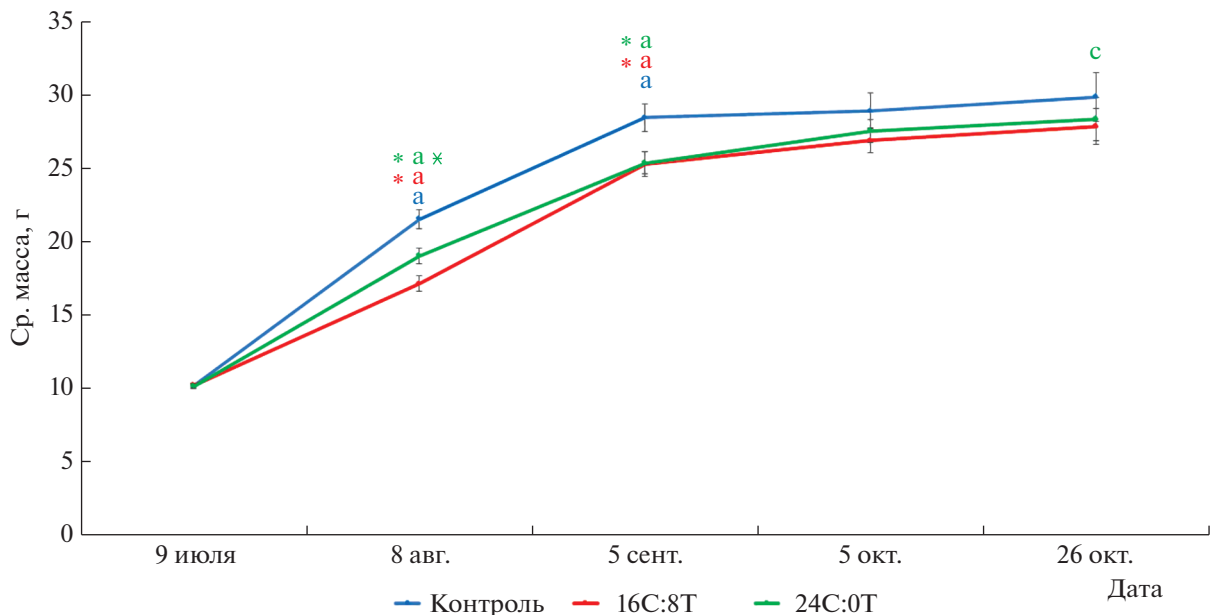


Рис. 2. Средняя масса двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения: Контроль (без дополнительного освещения), 16C:8T (16 ч/сут – свет, 8 ч/сут – темнота), 24C:0T (круглосуточное освещение 24/сут). * – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$), * – различия достоверны по сравнению с группой 2 с режимом освещения 16C:8T ($p < 0.05$), а – различия достоверны по сравнению с данными, полученными в предыдущий месяц ($p < 0.05$), с – различия в группе с постоянным освещением достоверны по сравнению с данными, полученными 5 сентября ($p < 0.05$).

тельным освещением в начале эксперимента связаны с реакцией на введение новых условий и необходимостью адаптации к ним. Ранее в исследованиях, проведенных на атлантическом лососе, было показано, что экспериментальное изменение условий фотопериода вызывает у рыб в начальный период своего воздействия стрессовую реакцию, в результате которой у них происходит снижение аппетита и темпов роста (Nordgarden et al., 2003; Oppedal et al., 2003). В работе, проведенной на молоди атлантической трески, которую содержали при постоянном освещении или в условиях естественного фотопериода, достоверные отличия по массе между группами были установлены только на 4-ый месяц исследования (Nagasawa et al., 2012), при этом масса у рыб из группы с постоянным освещением была больше на 13.3%. Вероятно, из-за периода адаптации рыб к новым световым условиям требуется более продолжительный период воздействия дополнительного освещения для проявления подобного стимулирующего роста эффекта. Необходимо отметить, что в аналогичном эксперименте, проведенном нами на сеголетках (0+) атлантического лосося, различия по массе рыб между контрольной группой и группой, содержащейся при постоянном освещении, в пользу последней, наблюдались уже в первый месяц исследования и сохранялись вплоть до конца экспериментального периода (Churova et al., 2020). Это указывает на возраст-

ные особенности пластичности роста рыб при их адаптации к новым условиям освещения. При сравнении результатов настоящей работы с данными нашего предыдущего исследования, проведенного на двухлетках лосося, которых содержали при круглосуточном освещении с мая, обращает на себя внимание то, что рыбы на всем протяжении эксперимента были больше по массе в отличие от особей из контрольной группы без дополнительного освещения (Shulgina et al., 2021). Вероятно, дополнительное освещение, включенное на два месяца раньше, нежели в настоящей работе, оказало более благоприятное воздействие на рост рыб, поскольку такое удлинение светового дня имитировало увеличение количества световых часов в весенне-летний период в естественной среде обитания лосося.

На протяжении периода исследования средняя масса рыб во всех трех группах достоверно повышалась вплоть до начала осени (5 сентября) ($p < 0.05$). В осенний период наблюдалось снижение темпов роста у рыб из всех исследуемых групп ($p < 0.05$). Тем не менее, в начале сентября рыбы из 2 группы по УТР достоверно превышали особей из двух других групп. У особей лосося из контрольной группы установлено наибольшее снижение темпов роста в течение сентября и октября в отличие от рыб из групп с дополнительным освещением, которые в этот период продолжали расти и достигли той же массы, что и рыбы из

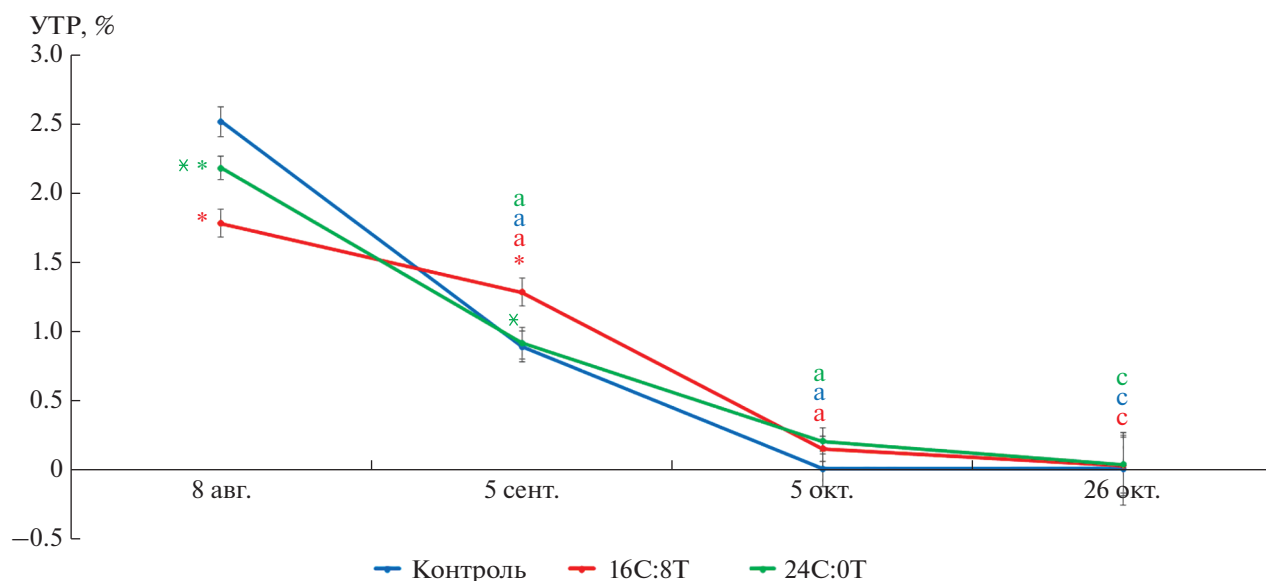


Рис. 3. Удельные темпы роста (УТР) (% день⁻¹) двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 2.

