



University of Tehran

Investigation of androgen receptor gene expression in response to predator and male densities in Guppy fish (*Poecilia reticulata*)

Mahdi Katebi¹ | Amir Reza Abed-Elmdoust^{2*} | Hamid Farahmand³ | Ali Momeninejad⁴

1. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: mahdikatebi@ut.ac.ir
2. Corresponding author, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: amirabed@ut.ac.ir
3. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: hfarahmand@ut.ac.ir
4. Department of Fisheries, Baharavaran Faculty of Agricultural, University of Applied Science, Qom, Iran. Email: a.momeninejad@gmail.com

ARTICLE INFO

Article type:

Research Article

Article History:

Received: 09 March 2025

Revised: 26 April 2025

Accepted: 04 May 2025

Published online: 08 July 2025

Keywords:

Androgen receptor,
Gene expression,
Guppy fish,
Predator,
Reproduction.

ABSTRACT

The guppy fish (*Poecilia reticulata*) is widely recognized as a model species for studying the evolution of reproductive behavior due to its broad range of mating strategies and the availability of genomic and genetic resources. Androgens, as key regulators of spermatogenesis, exert their effects by binding to the Androgen receptor (AR), which plays a critical role in the regulation of reproductive function. Given the importance of this hormonal pathway, the present study aimed to investigate the expression of the androgen receptor gene in response to varying densities of predators and male guppies. Male and female guppies were sampled at four time points: 5 minutes, 5 hours, 5 days, and 15 days after exposure to a predator. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. AR gene expression was analyzed using the reference gene S18 and quantified by the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. Data normality was assessed, and a two-way ANOVA was performed to determine the statistical significance of treatment effects. Results indicated that predator density had a significant effect on AR gene expression across different time points ($P < 0.05$). Specifically, the presence of predators led to a downregulation of AR gene expression, which is likely associated with reduced reproductive behavior in male guppies. These findings provide valuable insights into how environmental pressures, such as predator and conspecific density, can influence hormonal regulation of reproduction in this model species.

Cite this article: Katebi, M., Abed-Elmdoust, A.R., Farahmand, H., Momeninejad, A. (2025). Investigation of androgen receptor gene expression in response to predator and male densities in Guppy fish (*Poecilia reticulata*). *Journal of Fisheries*, 78 (2), 149-158. DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2025.393071.1454>



© The Author(s) **Publisher:** University of Tehran Press.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2025.393071.1454>



دانشگاه تهران

شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

سایت نشریه: <https://jfisheries.ut.ac.ir>

شاپا الکترونیکی: ۷۸۰۹-۲۴۲۳

بررسی بیان ژن گیرنده آندروژن در پاسخ به تغییرات تراکم شکارچی و تراکم نر در ماهی گویی (*Poecilia reticulata*)

مهدی کاتبی^۱ | امیررضا عابد علم دوست^{۲*} | حمید فرحمند^۳ | علی مومنی نژاد^۴

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mahdikatebi@ut.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: amirabed@ut.ac.ir

۳. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: hfarahmand@ut.ac.ir

۴. گروه شیلات، دانشکده کشاورزی بهارآوران، دانشگاه علمی کاربردی استان قم، قم، ایران. رایانامه: a.momeninejad@gmail.com

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۱۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۱۴

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۴/۱۷

کلیدواژه:

بیان ژن،

تولیدمثل،

شکارچی،

گیرنده آندروژن،

ماهی گویی.

ماهی گویی (*Poecilia reticulata*) به دلیل تنوع رفتاری گسترده در تولیدمثل و در دسترس بودن منابع ژنتیکی و ژنومی، به عنوان یک گونه مدل برای مطالعه تکامل رفتارهای تولیدمثلی شناخته می‌شود. آندروژن‌ها به عنوان هورمون‌های کلیدی در تنظیم اسپرم‌زایی، از طریق اتصال به گیرنده آندروژن نقش مهمی در کنترل تولیدمثل ایفا می‌کنند. با توجه به اهمیت این مسیر هورمونی، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر تراکم‌های مختلف شکارچی و نرهای گویی بر بیان ژن گیرنده آندروژن انجام شد. در این مطالعه، نمونه‌برداری از ماهیان نر و ماده در چهار بازه زمانی شامل ۵ دقیقه، ۵ ساعت، ۵ روز و ۱۵ روز پس از مواجهه با شکارچی انجام گرفت. نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شده و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بیان ژن گیرنده آندروژن با استفاده از ژن رفرنس ۱۸s و روش محاسباتی $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تحلیل شد. داده‌ها از نظر نرمال بودن بررسی و برای تحلیل معنی‌داری اثر تیمارها از تجزیه واریانس دوطرفه استفاده شد. نتایج نشان داد تراکم‌های مختلف شکارچی در زمان‌های متفاوت مواجهه، اثر معنی‌داری بر سطح بیان ژن گیرنده آندروژن داشتند ($P < 0.05$)، به طوری که در حضور شکارچی، بیان این ژن کاهش یافت. این کاهش بیان ژن به طور بالقوه منجر به افت در رفتارهای تولیدمثلی نرهای گویی شد. این یافته‌ها به درک بهتر از تعامل بین فشارهای زیستی محیطی و تنظیم هورمونی تولیدمثل در گونه‌های مدل کمک می‌کند.

