فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال چهاردهم، شماره اول، بهار ۱۴۰۵

مقاله پژوهشی

بررسی مولکولی اثرات اپی‌ژنتیکی آب مغناطیسی بر روی تخم چشم‌زده و لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مهدی پورداود[۱]، امیرهوشنگ بحری[۲]، فلورا محمدی‌زاده[۲]*، علیرضا سالارزاده[۲]، امیررضا عابد علم‌دوست[۳]

DOI: 10.22124/japb.2026.32565.1582
تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۴ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۵

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثر آب مغناطیسی شده بر زنده‌مانی، رشد، الگوی متیلاسیون DNA و بیان ژن‌های مرتبط با متیلاسیون و رشد در مراحل تخم چشم‌زده و لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام شد. برای این منظور، تخم‌های چشم‌زده و لاروها در معرض چهار تیمار شامل شاهد، آب مغناطیسی شده با شدت‌های ۰/۲، ۰/۵ و ۱/۲ تسلا قرار گرفتند. تغییرات الگوی متیلاسیون DNA با استفاده از تکنیک MSAP و بیان نسبی ژن‌های *dnmt1* و *gh1* با روش Real-time PCR ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تیمارهای مختلف آب مغناطیسی موجب تغییرات معنی‌دار در الگوهای متیلاسیون DNA شد. در مرحله تخم چشم‌زده، تیمار ۰/۵ تسلا بیشترین میزان متیلاسیون کل و متیلاسیون کامل را نشان داد، در حالی که در تیمار ۱/۲ تسلا افزایش جایگاه‌های غیرمتیله و شبه‌متیله مشاهده شد. در مرحله لاروی نیز تفاوت‌های معنی‌داری در توزیع انواع متیلاسیون بین تیمارها مشاهده شد. نتایج بیان ژن نشان داد که بیان *dnmt1* و *gh1* در شدت‌های بالاتر میدان مغناطیسی افزایش یافت، به طوری که بیشترین میزان بیان *dnmt1* در تیمار ۱/۲ تسلا در مرحله لاروی و بیشترین بیان *gh1* در تیمار ۰/۵ تسلا در مرحله تخم چشم‌زده ثبت شد. تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) نیز جدایش مشخص تیمارها را بر اساس الگوهای متیلاسیون تایید کرد. به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که آب مغناطیسی شده می‌تواند از طریق تغییر در الگوهای اپی‌ژنتیکی و تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با رشد، بر فرایندهای زیستی اولیه در قزل‌آلای رنگین‌کمان اثرگذار باشد و به عنوان یک ابزار مدیریتی بالقوه در آبزی‌پروری مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *آب مغناطیسی شده، متیلاسیون DNA، MSAP، dnmt1، قزل‌آلای رنگین‌کمان.*

۱- دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران.
۲- دانشیار گروه شیلات، مرکز تحقیقات فناوری‌های دریایی و شیلاتی، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران.
۳- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
* نویسنده مسئول: fmohammadi13@iau.ac.ir

مقدمه

نرخ رشد یکی از مهم‌ترین صفات اقتصادی در تولید گونه‌های پرورشی محسوب می‌شود و تاثیر مستقیمی بر کارایی تولید و سودآوری دارد. در سیستم‌های آبزی‌پروری، هزینه خوراک بخش عمده‌ای از هزینه‌های تولید را تشکیل می‌دهد. بنابراین بهبود رشد و کارایی تبدیل خوراک از عوامل کلیدی در افزایش بهره‌وری و پایداری تولید به شمار می‌رود (Salem et al., 2012; Abdelkhalek et al., 2021). در مراحل اولیه رشد ماهیان، کیفیت محیط آبی به عنوان یکی از عوامل تعیین‌کننده بقا، رشد و تکامل جنینی شناخته می‌شود (Brownell, 1980). ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آب مانند دما، pH، اکسیژن محلول، سختی، شوری، هدایت الکتریکی و ترکیبات یونی می‌توانند به طور مستقیم بر فرایندهای متابولیکی، فعالیت آنزیمی، تعادل اسمزی و الگوهای رشد و نمو تاثیر بگذارند (Townsend et al., 2003; Makori et al., 2017). علاوه بر این، نوسان‌های این عوامل در مراحل حساس رشد، به‌ویژه در دوره جنینی و لاروی، می‌تواند موجب تغییرات فیزیولوژیکی و مولکولی پایدار شود که بر زنده‌مانی، نرخ رشد و کیفیت نهایی ماهیان اثرگذار است (Canosa and Bertucci, 2023). از این رو، هرگونه عامل موثر بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب، حتی بدون تغییر مستقیم در ترکیب شیمیایی آن، می‌تواند پیامدهای زیستی مهمی در آبزیان ایجاد کند و به عنوان یک ابزار مدیریتی بالقوه در آبزی‌پروری مورد توجه قرار گیرد (Menon et al., 2023).

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که عبور آب از میدان مغناطیسی می‌تواند برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن را تغییر دهد. این تغییرات عمدتا به بازآرایی ساختار مولکولی آب، تغییر در شبکه پیوندهای هیدروژنی (Hydrogen Bond Network) و دگرگونی در الگوی خوشه‌بندی مولکولی (Molecular Clustering) نسبت داده می‌شود (Hassan et al., 2018). این تغییرات ساختاری ممکن است بر ویژگی‌هایی مانند کشش سطحی، ویسکوزیته، حلالیت گازها و رفتار یونی آب اثرگذار باشند و در نتیجه، بر فرایندهای زیستی وابسته به کیفیت آب تاثیر بگذارند (Yap et al., 2025). افزون بر این، شواهد نشان می‌دهد که علاوه بر شدت میدان مغناطیسی (Magnetic Field Intensity)، گرادیان میدان مغناطیسی (Magnetic Field Gradient) نیز می‌تواند در میزان و پایداری این تغییرات نقش مهمی ایفا

