Journal of Aquaculture Sciences 12(22): 23-38 (2024)
Print ISSN: 2322-5351
www.aquaculturesciences.ir

**نشریه علوم آبزی‌پروری**
دوره ۱۲، شماره ۲۲: ۲۳-۳۸ (۱۴۰۳)

# بررسی بیوانفورماتیک نقش miRNA ها در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در بلوغ جنسی و تولیدمثل در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

**مهدی بنایی[1*]، احمد علی بدر[2]، آریا وزیرزاده[3]**

**[1]گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا، بهبهان، ایران.**
**[2]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا بهبهان، بهبهان، ایران.**
**[3]گروه مهندسی منابع طبیعی و محیط‌زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.**

**تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۱** **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۶**

**چکیده**

MicroRNAها (miRNAs) به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های حیاتی بیان ژن شناخته می‌شوند و تأثیر به‌سزایی بر فرآیندهای مختلف زیستی از جمله بلوغ جنسی و تولید مثل دارند. در این مطالعه، از ابزارها و تکنیک‌های بیوانفورماتیک برای بررسی نقش miRNA ها در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با بلوغ جنسی و تولید مثل ( *ghrhra*، *kiss2*، *dnd*، *gh1*، *sox9a*، *shbg*، *fshb*، *stat3*، *cyp17a1*، *cyp19a1b*، *ar*، *amh*، *esr2b*، *rspo1* و *sox21a*) در ماهی گورخر (*Danio rerio*) استفاده شده است. در این روش با ادغام پیش‌بینی‌های محاسباتی با داده‌های اعتبارسنجی تجربی، شبکه‌های تنظیمی ژن miRNA خاص شناسایی گردید (dre-miR-429a، dre-miR-92a، dre-miR-200b، dre-miR-96، dre-miR-217، dre-miR-155، dre-miR-26a-5p، dre-miR-737، dre-miR-740، dre-miR-737-5p، dre-miR-93، dre-miR-140-3p، dre-miR-15a و dre-miR-144) که در مراحل کلیدی رشد و فرآیندهای فیزیولوژیکی مربوط به بلوغ جنسی و تولیدمثل در ماهی گورخری نقش دارند. یافته‌های این مطالعه، بر مکانیسم‌های نظارتی پیچیده‌ای را که توسط miRNAها در تعدیل بیان ژن‌های حیاتی برای موفقیت باروری در گورخرماهی تنظیم شده‌اند، تأکید می‌کند و بینش‌های ارزشمندی را در مورد اساس مولکولی زیست‌شناسی تولیدمثل در این ارگانیسم مدل ارائه می‌دهد. این مطالعه می‌تواند به درک عمیق‌تری از شبکه‌های نظارتی حاکم بر بلوغ و تولیدمثل جنسی ماهی‌ها کمک کند.

**کلید واژگان:** بیوانفورماتیک microRNA ها، تنظیم ژن، بلوغ جنسی، تولیدمثل

*نویسنده مسئول mahdibanaee2@gmail.com

## مقدمه

miRNAs ها مولکول‌های RNA غیر کد کننده کوتاه هستند، با طول ۲۳-۲۱ نوکلئوتید که نقش مهمی در تنظیم پس از رونویسی بیان ژن‌ها ایفا می‌کنند (Badr, 2022; Badr *et al*., 2022). از طریق جفت شدن پایه با توالی‌های مکمل در ناحیه ترجمه نشده ۳ '(UTR) رونوشت‌های RNAپیام‌رسان هدف، miRNA ها می‌توانند واسطه تخریب mRNA باشند یا ترجمه را مهار کنند؛ در نتیجه فراوانی پروتئین‌های خاص را در سلول‌ها تنظیم کنند (Raza *et al*., 2022). این مکانیسم تنظیمی miRNA ها را قادر می‌سازد تا اثرات عمیقی بر فرآیندهای مختلف زیستی از جمله توسعه، متابولیسم و ایمنی داشته باشند. در سال‌های اخیر، نقش miRNA ها در کنترل پویایی بیان ژن در طی فرآیندهای تولیدمثلی توجه را به‌خود جلب کرده است.

تولیدمثل یک پدیده زیستی پیچیده است که توسط تعداد زیادی رویداد مولکولی و سلولی از جمله سیگنال‌دهی هورمونی، گامتوژنز، تمایز غدد جنسی و بلوغ جنسی هماهنگ شده است. تنظیم بیان ژن در هر مرحله از رشد تولیدمثلی برای اطمینان از عملکرد مناسب اندام‌های تولیدمثل و تولید موفقیت‌آمیز گامت‌های زنده بسیار مهم است (Tavakoli-Kolour *et al*., 2022). در زمینه تولیدمثل ماهی، miRNA ها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی ظاهر شده‌اند که بیان ژن‌های دخیل در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای تولیدمثل را تعدیل می‌کنند (Oliveira *et al*., 2020; Bhat *et al*., 2021). ماهی‌ها تنوع قابل توجهی را در استراتژی‌های تولیدمثلی در طول فصل تولیدمثل از خود نشان می‌دهند (Banaee and Naderi, 2014; Ahmadniaye Motlagh *et al*., 2023). این همه تنوع در استراتژی‌های تولیدمثلی مرهون تنوع در شبکه‌های نظارتی پیچیده تحت کنترل miRNA ها است که به تنظیم دقیق الگوهای بیان ژن ضروری برای ویژگی‌ها و استراتژی‌های تولیدمثلی خاص گونه کمک می‌کند. یکی از زمینه‌های مورد توجه، نقش miRNA ها در کنترل بیان ژن‌های دخیل در رشد و عملکرد غدد جنسی است. تمایز گناد به بیضه‌ها یا تخمدان‌ها گامی حیاتی در رشد جنسی است و miRNA ها در تنظیم ژن‌های کلیدی و مسیرهای سیگنال‌دهی که باعث تمایز گناد می‌شوند، نقش دارند. علاوه بر این، miRNA ها نقش اساسی در گامتوژنز، از جمله تکثیر و تمایز سلول‌های زایا، پیشرفت میوز و حفظ یکپارچگی سلول‌های زاینده ایفا می‌کنند. علاوه بر این، miRNA ها در تنظیم مسیرهای سیگنال‌دهی هورمون‌های تولیدمثل، از جمله مسیرهایی که توسط گنادوتروپین‌ها، هورمون‌های استروئیدی و فاکتورهای رشد واسطه می‌شوند، دخیل هستند. با هدف قرار دادن اجزای این مسیرهای سیگنالی، miRNA ها می‌توانند پاسخ‌دهی بافت-های تولیدمثل را به نشانه‌های هورمونی تعدیل کنند و در نتیجه بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژی تولیدمثل مانند رشد فولیکولی، تخمک‌گذاری و بلوغ اسپرم تأثیر بگذارند (Juanchich *et al*., 2013; Wang e*t al*., 2018; Zhang *et al*., 2022).

در آبزی‌پروری، درک نقش miRNA ها در کنترل پویایی بیان ژن در طی تولیدمثل ماهی، پتانسیل بسیار زیادی برای بهبود عملکرد تولیدمثلی و پایداری دارد. با دستکاری سطوح بیان miRNA یا هدف قرار دادن فعل و انفعالات خاصmiRNA-mRNA ، ممکن است بتوان صفاتی مانند بازدهی تولیدمثلی، باروری و همزمانی تخمریزی را در گونه‌های مهم تجاری ماهی افزایش داد. هدف این بررسی ارائه یک نمای کلی از دانش فعلی در مورد نقش miRNA ها در کنترل بیان ژن‌های دخیل در تولیدمثل ماهی است. از طریق شناسایی شبکه‌های تنظیمی با واسطه miRNA در زمینه فرآیندهای تولیدمثلی، ما به‌دنبال روشن کردن مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی زیست‌شناسی تولیدمثلی در ماهی‌ها و برجسته کردن کاربردهای بالقوه رویکردهای مبتنی بر miRNA در آبزی‌پروری هستیم.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک تحقیق جامع بیوانفورماتیک جهت روشن کردن مکانیسم‌های تنظیمی پیچیده‌ای microRNA ها در تعدیل و تنظیم بیان ژن پس از رونویسی دخیل در تنظیم فیزیولوژی تولیدمثلی در ماهی گورخری (*Danio rerio*) است. در مرحله نخست، پروفایل ژنی جامع مرتبط با سیستم تولید مثلی ماهی گورخری (*D. rerio*) از مخزن مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) به‌طور دقیق استخراج گردید. این مجموعه داده به‌عنوان پایه‌ای برای تجزیه‌وتحلیل‌های بعدی با هدف بازگشایی رابطه تنظیمی بین miRNA ها و ژن‌های هدف آن‌ها انتخاب شد. سپس

**جدول ۱- پروفایل ژن‌های دخیل در فرآیند تولیدمثل ماهی گورخری و مشخصات miRNA های تنظیم‌کننده بیان آن‌ها**

| کد شناسایی | نام miRNA | ژن هدف | امتیاز (درصد) |
|---|---|---|---|
| MI0001720 | dre-miR-429a | *ghrhra* | ۹۹ |
| MI0001951 | dre-miR-92a | *kiss2* | ۹۹ |
| MI0002038 | dre-miR-200b | *dnd* | ۹۹ |
| MI0001955 | dre-miR-96 | *gh1* | ۹۸ |
| MI0001383 | dre-miR-217 | *sox9a* | ۹۸ |
| MI0002023 | dre-miR-155 | *shbg* | ۹۸ |
| MI0001923 | dre-miR-26a-5p | *fshb* | ۹۷ |
| MI0004783 | dre-miR-737 | *stat3* | ۹۷ |
| MI0004786 | dre-miR-740 | *cyp17a1* | ۹۴ |
| MI0001720 | dre-miR-740 | *cyp19a1b* | ۹۰ |
| MI0004783 | dre-miR-737-5p | *ar* | ۸۹ |
| MI0001954 | dre-miR-93 | *amh* | ۷۸ |
| MI0002003 | dre-miR-140-3p | *esr2b* | ۶۶ |
| MI0001891 | dre-miR-15a | *rspo1* | ۶۴ |
| MI0002009 | dre-miR-144 | *sox21a* | ۶۳ |

