



Investigation of Melanocortin-4 receptor gene expression in response to variations in predator density and male density in Guppy (*Poecilia reticulata*)

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

1. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: mahdikatebi@ut.ac.ir

2. Corresponding Author, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: amirabed@ut.ac.ir

3. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: hfarahmand@ut.ac.ir

4. Department of Fisheries, Baharavaran Faculty of Agriculture, University of Applied Science and Technology, Qom Province, Qom, Iran. E-mail: a.momeninejad@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	The guppy, due to its diverse reproductive behaviors and extensive genetic resources, is considered a suitable model for studying the evolution of reproductive behaviors. The melanocortin-4 receptor (MC4R) plays a role in regulating energy balance, stress response, and reproductive control in vertebrates. This study examined the effect of different predator densities and the presence of competing males on MC4R gene expression in guppy. Experiments were conducted under controlled conditions in six treatments with different predator numbers and male densities. Sampling was performed at four time points: 5 minutes, 5 hours, 5 days, and 15 days after exposure. The relative expression of the MC4R gene was evaluated using Real-Time PCR and compared with the reference gene 18s. The results showed that predator density and the presence of competing males had a significant effect on MC4R gene expression in guppy ($P < 0.05$). The highest gene expression was observed in treatments with predators and high male density, 5 hours after exposure; however, with prolonged exposure, gene expression decreased. These results indicate that MC4R is a key regulator in biological processes such as growth, reproduction, stress responses, and metabolic rate. The findings also confirm the relationship of this gene with the regulation of reproductive behaviors and adaptation to predators and sexual competition. It is suggested that future studies examine the signaling mechanisms of MC4R and its epigenetic changes under long-term exposure to stress factors to determine its precise role in regulating physiological and behavioral responses.
Article history: Received 08 April 2025 Received in revised form 30 May 2025 Accepted 03 June 2025 Published online 28 June 2025	
Keywords: <i>Gene expression,</i> <i>Growth,</i> <i>Guppy,</i> <i>Melanocortin-4 receptor,</i> <i>Predator.</i>	

Cite this article: Katebi, M., Abed-Elmdoust, A.R., Farahmand, H., & Momeninejad, A. (2025). Investigation of Melanocortin-4 receptor gene expression in response to variations in predator density and male density in Guppy (*Poecilia reticulata*). *Journal of Natural Environment*, 77 (4), 591-599.
 DOI: <http://doi.org/10.22059/jne.2025.392154.2786>



بررسی بیان ژن گیرنده ملانوکورتین ۴ در پاسخ به تغییرات تراکم شکارچی و تراکم نر در ماهی گویی (*Poecilia reticulata*)

مهدی کاتبی^۱ | امیرضا عابد علم دوست^۲ | حمید فرحمند^۳ | علی مومنی نژاد^۱

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

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

۳. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشکدهگان کشاورزی و 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

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	ماهی گویی به دلیل رفتارهای تولیدمثلی متنوع و منابع ژنتیکی گسترده، مدلی مناسب برای مطالعه تکامل رفتارهای تولیدمثلی محسوب می شود. گیرنده ملانوکورتین ۴ (MC4r) در تنظیم تعادل انرژی، پاسخ به استرس و کنترل تولیدمثل در مهره داران نقش دارد. این پژوهش تأثیر تراکم های مختلف شکارچی و حضور نرهای رقیب بر بیان ژن MC4r در ماهی گویی را بررسی کرد. آزمایش ها در شرایط کنترل شده و در شش تیمار با تعداد متفاوت شکارچی و تراکم نر انجام شد. نمونه برداری در چهار بازه زمانی ۵ دقیقه، ۵ ساعت، ۵ روز و ۱۵ روز پس از مواجهه انجام گرفت. بیان نسبی ژن MC4r با روش Real-Time PCR و مقایسه با ژن مرجع ۱۸S ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تراکم شکارچی و حضور نرهای رقیب تأثیر معنی داری بر میزان بیان MC4r در گویی دارد ($P < 0.05$). بیشترین بیان ژن در تیمارهای دارای شکارچی و تراکم نر زیاد، ۵ ساعت پس از مواجهه مشاهده شد اما در ادامه، با افزایش مدت زمان مواجهه، بیان ژن کاهش یافت. این نتایج نشان می دهد که MC4r تنظیم کننده کلیدی در فرآیندهای زیستی مانند رشد، تولیدمثل، پاسخ های استرس و نرخ متابولیک بدن است. یافته ها همچنین ارتباط این ژن را با تنظیم رفتارهای تولیدمثلی و سازگاری با شکارچیان و رقابت جنسی تأیید می کنند. پیشنهاد می شود مطالعات آینده مکانیسم های سیگنال دهی MC4r و تغییرات اپی ژنتیکی آن را در مواجهه طولانی مدت با عوامل استرس زا بررسی کنند تا نقش دقیق آن در تنظیم پاسخ های فیزیولوژیکی و رفتاری مشخص شود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۱۹	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۳/۰۹	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۳	
تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۴/۰۷	
کلیدواژه ها:	
بیان ژن،	
شکارچی،	
رشد، شکارچی،	
گیرنده ملانوکورتین ۴،	
ماهی گویی.	