первой группы. При этом на конец эксперимента (спустя 3.5 мес.) средняя масса у особей в группе с постоянным освещением (3) была достоверно больше по сравнению с данными на начало сентября ($p < 0.05$). Полученные результаты можно объяснить с точки зрения влияния на рыб двух факторов. Замедление темпов роста двухлеток лосося в осенний период, вероятно, является результатом снижения аппетита у рыб, вызванного сезонным снижением температуры воды. В то же время различия по темпам роста между группами, а также наибольший прирост массы тела у особей из опытных групп (2 и 3) могут быть связаны с воздействием на рыб дополнительного освещения. Необходимо отметить, что подобные межгрупповые различия относительно прироста массы тела рыб к концу экспериментального периода на фоне замедления их темпов роста в осенний период были получены нами и в других исследованиях, проведенных на сеголетках и двухлетках атлантического лосося (Churova et al., 2020; Shulgina et al., 2021). Как было показано ранее, искусственное увеличение продолжительности периода освещения позволяет продлить период активного питания рыб, а также влияет на нейроэндокринную систему, что стимулирует пищевое поведение и способствует расходованию поступающих ресурсов преимущественно на процессы роста (Handeland et al., 2003; Nordgarden et al., 2003). Экспериментальные исследования, проведенные на лососевых видах рыб, подтверждают стимулирующее рост воздействие как удлиненного фотопериода, так и постоянного режима освещения (Johnston et al., 2003; Noori et al., 2015).

Таким образом, в нашем исследовании дополнительное освещение в группах 2 и 3 повлияло на продолжительность роста рыб в осенний период при снижении температуры воды. Необходимо отметить, что искусственное освещение экспериментальных бассейнов не повлияло на смертность двухлеток лосося за исследуемый период (погибших рыб выявлено не было, также как и в контрольной группе).

Экспрессия генов

Межгрупповые отличия в уровнях экспрессии исследуемых генов. Согласно полученным данным уровни экспрессии всех исследуемых генов в мышцах молоди атлантического лосося имели сезонную динамику и изменялись на протяжении всего эксперимента. Наряду с этим уровни экспрессии генов тяжелой цепи миозина (*MyHC*), *MyoG* и *MyoD1b* менялись в зависимости от используемого режима освещения.

Достоверные различия в уровнях экспрессии генов, регулирующих мышечный рост, между группами рыб, содержащимися в разных условиях освещения, были выявлены уже в первый месяц исследования (август). Так, у двухлеток лосося из группы с постоянным освещением (3) были выявлены достоверно более высокие уровни экспрессии гена *MyoG* по сравнению с таковыми у рыб в группе с режимом освещения 16C:8T (2) (рис. 4, $p < 0.05$), а также генов *MyoD1b* (рис. 5, $p < 0.05$) и *MyoD1a* (рис. 6, $p < 0.05$) по сравнению с таковыми у особей из контрольной группы (1). Высокие уровни экспрессии этих генов у молоди рыб могут быть связаны с интенсивно идущими процессами ги-

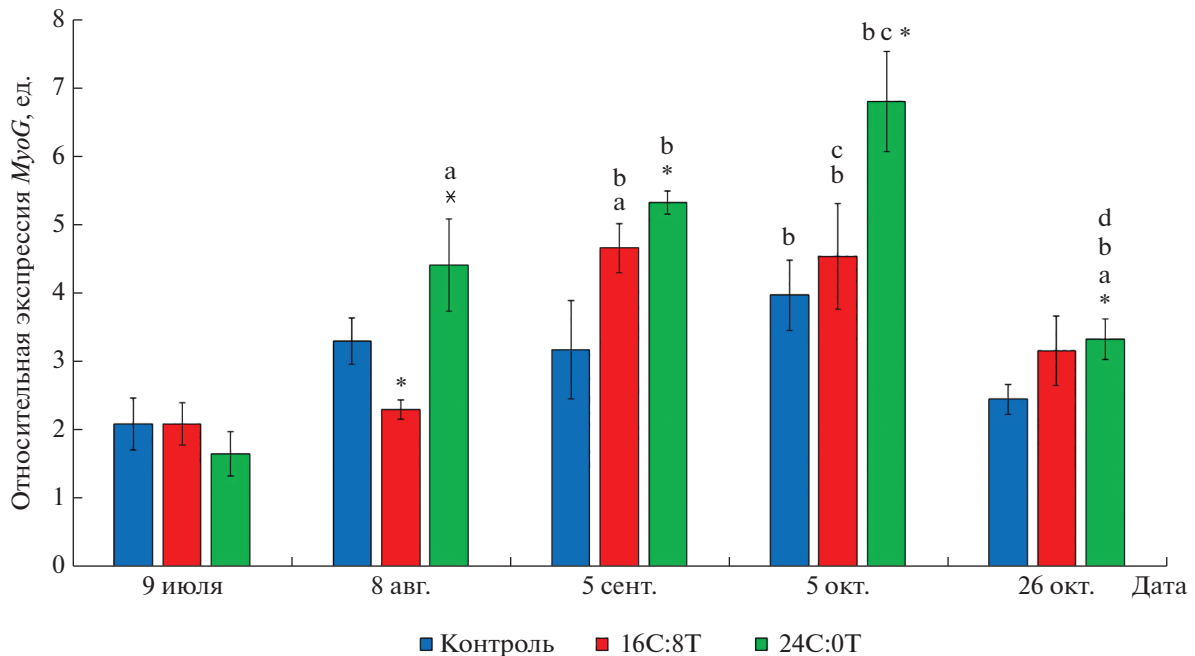


Рис. 4. Относительная экспрессия гена *MyoG* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения: Контроль (без дополнительного освещения), 16C:8T (16 ч/сут – свет, 8 ч/сут – темнота), 24C:0T (круглосуточное освещение 24 ч/сут). * – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$), * – различия достоверны по сравнению с группой 2 с режимом освещения 16C:8T ($p < 0.05$), а – различия достоверны по сравнению с данными, полученными в предыдущий месяц ($p < 0.05$), b – различия достоверны по сравнению с данными, полученными 9 июля ($p < 0.05$), c – различия достоверны по сравнению с данными, полученными 8 августа ($p < 0.05$), d – различия достоверны по сравнению с данными, полученными 5 сентября ($p < 0.05$).

перплазии и гипертрофии мышечных волокон. Так, ранее было показано (Johansen, Overturf, 2005), что уровень экспрессии генов, регулирующих миогенез (*MyoD*, *Myf5*, *MyoG* и *Mrf4*), коррелирует с механизмами роста мышц во время развития радужной форели. При этом, на ранних стадиях мышечного роста увеличение уровней экспрессии *MyoD* и *Myf5* в недифференцированных миогенных клетках-предшественниках (МКП) напрямую связано с их интенсивной пролиферацией и последующей клеточной гиперплазией (образованием миотуб и их дифференцировкой в новые мышечные волокна). *MyoG* и *Mrf4* экспрессируются позже и связаны с терминальной дифференцировкой и слиянием миобластов с существующими миофибриллами в процессе гипертрофии мышечных волокон (увеличения числа ядер, способствующих синтезу дополнительных миофибрилл) (Johansen, Overturf, 2005). Экспрессия *MyoG* индуцирует выход МКП из клеточного цикла, удлинение миофибрилл, сборку саркомеров и образование функциональной сократительной мускулатуры, а отсутствие экспрессии гена этого МРФ, напротив, предотвращает слияние миоцитов и приводит к образованию одноядерных мышечных волокон, как было показано на эмбрионах и личинках данио рерио (*Danio rerio*) (Ganassi et al., 2018), а также в исследованиях на клеточных культурах

миобластов, полученных из мышц радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) (Rescan et al., 1995), атлантического лосося (*Salmo salar*) (Bower and Johnston, 2010) и дорады (*Sparus aurata*) (Codina et al., 2014). Межгрупповые различия в уровнях экспрессии МРФ, выявленные в нашей работе, согласуются с результатами исследования, в котором воздействие непрерывного освещения, в отличие от естественного режима фотопериода, способствовало увеличению экспрессии генов МРФ – *rax7*, *Myf5* и *MyoG* в мышцах молоди атлантической трески, сопровождающемуся усилением роста рыб (Nagasawa et al., 2012).