کند (Pang et al., 2012). با وجود این، به دلیل پیچیدگی رفتار آب و وابستگی این اثرات به شرایط آزمایش، ساز و کار دقیق و پیامدهای زیستی آب مغناطیسی همچنان نیازمند بررسی‌های بیشتر است. مطالعات مختلف نشان داده است که استفاده از آب مغناطیسی شده در سیستم‌های پرورشی آبزیان می‌تواند برخی شاخص‌های رشد، زنده‌مانی و وضعیت فیزیولوژیک را در گونه‌های مختلف بهبود بخشد (Hassan et al., 2018). برای مثال، در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) گزارش شده است که استفاده از آب مغناطیسی باعث افزایش نرخ رشد ویژه، بهبود ضریب تبدیل غذایی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شده است (Abd-El Azeem et al., 2025). در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نیز بهبود رشد، افزایش بازده مصرف غذا و کاهش استرس اکسیداتیو در شرایط استفاده از آب تیمار شده با میدان مغناطیسی مشاهده شده است (Irhayyim et al., 2020). همچنین در برخی سخت‌پوستان از جمله میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)، آب مغناطیسی با بهبود کیفیت آب و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، موجب افزایش بقا و بهبود شاخص‌های رشد شده است (Sudarti et al., 2022). افزون بر این، مطالعات انجام شده بر روی مراحل اولیه رشد ماهیان نشان داده‌اند که شرایط فیزیکوشیمیایی آب می‌تواند بر فرایند تفریخ، رشد لاروی و فعالیت متابولیکی تاثیر بگذارد (Fey et al., 2019). با این حال، اطلاعات موجود درباره اثر آب مغناطیسی بر مراحل حساس تخم چشم‌زده و لارو و به‌ویژه پاسخ‌های مولکولی و اپی‌ژنتیکی ناشی از آن هنوز بسیار محدود است. این خلأ دانشی، ضرورت انجام مطالعات دقیق‌تر را در این زمینه نشان می‌دهد.

اپی‌ژنتیک به عنوان مطالعه تغییرات وراثت‌پذیر در بیان ژن بدون تغییر در توالی DNA، در سال‌های اخیر توجه زیادی را در علوم شیلاتی و آبزی‌پروری به خود جلب کرده است (Fatima and Siddique, 2025). مراحل اولیه رشد جنینی ماهیان دوره‌ای حساس برای تاثیرپذیری از عوامل محیطی محسوب می‌شود و تغییر در الگوهای متیلاسیون DNA در این دوره می‌تواند پیامدهای پایداری بر رشد، بیان ژن و ویژگی‌های فنوتیپی بعدی داشته باشد (Anastasiadi and Piferrer, 2019). عوامل محیطی مختلف از جمله تغییرات دمایی، آلودگی‌ها، تنش‌های پرورشی و تغییرات تغذیه‌ای می‌توانند از طریق ساز و

کارهایی مانند متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و RNAهای غیرکدکننده، فعالیت ژن‌ها را تحت تاثیر قرار دهند. این تغییرات اپی‌ژنتیکی نقش مهمی در تنظیم صفاتی نظیر رشد، مقاومت به بیماری، تحمل تنش و تعیین جنسیت در گونه‌های آبزی داشته باشند (Fatima and Siddique, 2025).

متیلاسیون سیتوزین از مهم‌ترین ساز و کارهای اپی‌ژنتیکی در یوکاریوت‌ها است که با خاموش‌سازی پروموترها، عناصر جابه‌جاشونده و برخی ژن‌های نقش‌بسته، در تنظیم پایدار بیان ژن نقش دارد (Goll and Bestor, 2005). الگوهای متیلاسیون DNA توسط مجموعه‌ای از عوامل از جمله توالی‌های تکراری، تغییرات هیستونی، RNAهای کوچک و خانواده آنزیم‌های DNA متیل‌ترانسفراز کنترل می‌شوند (Jeltsch and Jurkowska, 2014). در این میان، *dnmt1* عمدتا در حفظ الگوهای متیلاسیون طی همانندسازی DNA نقش دارد و تغییر بیان آن می‌تواند نشان‌دهنده پاسخ اپی‌ژنتیکی ژنوم به شرایط محیطی باشد. از این رو، بررسی هم‌زمان الگوی متیلاسیون DNA و بیان *dnmt1* می‌تواند برای ارزیابی اثر عوامل فیزیکی محیط، مانند آب مغناطیسی، بر تنظیم ژنی در ماهیان مفید باشد (Anastasiadi et al., 2017).

برای بررسی تغییرات اپی‌ژنتیکی در سطح ژنوم، روش‌های متعددی توسعه یافته‌اند که یکی از رایج‌ترین آنها روش MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) است. این روش که تکنیک اصلاح شده RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) محسوب می‌شود، امکان شناسایی تغییرات متیلاسیون DNA در جایگاه‌های خاص ژنومی را فراهم می‌کند (Reyna-Lopez et al., 1997). در این روش، DNA ژنومی با استفاده از آنزیم محدودکننده EcoRI و ایزوشیزومرهای حساس به متیلاسیون، یعنی HpaII و MspI، هضم می‌شود. این دو آنزیم هر دو توالی CCGG را تشخیص می‌دهند، اما حساسیت متفاوتی نسبت به متیلاسیون دارند. به طوری که حضور یا عدم حضور باندهای به دست آمده از هضم آنزیمی می‌تواند بیانگر وضعیت‌های مختلف متیلاسیون در این جایگاه‌ها باشد. روش MSAP به دلیل سادگی، قابلیت اطمینان و هزینه نسبتا پایین، به طور گسترده در مطالعات تنوع اپی‌ژنتیکی و بررسی پاسخ‌های اپی‌ژنتیکی موجودات زنده به

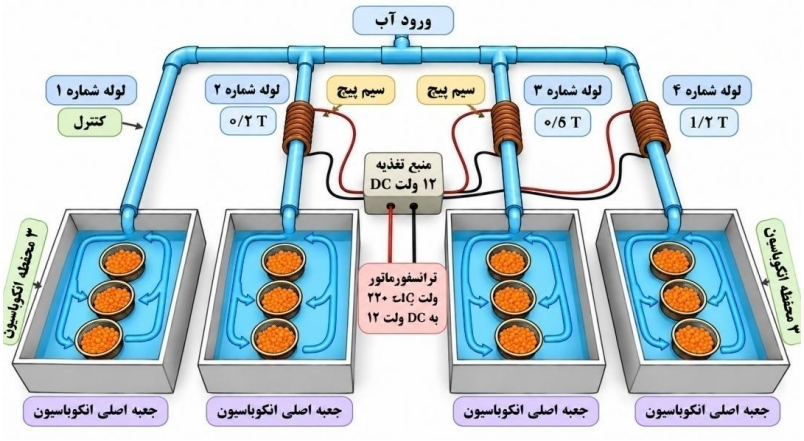
عوامل محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Schulz et al., 2013).