استناد: کاتبی، مهدی؛ عابد علم دوست، امیررضا؛ فرحمند، حمید؛ و مومنی نژاد، علی (۱۴۰۳). بررسی بیان ژن گیرنده ملانوکورتین ۴ در پاسخ به تغییرات تراکم شکارچی و تراکم نر در ماهی گویی (*Poecilia reticulata*). محیط زیست طبیعی، ۷۷ (۴)، ۵۹۹-۵۹۱.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jne.2025.392154.2786>



© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

تقریباً همه موجودات زنده، صرف نظر از اینکه اجتماعی باشند یا نه، با هم گونه‌های خود تعامل اجتماعی دارند. این تعاملات شامل جفت‌گیری، رقابت، ارتباط، همکاری و حرکت در کنار هم گونه‌ها می‌شود (Fisher et al., 2021). از سوی دیگر، شکارگری یکی از عوامل کلیدی در تعیین الگوهای موجود در سیستم‌های طبیعی (مانند انرژی و اطلاعات) است. دستکاری‌های تجربی در جمعیت شکارگران نشان داده‌اند که آنها تأثیرات مهمی بر جمعیت طعمه‌ها دارند. تنوع در تعاملات اجتماعی یکی از محورهای اساسی تنوع زیستی در میان گونه‌ها، جمعیت‌ها و افراد مختلف است (H. Liu et al., 2016).

یافته‌های اخیر از مطالعات آزمایشگاهی و میدانی نشان می‌دهد که شکارچی یا بوی شکارچی می‌تواند باعث استرس فیزیولوژیکی مزمن شده که بر تولیدمثل و بقا و در نتیجه جمعیت‌شناسی^۱ طعمه اثر می‌گذارد (Boonstra et al., 2014). برای به‌حداکثر رساندن کارایی سازوکارهای ضدشکار، افراد طعمه منابع در دسترس مانند زمان و انرژی را به پاسخ‌های دفاعی اختصاص می‌دهند و فعالیت‌های دیگر، از جمله تغذیه و تولیدمثل، را محدود می‌کنند (Jermacz et al., 2020). چنین سازگاری‌هایی باعث افزایش کارایی ارگانیسم می‌شود که در طول یک واکنش دفاعی ضروری است (Jermacz et al., 2020). فشارهای تکاملی ناشی از تهدید شکارچیان تأثیر قابل توجهی بر شکل‌گیری ویژگی‌های تطبیقی در گونه‌های طعمه دارد. درحالی که برخی از موجودات برای محافظت از خود به سازوکارهای دفاعی فیزیکی متکی هستند، استفاده از استراتژی‌های رفتاری، رویکردی کارآمدتر و انعطاف‌پذیرتر محسوب می‌شود. این شیوه به طعمه امکان می‌دهد تا به‌طور مؤثر از شکارچیان دوری کرده و همزمان به فعالیت‌های حیاتی مانند تغذیه و تولیدمثل بپردازد (Chuard et al., 2018).

رشد و تطابق ماهیان با شرایط محیطی به‌شدت تحت تأثیر سیستم هورمونی غدد درون‌ریز قرار دارد (Gairin et al., 2022). در ماهیان، پاسخ به استرس شامل فعال‌سازی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-اینترنال^۲ (HPI) است که در نهایت منجر به ترشح گلوکوکورتیکوئیدها از سلول‌های اینترنال واقع در فوق کلیه می‌شود (Uren Webster et al., 2020). شناسایی گیرنده‌های ملانوکورتین در ماهیان غضروفی پرسش‌های متعددی را در مورد نقش این گیرنده‌ها در محور هیپوتالاموس، هیپوفیز، اینترنال در این ماهیان مطرح می‌کند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد سلول‌های اینترنال در ماهیان غضروفی در تنظیم استرس، هومئوستازی گلوکز و تنظیم اسمزی نقش دارند (Liang et al., 2013). گیرنده ملانوکورتین-۴ (MC4r) نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی متعدد از جمله هومئوستازی انرژی، تولیدمثل، عملکرد جنسی و سایر عملکردها در پستانداران ایفا می‌کند (Zhang et al., 2019). مطالعات نشان داده است که جهش‌های MC4r در غارماهی مکزیک^۴ به افزایش اشتها، مقاومت در برابر گرسنگی و رشد کمک می‌کند و نقش مهمی در سازگاری با یک محیط فقیر از مواد مغذی دارد. علاوه بر این، MC4r نقش کلیدی در رفتار جنسی و تولیدمثل در ماهی‌های استخوانی^۵ دارد (Ji et al., 2023).