Установлены достоверные отличия по уровню экспрессии гена *MyoG* между группами 1 (контроль) и 2 (с режимом 16C:8T) в пользу контрольной в августе (рис. 4, $p < 0.05$). Как было показано ранее на эмбрионах и взрослых особях камбалы, сравнительно высокий уровень *MyoG* может свидетельствовать о том, что большинство мышечных клеток находится на стадии дифференцировки, а не пролиферации (Zhang et al., 2010). Поскольку уровень экспрессии мРНК *MyoG* положительно коррелировал с массой рыб во всех исследуемых группах (в период с июля по октябрь) (табл. 4, $p < 0.05$), можно предположить, что наиболее низкие значения экспрессии этого гена у особей лосося, выращенных в условиях режима 16C:8T, отражают более

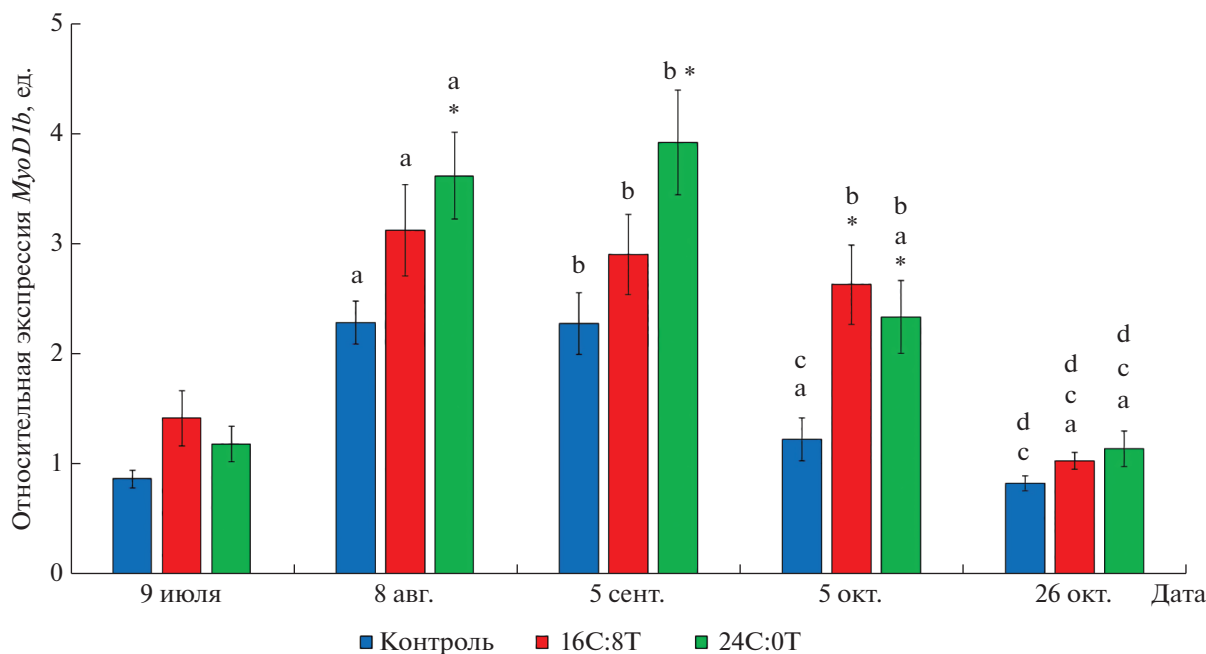


Рис. 5. Относительная экспрессия гена *MyoD1b* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

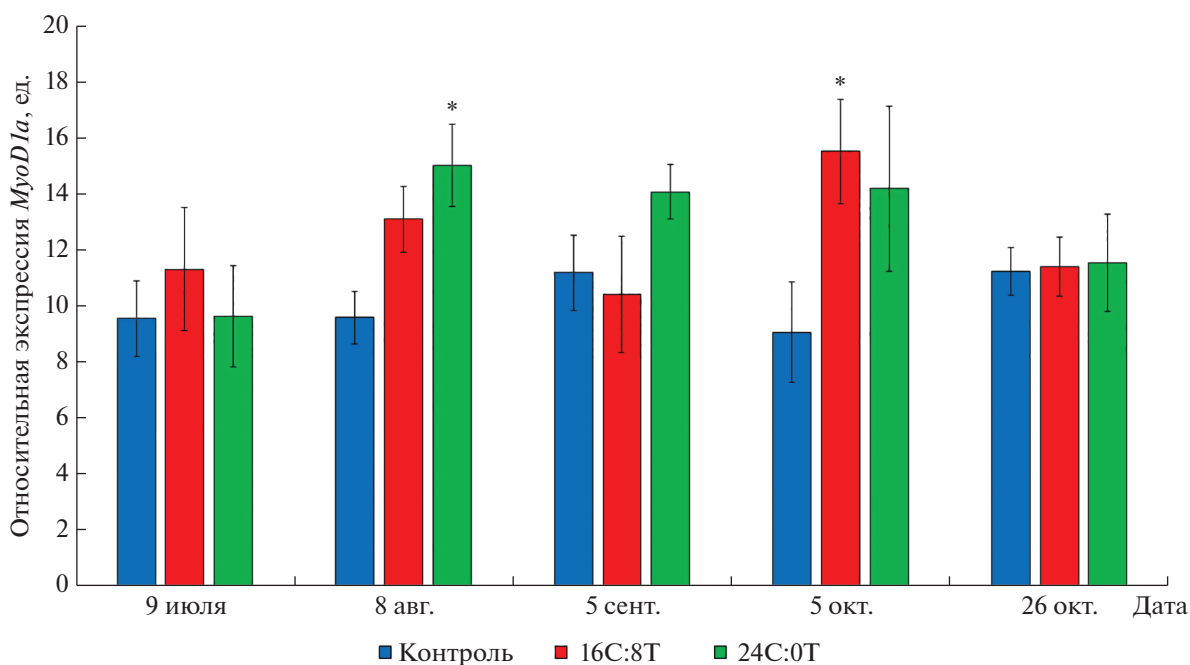


Рис. 6. Относительная экспрессия гена *MyoD1a* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

выраженное снижение прироста мышечной массы у этой группы рыб по сравнению с другими в начале эксперимента.

Таким образом, выявленные межгрупповые отличия в экспрессии исследуемых генов в мыш-

цах особей лосося в начале эксперимента указывают на различия в механизмах мышечного роста у рыб в зависимости от режима освещения. Необходимо отметить, что в опубликованных нами ранее исследованиях, проведенных на семголетках и

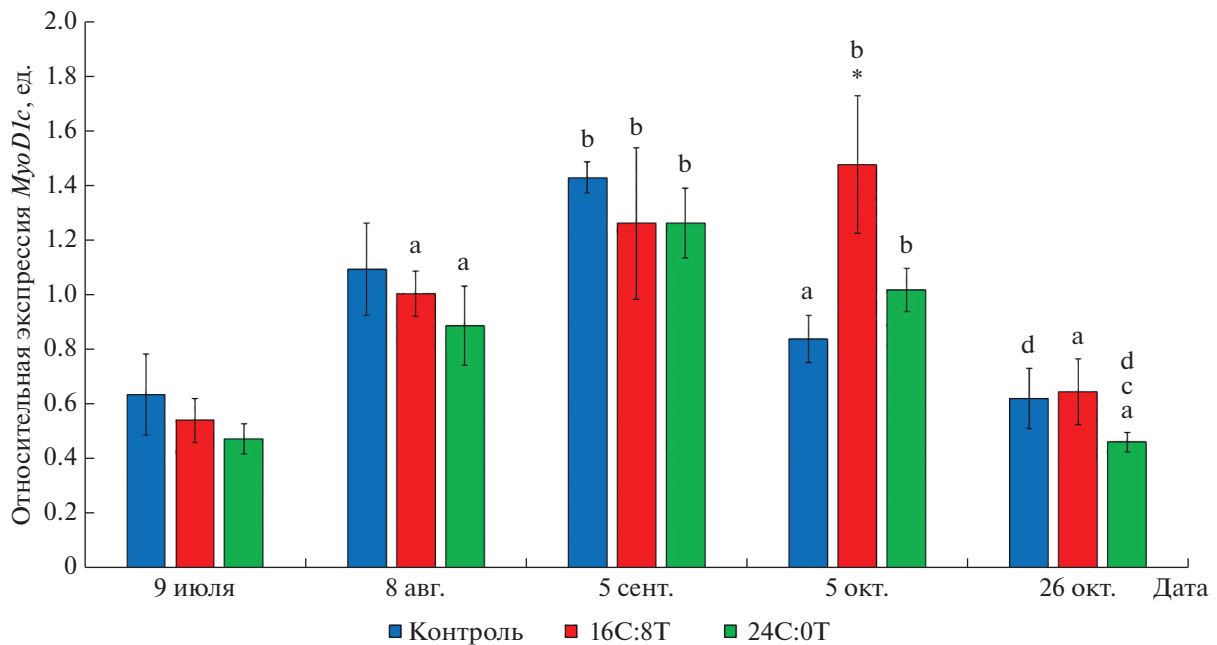


Рис. 7. Относительная экспрессия гена *MyoD1c* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

двухлетках атлантического лосося, также была показана зависимость уровней экспрессии генов *MyoG* и *MyoD1b* от используемого режима освещения (Churova et al., 2020; Shulgina et al., 2021).

