

Research Article**Investigation of Androgen Receptor Gene Expression in Response to Predator Density and Male Density Variation in Guppy Fish (*Poecilia reticulata*)****Mahdi Katebi¹, Amir Reza Abed-Elmdoust^{1*}, Hamid Farahmand¹, Ali Momeninejad²**¹ Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran² Department of Fisheries, Baharavaran Faculty of Agricultural, University of Applied Science, Qom, Iran**Key Words**Guppy fish
Androgen receptor
Predator
Reproduction
Gene expression**Abstract**

Introduction: Due to its broad range of reproductive behaviors and availability of genetic and genomic resources, the guppy fish is a model species for studying the evolution of reproductive behavior. Androgens are the primary hormones regulating spermatogenesis and bind to androgen receptors on cells to control reproductive function across different growth stages. Given the importance of androgens in reproductive processes, the present study aims to examine the expression of the androgen receptor gene in response to varying predator densities and different male guppy densities. The findings of this research offer insights into how predator and male guppy densities affect androgen receptor gene expression, as well as the interaction between environmental factors and reproductive regulation in this model species.

Materials & Methods: Sampling of male and female guppies was conducted 5 minutes, 5 hours, 5 days, and 15 days after exposure to predators. The samples were immediately placed in liquid nitrogen tanks and stored at -80°C until RNA extraction. The data related to the target gene were analyzed using the comparative method $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ with the s18 reference gene. Subsequently, the normality of the data and two-sided statistical analysis were performed to determine the significant effects of treatments.

Results: The expression of the target gene indicated that varying predator densities at different exposure times had a significant effect on androgen receptor gene expression levels ($P < 0.05$).

Conclusion: Androgen receptor gene expression decreased in the presence of predators, leading to a reduction in reproductive behavior in guppies.

Article info* Corresponding Author's email:
amirabed@ut.ac.irReceived: 6 March 2025
Reviewed: 6 April 2025
Revised: 8 June 2025
Accepted: 10 July 2025

مقاله علمی - پژوهشی

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

مهدی کاتبی^۱، امیرضا عابد علم‌دوست^{۱*}، حمید فرحمند^۱، علی مومنی‌نژاد^۲

^۱ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۲ گروه شیلات، دانشکده کشاورزی بهارآوران، دانشگاه علمی کاربردی استان قم، قم، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: ماهی گویی به دلیل داشتن طیف گسترده‌ای از رفتارهای تولیدمثل و وجود منابع ژنتیکی و ژنومی یک گونه مدل برای مطالعه تکامل رفتار تولیدمثل می‌باشد. آندروژن‌ها هورمون تنظیم‌کننده اولیه اسپرماتوژنیز هستند و برای کنترل عملکرد تولیدمثل در مراحل مختلف رشد توسط گیرنده آندروژن به سلول متصل می‌شود. با توجه به اهمیت هورمون آندروژن در فرایند تولیدمثل، پژوهش حاضر به منظور بررسی بیان ژن گیرنده آندروژن در مواجهه با تراکم مختلف شکارچی و تراکم متفاوت ماهی گویی نر انجام گرفت. نتایج این تحقیق بینش‌هایی را در مورد این که چگونه تراکم ماهی‌های شکارچی و گویی نر بر بیان ژن گیرنده آندروژن تأثیر می‌گذارد و همچنین تأثیر متقابل بین عوامل محیطی و تنظیم تولیدمثل در این گونه مدل را ارائه می‌کند.

مواد و روش‌ها: نمونه برداری از ماهیان نر و ماده گویی پس از ۵ دقیقه، ۵ ساعت، ۵ روز و ۱۵ روز پس از مواجهه با گونه شکارچی صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله در تانک ازت مایع قرار گرفته و تا زمان استخراج RNA در یخچال ۸۰- نگه‌داری شدند. داده‌های مربوط به ژن هدف به وسیله ژن رفرنس ۱۸S با روش محاسباتی $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تحلیل شد. در ادامه نرمال بودن داده‌ها و آنالیز آماری دوطرفه جهت معنی‌دار بودن اثر تیمارها صورت گرفت.