از آنجا که پدیده اجتناب از شکارچی نئوفوبیک در ابتدا در جمعیت‌های گویی ترینیدادی (*Poecilia reticulata*) مشاهده شد، این ماهی به‌عنوان مدلی برای درک تنوع فنوتیپی، تحت فشارهای انتخاب طبیعی و جنسی عمل می‌کند (Crane et al., 2024). درمطالعه‌ای بیان شد که فشار شکارگری بر پاسخ‌های رفتاری و فیزیولوژیکی به استرس در ماهیان تأثیر می‌گذارد، به‌طوری که جمعیت‌های با شکارگری بالا، کاوشگری و فعالیت بیشتری نشان می‌دهند و میزان ترشح کورتیزول کمتری دارند که نقش انتخاب طبیعی در شکل‌دهی صفات رفتاری و هورمونی مرتبط را نشان می‌دهد (Archard et al., 2012). خطر شکارگری، رفتار کاوشگری را در ماهی‌های گویی سرکوب می‌کند، به‌طوری که جمعیت‌های با شکارگری کم کاوشگری بیشتری نشان می‌دهند. از این‌رو تأثیر عوامل ژنتیکی نامشخص است و نیاز به مطالعه بیشتر دارد (Burns et al., 2016).

¹Demography²hypothalamus-pituitary-interrenal³Melanocortin-4 receptor⁴Mexican cavefish⁵Teleost's

مطالعاتی که در خصوص بررسی تغییرات بیان ژن در ماهی گوپی در مواجهه با سطوح مختلف شکارچی بسیار کم است. به طور مثال در پژوهشی بیان شد خطر شکارگری بر رفتار اجتماعی و تنظیم نوروهورمونی در ماهی گوپی تأثیر می‌گذارد، به طوری که جمعیت‌های با شکارگری بالا بیان بیشتر وازوتوسین را نشان می‌دهند، که نقش آن در تنوع اجتماعی را تأیید اما عملکرد کلی آن در گونه‌های مختلف را به چالش می‌کشد (Reddon et al., 2022). در زمینه تفاوت رفتار پاسخ به شکارچی بین جنس نر و ماده در ماهی گوپی، مطالعات نشان داده است که ماده‌ها واکنش‌های ضد شکارچی قوی‌تری دارند و نوهراسی نشان می‌دهند، در حالی که نرها بدون توجه به سطح خطر، پاسخ ضعیف‌تری به نشانه‌های هشدار داده و نوهراسی ندارند (Brusseau et al., 2023). ماهی گوپی در جمعیت‌هایی یافت می‌شود که به طور چشمگیری از نظر خطر شکار متفاوت هستند و گروه‌بندی بیشتر و کاهش رفتارهای رقابتی را در جمعیت‌های با شکار بالا در مقایسه با جمعیت‌های کم شکار نشان می‌دهند. مکانیسم‌های عصبی هورمونی که زیربنای این تفاوت‌ها در رفتار در بین جمعیت‌ها هستند ناشناخته باقی می‌ماند و روشن کردن این مکانیسم‌ها ممکن است به ما در درک تکامل تنوع رفتاری در این گونه کمک کند.

با توجه به اهمیت هورمون ملانوکورتین در عملکردهای فیزیولوژیکی تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر عامل شکار و تراکم نر بر میزان بیان ژن MC4r در زمان‌های مختلف مواجهه با شکارچی انجام نگرفته است زیرا در پژوهش حاضر اثر تراکم متفاوت شکارچی و تراکم مختلف نر در بیان ژن MC4r در ماهی گوپی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌شناسی پژوهش

آماده‌سازی آزمایش و معرفی تیمارها: این مطالعه در زمستان ۱۴۰۲ در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی واقع در شهرستان قنات استان قم انجام شد. در این پژوهش، ۱۰۸۰ ماهی گوپی (با وزن 0.1 ± 0.04 گرم) به تعداد مساوی نر و ماده از کارگاه خریداری و پس از ۲۴ ساعت هوادهی برای حذف کلر و هم‌دما شدن با آب، به آکواریوم‌های آزمایش منتقل شدند. تمامی ماهیان گوپی استفاده‌شده قبلاً جفت‌گیری نکرده بودند. آزمایش در آکواریوم‌های ۸۰ لیتری (ابعاد $35 \times 30 \times 120$ سانتی‌متر) انجام شد. ماهیان گوپی در محفظه‌های شیشه‌ای ($35 \times 30 \times 30$ سانتی‌متر) داخل آکواریوم‌های ۱۱۰ لیتری قرار گرفتند. شرایط آب شامل pH ۷/۵، دمای 26 ± 1 درجه سانتی‌گراد و اکسیژن $7/8$ ppm بود. محفظه‌های شیشه‌ای از تماس مستقیم با ماهیان شکارچی جلوگیری می‌کردند، اما تبادل دما و اکسیژن به طور یکنواخت برقرار بود. برای پناهگاه، از گیاهان مصنوعی با چیدمان یکسان استفاده شد و هوادهی به صورت مداوم انجام گرفت. تعداد تیمارهای آزمایش شده طبق جدول ۱، شش مورد و هر کدام با سه تکرار می‌باشد.