На протяжении эксперимента у двухлеток лосося, содержащихся при постоянном освещении (группа 3), наблюдались достоверно более высокие уровни экспрессии гена *MyoG* (в период с начала сентября и вплоть до конца эксперимента) (рис. 4, $p < 0.05$), а также гена *MyoD1b* (в начале сентября и октября) по сравнению с таковыми у рыб из контрольной группы (рис. 5, $p < 0.05$). Подобные различия по уровню экспрессии гена *MyoG* между группами с естественным режимом фотопериода и с постоянным освещением в пользу последней наблюдались на протяжении всего эксперимента (до 120 дней), проведенного на молоди атлантической трески, и сопровождались повышением темпов роста рыб (Nagasawa et al., 2012).

Уровни экспрессии мРНК паралога *MyoD1* – *MyoD1a*, *MyoD1b* и *MyoD1c* были выше у особей лосося в группе с режимом освещения 16C:8T (2) по сравнению с таковыми у рыб из контрольной группы в начале октября (рис. 5, 6, 7, $p < 0.05$). В исследовании на молоди паку (*Piaractus mesopotamicus*) было показано, что относительно более высокие уровни экспрессии гена *MyoD* могут быть связаны с преобладающим гиперпластическим механизмом роста мышц (Almeida et al., 2008). У лососевых в результате двухэтапной дупликации генома образовалось три функциональных

паралога гена *MyoD1*, которые отличаются друг от друга характером экспрессии в процессе развития рыб. Было высказано предположение, что *MyoD1c* возник в результате дупликации *MyoD1b* и эти гены в своей структуре имеют сходные регуляторные элементы (Macqueen, Johnston, 2006). На культурах клеток, выделенных из белых скелетных мышц атлантического лосося, было показано, что паралоги *MyoD* различаются на уровне регуляции транскрипции во время пролиферации и дифференцировки МКП. Так, экспрессируясь последовательно, гены *MyoD1c* и *MyoD1b* регулируют клеточный цикл миобластов, тогда как экспрессия *MyoD1a* сильно коррелирует с *MyoG* во время формирования миотуб, что говорит о том, что этот паралог участвует в терминальной дифференцировке мышечных клеток (Bower, Johnston, 2010).

Таким образом, установленные в нашей работе различия в уровнях экспрессии исследуемых МРФ в мышцах рыб из экспериментальных и контрольных бассейнов могут указывать на разное состояние мышечных клеток, формирующих новые волокна. Вероятно, относительно более высокие уровни экспрессии генов *MyoD1b* и *MyoG* у рыб из группы 3, а также паралога *MyoD1* в мышцах рыб из группы 2, свидетельствуют об интенсификации процессов пролиферации и дифференцировки мышечных клеток, что способствует росту мышц как посредством гиперпластического, так и гипертрофического механизмов.

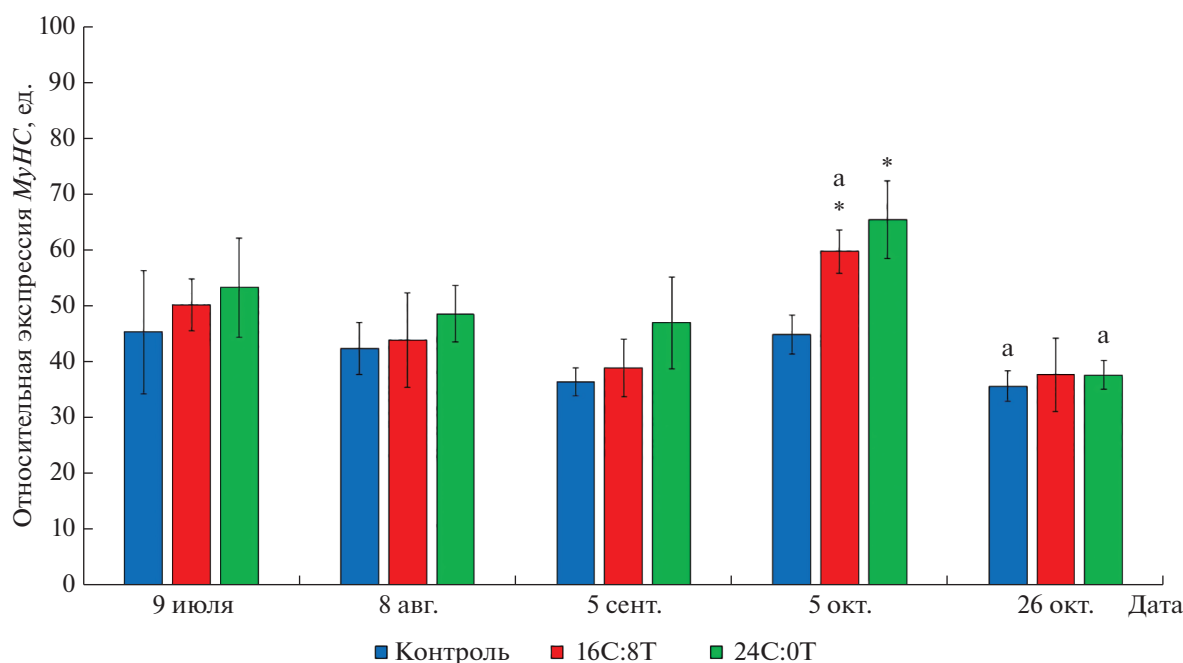


Рис. 8. Относительная экспрессия гена *MyHC* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

Уровень экспрессии гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*) был выше ($p < 0.05$) в мышцах рыб из экспериментальных групп с дополнительным освещением (16C:8T и 24C) по сравнению с таковыми у особей из контрольной группы в начале октября (рис. 8, $p < 0.05$). Вероятно, эти различия вызваны более высокими уровнями экспрессии генов МРФ на протяжении эксперимента у двухлеток лосося в группах с дополнительным освещением по сравнению с таковыми у рыб из контрольной группы. Как было показано ранее, последовательная экспрессия миогенных регуляторных факторов приводит к экспрессии генов структурных мышечных белков, включая ген тяжелой цепи миозина (*MyHC*) (Ahammad et al., 2019). Повышенный уровень транскриптов генов *MyoG* и *Mrf4* на этапе дифференцировки миобластов в присутствии миотуб коррелировал с высокой экспрессией генов тяжелой цепи миозина и десмина в исследовании на культуре клеток мышц дорады *Sparus aurata* (Codina et al., 2014). Тяжелая цепь миозина является наиболее важным функциональным и структурным доменом молекулы миозина – основного мышечного белка, и, как следствие, ключевым определяющим фактором развития скелетных мышц (Ikeda et al., 2007). В другой работе было показано, что, когда скорость синтеза белка превышает скорость его деградации, это приводит к увеличению размеров мышечных волокон и, как следствие, к гипертрофическому росту мышц (Fuentes et al., 2013). Кроме того, уровень экспрессии гена тяжелой цепи миозина

(*MyHC*) является показателем, отражающим темпы прироста мышечной массы у рыб (Невроу et al., 2006; Чурова и др., 2015). В нашем исследовании, проведенном на сеголетках лосося, были установлены аналогичные различия в уровне экспрессии *MyHC* у особей из контрольной группы и группы с постоянным освещением, которые отражали различия по массе рыб (Churova et al., 2020). Кроме того, в предыдущей работе на двухлетках лосося нами была показана положительная взаимосвязь массы рыб с уровнем экспрессии гена тяжелой цепи миозина, который изменялся в зависимости от используемого режима освещения (Shulgina et al., 2021). Учитывая вышесказанное, полученные в настоящей работе результаты по уровню экспрессии гена *MyHC* могут указывать на то, что дополнительное освещение оказывает положительный эффект на прирост мышечной массы у двухлеток лосося и способствует более продолжительному росту в осенний период при снижении температуры воды, что согласуется с данными по массе рыб в этот период. Отсроченное увеличение массы тела, наблюдаемое у рыб из групп 2 и 3 в начале эксперимента, вероятно, отражает время, необходимое для гипертрофии мышечных волокон, образующихся после адаптации рыб к стрессовому воздействию дополнительного освещения. Подобная задержка ростостимулирующих эффектов непрерывного освещения была отмечена ранее у смолтов атлантического лосося (Johnston et al., 2003). Тем не менее, авторы этого исследования выявили, что непрерывное освеще-