استناد: کاتبی، مهدی، عابد علم دوست، امیررضا، فرحمند، حمید، مومنی نژاد؛ علی (۱۴۰۴). بررسی بیان ژن گیرنده آندروژن در پاسخ به تغییرات تراکم شکارچی و تراکم نر در ماهی گویی (*Poecilia reticulata*). نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، ۷۸ (۲)، ۱۴۹-۱۵۸. DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2025.393071.1454>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2025.393071.1454>



۱. مقدمه

به‌طور کلی ماهی‌ها با چالش‌های مختلفی روبه‌رو می‌شوند که باعث می‌شود به‌طور مؤثر از زیستگاه خود برای کسب انرژی استفاده کنند و یاد بگیرند که منابع غذایی مغذی را شناسایی و مصرف کرده و یا با رقبا تعامل داشته باشند و شرکای تولیدمثل مناسب خود را پیدا کنند (Odling-Smee *et al.*, 2003). در حالی که عدم توجه به این چالش‌ها اگرچه به‌طور فوری به مرگ نمی‌انجامد، اما فرصت‌های بهبود مهارت‌های تولیدمثل را از بین می‌برد. همچنین پاسخ‌های ناکافی به شکارچیان می‌تواند منجر به مرگ شود، به گونه‌ای که رفتار ضدشکارچی در مقایسه با جنبه‌های دیگر رفتاری، مؤلفه ژنتیکی مهم‌تری محسوب می‌شود (Frommen *et al.*, 2022). فشارهای تکاملی ناشی از خطر شکار نقش اساسی در تشکیل ویژگی‌های سازگار گونه‌های طعمه دارد. در حالی که برخی از گونه‌ها از دفاع‌های فیزیکی مختص خود در برابر شکارچیان استفاده می‌کنند، استراتژی دفاع رفتاری راهکاری انعطاف‌پذیرتر و بهره‌ورتری ارائه می‌دهد. این رویکرد به طعمه اجازه می‌دهد تا به‌طور مؤثر چالش‌های فرار از شکارچیان را کنترل کرده و در عین حال به فعالیت‌های ضروری مانند جستجوی غذا و تولیدمثل بپردازد (PJC Chuard *et al.*, 2018).

ماهی گویی (*Poecilia reticulata*) به‌عنوان یک گونه مدل ارزشمند برای تحقیق در زمینه انتخاب طبیعی در زیستگاه طبیعی خود شناخته شده است. شواهد قابل توجهی نشان می‌دهد که ویژگی‌های مختلف گویی‌ها، از جمله تاریخچه زندگی، رنگ‌آمیزی و رفتار (شامل رفتار تولیدمثل)، در پاسخ به شکارچی غالب و عوامل محیطی مرتبط، تحت تأثیر قرار گرفته و به تغییرات تکاملی منجر شده‌اند (Magurran, 2005). در بین گروه‌های مختلف حیوانات، اغلب تفاوت‌های چشمگیری بین نر و ماده در ظاهر، عملکرد بدنی و رفتار وجود دارد. با این حال، زمانی که به درک چگونگی ارزیابی و واکنش به خطرات در حیوانات پرداخته می‌شود، تمایزات بین نر و ماده را به اندازه کافی مورد بررسی قرار قرار نگرفته است (Pierre Chuard, 2017). آندروژن‌ها هورمون تنظیم‌کننده اولیه اسپرماتوزنیز هستند (Singh *et al.*, 2006). همچنین با فرایندهای توسعه، نگهداری و تمایز ارتباط دارند. در طول بلوغ، آندروژن برای کنترل عملکرد تولیدمثل در مراحل مختلف رشد توسط گیرنده آندروژن (AR) به سلول متصل می‌شود (Borg, 1994). آندروژن همچنین می‌تواند بر محور هیپوتالاموس، هیپوفیز، گناد در مهره‌داران اثرگذار باشد و به‌عنوان واسطه در رفتارهای اجتماعی و تولیدمثل از جمله قلمروطلبی، پرخاشگری و خواستگاری عمل کند (Breton *et al.*, 1996). تاکنون AR هسته‌ای و AR غشایی در ماهی‌ها شناسایی شده است (Golshan *et al.*, 2019). پاسخ‌های فنوتیپ و فیزیولوژیک به آندروژن‌ها از طریق گیرنده آندروژن متعلق به خانواده گیرنده‌های هسته‌ای انجام می‌شود (Ogino *et al.*, 2023). تاکنون پژوهش‌هایی در مورد شناسایی گیرنده آندروژن و میزان بیان ژن و عملکرد آن در تولیدمثل، تغییرات جنسی و رفتار ماهی‌ها انجام گرفته است. در پژوهشی به بررسی کنش‌های رفتاری آندروژن‌ها و بیان گیرنده آندروژن در سیستم ارتباط الکتریکی یک ماهی الکتریکی (*virescens Eigenmannia*) پرداخته شد (Dunlap *et al.*, 1998) در مطالعه دیگری، ارتباط بین بیان ژن گیرنده آندروژن با تغییرات فصلی در رفتار ماهی الکتریکی (*Brachyhypopomus gauderio*) بررسی شد (Pouso *et al.*, 2010). همچنین تفاوت‌های جنسی در بیان گیرنده‌های آندروژن عصبی-عضلانی و رفتار اجتماعی-جنسی در ماهی در حال تغییر جنسیت مورد مطالعه قرار گرفت (Schuppe *et al.*, 2017). در مطالعه‌ای، بیوسنتز آندروژن در ماهی‌ها مورد و ساختار مولکولی AR هسته‌ای در گونه‌های مدل پستانداران و ماهی‌ها مقایسه شد و مکانیسم‌های عمل آلاینده‌های محیطی مختل‌کننده سیگنال‌دهی آندروژن در تولیدمثل ماهی از راه دیگر نیز بررسی شده است (Golshan *et al.*, 2019). در پژوهش دیگری، شناسایی مولکولی یک گیرنده آندروژن و تأثیر برهمکنش تهاجمی طولانی‌مدت بر بیان ژن‌های هیپوتالاموس در ماهی سنگ‌سیاه (*Sebastes schlegelii*) انجام گردید (Xu *et al.*, 2021). مطالعه تنظیم آندروژن در تولیدمثل در یک گونه خاص می‌تواند به‌عنوان ارگانیسم مدل زیستی مناسب برای بررسی سیگنال‌دهی آندروژن از دیدگاه محیط‌زیست در نظر گرفته شود (Golshan *et al.*, 2019). اهمیت هورمون آندروژن در فرایند تولیدمثل و اثر عامل شکار و تراکم نر بر میزان بیان ژن گیرنده آندروژن در زمان‌های مختلف مواجهه با شکارچی انجام نگرفته است، لذا، در پژوهش حاضر اثر تراکم متفاوت شکارچی و تراکم مختلف نر در بیان ژن گیرنده آندروژن در ماهی گویی مورد بررسی قرار گرفت.