نتایج: بیان ژن مورد نظر نشان داد که اثر تراکم مختلف شکارچی در زمان‌های متفاوت مواجهه با گونه شکارچی، اثر معنی‌داری در میزان بیان ژن گیرنده آندروژن داشته است ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: بیان ژن گیرنده آندروژن با حضور شکارچی کاهش یافته و این تغییر موجب کاهش رفتار تولیدمثلی در گویی‌ها می‌شود.

ماهی گویی
گیرنده آندروژن
شکارچی
تولیدمثل
بیان ژن

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

amirabed@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۶ اسفند ۱۴۰۳

تاریخ داوری: ۱۷ فروردین ۱۴۰۴

تاریخ اصلاح: ۱۸ خرداد ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۹ تیر ۱۴۰۴

مقدمه

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 (*Eigenmannia virescens*) پرداخته شد (۱۱). در مطالعه دیگری، ارتباط بین بیان ژن گیرنده آندروژن با تغییرات فصلی در رفتار ماهی الکتریکی (*Brachyhyppopomus gauderio*) بررسی شد (۱۲). هم‌چنین تفاوت‌های جنسی در بیان گیرنده‌های آندروژن عصبی-عضلانی و رفتار اجتماعی جنسی در ماهی در حال تغییر جنسیت مورد مطالعه قرار گرفت (۱۳). در مطالعه‌ای، بیوسنتز آندروژن در ماهی‌ها مورد بررسی قرار گرفت و ساختار مولکولی AR هسته‌ای در گونه‌های مدل پستانداران و ماهی‌ها مقایسه شد و مکانیسم‌های عمل آلاینده‌های محیطی را که به طور متفاوت سیگنال‌دهی آندروژن را در تولیدمثل ماهی مختل می‌کنند، بررسی شد (۹). در پژوهش دیگری، شناسایی مولکولی یک گیرنده آندروژن و تأثیر برهمکنش تهاجمی طولانی مدت بر بیان ژن‌های هیپوتالاموس در ماهی سنگ‌سیاه (*Sebastes schlegelii*) انجام گردید (۱۴). مطالعه تنظیم آندروژن تولیدمثل در یک گونه خاص می‌تواند در ماهی‌ها انجام گیرد. علاوه بر این، ماهی را می‌توان به عنوان ارگانسیم مدل بیولوژیکی مناسب برای بررسی سیگنال‌دهی آندروژن از دیدگاه محیط‌زیست در نظر گرفت (۹). با توجه به اهمیت هورمون آندروژن در فرایند تولیدمثل تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر عامل شکار و تراکم نر بر میزان بیان ژن گیرنده آندروژن در زمان‌های مختلف مواجهه با شکارچی انجام نگرفته است زیرا در پژوهش حاضر اثر تراکم متفاوت شکارچی و تراکم مختلف نر در بیان ژن گیرنده آندروژن در ماهی گویی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی محیط آزمایش: مطالعه حاضر، در زمستان ۱۴۰۲ در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی آقای مومنی‌نژاد واقع در استان قم، شهرستان قنوات انجام پذیرفت. تعداد ۱۰۸۰ ماهی گویی با وزن 0.4 ± 0.1 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 سلسیوس و میزان اکسیژن $7/8$ ppm به مدت دو هفته جهت سازگاری با محیط