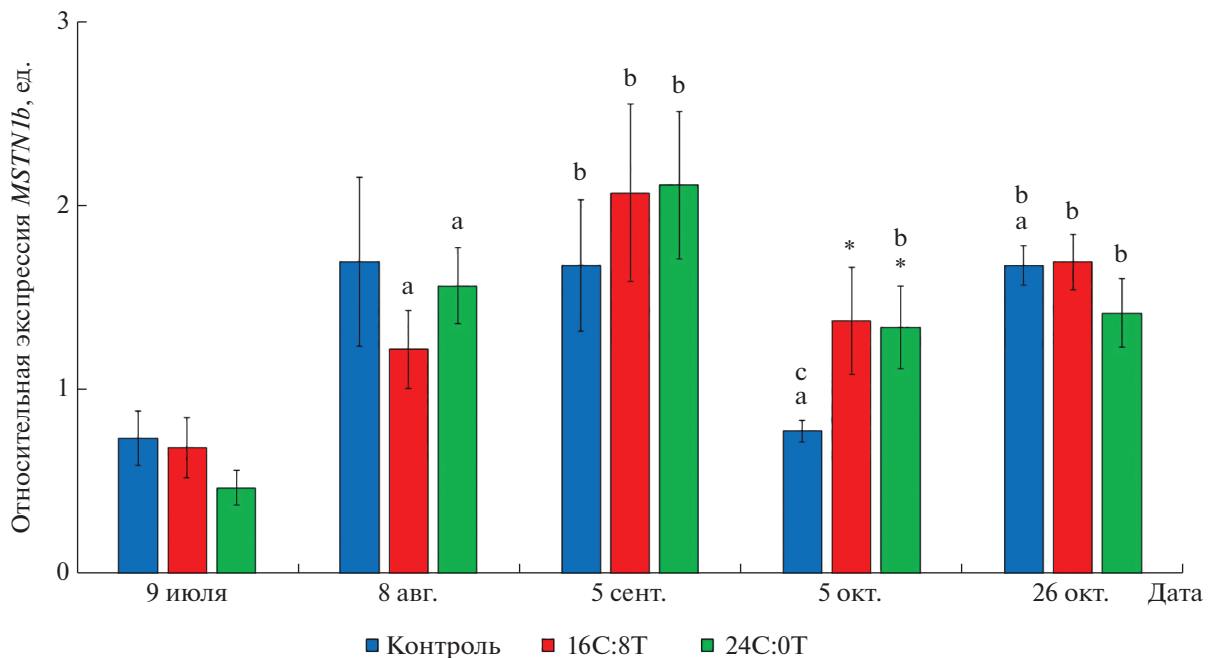


Рис. 9. Относительная экспрессия гена *MSTN1b* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

ние, в отличие от короткого светового дня, способствует увеличению числа делений МКП и/или уменьшению времени их клеточного цикла, что стимулирует их пролиферацию и впоследствии приводит к увеличению количества мышечных волокон лосося.

Наряду с установленными межгрупповыми различиями по уровню экспрессии гена *MyHC* в начале октября были выявлены относительно более высокие уровни экспрессии мРНК *MSTN1b* в группах 2 и 3 по сравнению с контрольной группой (рис. 9, $p < 0.05$), что, вероятно, связано с регуляцией роста мышц у рыб из экспериментальных групп в ответ на стимулирующее действие дополнительного освещения. Исследования *in vitro* показали, что миостатин подавляет развитие и рост скелетных мышц путем ингибирования пролиферации и дифференцировки миобластов и сателлитных клеток (Thomas et al., 2000). Частично это достигается за счет подавления экспрессии генов миогенных регуляторных факторов. Так, было показано, что специфические последовательности в промоторе гена *MSTN1b* связывают гомо- и гетеродимеры регуляторного фактора *MyoD*, необходимого для инициации программы миогенеза (Østbye et al., 2007). В другом исследовании, проведенном на молоди учанского леща (*Megalobrama amblycephala*), экспрессия *MSTNa* и *MSTNb* возросла в ответ на усиление дифференцировки и гипертрофии мышечных волокон, что, по мнению авторов, вероятно, связано с подавлением действия миогенина (Zhu et al., 2014). Таким

образом, в нашей работе повышенная экспрессия *MSTN1b* у рыб в группах с дополнительным освещением по сравнению с таковой у особей в контрольной группе, вероятно, связана с механизмами контроля мышечного роста, направленными на ослабление процессов их гиперплазии и гипертрофии. Это предположение согласуется с аналогичными результатами, полученными нами ранее для двухлеток лосося в другом эксперименте, где рыбы содержались при круглосуточном освещении более продолжительное время (Shulgina et al., 2021).

Динамика уровней экспрессии исследуемых генов. Согласно результатам, полученным в нашей работе, динамика экспрессии исследуемых генов у лосося имела сезонный характер. Так, на протяжении эксперимента уровни экспрессии генов *MyoD1b*, *MyoD1c*, *MyoG*, *MSTN1a* и *MSTN1b* возрастали у рыб из всех исследуемых групп и осенью были достоверно выше по сравнению с летним периодом (рис. 4, 5, 7, 9, 10, $p < 0.05$). При этом за период с 9 июля по 5 сентября была выявлена положительная корреляция между массой рыб и уровнями экспрессии генов *MyoD1b*, *MyoD1c* в контрольной группе, генов *MyoD1c*, *MyoG*, *MSTN1a* и *MSTN1b* в группе 2 (16C:8T), всех вышеуказанных генов в группе 3 (24C) (табл. 3, $p < 0.05$). За период с 9 июля по 5 октября положительная корреляция с массой была показана для уровней экспрессии генов *MyoD1c* и *MyoG* у рыб в контрольной группе, для уровней экспрессии генов *MyoG*, *MSTN1a* и *MSTN1b* у рыб

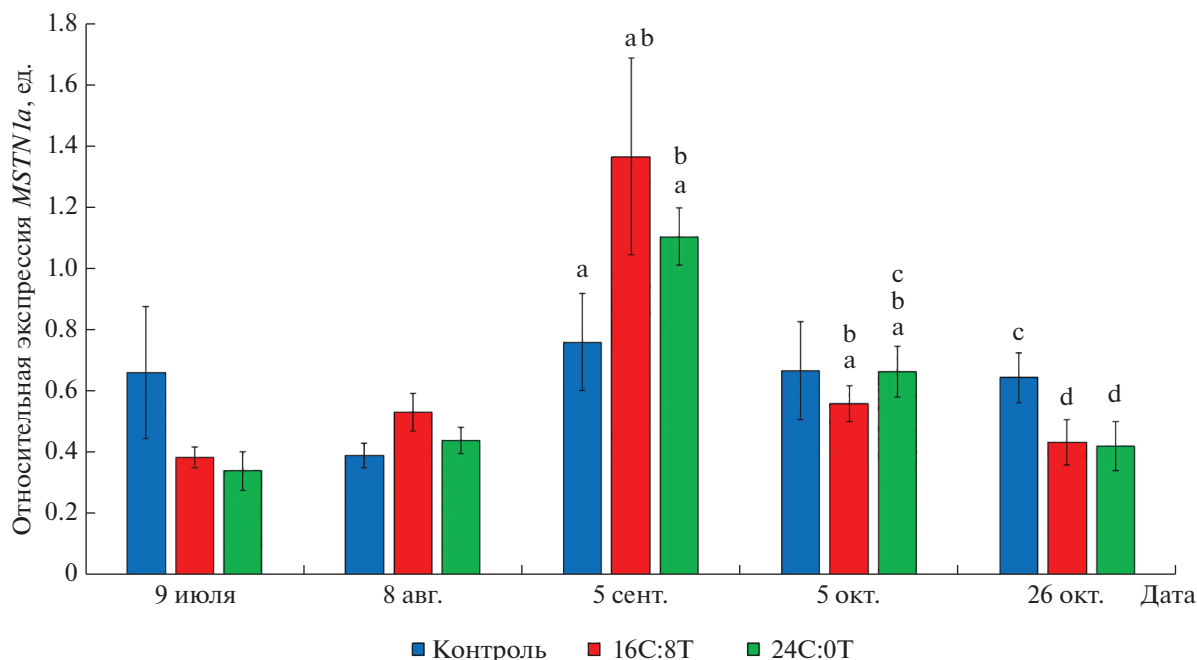


Рис. 10. Относительная экспрессия гена *MSTN1a* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

из группы 2, и для уровней экспрессии *MyoD1c*, *MyoG*, *MSTN1a* и *MSTN1b* у рыб из группы 3 (табл. 4, $p < 0.05$). Уровень экспрессии мРНК *Myf5* постепенно повышался у рыб в группах с дополнительным освещением и положительно коррелировал с их массой в период с 9 июля по 5 сентября (рис. 11, табл. 3, $p < 0.05$). Вероятно, такое повышение уровней экспрессии генов МРФ, а также паралогов миостатина, связано с усилением процессов гиперплазии и гипертрофии мышечных волокон и отражает прирост мышечной массы у молоди рыб в период их активного роста. Как известно, темпы роста и развития многих видов рыб, обитающих в умеренных широтах северных регионов, в том числе лососевых, подвержены воздействию сезонных колебаний температуры и фотопериода, в связи с чем в весенне-летний период наблюдается более быстрый рост, в отличие от осенне-зимнего (Danzmann et al., 2016). В нашем эксперименте температурный режим был естественным, и температура воды в бассейнах в период с начала июля и до начала сентября была значительно выше, нежели в осенний период. Ранее было показано, что повышение температуры воды способствует увеличению диаметра мышечных волокон, скорости пролиферации и интенсивности гиперплазии у молоди паку (*Piaractus mesopotamicus*) (de Paula et al., 2014). Более того, в исследованиях на других видах рыб была выявлена зависимость количества мРНК нескольких МРФ от температуры среды (Fernandes et al., 2006; Johnston et al., 2009). Так, у эмбрионов рыбы

фугу (*Takifugu rubripes*), инкубированных при более высоких температурах, наблюдалось увеличение уровня экспрессии гена *MyoG* (Fernandes et al., 2006).