۲. روش‌شناسی پژوهش

۲-۱. آماده‌سازی محیط آزمایش

مطالعه حاضر، در زمستان ۱۴۰۲ در مرکز تحقیقات تکثیر و پرورش ماهیان زینتی آقای مومن‌نژاد واقع در استان قم، شهرستان قنات انجام پذیرفت. تعداد ۱۰۸۰ ماهی گویی با وزن 1 ± 0.4 گرم به تعداد مساوی نر و ماده از کارگاه محل انجام آزمایش خریداری شد و پس از ۲۴ ساعت هوادهی جهت کلرپرانی و یکسان‌سازی دمای آب به آکواریوم‌های مورد نظر منتقل گردیدند. تمامی ماهیان گویی مورد استفاده در این آزمایش هیچکدام از قبل جفت‌گیری نکرده بودند. این آزمایش در آکواریوم‌های ۸۰ لیتری با ابعاد $35 \times 30 \times 120$ سانتی‌متر انجام گردید. ماهیان گویی به‌عنوان گونه مورد مطالعه در داخل محفظه شیشه‌ای با ابعاد $35 \times 30 \times 30$ سانتی‌متر در داخل آکواریوم ۱۱۰ لیتری همراه آب با pH میانگین 7.5 با دمای 26 ± 1 درجه سانتی‌گراد و میزان اکسیژن $7/8$ ppm میلی‌گرم در لیتر به مدت دو هفته جهت سازگاری با محیط آزمایش نگهداری شدند. این دیواره شیشه‌ای در داخل آکواریوم به‌عنوان حائل عمل کرد و مانع برخورد فیزیکی گونه شکارچی با گونه شکار شد، به‌صورتی که تبادل دمایی و اکسیژن در کل آکواریوم به‌طور یکسان وجود داشت. در داخل هر آکواریوم از تزئینات گیاهان مصنوعی با چیدمان یکسان به‌عنوان پناهگاه استفاده شد. هوادهی به‌وسیله هواده مرکزی کارگاه به‌طور کامل در طول روز انجام گردید. در ادامه تعداد ۶۰ عدد ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*) با وزن 2 ± 8 گرم از کارگاه تهیه گردید و به‌عنوان گونه شکارچی در آکواریوم‌ها توزیع شدند. ماهیان گویی در داخل محفظه شیشه‌ای قرار گرفته و توسط گونه شکارچی اسکار رویت شدند. ماهیان گویی با جیره غذایی آغازگر سه صفر شرکت فردانه سه وعده در روز غذادهی شدند. ماهیان به مدت ۱۵ روز در آکواریوم‌ها جهت سازگاری با محیط آزمایشی نگهداری شدند و سپس نمونه‌برداری از ماهیان گویی نر و ماده در چهار دوره زمانی متفاوت انجام گردید. مبنای تشخیص جنسیت سبزه‌پوشی بدنشان بود. به‌گونه‌ای که نرها لاغرتر و کوچک‌تر از ماده‌ها هستند و همچنین باله دمی در جنس نر بزرگ‌تر و رنگارنگ‌تر از ماده‌ها است.

۲-۲. طراحی آزمایش و معرفی تیمارها

در این آزمایش از یک طرح فاکتوریل 3×2 استفاده شد. به‌صورت سه سطر خطر شکار (بدون خطر، کم خطر و پرخطر) و دو سطح تراکم نر ماهی گویی (کم و زیاد). هر تیمار داری سه تکرار بود و ۱۸ واحد آزمایشی (آکواریوم) آماده شد. هر واحد آزمایشی شامل یک مخزن ۸۰ لیتری حاوی دو سطح از تراکم ماهی گویی (تراکم کم: ۲۰ نر و ۴۰ ماده و تراکم زیاد: ۴۰ نر و ۲۰ ماده) و سه سطح از تراکم گونه شکارچی (ماهی اسکار) (بدون شکارچی، ۴ شکارچی و ۶ شکارچی) بود. پس از مرور منابع در مطالعات پیشین در روش‌های آزمایشگاهی (Brusseau et al., 2023)، تعداد تیمارهای آزمایش طبق جدول ۱، شش مورد و هر کدام با سه تکرار بود.