جدول ۱- تیمارهای آزمایش

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

نمونه‌گیری: نمونه‌گیری از ماهیان گوپی نر و ماده در چهار بازه زمانی انجام شد. در هر مرحله، سه ماهی (دو نر و یک ماده) از هر آکواریوم با استفاده از یک تور صید شده و در مخزن نیتروژن قرار گرفتند. زمان‌های نمونه‌گیری شامل موارد زیر بود: (۱) پنج دقیقه پس از اولین مواجهه با شکارچی، (۲) پنج ساعت پس از اولین مواجهه، (۳) پنج روز پس از اولین مواجهه، و (۴) پانزده روز پس از اولین مواجهه. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در یک مخزن نیتروژن ۳ لیتری به فریزر با دمای -80 درجه سانتی‌گراد در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل شدند و تا زمان استخراج RNA نگهداری گردیدند.

استخراج RNA: در این تحقیق تکنیک Real-time ^۷PCR به منظور بررسی بیان نسبی ژن MC4r در حضور ژن کنترل داخلی ۱۸S برای نمونه‌های مورد تیمار ماهی گوپی در ۳ تکرار تکنیکی اجرا شد. نمونه‌ها با ازت مایع پودر و در تیوب‌های RNase

^۶Agonism

^۷Polymerase chain reaction

free منتقل شدند. RNA استخراج شده با ژل آگاروز و نانودراپ ارزیابی شد. برای حذف آلودگی، ۵ میکروگرم RNA با DNase و بافر مخلوط و در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس با EDTA در ۷۵ درجه سانتی گراد غیرفعال شد.

سنتز cDNA: برای سنتز cDNA، غلظت RNA به ۱۰۰۰ نانوگرم نرمال سازی شد. RNA با آغازگرها ترکیب و در ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس با آنزیم Reverse Transcriptase در ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه سنتز و در ۷۰ درجه سانتی گراد متوقف شد. cDNA در ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. خلاصه مراحل سنتز cDNA در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- ساخت cDNA ها با استفاده از آغازگرهای تصادفی و OligodT

نام ماده شیمیایی	مقدار	عملیات
کل RNA	۱ میکروگرم	
آغازگرهای تصادفی	۱ میکرولیتر	
OligidT	۱ میکرولیتر	
آب DEPC	تا حجم ۱۲ میکرولیتر	
مخلوط آنزیم Reverse Transcriptase	تا حجم ۲۰ میکرولیتر	انکوبه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه
انکوباسیون RNA و آغازگرها	-	انکوبه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه

طراحی آغازگرها: آغازگرها با استفاده از Primer3 در نرم افزار Geneious IR9.1.8 طراحی شدند، به گونه ای که دمای ذوب بهینه آن ها بین ۵۸-۶۵ درجه سانتی گراد و طول محصولات کمتر از ۱۵۰ جفت باز بود (جدول ۳). این آغازگرها توسط شرکت Metabion (آلمان) سنتز شده و در شرایط RT-PCR تحت جریان لامینار با استفاده از مخلوط واکنش ۱۵ میکرولیتر مورد آزمایش قرار گرفتند. چرخه حرارتی شامل ۴۰ سیکل بود و محصولات PCR روی ژل آگاروز ۲ درصد همراه با نشانگر (SMOBIO) ۱ kb در ولتاژ ۸۰ V به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز و مشاهده شدند.

جدول ۳- نام و توالی آغازگرهای استفاده شده در این آزمایش

نام آغازگر	توالی (۵-۳)	دمای ذوب	اندازه محصول	نمونه ^۸
MC4r-F	CTCTGCCGAGAAAGACGTT	۶۰	۱۰۱	XM_008396409.2
MC4r-R	GATGCCCAACGTGAGGAAGA	۶۰		
18s-F	GTTCGAAGACGATCAGATACCGT	۶۰	۳۷۱	XR_008605766.1
18s-R	CCGCGTAACTAGTTAGCATGCCG	۶۰		

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 (Ampliqon 2x SYBR green Lowrox) green، ۰/۵ میکرولیتر آغازگرهای رفت و برگشت و ۱ میکرولیتر از cDNA سنتز شده بود. شرایط واکنش دمایی شامل دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه بوده است. در نهایت، منحنی ذوب از دامنه دمایی ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتی گراد با شیب ۰/۳ درجه سانتی گراد ترسیم شد. نتایج بیان ژن به روش Real-time PCR با استفاده از روش محاسباتی ($-\Delta\Delta Ct$)^۹ برای محاسبه مقدار تغییرات نسبی بیان ژن MC4r گزارش شد (Schmittgen and Livak, 2008).