با استفاده از ابزارهای محاسباتی پیچیده، مانند نرم‌افزار Target Scan (http://www.targetscan.org/fish_62)، پروفیل miRNA های دخیل در تنظیم بیان ژن‌های مد نظر، تأیید شد. در این روش یک رویکرد چند وجهی، به‌صورت الگوریتمی ۷ یا ۸ ناحیه نوکلئوتیدی از توالی miRNA که مکمل ناحیه هسته ژن‌های هدف است، شناسایی می‌کند. علاوه بر این، این نرم‌افزار ارزیابی پایداری ترمودینامیکی این دوبلکس‌های-miRNA هدف را تسهیل می‌کند و در نتیجه بینش‌هایی در مورد احتمال تنظیم مؤثر با واسطه miRNA ارائه می‌دهد. در سیستم رتبه‌بندی Target Scan ، امتیازات و رتبه‌های عددی بالاتر نشان‌دهنده احتمال افزایش یافته اتصال miRNA خاص و دقیق به ژن هدف است (Banaee and Sagvand, 2019). در مرحله بعدی، با استفاده از پایگاه داده‌های (http://diana.imis.athena-innovation.gr/dianatools) DIANA، و بهره‌گیری از مجموعه ابزارهای جامع این پلتفرم، miRNA هدف شناسایی و تفسیر گردید. پلتفرم DIANA با استفاده از حد آستانه از پیش تعریف‌شده ۰/۷، و در نظر گرفتن شاخص‌های مختلف برای ارزیابی پتانسیل تنظیمی miRNA ها بر بیان ژن هدف، یک تجزیه‌وتحلیل الگوریتمی پیچیده را به‌اجرا می‌گذارد. در این الگوریتم، امتیازدهی براساس شاخص‌هایی مانند قدرت اتصال ناحیه هسته در میان miRNA های مختلف و فراوانی تکرار ناحیه هدف در ناحیه ترجمه نشده ۳ (3'-UTR) 'فاکتور رونویسی صورت می‌گیرد. در نهایت، ادغام مناطق محافظت‌شده و غیر محافظت‌شده با استخراج یک امتیاز miTG فراگیر به اوج خود می‌رسد، هرچه مقادیر نزدیک به ۱ باشد نشان‌دهنده دقت بیشتر در پیش‌بینی است. روش امتیازدهی دقیق براساس متغیرهایی مانند تمایل اتصال و تکرار منطقه هدف، عوامل رونویسی با بالاترین امتیاز است که به‌عنوان کاندیدهای احتمالی برای آزمایش‌های عملی بعدی در نظر گرفته شدند (Riffo-Campos *et al*., 2016; Banaee and Sagvand, 2019).

## نتایج

تجزیه و تحلیل داده‌ها، miRNA و پروفایل ژن‌های دخیل در فرآیند تولیدمثل ماهی گورخری نشان داد که dre-miR-429a در تنظیم بیان ژن *ghrhra* کد کننده گیرنده هورمون GHRH است، نقش دارد. علاوه براین، تنظیم بیان ژن *gh1* کد کننده هورمون رشد (GH) ۱ توسط dre-miR-96 کنترل می‌شود (جدول ۱).

تنظیم بیان ژن *kiss2* که با نام Kisspeptin-2 نیز شناخته می‌شود، توسط dre-miR-92a صورت می‌پذیرد. در واقع، dre-miR-92a می‌تواند با تنظیم بیان ژن *kiss2* سطح سنتز نوروپپتید kisspeptin-2 را مدیریت کند. ژن بن‌بست *dnd* یک پروتئین متصل‌کننده به RNA را کد می‌کند که نقشی در مهاجرت سلول‌های زایای اولیه

**جدول ۲- آنالیز miRNA ها در پایگاه اطلاعاتی DIANA با حد آستانه ۰/۷**

| کد نسخه‌برداری | نام ژن و کد شناسایی | نام miRNA | امتیاز miTG |
|---|---|---|---|
| ENSDART00000054331 | ENSDARG00000037341 (*ghrhra*) | dre-miR-429a | ۰/۹۸۷ |
| ENSDART00000043156 | ENSDARG00000033566 (*cyp17a1*) | dre-miR-740 | ۰/۹۵۹ |
| ENSDARG00000009852 | ENSDARG00000009852 (*cyp19a1b*) | dre-miR-740 | ۰/۹۱۸ |
| ENSDART00000098022 | ENSDARG00000067976 (*ar*) | dre-miR-737-5p | ۰/۹۱۷ |
| ENSDART00000013803 | ENSDARG00000014357 (*amh*) | dre-miR-93 | ۰/۹۰۶ |
| ENSDART00000104519 | ENSDARG00000022712 (*stat3*) | dre-miR-737 | ۰/۹۰۴ |
| ENSDART00000036463 | ENSDARG00000022813 (*dnd*) | dre-miR-200b | ۰/۸۹۶ |
| ENSDART00000005676 | ENSDARG00000003293 (*sox9a*) | dre-miR-217 | ۰/۸۴۷ |
| ENSDART00000055675 | ENSDARG00000038185 (*gh1*) | dre-miR-96 | ۰/۸۴۶ |
| ENSDART00000173841 | ENSDARG00000010841 (*fshb*) | dre-miR-26a-5p | ۰/۸۸۳ |
| ENSDART00000113344 | ENSDARG00000077985 (*kiss2*) | dre-miR-92a | ۰/۷۹۶ |
| ENSDART00000020942 | ENSDARG00000019492 (*shbg*) | dre-miR-155 | ۰/۷۷۹ |
| ENSDART00000058459 | ENSDARG00000039957 (*rspo1*) | dre-miR-15a | ۰/۷۷۴ |
| ENSDART00000131800 | ENSDARG00000034181 (*esr2b*) | dre-miR-140-3p | ۰/۷۳۷ |
| ENSDART00000049339 | ENSDARG00000031664 (*sox21a*) | dre-miR-144 | ۰/۷۰۲ |

(PGCs) به ناحیه غدد جنسی در طول جنین‌زایی در مهره‌داران ایفا می‌کند. آنالیز miRNAها نشان داد که dre-miR-200b می‌تواند بیان این ژن را تنظیم کند. نتایج نشان می‌دهد dre-miR-217 و dre-miR-144 نقش مهمی در تنظیم بیان ژن *Sox9a* و *Sox21a* دارد. بیان ژن *shbg* که کد کننده گلبولین متصل شوند، به هورمون جنسی در کبد است توسط dre-miR-155 تنظیم می‌شود. dre-miR-26a-5p در تنظیم بیان ژن *fshb* ، ژن کد کننده زیر واحد بتا هورمون محرک فولیکول، دخیل است. بیان ژن *stat3* نیز توسط dre-miR-737 تنظیم و تعدیل می‌شود. به‌ترتیب dre-miR-740 و dre-miR-740 در تنظیم و تعدیل بیان ژن‌های *cyp17a1* و *cyp19a1b* که کد کننده آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی هستند، نقش دارند (جدول ۱).

داده‌های ارائه شده در جدول ۱ نشان می‌دهد که dre-miR-737-5p می‌تواند بیان ژن *ar* که کد کننده گیرنده آندروژنی است، را تعدیل و تنظیم نماید. بیان ژن *amh* که به‌عنوان ژن هورمون آنتی‌مولرین به‌ویژه در لاروهای نر توسط dre-miR-93 تنظیم می‌شود. dre-miR-140-3p و dre-miR-15a نیز به‌ترتیب در تنظیم و تعدیل بیان ژن‌های *esr2b* و *rspo1* نقش دارند (جدول ۱).

DAINA معمولاً با شناسایی miRNA ها و ژن‌های هدف آن‌ها شروع می‌شود. این فرآیند ممکن است شامل الگوریتم‌های پیش‌بینی محاسباتی برای پیش‌بینی مکان‌های بالقوه اتصال miRNA بر روی ژن‌های هدف باشد. DAINA براساس عوامل مختلفی مانند مکمل بودن توالی، حفظ و پایداری ترمودینامیکی دوبلکس-miRNA هدف، امتیازها یا رتبه‌هایی را به برهمکنش‌های-miRNA miTGپیش‌بینی‌شده اختصاص می‌دهد. نمرات یا رتبه‌های بالا معمولاً نشان‌دهنده تعاملات بالقوه قوی تر است. DAINA ممکن است حاشیه‌نویسی‌های عملکردی برای ژن‌های هدف ارائه دهد، که نشان‌دهنده نقش‌های زیستی آن‌ها، مسیرهایی که در آن نقش دارند و ارتباط آن‌ها با فرآیندهای زیستی را نشان می‌دهد. این مرحله به درک پیامدهای عملکردی بالقوه هدف‌گیری miRNA کمک می‌کند (جدول ۲).