جدول ۱- تیمارهای آزمایش

تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱
۸ شکارچی، تراکم نر کم	۴ شکارچی، تراکم نر کم	بدون شکارچی، تراکم نر کم
تیمار ۶	تیمار ۵	تیمار ۴
۸ شکارچی، تراکم نر زیاد	۴ شکارچی، تراکم نر زیاد	بدون شکارچی، تراکم نر زیاد

۲-۳. نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از ماهیان گویی نر و ماده در چهار دوره زمانی صورت گرفت و در هر نمونه‌برداری تعداد ۳ نمونه (دو نر و یک ماده) از هر آکواریوم توسط تور صید شده و به تانک ازت منتقل شد. دوره‌های زمانی نمونه‌برداری به شرح زیر است:

- ۱- پنج دقیقه پس از مواجهه اولیه با گونه شکارچی
- ۲- پنج ساعت پس از مواجهه اولیه با گونه شکارچی
- ۳- پنج روز پس از مواجهه اولیه با گونه شکارچی
- ۴- پانزده روز پس از مواجهه اولیه با گونه شکارچی

۲-۴. تحلیل بیان ژن

در این تحقیق تکنیک Real-time PCR به منظور بررسی بیان نسبی ژن AR در حضور ژن کنترل داخلی S ۱۸ برای نمونه‌های مورد تیمار ماهی گوپی در ۳ تکرار تکنیکی اجرا شد.

۲-۵. استخراج RNA

نمونه‌ها با استفاده از نیتروژن مایع به صورت پودر شده و ۵۰ میلی گرم از هر نمونه به تیوب‌های RNAse free حجم ۲ میلی لیتر منتقل شدند. تمام وسایل مورد نیاز از جمله میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتر، هاون، دسته هاون و پنس از پیش با اتوکلاو استریل شده بودند و سپس با نیتروژن مایع سرد شسته شدند، تا از هر گونه آسیب حرارتی ممکن به RNA جلوگیری شود. RNA استخراج شده روی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی و نمونه‌ها جهت ارزیابی کمی و کیفی دقیق تر با استفاده از دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نمونه‌ها از نظر غلظت و کیفیت، مناسباند و برای مراحل بعدی آماده بودند.

۲-۶. تیمار DNase

پس از بررسی غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ، برای حذف هرگونه آلودگی ممکن، نرمال سازی با مقدار ۵۰۰۰ نانوگرم انجام شد. به این منظور، ۵ میکروگرم از RNA استخراج شده با ۱ میکرولیتر DNase (Fermentase, USA) و ۱ میکرولیتر بافر مخلوط و با استفاده از آب مقطر به حجم ۱۵ میکرولیتر رسانده شدند. سپس در دستگاه (PeQlab, 96Grad) Thermo cycler در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه برای فعال سازی آنزیم DNase قرار گرفتند. در پایان، ۱ میکرولیتر EDTA 50 میلی مولار جهت غیرفعال سازی آنزیم DNase اضافه شد و در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شدند.

۲-۷. سنتز cDNA

برای سنتز cDNA، غلظت RNA براساس ۱۰۰۰ نانوگرم نرمال سازی شد. ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده با ۱ میکرولیتر آغازگر ۵۰ uM OligodT و ۱ میکرولیتر Random primer 10 uM ترکیب شد و با استفاده از آب DEPC به حجم ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. سپس در دمای ۶۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید تا RNA ها ساختار ثانویه خود را از دست داده و آغازگرهای dT بتوانند مستقر شوند (مرحله اتصال آغازگر). سپس نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و به آنها مخلوط آنزیم Reverse transcriptase (SMOBio, Taiwan) (۱ میکرولیتر آنزیم RT، ۲ میکرولیتر Buffer 10X، ۴ میکرولیتر dNTPs 10mM، ۰/۵ میکرولیتر RNase inhibitor و ۰/۵ میکرولیتر H₂O) که در مجموع به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه انکوبه شدند (مرحله سنتز cDNA). واکنش با قرار دادن نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه پایان یافت (مرحله اتمام و توقف واکنش). cDNA های ساخته شده تا انجام فرآیند Real-time PCR در فریزر -۸۰ درجه نگهداری شدند.

۲-۸. طراحی آغازگر^۱

با استفاده از نرم افزار primer3 که به طور خاص روی نرم افزار Geneious IR9.1.8 قابل استفاده است، آغازگرها براساس جدول ۲ با در نظر گرفتن دمای ذوب بهینه بین ۵۸-۶۰ درجه و طول قطعه کمتر از ۱۵۰ جفت باز طراحی شدند. سپس سنتز آغازگرها در شرکت متابیون آلمان صورت گرفت. واکنش PCR در دستگاه Thermocycler با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر اجرا شد که شامل ۷/۵ میکرولیتر میکس Taq DNA polymerase (Ampliqon 2x)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگرهای رفت و برگشت و ۱ میکرولیتر از cDNA سنتز شده (رق ۱/۵) بود. شرایط واکنش دمایی شامل دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل دمای ۹۴ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۵۹ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه بود. سپس ۵ میکرولیتر از محصول به دست آمده روی ژل آگاروز ۲ درصد در حضور مارکر وزن مولکولی ۱Kb (SMOBIO 1kb ladder) با جریان ۸۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند.