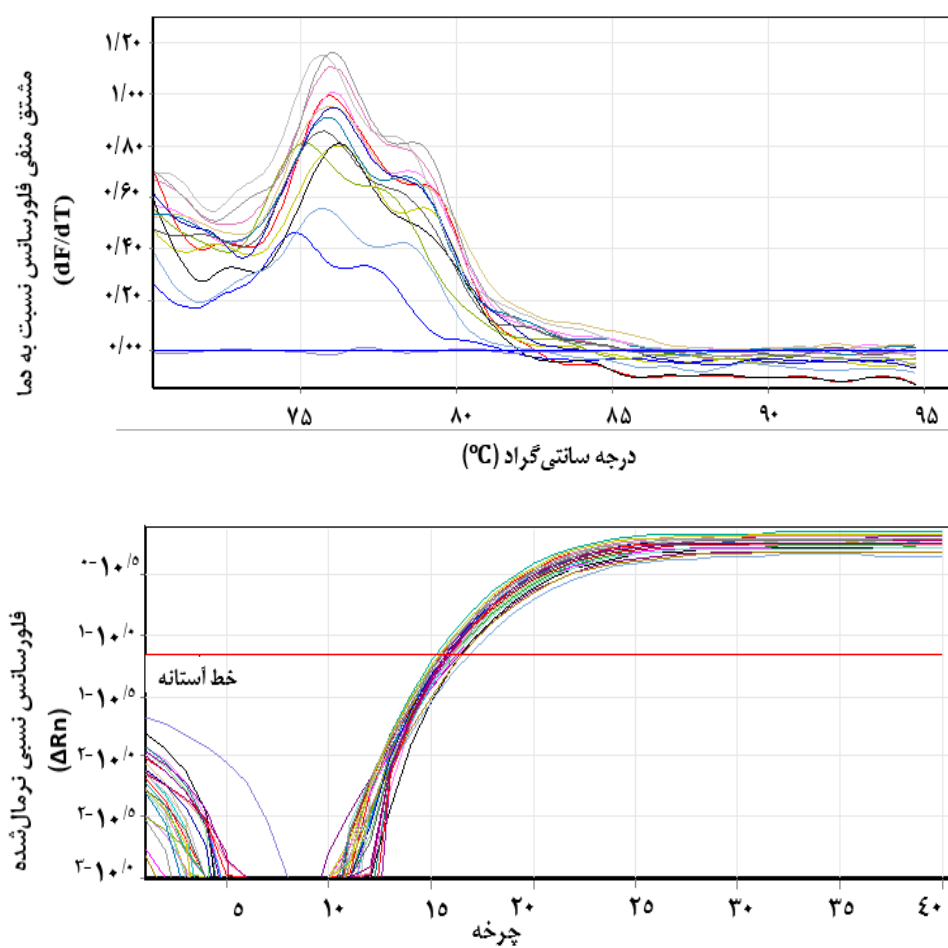
آنالیز داده ها: نرمال بودن توزیع داده ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک در نرم افزار SPSS 27 بررسی شد. برای ارزیابی تفاوت های بین گروه های آزمایشی و تأثیر تراکم نسبی نرها و تعداد شکارچیان بر تیمارها، از تحلیل واریانس دوطرفه^۹ استفاده گردید. به منظور مقایسه میانگین ها، آزمون توکی در سطح معنی داری ۹۵ درصد ($P < 0/05$) انجام شد. این تحلیل های آماری