Напротив, при снижении температуры воды в период с начала сентября и вплоть до конца эксперимента у рыб во всех группах было зафиксировано снижение уровней экспрессии исследуемых генов. Так, в конце октября наблюдались достоверно более низкие значения экспрессии мРНК *MyHC* в группах 1 и 3 (рис. 8, $p < 0.05$), *MyoG* – в группе 3 (рис. 4, $p < 0.05$), *MSTN1a* – в группах 2 и 3 (рис. 10, $p < 0.05$), *Myf5*, *MyoD1b* и *MyoD1c* – у рыб во всех исследуемых группах (рис. 5, 7, 11, $p < 0.05$). При этом у особей лосося во всех группах уровни экспрессии мРНК *MSTN1b* в конце октября достоверно превышали таковые в начале эксперимента (рис. 9, $p < 0.05$). В аналогичном эксперименте, проведенном нами на сеголетках (0+) атлантического лосося, было показано подобное одновременное снижение к концу исследования уровней экспрессии генов *Myf5*, *MyoD1b* и *MyoD1c* и повышение экспрессии *MSTN1a* и *MSTN1b* во всех группах независимо от условий освещения (Churova et al., 2020). Кроме того, наблюдаемая динамика экспрессии генов *Myf5*, *MyoD1b* и *MyoD1c* соответствует таковой, установленной нами для двухлеток лосося, которые содержались в группах с постоянным освещением и без дополнительного освещения в более продолжительном эксперименте (Shulgina et al., 2021). Полученные результаты согласуются

Таблица 3. Линейная регрессия и коэффициент корреляции между уровнями экспрессии генов МРФ, *MyHC* и паралогов *MSTN* в белых мышцах и массой двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, в период с июля по 5 сентября

Переменная (y)	Группа	Масса (x)	Коэффициент корреляции
<i>MyHC</i>	Контроль	$y = 47.50 - 0.35x$ $R^2 = 0.076$	-0.28
	16С:8Т	$y = 55.93 - 0.62x$ $R^2 = 0.103$	-0.32
	24С:0Т	$y = 54.03 - 0.24x$ $R^2 = 0.013$	-0.11
<i>MyoG</i>	Контроль	$y = 2.17 + 0.04x$ $R^2 = 0.096$	0.31
	16С:8Т	$y = 0.96 + 0.11x$ $R^2 = 0.474$	0.69*
	24С:0Т	$y = 0.71 + 0.16x$ $R^2 = 0.504$	0.71*
<i>Myf5</i>	Контроль	$y = 0.276 + 0.003x$ $R^2 = 0.033$	0.18
	16С:8Т	$y = 0.14 + 0.01x$ $R^2 = 0.373$	0.61*
	24С:0Т	$y = 0.08 + 0.01x$ $R^2 = 0.353$	0.59*
<i>MyoD1a</i>	Контроль	$y = 9.13 + 0.05x$ $R^2 = 0.026$	0.16
	16С:8Т	$y = 13.00 - 0.08x$ $R^2 = 0.041$	-0.20
	24С:0Т	$y = 11.63 + 0.08x$ $R^2 = 0.050$	0.22
<i>MyoD1b</i>	Контроль	$y = 0.43 + 0.07x$ $R^2 = 0.480$	0.69*
	16С:8Т	$y = 1.78 + 0.04x$ $R^2 = 0.077$	0.28
	24С:0Т	$y = 1.29 + 0.09x$ $R^2 = 0.227$	0.48*
<i>MyoD1c</i>	Контроль	$y = 0.28 + 0.04x$ $R^2 = 0.452$	0.67*
	16С:8Т	$y = 0.44 + 0.03x$ $R^2 = 0.207$	0.45*
	24С:0Т	$y = 0.21 + 0.04x$ $R^2 = 0.460$	0.68*
<i>MSTN1a</i>	Контроль	$y = 0.51 + 0.01x$ $R^2 = 0.017$	0.13
	16С:8Т	$y = -0.22 + 0.05x$ $R^2 = 0.558$	0.75*
	24С:0Т	$y = 0.05 + 0.03x$ $R^2 = 0.438$	0.66*
<i>MSTN1b</i>	Контроль	$y = 0.62 + 0.04x$ $R^2 = 0.154$	0.39
	16С:8Т	$y = -0.03 + 0.07x$ $R^2 = 0.517$	0.72*
	24С:0Т	$y = 0.10 + 0.07x$ $R^2 = 0.377$	0.61*

* – Достоверные корреляции при $p < 0.05$.

Таблица 4. Линейная регрессия и коэффициент корреляции между уровнями экспрессии генов МРФ, *MyHC* и паралога *MSTN* в белых мышцах и массой двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, в период с июля по 5 октября

Переменная (y)	Группа	Масса (x)	Коэффициент корреляции
<i>MyHC</i>	Контроль	$y = 45.77 - 0.16x$ $R^2 = 0.013$	-0.12
	16С:8Т	$y = 50.50 - 0.09x$ $R^2 = 0.002$	-0.05
	24С:0Т	$y = 49.22 + 0.18x$ $R^2 = 0.008$	0.09
<i>MyoG</i>	Контроль	$y = 1.80 + 0.06x$ $R^2 = 0.223$	0.47*
	16С:8Т	$y = 0.91 + 0.12x$ $R^2 = 0.362$	0.60*
	24С:0Т	$y = 0.49 + 0.19x$ $R^2 = 0.588$	0.77*
<i>Myf5</i>	Контроль	$y = 0.348 - 0.003x$ $R^2 = 0.048$	-0.22
	16С:8Т	$y = 0.208 + 0.004x$ $R^2 = 0.048$	0.22
	24С:0Т	$y = 0.168 + 0.004x$ $R^2 = 0.062$	0.23
<i>MyoD1a</i>	Контроль	$y = 8.14 + 0.07x$ $R^2 = 0.04$	0.20
	16С:8Т	$y = 13.31 - 0.03x$ $R^2 = 0.004$	-0.06
	24С:0Т	$y = 7.87 + 0.26x$ $R^2 = 0.229$	0.48*
<i>MyoD1b</i>	Контроль	$y = 1.01 + 0.03x$ $R^2 = 0.107$	0.33
	16С:8Т	$y = 1.76 + 0.04x$ $R^2 = 0.086$	0.29
	24С:0Т	$y = 1.94 + 0.04x$ $R^2 = 0.071$	0.27
<i>MyoD1c</i>	Контроль	$y = 0.53 + 0.02x$ $R^2 = 0.190$	0.44*
	16С:8Т	$y = 0.54 + 0.03x$ $R^2 = 0.144$	0.38
	24С:0Т	$y = 0.35 + 0.03x$ $R^2 = 0.367$	0.61*
<i>MSTN1a</i>	Контроль	$y = 0.554 + 0.003x$ $R^2 = 0.007$	0.08
	16С:8Т	$y = -0.03 + 0.04x$ $R^2 = 0.334$	0.58*
	24С:0Т	$y = 0.19 + 0.02x$ $R^2 = 0.292$	0.54*
<i>MSTN1b</i>	Контроль	$y = 0.96 + 0.01x$ $R^2 = 0.018$	0.14
	16С:8Т	$y = 0.29 + 0.05x$ $R^2 = 0.276$	0.53*
	24С:0Т	$y = 0.31 + 0.05x$ $R^2 = 0.295$	0.54*

* – Достоверные корреляции при $p < 0.05$.