به طور کلی ماهی‌ها با چالش‌های مختلفی روبه‌رو می‌شوند که باعث می‌شود به‌طور موثر از زیستگاه خود برای کسب انرژی استفاده کنند و یاد بگیرند که منابع غذایی مغذی را شناسایی و مصرف کرده، با رقبا تعامل داشته باشند و شرکای تولیدمثل مناسب پیدا کنند (۱). در حالی که عدم توجه به این چالش‌ها به‌طور فوری به مرگ نمی‌انجامد، اما فرصت‌هایی برای بهبود مهارت‌های تولیدمثل وجود دارد. هم‌چنین پاسخ‌های ناکافی به شکارچیان می‌تواند منجر به مرگ شود، به گونه‌ای که رفتار ضدشکارچی در مقایسه با جنبه‌های دیگر رفتاری، مؤلفه ژنتیکی مهم‌تری داشته باشد (۲). 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 موثر چالش‌های فرار از شکارچیان را کنترل کرده و در عین حال به فعالیت‌های ضروری مانند جستجوی غذا و تولیدمثل بپردازد (۳). ماهی گویی (*Poecilia reticulata*) به عنوان 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 (۴). 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 می‌پردازیم، تمایزات بین نر و ماده را به اندازه کافی مورد بررسی قرار نداده‌ایم (۵). آندروژن‌ها هورمون تنظیم‌کننده اولیه اسپرماتوزنیز هستند (۶). هم‌چنین با فرایندهای توسعه، نگهداری و تمایز مرتبط می‌باشد. در طول بلوغ، آندروژن برای کنترل عملکرد تولید مثل در مراحل مختلف رشد توسط گیرنده آندروژن (AR: Androgen receptor) به سلول متصل می‌شود (۷). آندروژن هم‌چنین می‌تواند بر محور هیپوتالاموس، هیپوفیز، گناد در مهره‌داران اثرگذار باشد و به عنوان واسطه در رفتارهای اجتماعی و تولیدمثل از جمله قلمروطلبی، پرخاشگری و خواستگاری عمل کند (۸). تاکنون AR هسته‌ای و AR غشایی در ماهی‌ها شناسایی شده است (۹). پاسخ‌های فنوتیپی و فیزیولوژیکی به آندروژن‌ها توسط گیرنده آندروژن، که به خانواده گیرنده‌های هسته‌ای تعلق دارد، انجام می‌شود (۱۰). تاکنون پژوهش‌هایی در مورد شناسایی گیرنده آندروژن و میزان بیان ژن و عملکرد آن در

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

آنالیز بیان ژن: در این تحقیق تکنیک Real-time PCR به منظور بررسی بیان نسبی ژن AR در حضور ژن کنترل داخلی 18 S برای نمونه‌های مورد تیمار ماهی گوپی در ۳ تکرار تکنیکی اجرا شد.

استخراج RNA: نمونه‌ها با استفاده از ازت مایع به صورت پودر شده و ۵۰ میلی‌گرم از هر نمونه به تیوب‌های RNAse free حجم ۲ میلی‌لیتر منتقل شدند. تمام وسایل مورد نیاز از جمله میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتر، هاون، دسته هاون و پنس از پیش با اتوکلاو استریل شده بودند و سپس با ازت مایع سرد شسته شدند تا از هرگونه حرارتی که ممکن بوده و موجب آسیب به RNA می‌شد، جلوگیری شود. RNA استخراج شده بر 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، مناسب بوده و برای مراحل بعدی آماده بودند.

تیمار DNase: پس از بررسی غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ، برای حذف هرگونه آلودگی ممکن، نرمال‌سازی با مقدار ۵۰۰۰ نانوگرم انجام شد. به این منظور، ۵ μg 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 Thermo cycler (PeQlab, 96Grad) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه برای فعال‌سازی آنزیم DNase قرار گرفتند. در پایان، ۱ میکرولیتر EDTA 50 میلی‌مولار جهت غیرفعال‌سازی آنزیم DNase اضافه شده و در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شدند.

سنتز cDNA: برای سنتز cDNA، غلظت RNA براساس ۱۰۰۰ نانوگرم نرمال‌سازی شد. ۱ μg از RNA استخراج شده با ۱ میکرولیتر آغازگر ۵۰ uM OligodT و ۱ میکرولیتر 10 uM Random primer 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 RNAها 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 10mM dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر RNase inhibitor و ۰/۵ میکرولیتر H₂O) که در مجموع ۲۰ میکرولیتر شده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه انکوبه شدند (مرحله سنتز cDNA).