^۸Accession^۹Two-way ANOVA

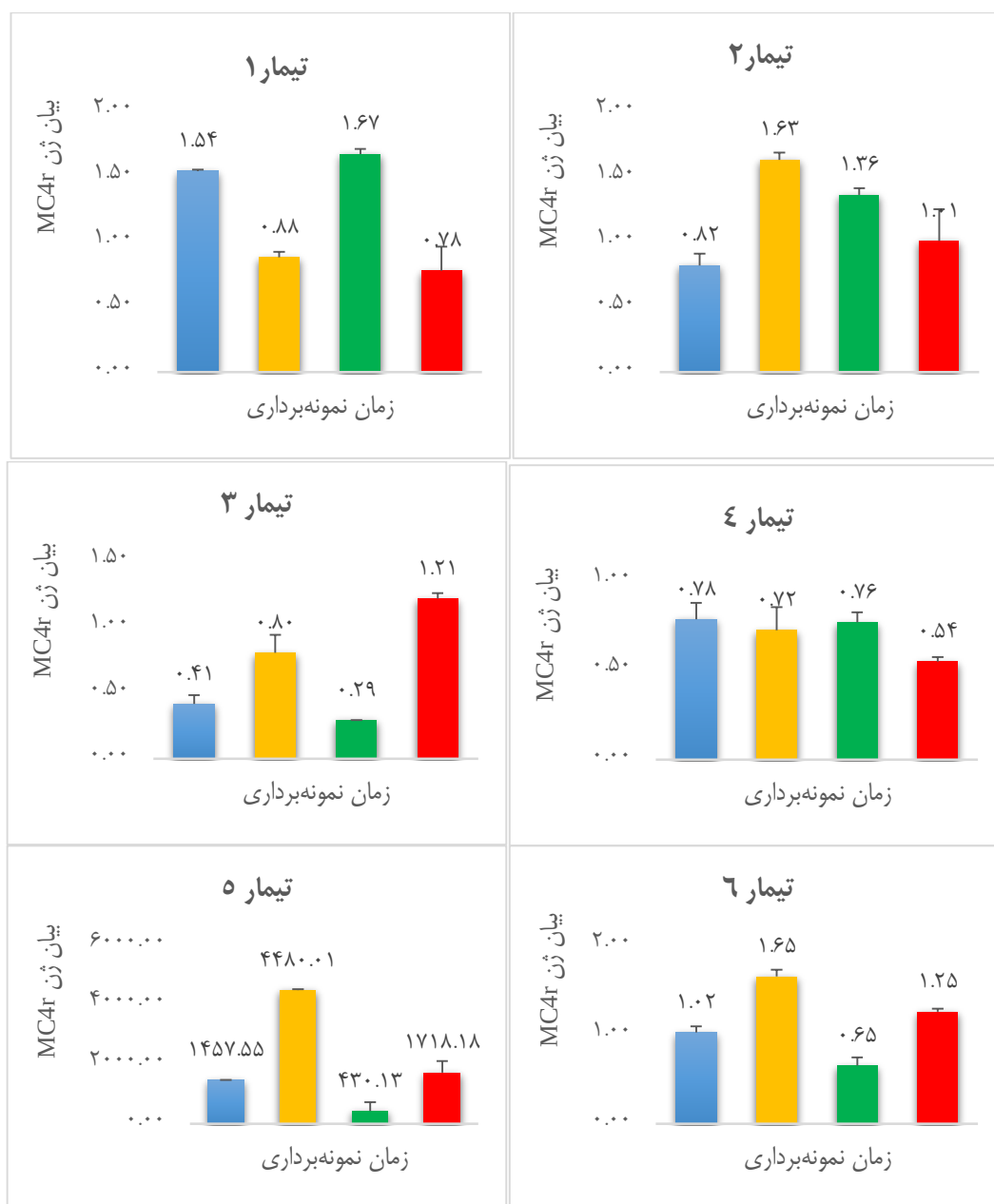
به صورت جداگانه برای هر یک از پنج زمان نمونه برداری شامل پنج دقیقه، پنج ساعت، پنج روز و پانزده روز صورت گرفت. نتایج به دست آمده با ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۹ انجام شد.

یافته‌های پژوهش

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به منظور بررسی بیان ژن MC4r در نمونه‌های ماهی گویی، تحت تأثیر تیمارهای مختلف شکارچی و تراکم نرها، انجام شد. همچنین، منحنی ذوب، تکثیر و نقاط پیک و شکست این ژن ترسیم گردید (شکل ۱). نتایج نشان داد که تأثیر تراکم نسبی نرها و تعداد شکارچیان در سه زمان نمونه برداری (پنج دقیقه، پنج ساعت و پانزده روز پس از مواجهه) معنی دار بود ($P < 0.05$). اما در نمونه برداری روز پنجم، این تأثیر معنی دار مشاهده نشد ($P > 0.05$). براساس نمودار شکل ۲، پنج دقیقه پس از مواجهه، بیان ژن MC4r در تیمار با تعداد متوسط شکارچی و تراکم نر زیاد نسبت به تیمار بدون شکارچی (شاهد) افزایش معنی داری داشت. اما در تیمار با تعداد شکارچی زیاد و تراکم نر بالا نسبت به تیمار با شکارچی متوسط و تراکم نر زیاد، کاهش معنی دار مشاهده شد ($P < 0.05$). الگوی مشابهی در نمونه برداری‌های پنج ساعت و پانزده روز نیز مشاهده شد؛ به طوری که بیان ژن در تیمار با تعداد متوسط شکارچی و تراکم نر زیاد در مقایسه با تیمار بدون شکارچی افزایش یافت، اما در تیمار با تعداد شکارچی بالا و تراکم نر زیاد، نسبت به تیمار شکارچی متوسط و تراکم نر زیاد، کاهش معنی داری مشاهده شد ($P < 0.05$).



شکل ۱- منحنی ذوب (بالا) و تکثیر ژن (پایین) ژن MC4r



شکل ۲- بیان نسبی ژن گیرنده ملانوکورتین ۴ در ماهی گویی پس از مواجهه با تراکم مختلف گونه شکارچی و تراکم نسبی نر متفاوت در طول زمان های نمونه برداری. اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده است. ستون قرمز (۵ دقیقه)، ستون زرد (۵ ساعت)، ستون سبز (۵ روز)، ستون قرمز (۱۵ روز)

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش رفتارشناسی مولکولی ژن MC4r در حضور تراکم مختلف متفاوت شکارچی و تراکم مختلف نر در ماهی گویی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن MC4r در ماهی گویی در زمان های ۵ دقیقه، ۵ ساعت و ۱۵ روز پس از مواجهه با گونه شکارچی و جنس نر رقیب، در تیمار ۵ نسبت به تیمار شاهد اختلاف میانگین معنی داری داشته است. این اختلاف میانگین پس از ۵ ساعت مواجهه با گونه شکارچی و جنس نر رقیب به بیشترین مقدار خود رسیده است.