با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در درک ساز و کارهای فیزیولوژیکی و مولکولی موثر بر رشد در ماهیان، همچنان نقش عوامل فیزیکی محیطی از جمله آب مغناطیسی شده در تنظیم فرایندهای اپی‌ژنتیکی مرتبط با رشد به طور کامل روشن نشده است (Liu et al., 2022). اگرچه در سال‌های اخیر اثرات مثبت آب مغناطیسی بر برخی شاخص‌های رشد و عملکرد فیزیولوژیک در آبزیان گزارش شده است (Krzemieniewski et al., 2004)، اطلاعات محدودی درباره پیامدهای مولکولی و اپی‌ژنتیکی آن، به‌ویژه در مراحل حساس اولیه رشد مانند تخم چشم‌زده و لاروی، وجود دارد. از این رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر آب مغناطیسی شده با شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی بر زنده‌مانی و رشد، الگوی متیلاسیون DNA با استفاده از روش MSAP و همچنین بیان ژن‌های مرتبط با متیلاسیون و رشد شامل *dnmt1* و *gh1* در مراحل تخم چشم‌زده و لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها و شرایط نگهداری

تخم‌های چشم‌زده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از مرکز تکثیر و پرورش شرکت تعاونی سالمون مهرپرور (جاده فیروزکوه) تهیه و در سیستم تیماردهی مطابق شکل ۱ پیاده‌سازی شد. تخم‌ها به صورت تصادفی در سینی‌های تفریخگاه (Hatchery) در یک سیستم جریان‌دار پیوسته قرار داده شدند. شرایط انکوباسیون مطابق استانداردهای رایج پرورش قزل‌آلا تنظیم شد و دمای آب در محدوده ۱۰ درجه سلسیوس، اکسیژن محلول بالاتر از ۷ میلی‌گرم در لیتر و pH در حدود ۷-۷/۸ حفظ شد. در هر تیمار، تعداد ۵۰ عدد تخم چشم‌زده در مرحله رشدی یکنواخت انتخاب و در واحدهای آزمایشی مستقل ۳ تایی قرار داده شد تا اثر ناهمگنی رشدی اولیه به حداقل برسد. پس از تفریخ، لاروهای کیسه‌زرده در همان شرایط سیستم جریان‌دار نگهداری شدند و تا زمان جذب نسبی کیسه زرده تحت تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند.



شکل ۱: نمای شماتیک سیستم آزمایشی مورد استفاده برای تیمار آب با میدان مغناطیسی در مراحل انکوباسیون تخم چشم‌زده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). آب از منبع اصلی وارد چهار خط جریان مستقل شد که شامل یک تیمار شاهد (بدون میدان مغناطیسی) و سه تیمار با شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی (۰/۲، ۰/۵ و ۱/۲ تسلا) بود. در هر تیمار، آب پیش از ورود به واحدهای انکوباسیون از ناحیه مغناطیسی‌سازی عبور می‌کرد و سپس به سه تکرار مستقل شامل سبدهای حاوی تخم‌های چشم‌زده هدایت می‌شد. میدان مغناطیسی توسط واحد تیمار الکترومغناطیسی آب (EWTU) و با استفاده از منبع تغذیه ۱۲ ولت مستقیم تامین می‌شد.

در طول کل دوره آزمایش ۳۰ روزه، تمامی شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب در بین تیمارها ثابت نگه داشته شد و تنها متغیر مستقل، شدت میدان مغناطیسی اعمال شده به آب بود. جریان آب به صورت مداوم تامین شد و هوادهی کافی برای حفظ شرایط پایدار پرورشی در تمام واحدها برقرار بود.

تیمار میدان مغناطیسی

به منظور تهیه آب مغناطیسی شده، از یک واحد تیمار الکترومغناطیسی آب (Electromagnetic Water Treatment Unit: EWTU) شامل سیم‌پیچ‌های مولد میدان مغناطیسی با شدت‌های ۰/۲، ۰/۵ و ۱/۲ تسلا (T) استفاده شد. سیم‌پیچ‌ها به صورت اختصاصی طراحی و ساخته شدند و شدت میدان تولید شده با استفاده از دستگاه گاوس‌متر (Gaussmeter) پیش از شروع آزمایش کالیبره و تایید شد. هر یک از تیمارهای شدت میدان مغناطیسی به همراه تیمار شاهد (۰ تسلا) در سه تکرار مستقل اجرا شد. برای تامین جریان

الکتریکی مورد نیاز سیم‌پیچ‌ها، از یک منبع تغذیه AC/DC (۲۲۰ ولت برق متناوب به ۱۲ ولت برق مستقیم) استفاده شد. سیم‌پیچ‌ها در اطراف لوله ورودی آب و با فاصله تقریبی ۱ سانتی‌متر از سطح خارجی لوله نصب شدند تا آب پیش از ورود به واحدهای انکوباسیون در معرض میدان مغناطیسی قرار گیرد. آب پس از عبور از ناحیه مغناطیسی‌سازی (Magnetization Chamber) به طور مستقیم وارد سیستم پرورش شد و ذخیره‌سازی جداگانه‌ای برای آن در نظر گرفته نشد تا اثرات میدان در شرایط جریان پیوسته حفظ شود. به منظور اطمینان از پایداری شدت میدان و عملکرد صحیح سیستم، وضعیت سیم‌پیچ‌ها و شدت میدان به صورت روزانه پایش و کنترل شد (Hassan et al., 2019). شکل ۱ نمایی شماتیک از سامانه تولید آب مغناطیسی با شدت‌های مختلف میدان و نحوه اعمال تیمار بر روی تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان را نشان می‌دهد.

ارزیابی رشد و زنده‌مانی

زنده‌مانی به صورت نسبت تعداد لاروهای زنده به تعداد اولیه تخم‌ها در هر تکرار محاسبه شد. داده‌های به دست آمده برای تحلیل‌های آماری ثبت و میانگین هر تیمار محاسبه شد.