## بحث

کنترل فرآیند تولیدمثل در ماهی توسط تعداد زیادی ژن و مسیرهای مولکولی مرتبط تنظیم می‌شود. ژن‌های کلیدی در اندام‌های تناسلی مانند غدد جنسی، مغز و غده هیپوفیز بیان می‌شوند و فرآیندهای پیچیده گامتوژنز، تنظیم هورمونی و رفتارهای جفت‌گیری را تنظیم می‌کنند. در طول گامتوژنز، ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دخیل در رشد سلول‌های زاینده، میوز و بلوغ گامت نقش‌های محوری دارند. این ژن‌ها تکثیر و تمایز سلول‌های زایا را به گامت‌های عملکردی تنظیم می‌کنند و تولید اسپرم و تخمک زنده را تضمین می‌کنند. تنظیم هورمونی تولیدمثل در ماهی عمدتاً توسط

ژن‌های دخیل در سنتز، آزادسازی و دریافت هورمون‌های تولیدمثلی مانند هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH)، هورمون محرک فولیکول (FSH)، هورمون لوتئینیزه کننده (LH) و استروئیدهای جنسی کنترل می‌شود (Vazirzadeh *et al*., 2016; Vazirzadeh and Guiguen, 2017). علاوه بر این، ژن‌های کدکننده‌ی فرمون‌ها، انتقال‌دهنده‌های عصبی و نوروپپتیدها به تنظیم رفتارهای جفت‌گیری و تعاملات اجتماعی در ماهی‌ها کمک می‌کنند. این ژن‌ها بر نمایش‌های معاشقانه، انتخاب جفت و رفتارهای تخمریزی تأثیر می‌گذارند و تولیدمثل و تکثیر گونه‌ها را تضمین می‌کنند (D'Ambrosio *et al*., 2020; Zohar, 2021).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که dre-miR-429a می‌تواند در تنظیم بیان ژن *ghrhra* کد کننده گیرنده‌ی هورمون GHRH است، نقش داشته باشد. هورمون محرک آزاد کننده هورمون رشد (GHRH) هورمونی است که توسط هیپوتالاموس تولید می‌شود و ترشح هورمون رشد (GH) از غده هیپوفیز را تحریک می‌کند. عملکرد و کارایی هورمون محرک آزاد کننده هورمون رشد (GHRH) به‌وجود گیرنده‌های هورمونی در هیپوفیز بستگی دارد. ژن *ghrhra* کد کننده گیرنده‌ی هورمون GHRH است. هنگامی که GHRHبه گیرنده خود متصل می شود، آبشاری از فرآیندهای سیگنالی را ایجاد می‌کند که در نهایت منجر به ترشح هورمون رشد می‌شود (Xu *et al*., 2017). بیان ژن *ghrhra* در مغز ماهی کپور علف‌خوار (*Ctenopharyngodon idellus*) و توربوت (*Scophthalmus maximus*) به‌وضوح نقش گیرنده هورمون رشد را نشان می‌دهد (Ye *et al*., 2019; Liu *et al*., 2022). بنابراین تنظیم و تعدیل بیان ژن *ghrhra* توسط dre-miR-429a می‌تواند بر روند بلوغ جنسی و عملکرد سیستم تولیدمثلی ماهی‌ها تاثیر بگذارد. امتیاز محاسبه شده miTG برای miR-429a نیز ۰/۹۸۷ محاسبه شده است. این امتیاز نشان دهنده بالاترین سطح تعاملات بالقوه بین miR-429a و mRNA مربوط به ژن *ghrhra* است. این در حالی است که بیان ژن *gh1* نیز توسط dre-miR-96 کنترل می‌شود. ژن *gh1* کد کننده هورمون رشد (GH) ۱ است. امتیاز miTG مربوط به میزان تعاملات بین dre-miR-96 و mRNA ژن *gh1* برابر با ۰/۸۴۶ است.

هورمون رشد، یک هورمون پپتیدی است که نقش مهمی در تحریک رشد، تولیدمثل سلولی، بلوغ جنسی، گامت‌زایی و بازسازی در ماهی‌ها ایفا می‌کند. هورمون رشد با تنظیم رشد و نمو بافت‌ها و اندام‌های مختلف درگیر در فرآیندهای تولیدمثل به‌طور غیر مستقیم بر تولیدمثل ماهی‌ها تأثیر می‌گذارد. هورمون رشد می‌تواند رشد غدد جنسی، اعم از تخمدان و بیضه‌ها را در ماهی‌ها تحریک کند و منجر به بلوغ اندام‌های جنسی شود. از آنجا که بلوغ غدد جنسی، برای شروع رفتارهای تولیدمثلی و تولید گامت‌های لازم برای تولید مثل (تخمک و اسپرم) ضروری است، این هورمون نقش مهمی در پیشبرد گامت‌زایی ایفا می‌کند. علاوه براین، هورمون رشد می‌تواند بر سنتز و ترشح هورمون‌های تولیدمثلی مانند گنادوتروپین‌ها (هورمون محرک فولیکول (FSH) و هورمون لوتئینیزه (LH)) و استروئیدهای جنسی (استروژن، تستوسترون) در ماهی تأثیر بگذارد. این هورمون‌ها نیز به‌نوبه خود می‌توانند در تنظیم جنبه‌های مختلف تولیدمثل، از جمله گامتوژنز، رفتار جفت‌گیری و تولید تخمک یا اسپرم نقش مهمی بازی کنند. تولیدمثل در بسیاری از گونه‌های ماهی از یک الگوهای فصلی پیروی می‌کند و هورمون رشد اغلب در تنظیم این چرخه‌های تولیدمثلی نقش دارد. تغییرات در عوامل محیطی مانند دما، دوره نوری و در دسترس بودن غذا می‌تواند بر ترشح GH تأثیر دارد که به‌نوبه خود بر فعالیت تولیدمثل تأثیرگذار هستند (Kamenskaya and Brykov, 2020).

تنظیم و تعدیل بیان ژن *kiss2* نیز توسط dre-miR-92a صورت می‌گیرد. محاسبات DIANA نشان داد که امتیاز miTG مربوط به میزان تعاملات بین dre-miR-92a و mRNA ژن *kiss2* برابر با ۰/۷۹۶ است. ژن *Kiss2* که با نام Kisspeptin-2 نیز شناخته می‌شود، ژنی است که نوروپپتید kisspeptin-2 را کد می‌کند. کیسپپتین‌ها گروهی از هورمون‌های پپتیدی هستند که نقش مهمی در تنظیم تولیدمثل، به‌ویژه در کنترل محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد (HPG) دارند. ژن *Kiss2* و محصول پروتئینی آن، kisspeptin-2، به‌دلیل نقش آن‌ها در فیزیولوژی تولیدمثل در گونه‌های مختلف از جمله پستانداران، ماهی‌ها و سایر مهره‌داران به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. نورون‌های کیسپپتین که ژن‌های Kiss1 و Kiss2 را بیان می‌کنند، عمدتاً در هیپوتالاموس قرار دارند و به نورون‌های

هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) منتقل می‌شوند. کیسپپتین به‌عنوان یک محرک قوی آزادسازی GnRH از هیپوتالاموس عمل می‌کند. GnRH به‌نوبه خود ترشح گنادوتروپین‌ها (هورمون لوتئینه کننده و هورمون محرک فولیکول) را از غده هیپوفیز تنظیم می‌کند که عملکرد غدد جنسی (تخمدان‌ها و بیضه‌ها) را کنترل می‌کند. سیگنال دهی کیسپپتین برای شروع بلوغ ضروری است (Somoza *et al*., 2020; Oliveira *et al*., 2020). افزایش بیان ژن Kiss2 و ترشح کیسپپتین به فعال شدن نورون‌هایGnRH کمک می‌کند که منجر به آزادسازی ضربانیGnRH و بلوغ بعدی محور تولیدمثل می‌شود. سیگنالینگ کیسپپتین نقش مهمی در تنظیم تخمک‌گذاری در ماهی‌های ماده و تولید اسپرم در ماهی‌های نر ایفا می‌کند. کیسپپتین مستقیماً روی نورون‌های GnRH برای تحریک آزادسازی GnRH عمل می‌کند، که باعث آزاد شدن گنادوتروپین‌هایی می‌شود که گامتوژنز و استروئیدوژنز را در غدد جنسی تنظیم می‌کنند. از این‌رو، تنظیم و تعدیل بیان ژن *kiss2* نیز توسط dre-miR-92a می‌تواند از طریق تنظیم سطح بیوسنتز GnRH روند بلوغ جنسی، گامت‌زایی و تولیدمثل را کنترل و مدیریت نماید (Sivalingam *et al*., 2022; Zahangir *et al*., 2022). نقش کیسپپتین‌ها در تنظیم روند بلوغ جنسی در کفشک ماهی *Solea senegalensis*، مؤید این ادعا است (Oliveira *et al*., 2020).

تنظیم و تعدیل ژن بن‌بست *dnd* توسط dre-miR-200b می‌تواند نقش مهمی در تمایز سلولی، گامت‌زایی و حفظ سلول‌های زایا در ماهی‌ها ایفا کند. امتیاز miTG مربوط به میزان تعاملات بین dre-miR-200b و mRNA ژن *dnd* برابر با ۰/۸۹۶ است. ژن بن‌بست *dnd* یک پروتئین متصل‌کننده به RNA است که در رشد سلول‌های زاینده، به‌ویژه در فرآیند مهاجرت و بقای سلول‌های زاینده در طول رشد جنینی نقش دارد. سلول‌های زایا پیش‌ساز سلول‌های اسپرم و تخمک هستند و برای تولیدمثل جنسی ضروری می‌باشند. بیان ژن *dnd* برای جلوگیری از آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی) در سلول‌های زایای اولیه، و اطمینان از بقای آن‌ها در هنگام مهاجرت به غدد جنسی (بیضه‌ها یا تخمدان‌ها) در حال رشد، حیاتی است. بنابراین کاهش بیان ژن *dnd* می‌تواند منجر به از بین رفتن سلول‌های زایا و ناباروری شود. بیان زن *dnd* در ماهی فلاندر (*Platichthys stellatus*) و نقش آن مهاجرت سلول‌های زایای اولیه نشان‌دهنده نقش آن در تمایز و بلوغ سلول‌های جنسی است (Yoon et al., 2021). مکانیسم عمل ژن *dnd* بسیار جالب توجه است. محققین دریافتند که توالی‌های غنی از اوراسیل در miRNA-430 می‌تواند به توالی *dnd* در ماهی گورخری (*D. rerio*) متصل می‌شوند. بدین‌ترتیب ژن *dnd* از تخریب mRNA های پلاسمای زایا که توسط mi430 هدف قرار گرفته‌اند، جلوگیری می‌کند و در نتیجه رشد سلول‌های زاینده را حفظ می‌کند (Kedde *et al*., 2007). بیان اختصاصی *dnd* در سلول زایای برای اولین بار در ماهی گورخری کشف شد و پس از آن الگوهای بیان مشابهی در گونه‌های مختلف مهره‌داران از جمله موش (*Mus musculus*)، قورباغه (*Xenopus tropicalis*)، مرغ (*Gallus gallus*) و حتی انسان (*Homo sapiens*) کشف شد (Shinomiya *et al*., 2000; Aramaki *et al*., 2007; Bhattacharya *et al*., 2007; Yoon *et al*., 2021). از این‌رو، ژن *dnd* یک ژن حفظ شده در طی روند تکامل تلقی می‌شود. در ماهی گورخری و ماهی مداکا (*Oryzias latipes*)، لوچ برکه (*Misgurnus anguillicaudatus*) و ماهی قرمز (*Carassius auratus*) سلول‌های زایا برای تمایز غدد جنسی ماده ضروری هستند و فقدان PGCs باعث عقیمی در ماهی‌های نر و ماده می‌شود (Weidinger *et al*., 2003; Liu *et al*., 2009; Fujimoto *et al*., 2010; Goto *et al*., 2012). اکثر ماهی‌های پرورشی قبل از عرضه به بازار به بلوغ غدد جنسی می‌رسند و بلوغ گناد عامل مهمی است که بازارپسندی ماهی را تعیین می‌کند. با این حال، ماهی های نابارور نرخ رشد، کیفیت گوشت و مقاومت در برابر بیماری را بهبود می‌بخشند. این اثرات با به حداقل رساندن انرژی مورد نیاز برای رشد غدد جنسی به‌دست می‌آید. علاوه بر این، عقیم‌سازی روشی مؤثر برای کاهش آلودگی ژنتیکی بوم‌شناختی با محافظت از گونه‌های طبیعی در برابر ماهی‌های پرورشی فراری و در نتیجه حفظ تنوع ژنتیکی است.