^۱Primer

جدول ۲- لیست آغازگرهای مورد استفاده برای تحلیل بیان نسبی ژن‌های هدف در این پژوهش

نام آغازگر	توالی (۵-۳)	دمای ذوب	اندازه محصول	نمونه ^۱
AR-F	CAAGGAGCTGGACCGCTTAG	۶۰	۱۰۹	XM_008419624.2
AR-R	CAGCTTTCTCACGACCGACT	۶۰		
18s-F	GTTTGAAGACGATCAGATACCGT	۶۰	۳۷۱	XR_008605766.1
18s-R	CCGCGTAACTAGTTAGCATGCCG	۶۰		

۲-۹. واکنش Real Time PCR

واکنش Real-time PCR در دستگاه RotorGene real-time PCR (Qiagen, Germany) با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد، که شامل ۱۰ میکرولیتر میکس Taq SYBR green (Ampliqon 2x SYBR green Lowroxx)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگرهای رفت و برگشت و ۱ میکرولیتر از cDNA سنتز شده بود. شرایط واکنش دمایی شامل دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل دمای ۹۴ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۵۹ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه بود. در نهایت، منحنی ذوب از دامنه دمایی ۶۵ تا ۹۵ درجه با شیب ۰/۳ درجه سانتی گراد ترسیم شد.

۲-۱۰. تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج بیان ژن به روش Real-time PCR با استفاده از روش محاسباتی $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای محاسبه مقدار تغییرات نسبی بیان ژن AR گزارش شد (Schmittgen *et al.*, 2008). این نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند. پس از بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون‌های کولموگروف-اسمیرنوف و شاپیرو-ویلک، وجود یا عدم وجود اختلاف بین گروه‌های آزمون و بررسی سطح معنی‌داری اثر متغیرهای تراکم نسبی نر و تعداد شکارچی روی تیمارها، توسط تجزیه واریانس دو طرفه ANOVA با استفاده از نرم‌افزار SPSS 27، انجام گردید. در ادامه، وجود اختلاف معنی‌دار در بین میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد ($P < 0/05$) محاسبه شد. این تحلیل‌ها ANOVA برای هر پنج زمان نمونه‌برداری (پنج دقیقه، پنج ساعت، پنج روز و پانزده روز) به صورت جداگانه محاسبه گردید.