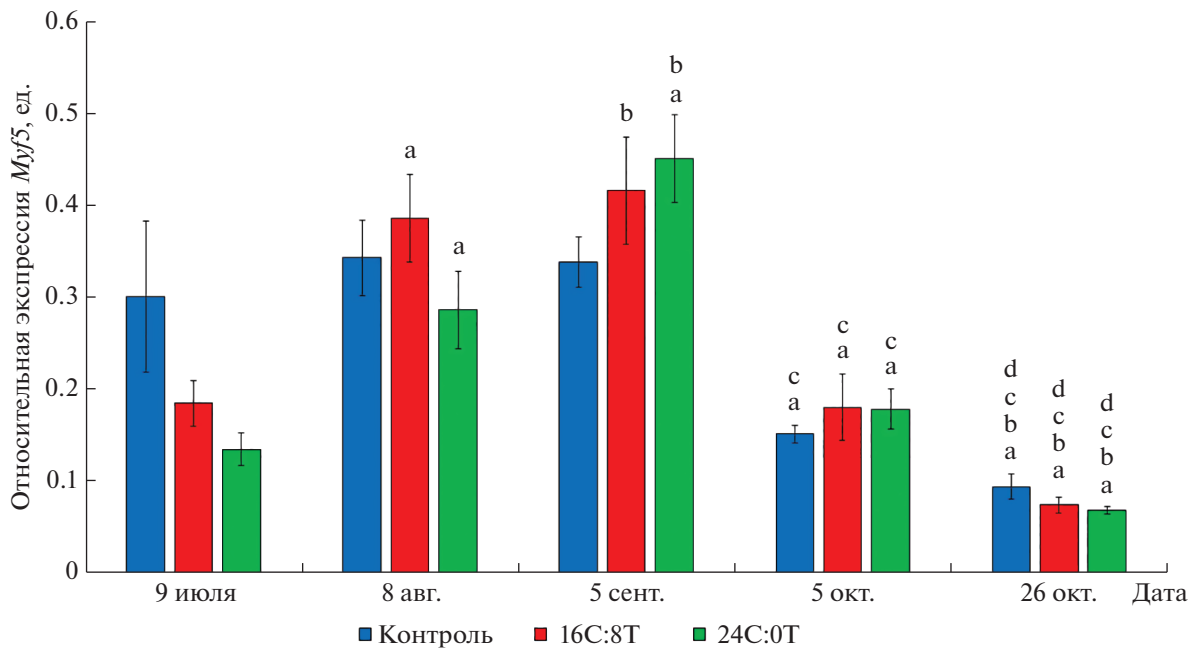


Рис. 11. Относительная экспрессия гена *Myf5* (ед.) в белых мышцах двухлеток лосося, содержащихся в группах с разным режимом освещения, $M \pm SE$. Обозначения как на рис. 4.

с данными исследования, в котором в мышцах морского леща спустя 30 дней голодания наблюдалась сниженная экспрессия генов *Myf5* и *MyoD2* и повышенная экспрессия *MSTN1*, что, по мнению авторов, указывает на снижение активации миобластов и мышечного роста (Codina et al., 2014). В другой работе, было показано, что продолжительное воздействие низкой температуры воды способствует повышению концентрации мРНК *MSTN* в мышцах канального сома (Weber, Bosworth, 2005). Необходимо отметить, что в нашей работе динамика уровней экспрессии паралога миостатина (*MSTN1a* и *MSTN1b*) была неодинаковой, что может указывать на различия в их функционировании в процессе миогенеза, однако их дифференциальную роль в регуляции этого процесса еще предстоит выяснить. Вероятно, наблюдаемые изменения уровней экспрессии исследуемых генов в конце эксперимента связаны с замедлением процессов гиперплазии и гипертрофии мышечных волокон у особей лосося при снижении их темпов роста в осенний период. Как было показано ранее в исследованиях на постсмолтах атлантического лосося, гиперплазия мышечных волокон заметно снижается по мере уменьшения температуры воды и продолжительности освещения в зимний период (Johnston et al., 2003). Было высказано предположение, что у рыб существует сезонный цикл формирования мышечных волокон, который накладывается на эндогенный ритм роста, зависящий от возраста и стадии жизненного цикла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали, что двухлеткам атлантического лосося, которых выращивали в бассейнах с подключением дополнительного освещения, требуется период адаптации к новым световым условиям. При снижении темпов роста рыб в осенний период использование искусственного освещения оказало стимулирующий эффект на рост особей лосося из экспериментальных групп. Полученные в нашей работе данные указывают на то, что миогенные регуляторные факторы могут играть важную роль в регуляции формирования и роста мышц у молоди атлантического лосося в условиях вариабельности факторов окружающей среды. Межгрупповые различия в уровнях экспрессии генов МРФ, тяжелой цепи миозина и паралога миостатина могут отражать различия в регуляции процессов миогенеза у рыб в зависимости от условий освещения. Показано, что существуют определенные сезонные закономерности в одновременной экспрессии исследуемых генов у рыб, выращенных как в условиях дополнительного освещения, так и без него. Было высказано предположение, что это может отражать изменения интенсивности процессов гиперплазии и гипертрофии мышечных волокон, связанные с сезонными вариациями температуры окружающей среды. Представленные в настоящей работе данные совместно с опубликованными нами ранее результатами по исследуемой теме расширяют современные знания о молекулярных механизмах регуляции мы-

щечного роста, а также закономерностях раннего роста и развития у рыб при влиянии факторов среды.

В настоящее время результаты исследования используются при постановке экспериментов с подключением дополнительного освещения для стимуляции роста молоди атлантического лосося, который выращивается на рыбноводном хозяйстве в Северной Осетии-Алании (южный регион РФ, Ардонский район), что существенно дополнит представления о роли факторов среды в механизмах развития биохимических адаптаций у молоди лососевых рыб с учетом климатических, географических, экологических особенностей региона.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность администрации и рыбводам Выгского рыбноводного завода за сотрудничество. Исследование было выполнено на научном оборудовании ЦКП КарНЦ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проекты № 19-14-00081 и № 19-14-00081П).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Н.С. Шульгина – постановка и проведение эксперимента, сбор биоматериала, пробоподготовка и проведение лабораторного анализа образцов, анализ и статистическая обработка полученных данных, обсуждение результатов исследования, написание и подготовка публикации; М.В. Кузнецова – разработка, постановка и проведение эксперимента, сбор биоматериала, анализ полученных данных и обсуждение результатов исследования, подготовка публикации; Н.Н. Немова – руководитель проекта, обсуждение результатов исследования, подготовка публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). М., 2012. 80 с.

Ивантер Э.В., Коросов А.В. Элементарная биометрия. Петрозаводск, 2010. 104 с.

Коросов А.В., Горбач В.В. Компьютерная обработка биологических данных. Петрозаводск, 2007. 75 с.

Чурова М.В., Мещерякова О.В., Веселов А.Е., Немова Н.Н. Активность ферментов энергетического и углеводного обмена и уровень некоторых молекулярно-генетических показателей у молоди лосося (*Salmo salar* L.), различающейся возрастом и массой // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 5. С. 304–312.

Ahammad A.S., Asaduzzaman M., Ceyhun S.B., Ceylan H., Asakawa S., Watabe S., Kinoshita S. Multiple transcription factors mediating the expressional regulation of myosin heavy chain gene involved in the indeterminate muscle growth of fish // Gene. 2019. V. 687. P. 308–318.

Almeida F.L.A., Carvalho R.F., Pinhal D., Padovani C.R., Martins C., Dal Pai-Silva M. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases // Micron. 2008. V. 39. P. 1306–1311.

Bower N.I., Johnston I.A. Paralogs of Atlantic salmon myoblast determination factor genes are distinctly regulated in proliferating and differentiating myogenic cells // American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2010. V. 298. № 6. P. R1615–R1626.

Chapalamadugu K.C., Robison B.D., Drew R.E., Powell M.S., Hill R.A., Amberg J.J., Murdoch G.K. Dietary carbohydrate level affects transcription factor expression that regulates skeletal muscle myogenesis in rainbow trout // Comparative Biochemistry and Physiology B. 2009. V. 153. № 1. P. 66–72.

Churova M.V., Shulgina N., Kuritsyn A., Krupnova M.Y., Nemova N.N. Muscle-specific gene expression and metabolic enzyme activities in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fry reared under different photoperiod regimes // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2020. V. 239. P. 110330.

Codina M., Capilla E., Jiménez-Amilburu V., Navarro I., Du S.J., Johnston I.A., Gutiérrez J. Characterisation and expression of myogenesis regulatory factors during in vitro myoblast development and in vivo fasting in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. 2014. V. 167. P. 90–99.