با توجه به نقش حیاتی MC4r در تنظیم تعادل انرژی، این ژن ممکن است به عنوان یک پیوند ارتباطی مهم بین سیستم های متابولیک مغز و پاسخ به استرس عمل کند (Ryan et al., 2014). وجود اختلاف میانگین معنی دار در بیان این ژن، بیانگر تأثیر تراکم گونه شکارچی و حضور جنس نر رقیب به عنوان عوامل استرس زای محیطی بر افزایش بیان MC4r در مراحل اولیه مواجهه است. در ماهی گویی، افزایش معنی دار بیان این ژن احتمالاً در راستای حفظ تعادل انرژی، تنظیم تغذیه، افزایش رفتار تولیدمثلی و

کاهش استرس صورت گرفته است (Álvarez-Martín et al., 2024). با این حال، با افزایش مدت زمان مواجهه با عامل استرس‌زای محیطی، تعدیل بیان ژن مشاهده شده و روند کاهشی در بیان MC4r اتفاق افتاده است. پژوهشی نشان داد که گیرنده MC4r در سنگ‌ماهی سیاه (*Sebastes schlegelii*) احتمالاً در تنظیم عملکرد تولیدمثلی نقش دارد (Ying Zhanga, 2020). نقش گیرنده MC4r در تنظیم رشد غدد جنسی و تولیدمثل پیش‌تر در ماهی زبرا (*Danio rerio*) و ماکا (*Oryzias latipes*) اثبات شده است (Liu et al., 2019). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تراکم نسبی نرها و تعداد متفاوت گونه شکارچی در تیمارهای آزمایشی بر بیان ژن گیرنده MC4r، که نقش کلیدی در تعادل انرژی و تنظیم تغذیه دارد، تأثیرگذار بوده است. داده‌های تجربی حاکی از آن است که بیان MC4r در مواجهه اولیه با گونه شکارچی و جنس نر رقیب افزایش می‌یابد، اما در ادامه، با گذشت زمان این بیان کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند. ایجاد واکنش به استرس و مقاومت در برابر عامل استرس‌زا فرآیندی پرهزینه است که یکی از هزینه‌های آن، تلاش موجود برای بازگرداندن تعادل هومئوستاتیک می‌باشد (Schreck, 2010). در شرایط استرس، مکانیسم‌های تنظیم‌کننده دریافت غذا در ماهیان دچار اختلال شده و سیگنال‌های مرتبط با اشتها در مغز، همانند شرایط کنترل عمل نمی‌کنند. این وضعیت منجر به تغییر در بیان نوروپپتیدهای مرتبط با اشتها شده و معمولاً کاهش دریافت غذا را به دنبال دارد (Conde-Sieira et al., 2018). مهار سیستم ملانوکورتین از طریق بیان بیش از حد یک رده تراریخته، یک راهبرد مؤثر برای افزایش رشد بدون ایجاد چاقی محسوب می‌شود، زیرا کارایی تغذیه را بهبود می‌بخشد بدون اینکه موجب تسریع در شروع بلوغ گردد (Navarro et al., 2022).

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که بیان ژن‌های مورد مطالعه در ماهی گویی تحت شرایط آزمایشی تعریف‌شده تغییرات معنی‌داری را نشان می‌دهد. این تغییرات احتمالاً نشان‌دهنده پاسخ فیزیولوژیکی ماهی به فشارهای محیطی در راستای بهینه‌سازی فرآیندهای زیستی مانند رشد، تولیدمثل، تنظیم پاسخ‌های استرس و نرخ متابولیک بدن است. با توجه به نتایج این پژوهش، پیشنهاد می‌شود که مطالعات آینده به بررسی مکانیسم‌های تنظیمی دقیق‌تر مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با MC4r در پاسخ به استرس محیطی بپردازند. همچنین، بررسی تغییرات اپی‌ژنتیکی مرتبط با بیان MC4r در مواجهه طولانی‌مدت با عوامل استرس‌زا می‌تواند به درک بهتری از نقش این گیرنده در تنظیم تعادل انرژی، رفتار تولیدمثلی و سازگاری فیزیولوژیکی ماهیان منجر شود.