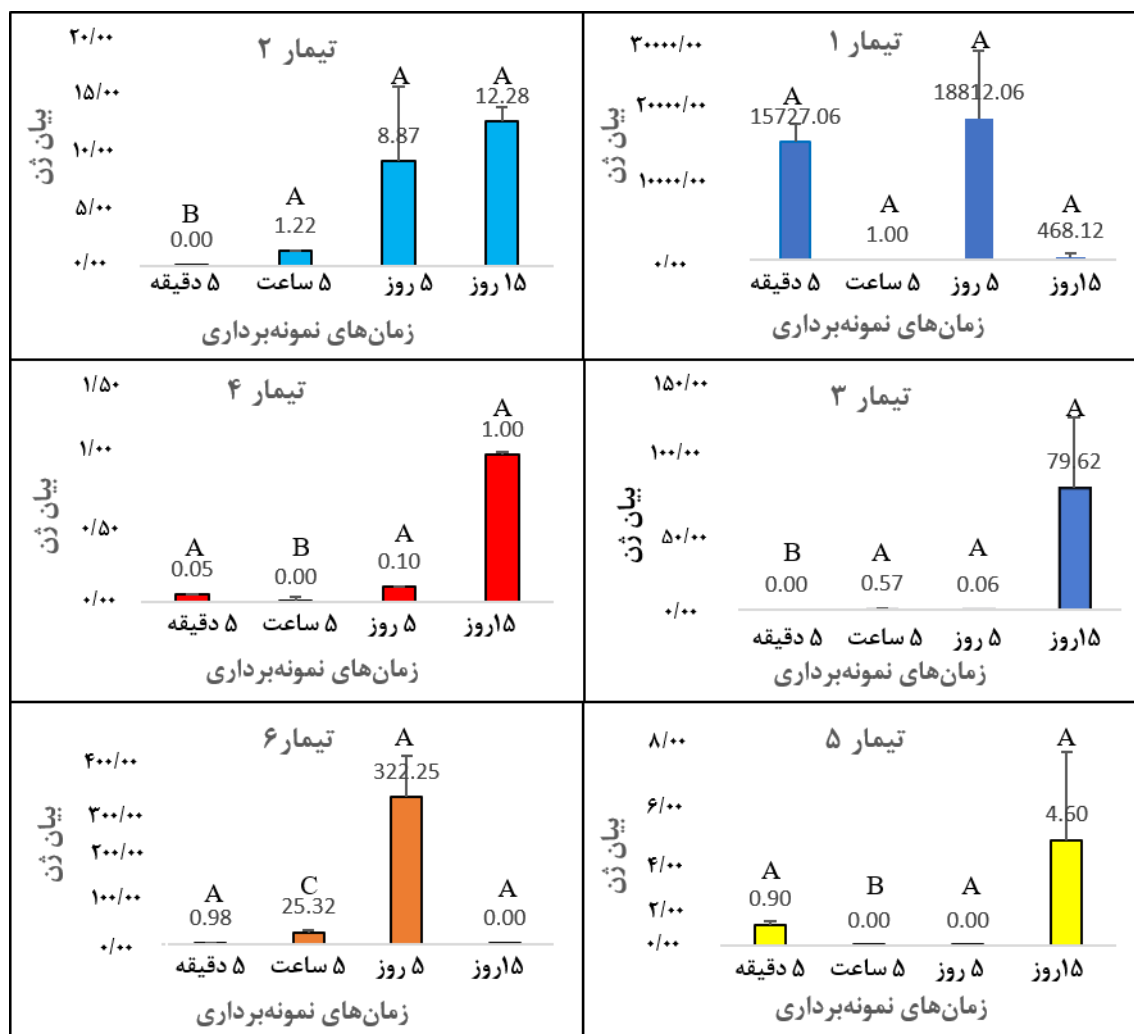
۳. یافته‌های پژوهش

طبق نتایج به دست آمده، اثر متغیرهای تراکم نسبی نر و تعداد شکارچی بر تیمارهای مورد آزمایش در زمان‌های نمونه‌برداری پنج دقیقه، پنج ساعت پس از مواجهه ماهی گوپی با گونه شکارچی و جنس نر رقیب، معنی‌دار بود ($P < 0/05$). اما در زمان‌های نمونه‌برداری ۵ روز و ۱۵ روز پس از مواجهه، اثر معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$). (جدول ۳) مطابق شکل ۱، ۵ دقیقه پس از مواجهه، بیان ژن گیرنده آندروژن در تیمارهای با تعداد شکارچی بالا و متوسط و تراکم نسبی نر کم نسبت به تیمار بدون شکارچی (شاهد)، کاهش معناداری نشان داد ($P < 0/05$). در ادامه پس از ۵ ساعت از مواجهه با گونه شکارچی و جنس نر رقیب، بیان این ژن در تیمار با تعداد شکارچی بالا و تراکم زیاد به نسبت تیمار با تعداد شکارچی متوسط و تراکم نر زیاد و تیمار بدون شکارچی (شاهد)، افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$).

جدول ۳- نتایج آماری آزمون نرمال بودن داده‌های ژن

تراکم شکارچی	شاپیرو-ویلک			کولموگروف-اسمیرنوف		
	Statistic	درجه آزادی	Sig.	Statistic	درجه آزادی	Sig.
تراکم بالا	۰/۴۱	۱۶	<۰/۰۰۱	۰/۶۰	۱۶	<۰/۰۰۱
متوسط	۰/۳۵	۱۶	<۰/۰۰۱	۰/۶۸	۱۶	<۰/۰۰۱
پایین	۰/۳۸	۱۶	<۰/۰۰۱	۰/۵۵	۱۶	<۰/۰۰۱

^۱Accession



شکل ۱- نمودارهای بیان نسبی ژن AR در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در ماهی گوپی. زمان‌های نمونه‌برداری شامل: ۵ دقیقه، ۵ ساعت، ۵ روز و ۱۵ روز می‌باشد.

A: تیمارهایی که تفاوت معنی‌داری با تیمارهای دیگر در همان زمان ندارند. B: تیمارهایی که نسبت به تیمارهای با حرف A تفاوت معنی‌دار دارند. C: تیمارهایی که نسبت به هر دو گروه قبلی تفاوت دارند.

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

در این پژوهش رفتارشناسی مولکولی ژن AR در حضور تراکم مختلف متفاوت شکارچی و تراکم مختلف نر در ماهی گوپی مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه‌ای در ماهی برقی (*Gymnotus omarorum*) نشان داد که آندروژن‌ها می‌توانند اثرات سریعی در ته‌اجم غیرمولد اعمال کنند. همچنین مشخص شد که آندروژن‌ها تأثیرات سریعی بر سیگنال‌های اجتماعی در نرها و ماده‌ها دارد و این اثرات در دوجنس نر و ماده ثابت است (Valiño et al., 2024). آندروژن پاسخ بویایی محیطی را به یک ترکیب خاص و مرتبط با محیط‌زیست افزایش می‌دهد و پاسخ‌های افزایش یافته در سطح گیرنده دارای عملکرد است و اثر فعال آندروژن بر گیرنده‌های بویایی با رفتار جنسی مرتبط است (Cardwell et al., 1995). در حالی که رفتارهای آگونیستی خاص نرها در ماهیان با ساختار اجتماعی پیچیده، به‌واسطه نوروپپتیدهای مغزی انجام می‌شود و استروئیدهای آندروژنی نقش تعدیل‌کننده دارند، رفتارهای تولیدمثلی خاص نرها در ماهیان به‌طور مستقیم توسط آندروژن‌ها القا می‌شوند و نوروپپتیدها نقش اندکی ایفا می‌کنند (Ghosal et al., 2016). نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد اثر تراکم مختلف شکارچی در زمان‌های متفاوت مواجهه با گونه شکارچی، اثر معنی‌داری در میزان بیان ژن AR داشته است. طبق تحقیقات، طعمه‌ها نسبت به سطح تهدیدی که توسط یک شکارچی ایجاد می‌شود، حساس هستند