ارزیابی متیلاسیون DNA

برای بررسی تغییرات اپی‌ژنتیکی، DNA ژنومی از نمونه‌ها در سه تکرار زیستی با کیت ستونی (GeneAll Biotechnology، کره جنوبی) استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (2000، Thermo Scientific، آمریکا) و الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد بررسی شد. برای بررسی الگوهای متیلاسیون DNA از تکنیک MSAP، به عنوان نسخه اصلاح شده‌ای از روش AFLP، استفاده شد (Wischhusen et al., 2020). در این روش ۵۰۰ نانوگرم DNA ژنومی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر از آنزیم‌های محدودکننده (Restriction Enzymes) EcoRI و دو ایزوشیزومر HpaII و MspI (Thermo Scientific، آمریکا) به همراه ۲ میکرولیتر بافر Tango 10X هضم در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت انجام شد. پس از هضم آنزیمی، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه هضم شده با ۰/۵ میکرولیتر از آداپتورهای اختصاصی مربوط به جایگاه‌های EcoRI و HpaII/MspI به همراه ۱ میکرولیتر

آنزیم T4 DNA Ligase (Thermo Scientific، آمریکا) به همراه ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X مخلوط شد و در دمای ۲۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ ساعت قرار گرفت. در نهایت واکنش در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه متوقف شد. مرحله PCR پیش‌انتخابی (Pre-selective PCR) با استفاده از آغازگرهای مکمل آداپتورهای EcoRI و HpaII/MspI انجام شد. در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر از ترکیب کیت RED 2X (Ampliqon، دانمارک)، ۰/۲ میکرومولار از آغازگرها و ۱ میکرولیتر از DNA پیوسته شده (Ligated DNA) با برنامه یک مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه بود. در پایان، مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات به دست آمده با رقت ۱:۲۰ به عنوان الگو در واکنش PCR انتخابی (Selective PCR) همانند برنامه قبل مورد استفاده قرار گرفتند (Granada et al., 2018). در این مرحله از ۴ ترکیب مختلف از آغازگرهای EcoRI و HpaII/MspI استفاده شد که شامل آغازگر Eco ACT با آغازگر MsHpTCA، آغازگر Eco AAG با آغازگر MsHpTAG، آغازگر Eco ACT با آغازگر MsHpTAC و آغازگر Eco AAG با آغازگر MsHpTCT بود.

محصولات به دست آمده برای جداسازی و آشکارسازی بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید غیردناتوره ۸ درصد (۲۹:۱) در بافر TBE 1X تفکیک شدند. الکتروفورز با ولتاژ ۲۰۰ ولت به مدت ۶ ساعت انجام شد. پس از پایان الکتروفورز، باندهای DNA با استفاده از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره آشکارسازی شدند. تصاویر ژل ثبت و الگوهای باندی با استفاده از نرم‌افزار AlphaGelScanner استخراج شد. تنها باندهای واضح و قابل اعتماد در تحلیل‌ها وارد شدند و باندهای ضعیف یا Smeared حذف شدند (Zhang et al., 2017).

تحلیل بیان ژن *dnmt1* و *gh1*

برای بررسی بیان ژن‌ها، RNA کل با استفاده از کیت‌های ستونی (دنازیست آسیا، ایران) استخراج شد. نمونه‌ها ابتدا در حضور نیتروژن مایع پودر شده و هضم با استفاده از محلول DR1 انجام شد. پس از جداسازی فاز

آبی و رسوب RNA با ایزوپروپانول، نمونه‌ها خالص‌سازی شده و کیفیت RNA با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ ارزیابی شد. برای حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی، RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI (Thermo Scientific، آمریکا) تیمار شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (cDNA Synthesis kit، SMOBIO، تایوان) بر طبق دستور العمل سازنده با استفاده همزمان آغازگرهای dT و آغازگرهای تصادفی صورت گرفت. بیان نسبی ژن‌های *dnmt1* و *gh1* با استفاده از روش Real-time PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) بررسی شد. ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع داخلی مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر از ترکیبات کیت مسترمیکس سایبرگرین ریل‌تایم (SYBR Green 2X High ROX، Ampliqon، دانمارک) و مقدار ۰/۱ میکرولیتر از آغازگرها در سه تکرار تکنیکی در دستگاه Step One Real-time PCR (Applied Biosystems، آمریکا) انجام شد. برنامه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه بود (۲۷, ۲۸)(۲۷, ۲۸)(۲۷, ۲۸)(۲۷, ۲۸)(۲۷, ۲۸)(۲۶, ۲۷)(۲۶, ۲۷)(۲۶, ۲۷

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای اطمینان از تکرارپذیری نتایج فرایند کددهی ژل‌ها دو بار مستقل تکرار شد. نتایج به صورت فایل ۰ و ۱ در قالب CSV وارد بسته MSAP و در محیط R تحلیل شدند و شاخص‌های متیلاسیون شامل سطوح متیلاسیون کامل، نیمه‌متیلاسیون و عدم متیلاسیون محاسبه شد (Perez-Figueroa, 2013; Schulz et al., 2013). همچنین برای بررسی الگوی تمایز بین تیمارها از تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) استفاده شد. آزمون تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) هم به دو صورت درون‌گروهی و بین‌گروهی محاسبه شد (Perez-Figueroa, 2013).

بیان نسبی ژن‌ها در آزمایش Real-time PCR با استفاده از روش $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (Paknejad et al., 2019). تمامی داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. برای بررسی اختلاف بین تیمارها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵ درصد در نرم‌افزار XLSTAT 2025.1.3 استفاده شد و در صورت معنی‌دار بودن اختلاف‌ها (P<۰/۰۵)، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد (Yuan et al., 2006).

نتایج

زنده‌مانی

نتایج زنده‌مانی لاروها در مواجه با تیمارهای آب مغناطیسی در مقایسه با گروه شاهد در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: درصد زنده‌مانی در مراحل اولیه رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با آب مغناطیسی

تیمارها	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳	میانگین ± انحراف معیار
شاهد (٪)	۸۸/۶۶	۸۳/۳۳	۷۰/۰۰	۸۰/۰۰±۸/۶۶ [b]
تیمار ۰/۲ تسلا (٪)	۱۰۰	۹۴/۶۶	۹۶/۶۶	۹۷/۱۰±۲/۵۲ [a]
تیمار ۰/۵ تسلا (٪)	۹۳/۳۳	۱۰۰	۹۳/۳۳	۹۵/۵۵±۳/۷۷ [a]
تیمار ۱/۲ تسلا (٪)	۹۶/۶۶	۹۶/۶۶	۱۰۰	۹۷/۷۷±۱/۸۸ [a]

حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵)

میانگین زنده‌مانی در گروه شاهد کمترین مقدار را نشان داد، در حالی که در تیمارهای آب مغناطیسی به‌ویژه در شدت‌های ۰/۵ و ۱/۲ تسلا مقادیر بالاتری مشاهده شد. در برخی تکرارها در تیمارهای ۰/۲ ، ۰/۵ و ۱/۲ تسلا زنده‌مانی به ۱۰۰ درصد نیز رسید. به طور کلی نتایج بیانگر اثر مثبت تیمار آب مغناطیسی بر بهبود بقا در مراحل اولیه رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان بود.