آزمایش نگهداری شدند. این دیواره شیشه‌ای در داخل آکواریوم به عنوان حائل عمل کرده و مانع برخورد فیزیکی گونه شکارچی با گونه شکار می‌شود، به صورتی که تبادل دمایی و اکسیژن در کل آکواریوم به طور یکسان وجود دارد. در داخل هر آکواریوم از تزئینات گیاهان مصنوعی با چیدمان یکسان به عنوان پناهگاه استفاده شد. هوادهی به وسیله هواده مرکزی کارگاه به طور کامل در طول روز انجام گردید. در ادامه به تعداد ۶۰ عدد ماهی اسکار (*Astronotos ocellatus*) با وزن 8 ± 2 گرم از کارگاه تهیه گردید و به عنوان گونه شکارچی در آکواریوم‌ها توزیع شدند. ماهیان گوپی در داخل محفظه شیشه‌ای قرار گرفته و توسط گونه شکارچی اسکار رویت شدند. ماهیان گوپی با جیره غذایی آغازگر سه صفر شرکت فرادانه سه وعده در روز غذاهای شدند. ماهیان به مدت ۱۵ روز در آکواریوم‌ها جهت سازگاری با محیط آزمایشی نگهداری شده و سپس نمونه‌برداری از ماهیان گوپی نر و ماده در چهار دوره زمانی متفاوت انجام گردید. مبنای تشخیص جنسیت ساینز بدنشان بود. به گونه‌ای که نرها لاغرتر و کوچک‌تر از ماده‌ها هستند و هم چنین باله دمی در جنس نر بزرگ‌تر و رنگارنگ‌تر از ماده‌ها است.

طراحی آزمایش و معرفی تیمارها: در این آزمایش از یک طرح فاکتوریل ۳×۲ استفاده شد. به صورت سه سطر خطر شکار (بدون خطر، کم خطر، پرخطر) و دو سطح تراکم نر ماهی گوپی (کم، زیاد). هر تیمار دارای سه تکرار بود و ۱۸ واحد آزمایشی (آکواریوم) آماده شد. هر واحد آزمایشی شامل یک تانک ۸۰ لیتری که حاوی دو سطح از تراکم ماهی گوپی (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، ۶ شکارچی) بوده است. پس از مرور منابع در مطالعات پیشین در روش‌های آزمایشگاهی (۱۵)، تعداد تیمارهای آزمایش شده طبق جدول ۱، شش مورد و هر کدام با سه تکرار می‌باشد.

جدول ۱: تیمارهای آزمایش

Table 1: Experimental treatments

Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3
No predators, low male density	4 predators, low male density	8 predators, low male density
Treatment 4	Treatment 5	Treatment 6
No predators, high male density	4 predators, high male density	8 predators, high male density

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری از ماهیان گوپی 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

Thermocycler با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر اجرا شد که شامل ۷/۵ میکرولیتر میکس (Ampliqon 2x) Taq DNA polymerase، ۰/۵ میکرولیتر آغازگرهای رفت و برگشت و ۱ میکرولیتر از cDNA سنتز شده (رقت 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، دمای ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه بوده است. سپس ۵ میکرولیتر از محصول به دست آمده بر روی ژل آگاروز ۲ درصد در حضور مارکر وزن مولکولی (SMOBIO 1Kb ladder) با جریان ۸۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند.

واکنش با قرار دادن نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه پایان یافت (مرحله اتمام و توقف واکنش). cDNAهای ساخته شده تا انجام فرآیند Real-time PCR در فریزر ۸۰- درجه نگهداری شدند.

طراحی آغازگر (Primer): با استفاده از نرم‌افزار primer3 که به‌طور خاص بر روی نرم‌افزار Geneious IR9.1.8 قابل استفاده است، آغازگرها با در نظر گرفتن دمای ذوب بهینه بین ۶۰-۵۸ درجه و طول قطعه کم‌تر از ۱۵۰ جفت باز طراحی شدند. سپس سنتز آغازگرها در شرکت متابیون آلمان صورت گرفت. واکنش PCR در دستگاه

جدول ۲: لیست آغازگرهای مورد استفاده برای آنالیز بیان نسبی ژن‌های هدف در این پژوهش

Table 2: List of primers used to analyze the relative expression of target genes in this study

Primer name	sequence	Tm*	product	Accession
AR-F	CAAGGAGCTGGACCGCTTAG	60	109	XM_008419624.2
AR-R	CAGCTTCTCACGACCGACT	60		
18s-F	GTTCGAAGACGATCAGATACCGT	60	371	XR_008605766.1
18s-R	CCGCGTAACTAGTTAGCATGCCG	60		

* Melting temperature

تراکم نسبی نر و تعداد شکارچی بر روی تیمارها، توسط آنالیز ANOVA دو طرفه 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 آنالیزها برای هر پنج زمان نمونه‌برداری (پنج دقیقه، پنج ساعت، پنج روز و پانزده روز) به‌صورت جداگانه محاسبه گردید.