پژوهش‌ها نشان می‌دهد می‌توان با تنظیم بیان ژن *dnd* از طریق miRNA ها عقیمی را در ماهی‌ها القا نمود (Yoon *et al*., 2021). ارزیابی‌های بیوانفورماتیک حاکی از این است که dre-miR-217 و dre-miR-144 نقش مهمی در تنظیم بیان ژن *Sox9a* و *Sox21a* دارند. امتیاز

miTG مربوط به میزان تعاملات بین dre-miR-217 و dre-miR-144 و mRNA ژن‌های *Sox9a*و *Sox21a* به ترتیب برابر با ۰/۸۴۲ و ۰/۷۰۲ است. ژن‌های *Sox9a* و *Sox21a* از اعضای خانواده‌ی ژن (SRY-related HMG box) *Sox* است که در بسیاری از گونه‌های مهره‌داران از جمله ماهی یافت می‌شود. خانواده ژن *Sox9* و Sox21 فاکتورهای رونویسی را رمزگذاری می‌کند که نقش مهمی در رشد جنینی، به‌ویژه در تشکیل بافت‌ها و اندام‌های مختلف ایفا می‌کنند. در بسیاری از مهره‌داران، از جمله ماهی‌ها، Sox9a در فرآیند تعیین جنسیت و تمایز جنسی نقش دارد. با تنظیم تمایز گناد واجد پتانسیل به بیضه، نقش مهمی در ارتقاء رشد جنسی ماهی نر ایفا می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد که بیان ژن *Sox9a* معمولاً در بیضه‌های در حال رشد یا تمایز یافته در مقایسه با تخمدان‌ها بیشتر است. به‌عبارتی دیگر، بیان *Sox9a* در غدد جنسی در حال رشد جنین ماهی نر و ماده صورت می‌گیرد. با این حال، با پیشرفت تمایز جنسی، بیان آن در غدد جنسی ماهی‌های نر برجسته‌تر می‌شود. در ماهی‌های نر، ژن *Sox9a* در ترویج رشد سلول‌های سرتولی، که سلول‌های ضروری حمایت‌کننده در بیضه‌ها برای اسپرم‌سازی هستند، نقش دارد. علاوه بر این، بیان ژن *Sox9a* می‌تواند بیان ژن‌های مختلف درگیر در رشد و تمایز بیضه از جمله ژن *amh* و *Dmrt1* (دو جنسیتی و mab-3 مرتبط با فاکتور رونویسی 1) را تنظیم کند. در حالی که ژن *Sox21a* احتمالاً در تنظیم الگوهای بیان ژن که برای توسعه اندام‌ها و ساختارهای تولیدمثلی حیاتی است، شرکت می‌کند. اغلب ژن‌های *Sox* در رشد عصبی نقش دارند و *Sox21a* ممکن است در توسعه مدارها و شبکه‌های عصبی که عملکردهای نوروآندوکرین تولید مثل را تنظیم می‌کنند، نقش داشته باشد. این مدارهای عصبی برای کنترل فرآیندهای تولیدمثلی، از جمله ترشح هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) از هیپوتالاموس، که شروع کننده آزادسازی گنادوتروپین ها از غده هیپوفیز و تنظیم عملکرد غدد جنسی است، حیاتی است. علاوه براین، این امکان وجود دارد که *Sox21a* در تنظیم ژن‌های پاسخ‌دهنده به هورمون درگیر در فرآیندهای تولیدمثلی شرکت کند (Anitha and Senthilkumaran, 2021; Hu *et al*., 2021). بررسی نقش ژن‌های *Sox9a* و *Sox21a* در تولیدمثل ماهی *Lutraria sieboldii*، کپور معمولی *C. carpio* و ماهی *Culter alburnus*، به‌خوبی صحت این ادعا را ثابت می‌کند (Anitha and Senthilkumaran, 2020; Zheng *et al*., 2020; Lu *et al*., 2022; Anitha and Senthilkumaran, 2022).

تنظیم و تعدیل بیان ژن *shbg* در کبد است توسط dre-miR-155 می‌تواند بر سطح هورمون‌های جنسی فعال و غیرفعال در خون ماهی‌ها تأثیر معنی‌داری داشته باشد. امتیاز miTG مربوط به میزان تعاملات بین dre-miR-155 و mRNA ژن *shbg* برابر با ۰/۷۷۹ است. ژن *shbg*، پروتئین گلبولین را رمزگذاری می‌کند که به‌عنوان حامل هورمون جنسی در خون شناخته می‌شود. این پروتئین عمدتاً در کبد سنتز می‌شود و در جریان خون گردش می‌کند، جایی که محکم به هورمون‌های جنسی، از جمله تستوسترون و استرادیول (نوعی استروژن) متصل می‌شود. پروتئین SHBG به‌عنوان یک پروتئین حامل برای هورمون‌های جنسی در جریان خون عمل می‌کند. هنگامی که هورمون به SHBG متصل می‌شود، غیر فعال می‌شوند، و دیگر قادر به ورود آزادانه به سلول‌ها و تعامل با گیرنده‌های مربوطه خود نیستند. در عوض، هورمون‌های متصل به SHBG تا زمانی که از SHBG آزاد شوند، در گردش باقی می‌مانند و به آن‌ها اجازه می‌دهند اثرات زیستی خود را اعمال کنند. از این‌رو، پروتئین SHBG نقش مهمی در تنظیم فراهمی زیستی هورمون‌های جنسی، به‌ویژه تستوسترون دارد. با اتصال به تستوسترون، SHBG غلظت تستوسترون آزاد (ناپیوسته) را در جریان خون کاهش می‌یابد. همین امر بر میزان تستوسترون موجود برای جذب بافت و اتصال گیرنده تأثیر می‌گذارد، در نتیجه اثرات فیزیولوژیکی تستوسترون بر بافت‌های هدف، از جمله آنهایی که در تولیدمثل نقش دارند، تعدیل می‌شود. بدین‌ترتیب، در ماهی‌های نر، SHBG در دسترس بودن تستوسترون را ، که برای اسپرماتوژنز (تولید اسپرم) و سایر جنبه‌های فیزیولوژی تولیدمثل ماهی‌های نر ضروری است، تنظیم می‌کند. در حالی که در ماهی‌های ماده، SHBG بر فراهمی زیستی استرادیول که نقش مهمی در عملکرد تخمدان، چرخه تولیدمثلی و سایر فرآیندهای تولید مثل ایفا می‌کند، تأثیر می‌گذارد (Bock *et al*., 2021; Housh *et al*., 2024). عملکرد بیان ژن *shbg* در کبد ماهی *Cyprinodon variegatus*، *Cyprinodon nevadensis amargosae*

و مداکا *Oryzias melastigma* و نقش آن در نقل و انتقال هورمونی در طی فرآیند تولیدمثل و بلوغ بررسی شده است (Bock *et al.*, 2021; Dong *et al*., 2022; Housh *et al*., 2024).