و طعمه‌ها واکنش‌های ضد شکار خود را در حضور تهدیدات سطح بالاتر افزایش می‌دهند (Crane et al., 2020). مطالعات نشان می‌دهد گویی‌های ماده‌ای که در معرض نشانه‌های کم خطر شکارچی قرار می‌گیرند واکنش ضد شکارچی از خود نشان می‌دهند در حالی که ماده‌هایی که با پس زمینه شکار پرخطر مواجه می‌شوند چنین واکنشی نشان نمی‌دهند. اما نرها بدون در نظر گرفتن سطح خطر شکار واکنش معنی‌داری از خود نشان نمی‌دهند. این یافته نشان می‌دهد که گویی‌های نر و ماده به‌طور متفاوتی تعادل رفتاری برقرار می‌کنند (Brusseau et al., 2023). گویی‌های نر دارای تزئینات بدن درخشان هستند و به‌طور مداوم با رفتارهای اسرارآمیز، ماده‌ها را هدف قرار می‌دهند؛ یا از طریق نمایش‌های جفت‌گیری (نمایش‌های سینوسی^۱) برای جذب آنها اقدام می‌کنند، یا بدون انجام رفتار جفت‌گیری، با استفاده از گونوپودیوم، ماده‌های غیرپذیرا را تلقیح می‌نمایند و بدین ترتیب انتخاب جنسی توسط ماده را دور می‌زنند (Yang et al., 2023). همچنین گویی‌های نر تلاش می‌کنند با چندین ماده جفت‌گیری کنند. بنابراین تلاش زیادی جهت جذب جنس مخالف از خود نشان می‌دهند که از نظر زمان و انرژی پرهزینه است (Griffiths, 1996). پس مبادله بین رفتار جفت‌گیری و ضد شکارچی در نرها قوی‌تر است. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که گویی‌های نر کمتر از ماده‌ها به زیر آب می‌روند و محیط خود را کاوش می‌کنند و تعداد دفعات جفت‌گیری پنهان خود را در حضور شکارچی افزایش می‌دهند (Magurran et al., 1991; Chuard et al., 2020). در مطالعه‌ای بیان شده است که گویی‌های ماده باردار در محیط‌های پر شکار در مقایسه با ماده‌های جفت‌گیری نکرده به خطر شکار حاد پاسخ قوی‌تری نشان می‌دهند (Katwaroo-Andersen et al., 2016).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن AR در ماهی گویی پس از ۵ دقیقه از مواجهه با شکارچی و جنس نر رقیب در تیمار ۲ با تراکم شکارچی متوسط و تراکم نر کم، نسبت به تیمار شاهد (تیمار ۱) کاهش معنی‌داری دارد و این تغییرات به کاهش رفتار تولیدمثلی در اثر حضور شکارچی منجر شد. همچنین با گذشت ۵ ساعت از مواجهه، روند کاهشی بیان ژن در تیمار ۳ با تراکم شکارچی بالا و تراکم نر کم نسبت به تیمار شاهد ادامه پیدا کرد. عوامل استرس‌زا بسته به ماهیت و شدت عامل استرس‌زا به طریق مختلف بر تولیدمثل ماهی اثر می‌گذارد. این اثرات از طریق انتشار هورمونی و با درک عامل استرس‌زا آغاز و منتقل می‌شود و شامل محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-فوق کلیه، کاتکولامین‌ها است. ایجاد یک پاسخ استرس و مقاومت در برابر عامل استرس (مانند شکارچی یا گونه رقیب) یک فرآیند پرهزینه است، از جمله این هزینه‌ها، تلاش موجود زنده برای تنظیم مجدد هومئوستازی است (Schreck, 2010). در مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با تغذیه از جمله ژن نوروپپتید Y (NPY) و ژن گیرنده ملانوکورتین ۴ (MC4r) به همراه تحلیل رفتارشناسی مشاهده‌ای در تراکم‌های مختلف شکارچی مورد بررسی قرار گیرد تا درک جامع‌تری از تعامل بین عوامل محیطی، رفتار و تنظیم ژنتیکی تغذیه در ماهی گویی حاصل شود.

References

- Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 109(3), 219-245. DOI: 10.1016/0742-8413(94)00063-
- GBreton, B., Sambroni, E., 1996. Steroid activation of the brain-pituitary complex gonadotropic function in the triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 101(2), 155-164.
- Brusseau, A.J., Feyten, L.E., Groves, V., Felismino, M.E.L., Cao Van Truong, D., Crane, A.L., Brown, G.E., 2023. Sex and background risk influence responses to acute predation risk in Trinidadian guppies. *Behavioral Ecology* 34(5), 898-906. DOI: 10.1093/beheco/acad055
- Cardwell, J.R., Stacey, N.E., Lang, S.L.C., Tan, E.S.P., McAdam, D.S.O., 1995. Androgen increases olfactory receptor response to a vertebrate sex pheromone. *Journal of Comparative Physiology A* 176, 55-61. DOI: 10.1007/BF00197752