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 Lowrox)، 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، دمای ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه بوده است. در نهایت، منحنی ذوب از دامنه دمایی ۶۵ تا ۹۵ درجه با شیب ۰/۳ درجه سانتی‌گراد ترسیم شد.

نتایج

طبق نتایج به دست آمده، اثر متغیرهای تراکم نسبی نر و تعداد شکارچی بر تیمارهای مورد آزمایش در زمان‌های نمونه‌برداری ۵ دقیقه، ۵ ساعت پس از مواجهه ماهی گویی با گونه شکارچی و جنس نر رقیب، معنی‌دار بوده است ($P < 0.05$). اما در زمان‌های نمونه‌برداری ۵ روز و ۱۵ روز پس از مواجهه، اثر معنی‌دار مشاهده نشد ($P > 0.05$).

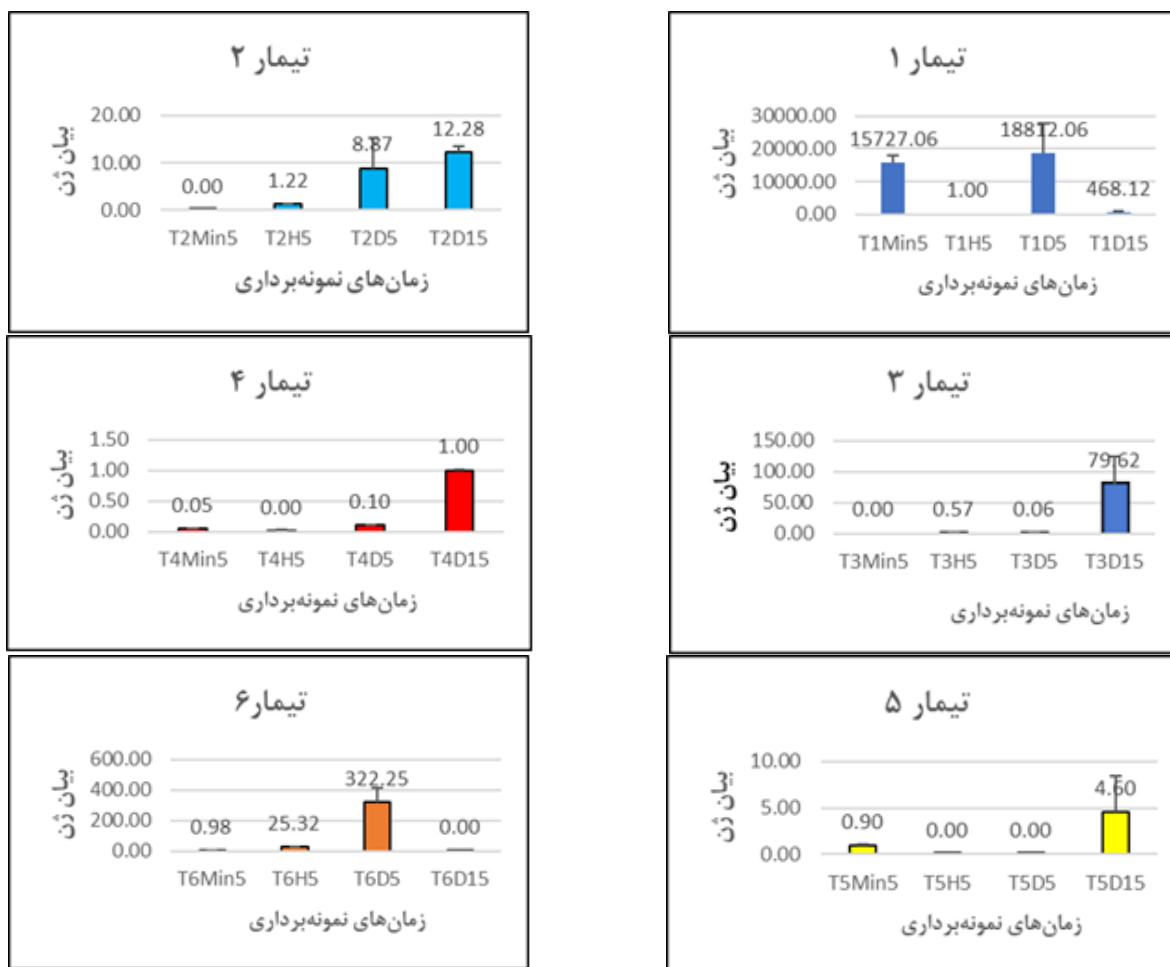
آنالیز داده‌ها: نتایج بیان ژن به روش Real-time PCR با استفاده از روش محاسباتی $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای محاسبه مقدار تغییرات نسبی بیان ژن AR گزارش شد (۱۶). این نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند. پس از بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون‌های کولموگروف-اسپیرنوف و شاپیرو-ویلک، وجود یا عدم وجود اختلاف بین گروه‌های آزمون و بررسی سطح معنی‌داری اثر متغیرهای