متیلاسیون DNA

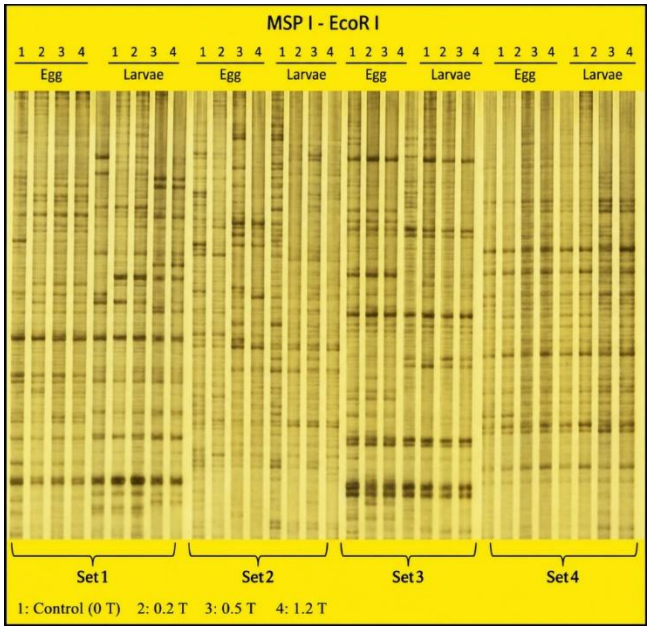
الگوی باننددهی به دست آمده از روش MSAP در تیمارهای مختلف آب مغناطیسی در نمونه‌های تخم چشم‌زده و لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در شکل ۲ نشان داده شده است. در نمونه‌های تخم چشم‌زده مجموعا ۸۶ جایگاه ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد ۸۲ جایگاه حساس به متیلاسیون (MSL) و ۴ جایگاه غیرمتیله (NML) بودند. از میان نواحی حساس به متیلاسیون، ۴۶ جایگاه (۵۶ درصد) دارای چندشکلی و از میان نواحی غیرمتیله ۳ جایگاه (۷۵ درصد) چندشکل بودند. شاخص تنوع شانون برای نواحی MSL و NML به ترتیب ۰/۵۸ و ۰/۵۷ محاسبه شد.

نتایج تحلیل واریانس مولکولی نشان داد در نواحی حساس به متیلاسیون بیشترین سهم واریانس مربوط به درون‌گروه‌ها (۵۲ درصد) بوده و سهم واریانس بین‌گروهی ۴۷ درصد بود. در مقابل، در نواحی غیرمتیله بیشترین واریانس بین‌گروه‌ها (۷۶ درصد) مشاهده شد (شکل ۳).

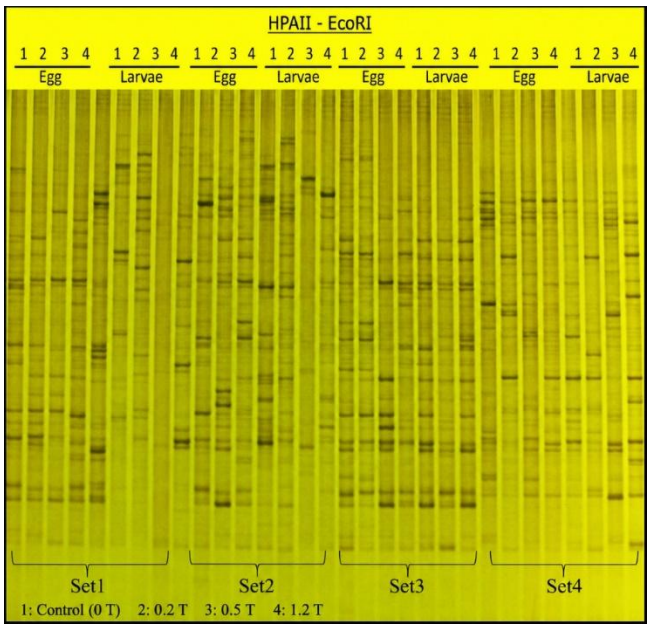
تحلیل الگوهای برش آنزیمی در روش MSAP نشان داد قطعات DNA بر اساس الگوی برش آنزیم‌های HpaII و MspI در چهار گروه شامل متیله نشده (HPA+/MSP+)، شبه‌متیله (HPA−/MSP+)، متیلاسیون سیتوزین داخلی (HPA+/MSP−) و کاملا متیله (HPA−/MSP−) قرار می‌گیرند و نتایج آن در تخم و لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۳ نشان داده شده است.

نتایج تحلیل MSAP در مرحله تخم چشم‌زده نشان داد که تیمارهای مختلف آب مغناطیسی موجب تغییر معنی‌دار در فراوانی الگوهای مختلف متیلاسیون DNA شد (جدول ۳). فراوانی جایگاه‌های بدون متیلاسیون (HPA+/MSP+) در تیمارهای ۰/۲ و ۱/۲ تسلا به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد و ۰/۵ تسلا بود ($P<0/05$). بیشترین مقدار این شاخص در تیمار ۱/۲ تسلا (۰/۰۱±۰/۱۳) و کمترین مقدار در تیمار ۰/۵ تسلا (۰/۰۱±۰/۰۵) مشاهده شد.