¹ Sigmoid displays

- Chuard, P.J., Grant, J.W., Ramnarine, I.W., Brown, G.E., 2020. Exploring the threat-sensitive predator avoidance hypothesis on mate competition in two wild populations of Trinidadian guppies. *Behavioural Processes* 180, 104225. DOI: 10.1016/j.beproc.2020.104225
- Chuard, P., 2017. Competition in Trinidadian guppies, *Poecilia reticulata*: Effects of competitor-to-resource ratio, sex, resource type, and tempo of predation risk (Doctoral dissertation, Concordia University).
- Chuard, P.J., Brown, G.E., Grant, J.W., 2018. Competition for food in two populations of a wild-caught fish. *Current Zoology* 64(5), 615-622.
- Crane, A.L., Feyten, L.E.A., Ramnarine, I.W., Brown, G.E., 2020. Temporally variable predation risk and fear retention in Trinidadian guppies. *Behavioral Ecology* 31(4), 1084-1090. DOI: 10.1093/beheco/araa055
- Dunlap, K.D., Zakon, H.H., 1998. Behavioral actions of androgens and androgen receptor expression in the electrocommunication system of an electric fish, *Eigenmannia virescens*. *Hormones and Behavior* 34(1), 30-38. DOI: 10.1006/hbeh.1998.1460
- Frommen, J.G., Thünken, T., Santostefano, F., Balzarini, V., Hettyey, A., 2022. Effects of chronic and acute predation risk on sexual ornamentation and mating preferences. *Behavioral Ecology* 33(1), 7-16. DOI: 10.1093/beheco/arab116
- Ghosal, R., Sorensen, P.W., 2016. Male-typical courtship, spawning behavior, and olfactory sensitivity are induced to different extents by androgens in the goldfish suggesting they are controlled by different neuroendocrine mechanisms. *General and Comparative Endocrinology* 232, 160-173. DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.04.028
- Golshan, M., Alavi, S.M.H., 2019. Androgen signaling in male fishes: Examples of anti-androgenic chemicals that cause reproductive disorders. *Theriogenology*, 139, 58-71. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.07.020
- Griffiths, S.W., 1996. Sex differences in the trade-off between feeding and mating in the guppy. *Journal of Fish Biology* 48(5), 891-898. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1996.tb01484.x
- Katwaroo-Andersen, J., Elvidge, C.K., Ramnarine, I., Brown, G.E., 2016. Interactive effects of reproductive assets and ambient predation risk on the threat-sensitive decisions of Trinidadian guppies. *Current Zoology* 62(3), 221-226. DOI: 10.1093/cz/zow062
- Magurran, A.E., 2005. *Evolutionary ecology: the Trinidadian guppy*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Magurran, A.E., Nowak, M.A., 1991. Another battle of the sexes: The consequences of sexual asymmetry in mating costs and predation risk in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 246(1315), 31-38. DOI: 10.1098/rspb.1991.0121
- Odling-Smee, L., Braithwaite, V.A., 2003. The role of learning in fish orientation. *Fish and Fisheries* 4(3), 235-246. DOI: 10.1046/j.1467-2979.2003.00127.x
- Ogino, Y., Ansai, S., Watanabe, E., Yasugi, M., Katayama, Y., Sakamoto, H., Okamoto, K., Okubo, K., Yamamoto, Y., Hara, I., Yamazaki, T., Kato, A., Kamei, Y., Naruse, K., Ohta, K., Ogino, H., Sakamoto, T., Miyagawa, S., Sato, T., Iguchi, T., 2023. Evolutionary differentiation of androgen receptor is responsible for sexual characteristic development in a teleost fish. *Nature Communications* 14(1), 1-16. DOI: 10.1038/s41467-023-37026-6
- Pouso, P., Quintana, L., Bolatto, C., Silva, A.C., 2010. Brain androgen receptor expression correlates with seasonal changes in the behavior of a weakly electric fish, *Brachyhypopomus gauderio*. *Hormones and Behavior* 58(5), 729-736. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2010.07.005
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3(6), 1101-1108. DOI: 10.1038/nprot.2008.73
- Schreck, C.B., 2010. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology* 165(3), 549-556. DOI: 10.1016/j.ygcen.2009.07.004
- Schuppe, E.R., Pradhan, D.S., Thonkulpitak, K., Drilling, C., Black, M., Grober, M.S., 2017. Sex differences in neuromuscular androgen receptor expression and sociosexual behavior in a sex changing fish. *PLOS ONE* 12(5), e0177711. DOI: 10.1371/journal.pone.0177711
- Singh, R., Shastri, P.K., Rasalkar, A.A., Singh, L., Thangaraj, K., 2006. A novel androgen receptor mutation resulting in complete androgen insensitivity syndrome and bilateral Leydig cell hyperplasia. *Journal of Andrology* 27(4), 510-516. DOI: 10.2164/jandrol.05181

- Valiño, G., Dunlap, K., Quintana, L., 2024. Androgen receptors rapidly modulate non-breeding aggression in male and female weakly electric fish (*Gymnotus omarorum*). *Hormones and Behavior* 159, 105475. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2023.105475
- Xu, X., Sun, X., Bai, Q., Zhang, Y., Qin, J., Zhang, X., 2021. Molecular identification of an androgen receptor and the influence of long-term aggressive interaction on hypothalamic gene expression in black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 207(3), 401-413. DOI: 10.1007/s00359-021-01480-8
- Yang, Y., Grant, E., López-Sepulcre, A., Gordon, S.P., 2023. Female foraging strategy co-evolves with sexual harassment intensity in the Trinidadian guppy. *Behavioral Ecology* 34(4), 593-601. DOI: 10.1093/beheco/arad027