جدول ۳: نتایج آماری آزمون نرمال بودن داده‌های ژن AR
Table 3: Statistical results of the normality test for AR gene data

Predator density	Shapiro-Wilk			Kolmogorov-Spirinov		
	Statistic	Degree of freedom	Sig.	Statistic	Degree of freedom	Sig.
High density	0.41	16	<0.001	0.60	16	<0.001
Medium density	0.35	16	<0.001	0.68	16	<0.001
Low density	0.38	16	<0.001	0.55	16	<0.001

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 معنی‌دار داشته است ($P < 0.05$).

طبق 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 معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$). در ادامه پس از ۵ ساعت از مواجهه با گونه شکارچی و



T: تیمار، 5: 5 دقیقه، 5: 5 ساعت، 5D: 5 روز، 15D: 15 روز

شکل ۱: بیان نسبی ژن AR در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در ماهی گویی

Figure 1: Relative expression of the AR gene at different sampling times in Guppy fish

بحث

خطر شکارچی قرار می‌گیرند واکنش ضدشکارچی از خود نشان می‌دهند درحالی‌که 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 (۱۵). 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 پر هزینه می‌باشد (۱۹). بنابراین مبادله بین رفتار جفت‌گیری و ضدشکارچی در نرها قوی‌تر است. در مطالعه‌ای نشان داد 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 (۲۰، ۲۱). در مطالعه‌ای بیان شده است که گویی‌های ماده باردار در محیط‌های پر شکار در مقایسه با ماده‌های جفت‌گیری نکرده به خطر شکار حاد

در این پژوهش رفتارشناسی مولکولی ژن AR در حضور تراکم مختلف متفاوت شکارچی و تراکم مختلف نر در ماهی گویی 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 تاثیرات سریعی بر سیگنال‌های اجتماعی در نرها و ماده‌ها دارد و این اثرات در دوجنس نر و ماده ثابت است (۱۷). آندروژن پاسخ بویایی محیطی را به یک ترکیب خاص و مرتبط با محیط زیست افزایش می‌دهد و پاسخ‌های افزایش یافته در سطح گیرنده دارای عملکرد است و اثر فعال آندروژن بر گیرنده‌های بویایی با رفتار جنسی مرتبط است (۱۸). 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. مطالعات نشان می‌دهد ماده‌هایی که در معرض نشانه‌های کم