الف

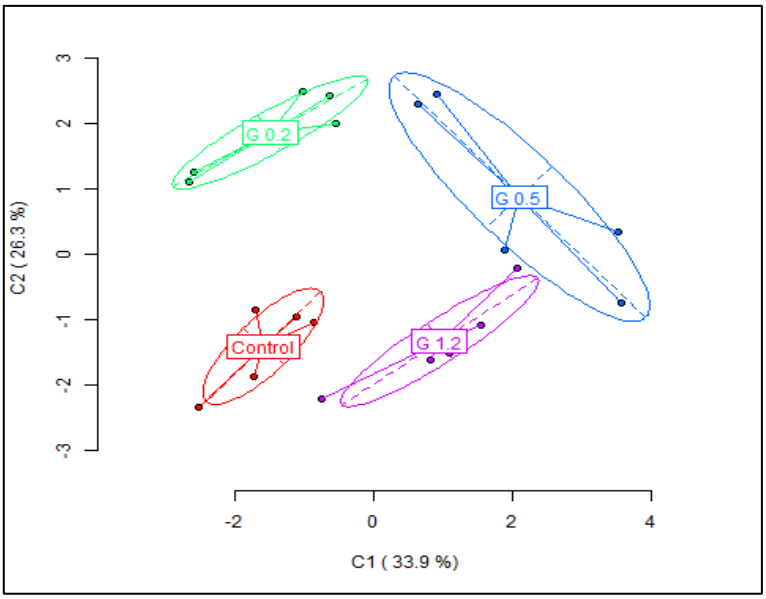


ب

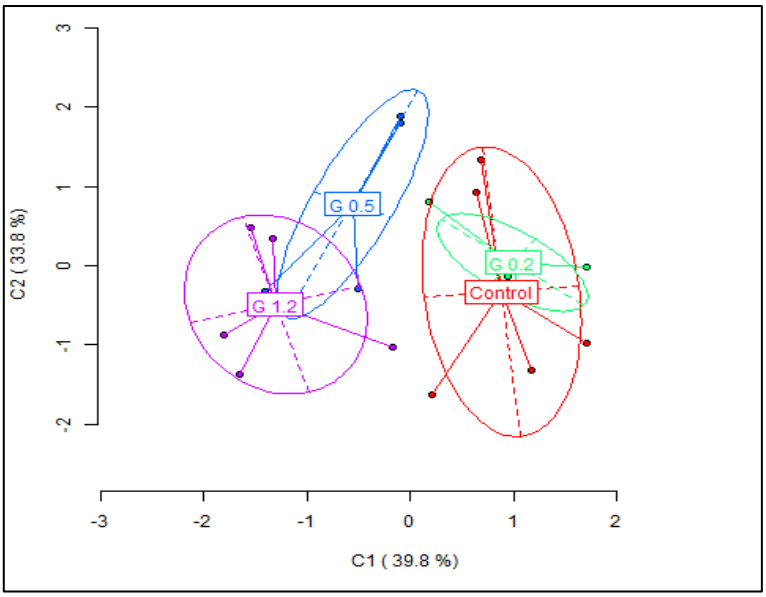


شکل ۲: تصویر ژل پلی‌اکریل آمید MSAP در تیمارهای مختلف آب مغناطیسی در نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. الف) تخم چشم‌زده؛ ب) لارو.

الف



ب



شکل ۳: آزمون PCA تیمارهای مختلف آب مغناطیسی شده در قزل‌آلای رنگین‌کمان. الف) تخم چشم‌زده؛ ب) لارو.

جدول ۳: چندشکلی MSAP در تخم چشم‌زده و لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با آب مغناطیسی (میانگین ± انحراف معیار)

مرحله رشد	تیمار	HPA+/MSP+	HPA+/MSP−	HPA−/MSP+	HPA−/MSP−	متیلاسیون کل (٪)
تخم چشم‌زده	شاهد	۰/۰۷±۰/۰۱ b	۰/۱۴±۰/۰۱ b	۰/۲۳±۰/۰۲ a	۰/۵۶±۰/۰۱ b	۹۳
	۰/۲	۰/۱۲±۰/۰۱ a	۰/۱۴±۰/۰۱ b	۰/۲۲±۰/۰۲ a	۰/۵۳±۰/۰۲ b	۸۸
	۰/۵	۰/۰۵±۰/۰۱ b	۰/۰۹±۰/۰۰ c	۰/۰۸±۰/۰۱ b	۰/۷۶±۰/۰۴ a	۹۵
	۱/۲	۰/۱۳±۰/۰۱ a	۰/۲۳±۰/۰۳ a	۰/۱۳±۰/۰۲ c	۰/۵۲±۰/۰۱ b	۸۷
لارو	شاهد	۰/۰۲±۰/۰۰ b	۰/۱۴±۰/۰۱ b	۰/۰۸±۰/۰۱ d	۰/۷۶±۰/۰۱ a	۹۸
	۰/۲	۰/۰۱±۰/۰۰ b	۰/۱۵±۰/۰۲ ab	۰/۱۸±۰/۰۱ a	۰/۶۳±۰/۰۱ b	۹۹
	۰/۵	۰/۰۱±۰/۰۰ b	۰/۱۴±۰/۰۲ b	۰/۱۲±۰/۰۱ c	۰/۷۳±۰/۰۱ a	۹۹
	۱/۲	۰/۰۵±۰/۰۱ a	۰/۱۸±۰/۰۱ a	۰/۱۶±۰/۰۱ b	۰/۶۳±۰/۰۱ b	۹۵

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در هر مرحله رشد است (P<۰/۰۵).

تیمار ۱/۲ تسلا بالاترین فراوانی جایگاه‌های شبه‌متیله (HPA−/MSP+) را نشان داد که به طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای دیگر بود (P<۰/۰۵). در مقابل، فراوانی جایگاه‌های HPA+/MSP− در تیمار شاهد و ۰/۲ تسلا بیشتر از تیمارهای دیگر بود. بیشترین فراوانی الگوی HPA−/MSP− در تیمار ۰/۵ تسلا مشاهده شد (۰/۷۶±۰/۰۴) که به طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای دیگر بود (P<۰/۰۵)، در حالی که کمترین مقدار آن در تیمار ۱/۲ تسلا (۰/۵۲±۰/۰۱) ثبت شد. میزان متیلاسیون کل DNA در مرحله تخم چشم‌زده بین ۸۷ تا ۹۵ درصد متغیر بود. بیشترین متیلاسیون کل در تیمار ۰/۵ تسلا (۹۵ درصد) و کمترین مقدار در تیمار ۱/۲ تسلا (۸۷ درصد) مشاهده شد.

در مرحله لاروی نیز اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف از نظر الگوهای متیلاسیون DNA مشاهده شد (جدول ۳). فراوانی جایگاه‌های بدون متیلاسیون (HPA+/MSP+) در تیمار ۱/۲ تسلا به طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای دیگر بود (P<۰/۰۵)، در حالی که بین تیمار شاهد، ۰/۲ و ۰/۵ تسلا اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مورد الگوی HPA−/MSP+، بیشترین مقدار در تیمار ۱/۲ تسلا (۰/۱۸±۰/۰۱) و کمترین مقدار در تیمار شاهد

و ۰/۵ تسلا مشاهده شد. فراوانی جایگاه‌های HPA+/MSP− در تیمار ۰/۲ تسلا بیشترین مقدار را داشت (۰/۰۱±۰/۱۸) و با افزایش شدت میدان مغناطیسی تا ۱/۲ تسلا به ۰/۰۱± ۰/۱۶ کاهش یافت. همچنین فراوانی الگوی HPA−/MSP− در تیمار شاهد (۰/۰۱±۰/۷۶) و ۰/۵ تسلا (۰/۰۱±۰/۷۳) به طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای ۰/۲ و ۱/۲ تسلا (۰/۰۱±۰/۶۳) بود (P<۰/۰۵). به طور کلی، تیمارهای ۰/۲ و ۱/۲ تسلا در مقایسه با شاهد و ۰/۵ تسلا با کاهش فراوانی جایگاه‌های کاملا متیله و افزایش فراوانی الگوهای دیگر متیلاسیون همراه بودند. میزان متیلاسیون کل DNA در مرحله لاروی در تمامی تیمارها در سطح بالایی قرار داشت و بین ۹۵ تا ۹۹ درصد متغیر بود. بیشترین میزان متیلاسیون کل در تیمارهای ۰/۲ و ۰/۵ تسلا (۹۹ درصد) و کمترین مقدار در تیمار ۱/۲ تسلا (۹۵ درصد) مشاهده شد.