ارزیابی‌های بیوانفورماتیک نشان داد که dre-miR-26a-5p می‌تواند با تعدیل و تنظیم بیان ژن *fshb*، بر سطح سنتز هورمون محرک فولیکول، تأثیر بگذارد. امتیاز miTG مربوط به میزان تعاملات بین dre-miR-26a-5p و mRNA ژن *fshb* برابر با ۰/۸۸۳ است. ژن *fshb* که به‌عنوان ژن زیر واحد بتا هورمون محرک فولیکول نیز شناخته می‌شود، مانند سایر مهره‌داران از جمله پستانداران در تولیدمثل ماهی‌ها نیز نقش دارد. این ژن زیرواحد بتا هورمون محرک فولیکول (FSH)، یک هورمون تولیدمثلی کلیدی است که نقش مهمی در تنظیم رشد و بلوغ فولیکول‌های تخمدان در ماهی‌های ماده و تولید اسپرم در ماهی‌های نر ایفا می‌کند. در ماهی‌ها، ژن *fshb* در غده هیپوفیز بیان می‌شود، جایی که به پروتئین زیر واحد بتا FSH تبدیل می‌شود. سپس این پروتئین با زیر واحد آلفا که توسط ژن دیگری به نام زیرواحد آلفا (*fsha*) FSH رمزگذاری شده است ترکیب می‌شود تا هورمون FSH فعال زیستی را تشکیل دهد. هورمون FSH جنبه‌های مختلف تولیدمثل از جمله رشد غدد جنسی، گامتوژنز (تشکیل اسپرم و تخمک) و تولید استروئیدهای جنسی را در ماهی‌ها را تنظیم می‌کند. از این‌رو، بیان ژن *fshb* و سنتز هورمون FSH در تحریک رشد فولیکول های تخمدان در ماهی‌های ماده و تولید اسپرم در ماهی‌های نر برای تولید مثل موفق بسیار مهم است. تنظیم بیان ژن *fshb* در ماهی تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند پارامترهای محیطی (مانند دوره نوری و دما)، سیگنال‌های هورمونی مانند هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) و مکانیسم‌های بازخوردی استروئیدهای جنسی است (Nyuji *et al*., 2020; Zhao *et al*., 2022).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن *stat3* نیز توسط dre-miR-737 تنظیم و تعدیل می‌شود. ژن*stat3* (مبدل سیگنال و فعال‌کننده رونویسی ۳) نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف از جمله تولیدمثل دارد. در حالی که نقش آن در تولیدمثل ممکن است به اندازه سایر ژن‌هایی که مستقیماً در فرآیندهای تولیدمثلی دخیل هستند مورد مطالعه قرار نگیرد، تحقیقات نشان داده است که این ژن در چندین جنبه از تولیدمثل نقش دارد. بیان ژن*stat3* در تنظیم ترشح هورمون هیپوفیز از جمله گنادوتروپین‌ها مانند هورمون لوتئینیزه کننده (LH) و هورمون محرک فولیکول (FSH) نقش دارد. سیگنالینگ STAT3 در تنظیم عملکرد تخمدان و بیضه نقش بنیادی دارد. در ماهی‌های ماده، STAT3 ممکن است در رشد فولیکولی و تخمک‌گذاری نقش داشته باشد. در حالی که در ماهی‌های نر، سیگنال دهی STAT3 ممکن است در تولید اسپرم و حفظ عملکرد بیضه نقش داشته باشد. بیان ژن *stat3* می‌تواند توسط هورمون‌های تولیدمثلی مختلف از جمله گنادوتروپین‌ها و استروئیدهای جنسی فعال شود. علاوه براین، ممکن است در پایین‌دست گیرنده‌های هورمونی برای تنظیم بیان ژن در بافت های تولیدمثلی عمل کند و در نتیجه بر فرآیندهای تولیدمثلی تأثیر بگذارد (Sun *et al*., 2020; Zeng *et al*., 2023). امتیاز miTG مربوط به میزان تعاملات بین dre-miR-737 و mRNA ژن *stat3* برابر با ۰/۹۰۴ است.

نتایج این مطالعه نشان داد که سنتز زیستی هورمون‌های استروئید جنسی منوط به بیان بیان ژن‌های *cyp17a1* و *cyp19a1b* است که توسط dre-miR-740 تنظیم و تعدیل می‌شوند. محاسبات DIANA نشان داد که امتیاز miTG مربوط به میزان تعاملات بین mRNA این دو ژن و dre-miR-740 به‌ترتیب ۰/۹۵۹ و ۰/۹۱۸ است. ژن *cyp19a1b* یک ایزوفرم خاص از خانواده سیتوکروم P450، زیرخانواده ۱۹، ژن پلی‌پپتیدی A1B است. این ژن آنزیم آروماتاز B را رمزگذاری می‌کند که در بیوسنتز استروژن‌ها نقش دارد. در ماهی‌ها، به‌ویژه ماهی‌های استخوانی مانند ماهی گورخری (*Danio rerio*)، آروماتاز B عمدتاً در غدد جنسی (تخمدان‌ها و بیضه‌ها) و مغز بیان می‌شود (Mouriec *et al*., 2019). آنزیم‌های آروماتاز، از جمله آروماتاز B کدگذاری شده توسط ژن *cyp19a1b*، تبدیل تستوسترون به استرادیول را کاتالیز می‌کنند. این تبدیل برای تولید استروژن در ماهی‌های نر و ماده بسیار مهم است. در ماهی-های ماده، استروژن‌ها نقش اساسی در عملکرد تخمدان، رشد تخمک و تولیدمثل دارند. در ماهی‌های نر، تولید استروژن برای فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف، از جمله اسپرم‌زایی، مهم است. استروژن‌های سنتز شده توسط آنزیم-های آروماتاز به تمایز جنسی در ماهی کمک می‌کند. در طول رشد اولیه، تعادل بین آندروژن و استروژن برای تعیین

ویژگی‌های جنسی بسیار مهم است. در برخی از گونه‌های ماهی، قرار گرفتن در معرض استروژن در طول دوره‌های حیاتی رشد می‌تواند بر تمایز جنسی تأثیر بگذارد و منجر به تغییر نسبت‌های جنسی یا رشد افراد بین جنس شود. استروژن‌های تولید شده توسط آنزیم‌های آروماتاز تنظیم‌کننده‌های کلیدی فرآیندهای تولیدمثل در ماهی هستند. این هورمون‌ها بر زمان رویدادهای تولیدمثلی مانند تخمریزی، بلوغ تخمک و رشد غدد جنسی تأثیر می‌گذارند. رابطه بین سطح بیان ژن *cyp19a1b* و فعالیت جنسی باس دهان‌گشاد (*Micropterus salmoides*) مؤید این ادعا است (Zhang *et al*., 2024). علاوه بر این، مسیرهای سیگنال‌دهی استروژن در کنترل رفتار جفت‌گیری، نمایش معاشقه و سلسله مراتب اجتماعی نیز نقش دارند. بیان ژن *cyp19a1b* و فعالیت آروماتاز می‌تواند تحت تأثیر عوامل محیطی مانند دما، دوره نوری و آلاینده‌ها باشد. تغییرات در شرایط محیطی می‌تواند بر سطح استروژن تأثیر بگذارد، که به‌نوبه خود ممکن است بر فیزیولوژی تولیدمثل و رفتار در جمعیت ماهی تأثیرگذار است. از این‌رو، درک عملکرد ژن *cyp19a1b* و آنزیم آروماتاز B برای روشن کردن مکانیسم‌های زیربنایی زیست‌شناسی تولیدمثل، تمایز جنسی و سازگاری محیطی در گونه‌های ماهی ضروری است (Zhang *et al*., 2024). بیان ژن *cyp19a1b* در لارو کپور هندی *Labeo rohita*، بر نقش این زن در تمایز جنسی تأکید می‌کند (Gupta *et al*., 2017).

ژن *cyp17a1*، آنزیم سیتوکروم P450 17A1 را کد می‌کند که با نام ۱۷-α هیدروکسیلاز/۱۷،۲۰–لیاز نیز شناخته می‌شود. این آنزیم نقش مهمی در استروئیدزایی دارد، فرآیندی که طی آن هورمون‌های استروئیدی در غدد جنسی ماهی‌ها سنتز می‌شوند. به‌طور خاص، آنزیم سیتوکروم P450 17A1در بیوسنتز گلوکوکورتیکوئیدها (مانند کورتیزول) و استروئیدهای جنسی (مانند آندروژن‌ها و استروژن‌ها) نقش دارد (Zhai *et al*., 2018; Yang *et al*., 2021). آنزیم سیتوکروم P450 17A1 دو واکنش مهم را در مسیر بیوسنتز آندروژن کاتالیز می‌کند. نخست، پرگننولون و پروژسترون را به‌ترتیب به فرم‌های ۱۷ α هیدروکسیله، دهیدرواپی آندروسترون (DHEA) و آندروستندیون تبدیل می‌کند، که پیش‌سازهایی برای تولید تستوسترون و سایر آندروژن ها هستند. علاوه براین، در بافت های محیطی، آنزیم سیتوکروم P450 17A1 در تبدیل آندروستندیون به استرون، یک استروژن ضعیف، نقش دارد. ارزیابی نقش آنزیم سیتوکروم P450 17A1 در بیوسنتز استروئیدهای جنسی در ماهی گورخری، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) مؤید این مطلب است (Blanco *et al*., 2016; Zhai *et al*., 2018; Zhai *et al*., 2022).

بیان ژن *ar* که کد کننده گیرنده آندروژنی نیز می‌تواند توسط dre-miR-737-5p تعدیل و تنظیم شود. امتیاز miTG مربوط به mRNA ژن *ar* و dre-miR-737-5p برابر ۰/۹۱۷ محاسبه شده است. ژن *ar* که به‌عنوان ژن گیرنده آندروژن نیز شناخته می‌شود، گیرنده آندروژن را کد می‌کند، پروتئینی که نقش مهمی در میانجی‌گری اثرات هورمون‌های آندروژن، به‌ویژه تستوسترون و دی هیدروتستوسترون (DHT) دارد. گیرنده آندروژن عضوی از خانواده گیرنده‌های هورمونی استروئیدی است و به‌عنوان یک فاکتور رونویسی عمل می‌کند و بیان ژن‌های هدف درگیر در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف را تنظیم می‌کند (Ogino *et al*., 2016). گیرنده آندروژن که توسط ژن *ar* کدگذاری می‌شود، با میل ترکیبی بالا به آندروژن‌هایی مانند تستوسترون و DHT متصل می‌شود. پس از اتصال، گیرنده آندروژن دچار تغییرات ساختاری می‌شود و به هسته سلول منتقل می‌شود، جایی که به توالی‌های خاصی از DNA به نام عناصر پاسخ آندروژن (AREs) متصل می‌شود. این اتصال، رونویسی ژن‌های هدف را تنظیم می‌کند و منجر به اثرات زیستی مختلفی می‌شود. آندروژن‌ها و گیرنده آندروژن نقش مهمی در تمایز و رشد جنسی در ماهی‌های نر دارند. با این وجود، در هر دو جنس نر و ماده، آندروژن‌ها و گیرنده‌های آندروژنی برای عملکرد طبیعی تولیدمثل ضروری هستند. در ماهی‌های نر، آندروژن ها باعث تنظیم اسپرماتوژنز، توسعه و نگهداری دستگاه تولیدمثلی و بروز رفتارهای جنسی می‌شوند.