Danzmann R.G., Kocmarek A.L., Norman J.D., Rexroad C.E., Palti Y. Transcriptome profiling in fast versus slow-growing rainbow trout across seasonal gradients // BMC Genomics. 2016. V. 17. № 1. P. 60.

de Paula T.G., de Almeida F.L.A., Carani F.R., Vechetti-Júnior I.J., Padovani C.R., Salomão R.A.S., ... Dal-Pai-Silva M. Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2014. V. 169. P. 31–37.

Fernandes J.M.O., Mackenzie M.G., Wright P.A., Steele S.L., Suzuki Y., Kinghorn J.R., Johnston I.A. Myogenin in model pufferfish species: Comparative genomic analysis and thermal plasticity of expression during early development // Comparative Biochemistry and Physiology

- Part D: Genomics and Proteomics. 2006. V. 1. № 1. P. 35–45.
- Fuentes E.N., Valdés J.A., Molina A., Björnsson B.T. Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone–insulin-like growth factor system // *Gen. and Comp. Endocrinol.* 2013. V. 192. P. 136–148.
- Ganassi M., Badodi S., Ortuste Quiroga H.P., Zammit P.S., Hinits Y., Hughes S.M. Myogenin promotes myocyte fusion to balance fibre number and size // *Nature Communications.* 2018. V. 9. № 1. P. 1–17.
- Good C., Davidson J. A review of factors influencing maturation of Atlantic salmon, *Salmo salar*, with focus on water recirculation aquaculture system environments // *Journal of the World Aquaculture Society.* 2016. V. 47. № 5. P. 605–632.
- Guerrero-Tortolero D.A., Bromage N. Growth and maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations with different grilse proportions under natural photoperiod and superimposed nighttime light // *Aquaculture.* 2008. V. 285. № 1. P. 63–66.
- Handeland S.O., Björnsson B.T., Arnesen A.M., Stefansson S.O. Seawater adaptation and growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of wild and farmed strain // *Aquaculture.* 2003. V. 220. P. 367–384.
- Hevroy E.M., Jordal A.O., Hordvik I., Espe M., Hemre G.I., Olsvik P.A. Myosin heavy chain mRNA expression correlates higher with muscle protein accretion than growth in Atlantic salmon, *Salmo salar* // *Aquaculture.* 2006. V. 252. № 2–4. P. 453–461.
- Ikeda D., Ono Y., Snell P., Edwards Y.J., Elgar G., Watabe S. Divergent evolution of the myosin heavy chain gene family in fish and tetrapods: evidence from comparative genomic analysis // *Physiol. Genomics.* 2007. V. 32. P. 1–15.
- Johansen K.A., Overturf K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Marine Biotechnology.* 2005. V. 7. № 6. P. 576–587.
- Johnston I.A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish // *J. Exp. Biol.* 2006. V. 209. P. 2249–2264.
- Johnston I.A., Lee H.-T., Macqueen D.J., Paranthaman K., Kawashima C., Anwar A., Dalmay T. Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: Genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes // *J. Experimental Biology.* 2009. V. 212. № 12. P. 1781–1793.
- Johnston I.A., Manthri S., Smart A., Campbell P., Nickell D., Alderson R. Plasticity of muscle fibre number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation // *J. Experimental Biology.* 2003. V. 206. № 19. P. 3425–3435.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method // *Methods.* 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
- Macqueen D.J., Johnston I.A. A novel salmonid *myoD* gene is distinctly regulated during development and probably arose by duplication after the genome tetraploidization // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. № 21. P. 4996–5002.
- Nagasawa K., Giannetto A., Fernandes J.M.O. Photoperiod influences growth and mll (mixed-lineage leukaemia) expression in Atlantic cod // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e36908.
- Nemova N.N., Nefedova Z.A., Pekkoeva S.N., Voronin V.P., Shulgina N.S., Churova M.V., Murzina S.A. The effect of the photoperiod on the fatty acid profile and weight in hatchery-reared underyearlings and yearlings of Atlantic salmon *Salmo salar* L. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 6. P. 845.
- Noori A., Mojazi Amiri B., Mirvaghefi A., Rafiee G., Kalvani Neitali B. Enhanced growth and retarded gonadal development of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) following a long-day photoperiod // *Aquac. Res.* 2015. V. 46. № 10. P. 2398–2406.
- Nordgarden U., Oppedal F., Taranger G.L., Hemre G.I., Hansen T. Seasonally changing metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) I—Growth and feed conversion ratio // *Aquaculture Nutrition.* 2003. V. 9. № 5. P. 287–293.
- Oppedal F., Taranger G.L., Hansen T. Growth performance and sexual maturation in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater tanks exposed to continuous light or simulated natural photoperiod // *Aquaculture.* 2003. V. 215. № 1–4. P. 145–162.
- Østbye T.K.K., Wetten O.F., Tooming-Klunderud A., Jakobsen K.S., Yafe A., Etzioni S., ... Andersen Ø. Myostatin (MSTN) gene duplications in Atlantic salmon (*Salmo salar*): evidence for different selective pressure on teleost MSTN-1 and -2 // *Gene.* 2007. V. 403. № 1–2. P. 159–169.
- Rescan P.Y., Gauvry L., Paboeuf G. A gene with homology to myogenin is expressed in developing myotomal musculature of the rainbow trout and *in vitro* during the conversion of myosatellite cells to myotubes // *FEBS Letters.* 1995. V. 362. № 1. P. 89–92.
- Shulgina N.S., Churova M.V., Murzina S.A., Krupnova M.Y., Nemova N.N. The effect of continuous light on growth and muscle-specific gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) yearlings // *Life.* 2021. V. 11. № 4. P. 328.
- Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S., Bass J., Kambadur R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation // *J. Biological Chemistry.* 2000. V. 275. № 51. P. 40235–40243.
- Watabe S. Myogenic regulatory factors // *Muscle Development and Growth* / Ed. Johnston I.A. San Diego: Academic Press, 2001. V. 18. P. 19–41.
- Weber T.E., Bosworth B.G. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish // *Aquaculture.* 2005. V. 246. № 1–4. P. 483–492.
- Zhang Y., Tan X., Xu P., Sun W., Xu Y., Zhang P. Quantitative comparison of the expression of myogenic regulatory factors in flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos and adult tissues // *Chinese J. Oceanology and Limnology.* 2010. V. 28. № 2. P. 248–253.
- Zhu K., Wang H., Wang H., Gul Y., Yang M., Zeng C., Wang W. Characterization of muscle morphology and satellite cells, and expression of muscle-related genes in skeletal muscle of juvenile and adult *Megalobrama amblycephala* // *Micron.* 2014. V. 64. P. 66–75.

The Effect of Different Lighting Regimes on Some Molecular-Genetic Parameters of Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Growth under Its Artificial Reproduction Conditions

N. S. Shulgina^{1, *}, M. V. Kuznetsova¹, and N. N. Nemova¹

¹*Institute of Biology – A Separate Subdivision of the FSBSI FRC “Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences”, ul. Pushkinskaya, 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

**e-mail: Shulgina28@yandex.ru*

We investigated the effect of two light regimes – 16L:8D (16 h light : 8 h dark) and continuous (24 h light : 0 h dark), on the growth rates and gene expression level of myogenic regulatory factors (*Myf5*, *MyoG*, *MyoD1a*, *MyoD1b*, *MyoD1c*), myosin heavy chain (*MyHC*), and myostatin paralogs (*MSTN1a* and *MSTN1b*) in the muscles of Atlantic salmon yearlings reared for 3.5 months (from July to October) in the hatchery conditions. The control group consisted of salmon yearlings reared in the tanks of the same hatchery using standard technology without additional lighting. Despite the fact that there were no significant differences in weight between the studied fish groups at the end of the experiment, additional lighting had a positive effect on the duration and intensity of fish growth in the autumn period with a decrease in water temperature. The expression levels of the *MyHC*, *MyoG*, *MyoD1* and *MSTN1b* paralogs were significantly higher in fish from the experimental groups with additional lighting compared to those in the control group in autumn. The revealed intergroup differences in the simultaneous expression of the studied genes indicate differences in the mechanisms of muscle growth regulation in fish depending on the lighting conditions. Patterns were established in the seasonal dynamics of genes expression levels that regulate muscle growth, which are similar for salmon yearlings groups kept under different lighting conditions.

Keywords: Atlantic salmon, expression of myogenic regulatory factors, growth, photoperiod regimes