نتایج تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) بر اساس الگوی حضور و عدم حضور باندهای حساس به متیلاسیون در مرحله تخم چشم‌زده نشان داد که دو مولفه اصلی نخست به ترتیب ۳۳/۹ و ۲۶/۳ درصد از تغییرات کل داده‌ها را تبیین کردند، به طوری که در مجموع ۶۰/۲ درصد از واریانس کل توسط این دو مولفه توضیح داده شد (شکل ۴). پراکنش نمونه‌ها در فضای دو مولفه اصلی نشان‌دهنده جدایش مشخص بین تیمارهای مختلف بود، به طوری که هر تیمار خوشه‌بندی نسبتا مستقلی را تشکیل داد. تیمار شاهد و تیمار ۰/۲ تسلا در سمت منفی مولفه اول قرار گرفتند، در حالی که تیمارهای ۰/۵ و ۱/۲ تسلا در سمت مثبت این مولفه متمایز شدند. بیشترین فاصله جدایش بین تیمار ۰/۵ تسلا و شاهد مشاهده شد که نشان‌دهنده بیشترین تفاوت در الگوی متیلاسیون DNA بین این دو گروه است. همچنین نزدیکی نسبی خوشه‌های ۱/۲ و ۰/۵ تسلا بیانگر شباهت نسبی پاسخ اپی‌ژنتیکی در شدت‌های بالاتر میدان مغناطیسی بود. پراکندگی پایین نمونه‌ها در داخل هر خوشه نیز نشان‌دهنده تکرارپذیری مناسب و همگنی درون‌گروهی داده‌ها است.

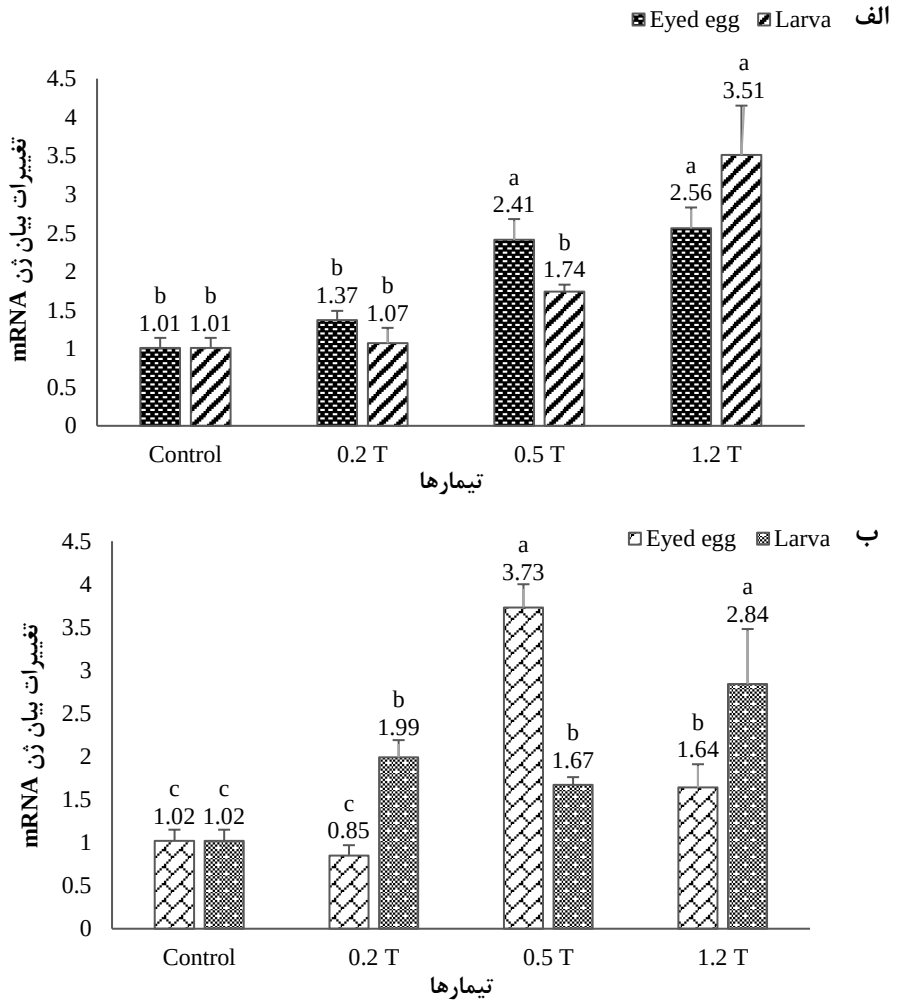
نتایج تحلیل مولفه‌های اصلی بر اساس الگوی حضور و عدم حضور باندهای حساس به متیلاسیون در مرحله لاروی نشان داد که دو مولفه اصلی نخست به ترتیب ۸/۳۹ و ۸/۳۳ درصد از تغییرات کل داده‌ها را تبیین کردند، به طوری که در مجموع ۶/۷۳ درصد از واریانس کل توسط این دو مولفه توضیح داده شد (شکل

۳). پراکنش نمونه‌ها در فضای دو مولفه اصلی نشان‌دهنده تفکیک نسبی تیمارهای مختلف بود، اگرچه میزان هم‌پوشانی بین برخی تیمارها نسبت به مرحله تخم چشم‌زده بیشتر مشاهده شد. تیمار ۰/۵ تسلا جدایش مشخصی از تیمارهای دیگر نشان داد و عمدتا در بخش مثبت مولفه دوم قرار گرفت، در حالی که تیمار ۱/۲ تسلا در بخش منفی مولفه اول خوشه‌بندی شد. در مقابل، تیمار شاهد و ۰/۲ تسلا هم‌پوشانی نسبی داشتند که بیانگر شباهت بیشتر الگوی متیلاسیون DNA در این دو گروه بود. همچنین پراکندگی بیشتر نمونه‌ها در تیمار ۱/۲ تسلا نشان‌دهنده افزایش ناهمگنی پاسخ اپی‌ژنتیکی در این شدت میدان مغناطیسی است.