در جنس ماده، آندروژن‌ها به عملکرد تخمدان و تنظیم چرخه‌های تولیدمثلی کمک می‌کنند (Ogino *et al*., 2023). نتایج این پژوهش نشان داد که بیان ژن *amh* ویژه در لاروهای نر توسط dre-miR-93 تنظیم می‌شود. ژن *amh*که به‌عنوان ژن هورمون آنتی‌مولرین یا ژن هورمون بازدارنده مولر نیز شناخته می‌شود، تولید هورمون ضد مولر

(*amh*) را کد می‌کند که یک هورمون پروتئینی متعلق به فاکتور رشد تبدیل کننده بتا (TGF-β) است. امتیاز miTG مربوط به تعاملات بین dre-miR-93 و mRNA ژن *amh* برابر با ۰/۹۰۶ است. بیان ژن *amh* در رابطه با رشد و تولیدمثل جنسی در ماهی گورخری، گامبوزیا (*Gambusia holbrooki*) و دیگر ماهی‌های استخوانی مورد بررسی قرار گرفته است (Pfennig *et al*., 2015; Kwan and Patil, 2019; Yan *et al*., 2019b). در جنین ماهی‌های نر، ژن *amh*در بیضه‌ها بیان می‌شود و نقش مهمی در تمایز جنسی با ایجاد پسرفت مجاری مولر، که ساختارهای پیش ساز اندام‌های تناسلی جنس ماده (رحم, لوله‌های فالوپ) هستند، ایفا می‌کند. این فرآیند به رشد اندام‌های تناسلی جنس نر (اپیدیدیم، مجرای دفران، وزیکول‌های منی) اجازه می‌دهد. پس از تفریخ و تکامل بیضه، ژن *amh* می‌تواند در سلول‌های سرتولی در بیضه‌ها بیان شود. هورمون آنتی مولرین می‌تواند در ایجاد محیط مناسب در لوله‌های منی‌ساز بیضه‌ها، حمایت از اسپرم‌زایی، و پیشرفت فرآیند تولید اسپرم، نقش ایفا کند. در ماهی‌های ماده، ژن *amh* در سلول‌های گرانولوزا در فولیکول‌های تخمدان بیان می‌شود (Pfennig *et al*., 2015; Kwan and Patil, 2019; Yan *et al*., 2019b). هورمون آنتی‌مولرین در تنظیم فولیکولوژنز، فرآیند رشد فولیکول تخمدان نقش دارد. غیرفعال کردن و حذف یکی از دو کپی *amh* بر روی کروموزوم Y منجر به افزایش بیان آروماتاز در غدد جنسی و تمایز تخمدان در ماهی *Odontesthes hatcheri* گردید (Hattori *et al*., 2012).

کنترل و تنظیم بیان ژن *esr2b* می‌تواند به‌وسیله dre-miR-140-3p انجام شود. محاسبات DIANA نشان داد که امتیاز miTG مربوط به تعاملات بین dre-miR-140-3p و mRNA ژن *esr2b* برابر با ۰/۷۳۷ است. ژن *esr2b*گونه‌ای از ژن‌های کد کننده گیرنده استروژن ۲ (ESR2) است که به‌عنوان گیرنده استروژن بتا (ERβ) نیز شناخته می‌شود. این ژن یکی از ایزوفرم‌های ژن ESR2 است که یک پروتئین گیرنده هورمون هسته‌ای را کد می‌کند که به استروژن متصل می‌شود. مانند سایر ایزوفرم‌های ژن *esr2b*، پروتئین گیرنده‌ای را کد می‌کند که به‌طور خاص به مولکول‌های استروژن متصل می‌شود. گیرنده‌های استروژن برای اثر بخشی استروژن در بافت‌ها و اندام‌های مختلف بدن بسیار مهم هستند. ایزوفرم ESR2B یا گیرنده استروژن بتا ممکن است در مقایسه با سایر ایزوفرم‌ها دارای الگوهای توزیع بافتی یا نمایه‌های بیان خاصی باشد. توزیع دقیق و عملکرد ESR2B ممکن است بسته به گونه متفاوت باشد (Yan *et al*., 2019a). پس از اتصال به استروژن، گیرنده‌های استروژن، از جمله ESR2B، می‌توانند به‌عنوان فاکتورهای رونویسی عمل کنند و بیان ژن‌های هدف را تنظیم کنند. این ژن‌های هدف در فرآیندهای زیستی مختلفی از جمله تکثیر سلولی، تمایز، آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و متابولیسم نقش دارند. علاوه براین، گیرنده‌های استروژن، از جمله ESR2B، نقش اساسی در فرآیندهای فیزیولوژیکی متعددی از جمله رشد و عملکرد تولیدمثل، سلامت استخوان، سلامت قلب و عروق، عملکرد مغز و تنظیم ایمنی ایفا می‌کنند. از این‌رو، هرگونه اختلال در تنظیم سیگنال‌دهی استروژن، از جمله بیان یا عملکرد ناهنجار ESR2B، می‌تواند منجر به بروز برخی از بیماری‌ها از جمله تومورزایی، اختلالات اسکلتی، نارسایی‌های قلبی و عروقی، اختلالات نورودژنراتیو، و بیماری‌های خود ایمنی منجر شود. بنابراین درک نقش‌ها و عملکردهای خاص ایزوفرم‌های مختلف گیرنده‌های استروژن، از جمله ESR2B، برای کشف پیچیدگی مسیرهای سیگنال‌دهی استروژن و پیامدهای آن‌ها بسیار مهم است. بیان ژن‌های مربوط به گیرنده‌های استروژنی و عملکرد آن‌ها در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، (*Oreochromis niloticus*)، ماهی قنات (*Gobiocypris rarus*) و ماهی گورخری مؤید این ادعا است (Qin *et al*., 2014; Delalande *et al*., 2015; López-Muñoz *et al*., 2015; Yan *et al*., 2019a).

تنظیم و تعدیل بیان ژن *rspo1* نیز توسط dre-miR-15a امکان‌پذیر است. محاسبات DIANA نشان داد که امتیاز miTG مربوط به میزان تعاملات بین dre-miR-15a و mRNA ژن *rspo1* برابر با ۰/۷۷۴ است. ژن *rspo1* یا R-spondin 1 یک پروتئین ترشحی را کد می‌کند که نقش مهمی در فرآیندهای رشدی مختلف از جمله جنین‌زایی، بازسازی بافت و نگهداری سلول‌های بنیادی ایفا می‌کند.این پروتئین ترشحی در زیست‌شناسی تولیدمثل، به‌ویژه در رشد غدد جنسی و تعیین جنسیت نیز نقش دارد. مطالعات نشان داده‌اند که سیگنال‌دهی RSPO1 برای تقویت رشد تخمدان در جنس ماده ضروری است. پروتئین RSPO1 برای تقویت

سیگنال‌دهی WNT/β-catenin ضروری شناخته شده است؛ این مسیر یک مسیر سیگنالینگ حیاتی برای اغلب فرآیندهای مختلف رشد، از جمله الگوبرداری جنینی، تعیین سرنوشت سلول‌ها به‌ویژه تمایز غدد جنسی به بیضه یا تخمدان است (Wei *et al*., 2018). نقش سیگنال‌دهی RSPO1 در رشد و تکامل تخمدان و بیضه ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) مؤید این مطالب است (Wu *et al*., 2016). در غدد جنسی با سیستم XY، بیان موقت ژن *Sry* در دودمان سلولی پشتیبان مسیر تمایز جنسی جانوران نر را با تنظیم مثبت بیان *Sox9* و *Fgf9* آغاز می‌شود (Chassot *et al*., 2014). در حالی‌که، در غدد جنسی با سیستم XX، چندین ژن به‌عنوان مهم در تمایز تخمدان شناخته شده‌اند و پروتئین RSPO1 نقش کلیدی در تمایز تخمدان ایفا می‌کند (Wu *et al*., 2016). بنابراین، نقش RSPO1 در افزایش سیگنال‌دهی WNT/β-catenin برای رشد تخمدان و حفظ فنوتیپ ماده بسیار حیاتی است. علاوه براین، با توجه به تأثیر این پروتئین بر رشد و عملکرد غدد جنسی، RSPO1 ممکن است به‌طور غیرمستقیم بر تولید و ترشح هورمون‌های تولیدمثلی مانند استروژن و تستوسترون تأثیر بگذارد. تاثیر سیگنال‌دهی Rspo1/Wnt/β-catenin در تمایز تخمدان در ماهی پیش‌نر مانند شانک ماهی سیاه ژاپنی (*Acanthopagrus schlegelii*)، ماهی مداکا (*Oryzias latipes*)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، کفشک‌ماهی چینی (*Cynoglossus semilaevis*) و ماهی گورخری (*Danio rerio*) این ادعا را تأیید می‌کند (Wu and Chang, 2009; Nicol and Guiguen, 2011; Zhang *et al*., 2011, Zhou *et al*., 2012; Wei *et al*., 2018). همچنین، افزایش سطح استروژن باعث افزایش بیان ژن Rspo1 در ماهی‌ها می‌شود (Zhou *et al*., 2012).

## نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که miRNA ها می‌توانند بیان ژن‌های دخیل در رشد، تمایز و بلوغ سلول‌های زایا را تنظیم کنند. آن‌ها بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با اسپرم‌زایی و اووژنز را کنترل می‌کنند و از تشکیل گامت و عملکرد مناسب اطمینان می دهند. علاوه براین، miRNA ها می‌توانند با تعدیل و تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با جنسیت به ایجاد فنوتیپ‌های نر و ماده کمک کنند. miRNA ها بر بیان ژن‌های کدکننده گیرنده‌های هورمونی، آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز و متابولیسم هورمون و سایر اجزای سیستم غدد درون‌ریز تأثیر می‌گذارند. آن‌ها تولید، ترشح و پاسخ به هورمون‌های تولیدمثلی مانند گنادوتروپین‌ها، هورمون‌های استروئیدی و فاکتورهای رشد را تنظیم می‌کنند. همچنین، miRNAها می‌توانند با تنظیم مسیرهای عصبی و مولکولی دخیل در بروز رفتارهای تولیدمثلی، از جمله معاشقه، انتخاب جفت، تخمریزی و مراقبت والدینی مؤثر باشند. همچنین بیان ژن‌های دخیل در سیگنال‌دهی عصبی غدد درون‌ریز، آزادسازی انتقال دهنده‌های عصبی و شکل‌پذیری سیناپسی را در نواحی مغز مرتبط با رفتار تولیدمثلی را تعدیل و تنظیم می‌کنند.