10. 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. and 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
11. Dunlap, K.D. and 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
12. Pouso, P., Quintana, L., Bolatto, C. and Silva, A.C., 2010. Brain androgen receptor expression correlates with seasonal changes in the behavior of a weakly electric fish, *Brachyhyppomus gauderio*. *Hormones and Behavior*. 58(5): 729-736. doi: 10.1016/J.YHBEH.2010.07.005
13. Schuppe, E.R., Pradhan, D.S., Thonkulpitak, K., Drilling, C., Black, M. and 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
14. Xu, X., Sun, X., Bai, Q., Zhang, Y., Qin, J. and Zhang, X., 2021. Molecular identification of an androgen receptor and the influence of long-term aggressive interaction on hypothalamic genes 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/FIGURES/6
15. Brusseau, A.J.P., Feyten, L.E.A., Groves, V., Felismino, M.E.L., Cao Van Truong, D., Crane, A.L., Ramnarine, I.W. and Brown, G.E., 2023. Sex and background risk influence responses to acute predation risk in Trinidadian guppies. *Behavioral Ecology*. doi: 10.1093/beheco/arad055
16. Schmittgen, T.D. and 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
17. Valiño, G., Dunlap, K. and 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
18. Cardwell, J., Stacey, N. and Lang, S., 1995. Androgen increases olfactory receptor response to a vertebrate sex pheromone. *Springer JR Cardwell, NE Stacey, SLC Lang, ESP Tan, DSO McAdam Journal of Comparative Physiology A*, 176(1): 55-61. doi: 10.1007/BF00197752
19. 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
20. Chuard, P.J.C., Grant, J.W.A., Ramnarine, I.W. and Brown, G.E., 2020. Exploring the threat-sensitive predator avoidance hypothesis on mate competition in two wild populations of Trinidadian guppies. *Behavioural Processes*. 180. doi: 10.1016/J.BEPROC.2020.104225
21. Magurran, A.E. and 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
22. Katwaroo-Andersen, J., Elvidge, C.K., Ramnarine, I. and 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
23. Schreck, C.B., 2010. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormones. *General and Comparative Endocrinology*. 165(3): 549-556. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.07.004
- پاسخ قوی‌تری نشان می‌دهند (۲۲). در این مطالعه، نتایج 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 داشته است. این تغییرات به کاهش رفتار تولیدمثلی در اثر حضور شکارچی منجر شد. هم‌چنین با گذشت ۵ ساعت از مواجهه، روند کاهش بیان ژن در تیمار ۳ با تراکم شکارچی بالا و تراکم نر کم نسبت به تیمار شاهد ادامه پیدا کرده است. عوامل استرس‌زا بسته به ماهیت و شدت عامل استرس‌زا به طرق مختلف بر تولیدمثل ماهی اثر می‌گذارد. این اثرات از طریق انتشار هورمونی که با درک عالم استرس‌زا آغاز شده، منتقل می‌شود و شامل محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-فوق‌کلیه، کتکولامین‌ها می‌باشد. ایجاد یک پاسخ استرس و مقاومت در برابر عامل استرس (مانند شکارچی یا گونه رقیب) یک فرایند پرهزینه است، از جمله این هزینه‌ها، تلاش موجود زنده برای تنظیم مجدد هومئوستازی است (۲۳). در مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود تغییرات ژن‌های دیگری مرتبط با تغذیه به همراه رفتارشناسی مشاهده‌ای در تراکم مختلف شکارچی مدنظر قرار گیرد.

منابع

1. Odling-Smee, L. and 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
2. Frommen, J.G., Thünken, T., Santostefano, F., Balzarini, V. and Hetttyey, 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
3. Chuard, P.J.C. and Brown, G.W.A., 2018. Competition for food in 2 populations of a wild-caught fish. Retrieved from <https://academic.oup.com/cz/article-abstract/64/5/615/4797078>
4. Magurran, A., 2005. Evolutionary ecology: the Trinidadian guppy. Retrieved from https://books.google.ca/books?hl=en&lr=&id=8uXclb_E6TMC&oi=fnd&pg=PR9&dq=Evolutionary+ecology:+the+Trinidadian+guppy&ots=eEz93HkMLr&sig=UP73br42mnyCdO6GVk1JeJwScCM
5. Chuard, P.J.C., 2017. Competition in Trinidadian guppies, *Poecilia reticulata*: Effects of competitor-to resource ratio, sex, resource type, and tempo of predation risk.
6. Singh, R., Shastry, P.K., Rasalkar, A.A., Singh, L. and 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
7. 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-G
8. Breton, B., 1996. Steroid Activation of the Brain Pituitary Complex Gonadotropic Function in the Triploid Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Elsevier*. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648096900179>
9. Golshan, M. and 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