References

- Álvarez-Martín, C., Caballero, F.F., de la Iglesia, R., Alonso-Aperte, E., 2025. Association of MC4R rs17782313 genotype with energy intake and appetite: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews* 83(3), e931-e946.
- Archard, G.A., Earley, R.L., Hanninen, A.F., Braithwaite, V.A., 2012. Correlated behaviour and stress physiology in fish exposed to different levels of predation pressure. *Functional Ecology*, 26(3), 637-645.
- Boonstra, R., Dantzer, B., Delehanty, B., Fletcher, Q.E., Sheriff, M.J., 2014. Equipped for life in the boreal forest: the role of the stress axis in mammals. *Arctic* 67(1), 82-97.
- Brusseau, A.J.P., Feyten, L.E.A., Groves, V., Felismino, M.E.L., Cao Van Truong, D., Crane, A.L., Ramnarine, I.W., Brown, G.E., 2023. Sex and background risk influence responses to acute predation risk in Trinidadian guppies. *Behavioral Ecology*, In press.
- Burns, J.G., Price, A.C., Thomson, J.D., Hughes, K.A., Rodd, F.H., 2016. Environmental and genetic effects on exploratory behavior of high- and low-predation guppies (*Poecilia reticulata*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 70(8), 1187-1196.
- Chuard, P.J.C., Brown, G.E., Grant, J.W.A., 2018. Competition for food in two populations of a wild-caught fish. *Current Zoology* 64(5), 615-622.
- Conde-Sieira, M., Chivite, M., Míguez, J.M., Soengas, J.L., 2018. Stress effects on the mechanisms regulating appetite in teleost fish. *Frontiers in Endocrinology* 9, 631.
- Crane, A.L., Feyten, L.E.A., Preagola, A.A., Ferrari, M.C.O., Brown, G.E., 2024. Uncertainty about predation risk: a conceptual review. *Biological Reviews* 99(1), 238-252.
- Fisher, D.N., Kilgour, R.J., Siracusa, E.R., Foote, J.R., Hobson, E.A., Montiglio, P., Saltz, J.B., Wey, T.W., Wice, E.W., 2021. Anticipated effects of abiotic environmental change on intraspecific social interactions. *Biological Reviews* 96(6), 2661-2693.

- Gairin, E., Dusseigne, M., Mercader, M., Berthe, C., Reynaud, M., Metian, M., Mills, S.C., Lenfant, P., Besseau, L., Bertucci, F., Lecchini, D., 2022. Harbours as unique environmental sites of multiple anthropogenic stressors on fish hormonal systems. *Molecular and Cellular Endocrinology* 555, 111727.
- Jermacz, Ł., Kletkiewicz, H., Nowakowska, A., Dzierżyńska-Białończyk, A., Klimiuk, M., Kobak, J., 2020. Continuity of chronic predation risk determines changes in prey physiology. *Scientific Reports* 10(1), 6972.
- Jermacz, Ł., Nowakowska, A., Kletkiewicz, H., Kobak, J., 2020. Experimental evidence for the adaptive response of aquatic invertebrates to chronic predation risk. *Oecologia* 192(2), 341-350.
- Ji, R.-L., Liu, T., Hou, Z.-S., Wen, H.-S., Tao, Y.-X., 2023. Divergent pharmacology and biased signaling of the four melanocortin-4 receptor isoforms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biomolecules* 13(8), 1248.
- Liang, L., Reinick, C., Angleson, J.K., Dores, R.M., 2013. Evolution of melanocortin receptors in cartilaginous fish: melanocortin receptors and the stress axis in elasmobranchs. *General and Comparative Endocrinology* 181, 4-9.
- Liu, H., Zeng, L., Cao, Z., Fu, S., 2016. Effects of different predator stress on vulnerability to predation and the underlying physiological and behavioral mechanisms of this vulnerability in juvenile qingbo (*Spinibarbus sinensis*). *Acta Ecologica Sinica* 36(2), 85-90.
- Liu, R., Kinoshita, M., Adolphi, M. C., & Scharl, M., 2019. Analysis of the role of the Mc4r system in development, growth, and puberty of medaka. *Frontiers in Endocrinology* 10, 213.
- Navarro, S., Crespo, D., Schulz, R.W., Ge, W., Rotllant, J., Cerdá-Reverter, J.M., Rocha, A., 2022. Role of the melanocortin system in gonadal steroidogenesis of zebrafish. *Animals* 12(20), 2737.
- Reddon, A.R., Aubin-Horth, N., Reader, S.M., 2022. Wild guppies from populations exposed to higher predation risk exhibit greater vasotocin brain gene expression. *Journal of Zoology* 316(2), 118-127.
- Ryan, K.K., Mul, J.D., Clemmensen, C., Egan, A.E., Begg, D.P., Halcomb, K., Seeley, R.J., Herman, J.P., Ulrich-Lai, Y.M., 2014. Loss of melanocortin-4 receptor function attenuates HPA responses to psychological stress. *Psychoneuroendocrinology* 42, 98-105.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3(6), 1101-1108.
- Schreck, C.B., 2010. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology* 165(3), 549-556.
- Uren Webster, T. M., Rodriguez-Barreto, D., Consuegra, S., Garcia de Leaniz, C., 2020. Cortisol-related signatures of stress in the fish microbiome. *Frontiers in Microbiology* 11, 1621.
- Zhang, Y., Wen, H. S., Li, Y., Lyu, L. K., Zhang, Z. X., Wang, X. J., ... & Qi, X., 2020. Melanocortin-4 receptor regulation of reproductive function in black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Gene* 741, 144541.
- Zhang, K.Q., Hou, Z.S., Wen, H.S., Li, Y., Qi, X., Li, W.J., Tao, Y.X., 2019. Melanocortin-4 receptor in spotted sea bass, *Lateolabrax maculatus*: Cloning, tissue distribution, physiology, and pharmacology. *Frontiers in Endocrinology* 10, 705.