## منابع


**Ahmadniaye Motlagh, H., Horie Y., Rashid H., Banaee M., Multisanti C.R., Faggio C. 2023.** Unveiling the effects of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed essential oil as a diet supplement on the biochemical parameters and reproductive function in female common carps (*Cyprinus carpio*). *Water* 15(16), 2978.

**Anitha A., Senthilkumaran B. 2020.** Role of sox30 in regulating testicular steroidogenesis of common carp. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 204, 105769.

**Anitha A., Senthilkumaran B. 2021.** Role of sox family genes in teleostean reproduction-an overview. *Reproduction and Breeding* 1(1), 22-31.

**Anitha A., Senthilkumaran B. 2022.** sox19 regulates ovarian steroidogenesis in common carp. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 217, 106044.

**Aramaki S., Sato F., Kato T., Soh T., Kato Y., Hattori M.A. 2007.** Molecular cloning and expression of dead end homologue in chicken primordial germ cells. *Cell and Tissue Research* 330(1), 45-52.

**Badr A.A. 2022.** Investigation of the role of microRNAs in the regeneration of damaged organs in zebrafish. *Aquaculture Sciences* 10(1), 67-79.

**Badr A.A., Banaee M., Heidarieh M. 2022.** Bioinformatics study of microRNAs effect on the

expression of genes involved in the process of tissue repair and regeneration of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Sciences* 10(2), 126-133.

**Banaee M., Naderi M. 2014.** The reproductive biology of shirbot (*Barbus grypus* Heckel, 1843) in the Maroon River, Iran. *International Journal of Aquatic Biology* 2(1), 43-52.

**Banaee M., Sagvand S. 2019.** Bioinformatics evaluation of the miRNAs effect on expression of genes involved in neurogenesis process in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Physiology and Biotechnology* 7(3), 73-88.

**Bhat R.A., Priyam M., Foysal M.J., Gupta S.K., Sundaray J.K. 2021.** Role of sex-biased miRNAs in teleosts–a review. *Reviews in Aquaculture* 13(1), 269-281.

**Bhattacharya C., Aggarwal S., Zhu R., Kumar M., Zhao M., Meistrich M.L., Matin A. 2007.** The mouse dead-end gene isoform α is necessary for germ cell and embryonic viability. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355(1), 194-199.

**Blanco M., Fernandes D., Medina P., Blázquez M., Porte C. 2016.** Drospirenone intake alters plasmatic steroid levels and cyp17a1 expression in gonads of juvenile sea bass. *Environmental Pollution* 213, 541-548.

**Bock S.L., Chow M.I., Forsgren K.L., Lema S.C. 2021.** Widespread alterations to hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis signaling underlie high temperature reproductive inhibition in the eurythermal sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Molecular and Cellular Endocrinology* 537, 111447.

**Chassot A.A., Gillot I., Chaboissier M.C. 2014.** R-spondin1, WNT4, and the CTNNB1 signaling pathway: strict control over ovarian differentiation. *Reproduction* 148(6), R97-110.

**D'Ambrosio J., Morvezen R., Brard-Fudulea S., Bestin A., Acin Perez A., Guéméné D., Poncet C., Haffray P., Dupont-Nivet M., Phocas F. 2020.** Genetic architecture and genomic selection of female reproduction traits in rainbow trout. *BMC Genomics* 21, 1-14.

**Delalande C., Goupil A.S., Lareyre J.J., Le Gac F. 2015.** Differential expression patterns of three aromatase genes and of four estrogen receptors genes in the testes of trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction and Development* 82(9), 694-708.

**Dong Z., Chen Y., Li X., Zhang N., Guo Y., Liang Y.Q., Wang Z. 2022.** Norethindrone alters growth, sex differentiation and gene expression in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Environmental Toxicology* 37(5), 1211-1221.

**Fujimoto T., Nishimura T., Goto-Kazeto R., Kawakami Y., Yamaha E., Arai K. 2010.** Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(40), 17211-17216.

**Goto R., Saito T., Takeda T., Fujimoto T., Takagi M., Arai K., Yamaha E. 2012.** Germ cells are not the primary factor for sexual fate determination in goldfish. *Developmental Biology* 370(1), 98-109.

**Gupta S., Moulik S.R., Pal P., Majumder S., Das S., Guha P., Juin S.K., Panigrahi A.K., Mukherjee D. 2017.** Estrogen-regulated expression of cyp19a1a and cyp19a1b genes in swim-up fry of *Labeo rohita*. *General and Comparative Endocrinology* 251, 85-93.

**Hattori R.S., Murai Y., Oura M., Masuda S., Majhi S.K., Sakamoto T., Fernandino J.I., Somoza G.M., Yokota M., Strüssmann C.A. 2012.** A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(8), 2955-2959.

**Housh M.J., Telish J., Forsgren K.L., Lema S.C. 2024.** Fluctuating and stable high temperatures differentially affect reproductive endocrinology of female pupfish. *Integrative Organismal Biology* 6(1), obae003.

**Hu Y., Wang B., Du H. 2021.** A review on sox genes in fish. *Reviews in Aquaculture* 13(4), 1986-2003.

Juanchich A., Le Cam A., Montfort J., Guiguen Y., Bobe J. 2013. Identification of differentially expressed miRNAs and their potential targets during fish ovarian development. *Biology of Reproduction* 88(5), 128-1.

**Kamenskaya D.N., Brykov V.A. 2020.** Fish growth hormone genes: structure and divergence. *Russian Journal of Marine Biology* 46, 233-242.

**Kedde M., Strasser M.J., Boldajipour B., Vrielink J.A.O., Slanchev K., le Sage C., Nagel R., Voorhoeve P.M., van Duijse J., Ørom U.A., Lund A.H. 2007.** RNA-binding protein Dnd1 inhibits

microRNA access to target mRNA. *Cell* 131(7), 1273-1286.

**Kwan T.N., Patil J.G. 2019.** Sex biased expression of anti-Mullerian hormone (amh) gene in a live bearing fish, *Gambusia holbrooki*: Evolutionary implications and potential role in sex differentiation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 231, 59-66.

**Liu B., Li P., He S., Xing S., Chen C., Liu L., Li Z.H. 2022.** Chronic exposure to tralopyril induced abnormal growth and calcium regulation of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Chemosphere* 299, 134405.

**Liu L., Hong N., Xu H., Li M., Yan Y., Purwanti Y., Yi M., Li Z., Wang L., Hong Y. 2009.** Medaka dead end encodes a cytoplasmic protein and identifies embryonic and adult germ cells. *Gene Expression Patterns* 9(7), 541-548.

**López-Muñoz A., Liarte S., Gómez-González N.E., Cabas I., Meseguer J., García-Ayala A., Mulero V. 2015.** Estrogen receptor 2b deficiency impairs the antiviral response of zebrafish. *Developmental & Comparative Immunology* 53(1), 55-62.

**Lu M., Xing Z., Zhou Y., Xu Y., Peng H., Zou J., Dan S.F., She Z., Wang P., Liu J., Qin S. 2022.** Cloning and Expression of Sox2 and Sox9 in Embryonic and Gonadal Development of *Lutraria* sieboldii. *Fishes* 7(6), 392.

**Mouriec K., Gueguen M.M., Manuel C., Percevault F., Thieulant M.L., Pakdel F., Kah O. 2009.** Androgens upregulate cyp19a1b (aromatase B) gene expression in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) through estrogen receptors. *Biology of Reproduction* 80(5), 889-896.

**Nicol B., Guiguen Y. 2012.** Expression profiling of Wnt signaling genes during gonadal differentiation and gametogenesis in rainbow trout. *Sexual development*, *5*(6), 318-329.

**Nyuji M., Hongo Y., Yoneda M., Nakamura M. 2020.** Transcriptome characterization of BPG axis and expression profiles of ovarian steroidogenesis-related genes in the Japanese sardine. *BMC Genomics* 21, 1-18.

**Ogino Y., Ansai S., Watanabe E., Yasugi M., Katayama Y., Sakamoto H., Okamoto K., Okubo K., Yamamoto Y., Hara I., Yamazaki T. 2023.** Evolutionary differentiation of androgen receptor is responsible for sexual characteristic development in a teleost fish. *Nature Communications* 14(1), 1428.

**Ogino Y., Kuraku S., Ishibashi H., Miyakawa H., Sumiya E., Miyagawa S., Matsubara H., Yamada G., Baker M.E. Iguchi T. 2016.** Neofunctionalization of androgen receptor by gain-of-function mutations in teleost fish lineage. *Molecular Biology and Evolution* 33(1), 228-244.

**Oliveira C.C., Fatsini E., Fernández I., Anjos C., Chauvigné F., Cerdà J., Mjelle R., Fernandes J.M., Cabrita E. 2020.** Kisspeptin influences the reproductive axis and circulating levels of microRNAs in *Senegalese sole*. *International Journal of Molecular Sciences* 21(23), 9051.

**Oliveira C.C., Fatsini E., Fernández I., Anjos C., Chauvigné F., Cerdà J., Mjelle R., Fernandes J.M., Cabrita E. 2020.** Kisspeptin influences the reproductive axis and circulating levels of microRNAs in Senegalese sole. *International Journal of Molecular Sciences* 21(23), 9051.

**Pfennig F., Standke, A., Gutzeit, H.O. 2015.** The role of Amh signaling in teleost fish–multiple functions not restricted to the gonads. *General and Comparative Endocrinology* 223, 87-107.

**Qin F., Wang X., Liu S., Zheng Y., Li M., Zhang Y., Wang Z. 2014.** Gene expression profiling of key genes in hypothalamus–pituitary–gonad axis of rare minnow *Gobiocypris rarus* in response to EE2. *Gene* 552(1), 8-17.

**Raza S.H.A., Abdelnour S.A., Alotaibi M.A., AlGabbani Q., Naiel M.A., Shokrollahi B., Noreldin A.E., Jahejo A.R., Shah M.A., Alagawany M., Zan L. 2022.** MicroRNAs mediated environmental stress responses and toxicity signs in teleost fish species. *Aquaculture* 546, 737310.

**Riffo-Campos Á.L., Riquelme I., Brebi-Mieville P. 2016.** Tools for sequence-based miRNA target prediction: what to choose?. *International journal of Molecular Sciences* 17(12), 1987.

**Shinomiya A., Tanaka M., Kobayashi T., Nagahama Y., Hamaguchi S. 2000.** The vasa-like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Development, Growth & Differentiation* 42(4), 317-326.

**Sivalingam M., Parhar I. S. 2022.** Hypothalamic kisspeptin and kisspeptin receptors: Species variation in reproduction and reproductive behaviours. *Frontiers in Neuroendocrinology* 64, 100951.

**Somoza G.M., Mechaly A.S., Trudeau V.L. 2020.** Kisspeptin and GnRH interactions in the reproductive brain of teleosts. *General and Comparative Endocrinology* 298, 113568.

**Sun S.X., Wu J.L., Lv H.B., Zhang H.Y., Zhang J., Limbu S.M., Qiao F., Chen L.Q., Yang Y., Zhang, M.L., Du, Z.Y., 2020.** Environmental estrogen exposure converts lipid metabolism in male fish to a female pattern mediated by AMPK and mTOR signaling pathways. *Journal of Hazardous Materials* 394, 122537.

**Tavakoli-Kolour P., Farhadi A., Ajdari A., Bagheri D., Hazraty-Kari S., Ghasemi A., Vazirzadeh A. 2022.** Genetic species identification and population structure of grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822) collected from fish markets along the Persian Gulf and the Oman Sea. *PeerJ*, *10*, e14179.

**Vazirzadeh A., Guiguen Y. 2017.** Differential expression of subunits of 20β-hydroxysteroid dehydrogenase during gametogenesis in rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*). *Animal reproduction Science* 184, 139-148.

**Vazirzadeh A., Farhadi A., Naseri M., Jeffs A. 2016.** Comparison of methods to improve induction of spermiation in wild-caught carp (*Cyprinus carpio carpio*), a threatened species from the Caspian Sea basin. *Animal Reproduction Science* 170, 100-107.

**Wang P., Wang L., Yang J., Luan P., Zhang X., Kuang Y., Sun X. 2018.** Sex-biased miRNAs of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and their potential role in reproductive development. *Aquaculture*, *485*, 73-80.

**Wei M., Xu W.T., Li H.L., Wang L., Xiu Y.J., Yang Y.M., Li Y.Z., Zhao F.Z., Chen S.L. 2018.** Molecular characterization and expression analysis of a novel r-spondin member (rspo2l) in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish & Shellfish Immunology* 72, 436-442.

**Weidinger G., Stebler J., Slanchev K., Dumstrei K., Wise C., Lovell-Badge R., Thisse C., Thisse B., Raz E. 2003.** Dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Current Biology*, *13*(16), 1429-1434.

**Wu G.C., Chang C.F. 2009.** Wnt4 is associated with the development of ovarian tissue in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Biology of Reproduction* 81(6), 1073-1082.

**Wu L., Yang P., Luo F., Wang D., Zhou L. 2016.** R-spondin1 signaling pathway is required for both the ovarian and testicular development in a teleosts, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology* 230, 177-185.

**Xu H., Liu E., Li Y., Li X., Ding C. 2017.** Transcriptome analysis reveals increases in visceral lipogenesis and storage and activation of the antigen processing and presentation pathway during the mouth-opening stage in zebrafish larvae. *International Journal of Molecular Sciences* 18(8), 1634.

**Yan L., Feng H., Wang F., Lu B., Liu X., Sun L., Wang, D. 2019a.** Establishment of three estrogen receptors (esr1, esr2a, esr2b) knockout lines for functional study in Nile tilapia. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 191, 105379.

**Yan Y.L., Batzel P., Titus T., Sydes J., Desvignes T., BreMiller R., Draper B., Postlethwait J.H. 2019b.** A hormone that lost its receptor: anti-Müllerian hormone (AMH) in zebrafish gonad development and sex determination. *Genetics* 213(2), 529-553.

**Yang L., Zhang X., Liu S., Zhao C., Miao Y., Jin L., Wang D., Zhou L. 2021.** Cyp17a1 is required for female sex determination and male fertility by regulating sex steroid biosynthesis in fish. *Endocrinology* 162(12), bqab205.

**Ye C., Xu S., Hu Q., Zhou L., Qin X., Jia J., Hu G. 2019.** Global view of neuropeptides and their receptors in the brain and pituitary of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture* 512, 734360.

**Yoon J.H., Cho Y.S., Lee H.B., Park J.Y., Lim H.K. 2021.** Dead-End (dnd) Gene Cloning and Gonad-Specific Expression Pattern in Starry Flounder (*Platichthys stellatus*). *Animals* 11(8), 2256.

**Zahangir M.M., Shahjahan M., Ando H. 2022.** Kisspeptin exhibits stimulatory effects on expression of the genes for kisspeptin receptor, gnRH1 and GTH subunits in a gonadal stage-dependent manner in the grass puffer, a semilunar-synchronized spawner. *Frontiers in Endocrinology* 13, 917258.

**Zeng Q., Hu N., Li Z., Yang Y., Zhou Z. 2023.** Evolutionarily conserved IL-20 enhances the response of JAK1/STAT3 axis in Carassius cuvieri× Carassius auratus red var. *Reproduction and Breeding* 3(2), 72-81.

**Zhai G., Shu T., Chen K., Lou Q., Jia J., Huang J., Shi C., Jin X., He J., Jiang D., Qian X. 2022.** Successful production of an all-female common carp (*Cyprinus carpio* L.) population using cyp17a1-deficient neomale carp. *Engineering* 8, 181-189.

**Zhai G., Shu T., Xia Y., Lu Y., Shang G., Jin X., He J., Nie P., Yin Z. 2018.** Characterization of sexual trait development in cyp17a1-deficient zebrafish. *Endocrinology* 159(10), 3549-3562.

**Zhang D., Shi B., Shao P., Shao C., Wang C., Li J., Liu X., Ma X., Zhao X. 2022.** The identification of miRNAs that regulate ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*. *Aquaculture* 555, 738250.

**Zhang D., Tian T., Han L., Du J., Zhu T., Lei C., Song H., Li S. 2024.** Expression characteristics of the Cyp19a1b aromatase gene and its response to 17β-estradiol treatment in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Fish Physiology and Biochemistry* pp. 1-14.

**Zhang Y., Li F., Sun D., Liu J., Liu N., Yu Q. 2011.** Molecular analysis shows differential expression of R-spondin1 in zebrafish (*Danio rerio*) gonads. *Molecular Biology Reports* 38, 275-282.

**Zhao C., Zhai Y., Geng R., Wu K., Song W., Ai N., Ge W. 2022.** Genetic analysis of activin/inhibin β subunits in zebrafish development and reproduction. *PLoS Genetics* 18(12), e1010523.

**Zheng J., Jia Y., Liu S., Chi M., Cheng S., Gu Z. 2020.** Molecular characterization and expression profiles of transcription factor Sox gene family in *Culter alburnus*. *Gene Expression Patterns* 36, 119112.

**Zhou L., Charkraborty T., Yu X., Wu L., Liu G., Mohapatra S., Wang D., Nagahama Y. 2012.** R-spondins are involved in the ovarian differentiation in a teleost, medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Developmental Biology* 12, 1-11.

**Zohar Y. 2021.** Fish reproductive biology–Reflecting on five decades of fundamental and translational research. *General and Comparative Endocrinology* 300, 113544.

**Journal of Aquaculture Sciences** Vol. 12, No 22, 23-38
**Print ISSN: 2322-5351**
**www.aquaculturesciences.ir**

# Bioinformatics study of the role of miRNAs in regulating the expression of genes involved in sexual maturity and reproduction in zebra fish (*Danio rerio*)

**Mahdi Banaee[1]*, Ahmad Ali Badr[2], Arya Vazirzadeh[3]**

[1]Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources, Khatam Al-Anbia University of Technology, Behbehan, Iran.
[2]Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran.
[3]Department of Natural Resources and Environmental Engineering, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

*Corresponding author: mahdibanaee2@gmail.com
**Received: 31.Jan.2024** **Accepted: 25.Apr.2024**

## Abstract
MicroRNAs (miRNAs) have known as crucial regulators of gene expression, influencing various biological processes such as sexual maturation and reproduction. In this study, the bioinformatics tools and techniques were used to investigate the role of miRNAs in regulating the expression of genes (*ghrhra, kiss2, dnd, gh1, sox9a, shbg, fshb, stat3, cyp17a1, cyp19a1b, ar, amh, esr2b, rspo1, sox21a*) associated with sexual maturity and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). In this study, by integrating computational predictions with experimental validation data, we identified specific miRNA-gene (dre-miR-429a, dre-miR-92a, dre-miR-200b, dre-miR-96, dre-miR-217, dre-miR-155, dre-miR-26a-5p, dre-miR-737, dre-miR-740, dre-miR-737-5p, dre-miR-93, dre-miR-140-3p, dre- miR-15a, dre-miR-144) regulatory networks implicated in key developmental stages and physiological processes related to sexual maturation and reproduction in zebrafish. The findings shed light on the intricate regulatory mechanisms orchestrated by miRNAs in modulating the expression of genes crucial for reproductive success in zebrafish, providing valuable insights into the molecular basis of reproductive biology in this model organism. This study has the potential to deepen our understanding of the regulatory networks involved in the maturation and sexual reproduction of fish.

**Keywords**: Bioinformatics, microRNAs, Gene regulation, Sexual maturity, Reproduction