در تحلیل مربوط به قطعات حساس به متیلاسیون، دو مولفه اصلی C1 و C2 توانستند بیش از ۷۲ درصد از تغییرات مشاهده شده در داده‌ها را توضیح دهند. الگوی پراکنش نمونه‌ها نشان داد که تیمارهای ۰/۵ و ۱/۲ تسلا نسبت به تیمار ۰/۲ تسلا و گروه شاهد دارای پراکنش متمایزی هستند. در این میان، تیمار ۰/۲ تسلا الگوی پراکنشی مشابه با گروه شاهد نشان داد، در حالی که تیمارهای ۰/۵ و ۱/۲ تسلا در فضای چندبعدی نزدیک به یکدیگر قرار گرفتند، هرچند تفاوت‌هایی در میان برخی نمونه‌ها مشاهده شد (شکل ۳).

بیان ژن‌های *dnmt1* و *gh1*

نتایج بررسی بیان نسبی ژن‌های *dnmt1* و *gh1* نشان داد که تیمارهای مختلف آب مغناطیسی اثر معنی‌داری بر سطح رونویسی این ژن‌ها در مراحل تخم چشم‌زده و لاروی داشتند (شکل ۴). در مرحله تخم چشم‌زده، بیان ژن *dnmt1* در تیمارهای ۰/۵ و ۱/۲ تسلا به طور معنی‌داری بیشتر از شاهد و تیمار ۰/۲ تسلا بود ($P<0/05$)، به طوری که بیشترین میزان بیان در تیمار ۱/۲ تسلا (۲/۵۶±۰/۲۷) مشاهده شد. در مقابل، تیمار ۰/۲ تسلا تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد. در همین مرحله، بیان ژن *gh1* نیز در تیمار ۰/۵ تسلا به طور معنی‌داری افزایش یافت و به ۳/۷۳±۰/۵۱ رسید که بالاترین مقدار ثبت شده در این مرحله بود. در حالی که تیمار ۰/۲ تسلا کمترین میزان بیان *gh1* (۰/۸۵±۰/۲۳) را نشان داد.



شکل ۴: تغییرات بیان ژن در تیمارهای مختلف تخم چشم‌زده و لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با آب مغناطیسی شده (میانگین ± انحراف معیار). الف) *dnmt1*. ب) *gh1*.

در مرحله لاروی، الگوی متفاوتی در بیان ژن‌ها مشاهده شد. بیان ژن *dnmt1* در تیمار ۱/۲ تسلا به طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای دیگر بود و به ۰/۶۴±۳/۵۱ رسید (P<۰/۰۵)، در حالی که بین تیمارهای شاهد، ۰/۲ و ۰/۵ تسلا اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین بیان ژن *gh1* در این مرحله روند افزایشی واضح‌تری نشان داد، به طوری که تیمار ۱/۲ تسلا با مقدار

۲/۸۴±۰/۱۵ بیشترین بیان را داشت و به طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای دیگر بود (P<۰/۰۵). تیمارهای ۰/۲ و ۰/۵ تسلا نیز افزایش نسبی در بیان *gh1* نسبت به شاهد نشان دادند، اما این افزایش کمتر از تیمار ۱/۲ تسلا بود. به طور کلی، نتایج نشان داد که شدت‌های بالاتر میدان مغناطیسی، به‌ویژه ۱/۲ تسلا، با افزایش بیان ژن‌های مرتبط با متیلاسیون DNA و رشد همراه بودند.

بحث

مراحل اولیه رشد در ماهیان، به‌ویژه دوره جنینی و لاروی، از حساس‌ترین بازه‌های زیستی برای تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی، مولکولی و اپی‌ژنتیکی محسوب می‌شود (Sifa and Mathias, 1987; Kho et al., 2024). در این مراحل، شرایط محیطی می‌تواند اثرات پایداری بر الگوی رشد، زنده‌مانی و کیفیت فنوتیپی در مراحل بعدی زندگی ایجاد کند (Ruiz et al., 2025). از میان عوامل محیطی، کیفیت آب و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن نقش تعیین‌کننده‌ای در موفقیت فرایند تفریخ و رشد اولیه دارد (Sidiq et al., 2026).

در سال‌های اخیر، آب مغناطیسی شده به عنوان یک ابزار غیرشیمیایی برای بهبود کیفیت آب و افزایش کارایی زیستی در سامانه‌های پرورشی مورد توجه قرار گرفته است (Fey et al., 2019). با این حال، اطلاعات موجود درباره ساز و کارهای مولکولی و به‌ویژه پیامدهای اپی‌ژنتیکی آن در آبزیان هنوز محدود است. از این رو، بررسی اثر آب مغناطیسی بر تغییرات متیلاسیون DNA و بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با رشد و تنظیم اپی‌ژنتیکی می‌تواند در شناخت بهتر ساز و کارهای زیستی آن اهمیت ویژه‌ای داشته باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آب مغناطیسی شده موجب تغییرات معنی‌داری در الگوی متیلاسیون DNA در هر دو مرحله تخم چشم‌زده و لاروی شد. در مرحله تخم چشم‌زده، تیمار ۰/۵ تسلا با افزایش متیلاسیون کامل و بالاترین میزان متیلاسیون کل همراه بود، در حالی که تیمار ۱/۲ تسلا افزایش بیشتری در جایگاه‌های غیرمتیله و شبه‌متیله نشان داد. این الگو نشان می‌دهد که شدت میدان مغناطیسی نه‌تنها بر میزان، بلکه بر نوع تغییرات اپی‌ژنتیکی نیز اثرگذار است. مطالعات پیشین در ماهی گورخری (*Danio rerio*) نشان داده است که تغییرات محیطی مانند دما و شوری می‌توانند به طور مستقیم الگوی متیلاسیون DNA را در مراحل اولیه رشد تغییر دهند (Salazar et al.,

2024). همچنین در تیلاپیای نیل گزارش شده است که تنش‌های محیطی می‌توانند موجب بازآرایی متیلاسیون ژنوم شوند (Hu et al., 2021). نتایج مطالعه حاضر با این گزارش‌ها همسو است و نشان می‌دهد که حتی تغییرات ساختاری آب نیز می‌تواند به عنوان محرک اپی‌ژنتیکی عمل کند.

افزایش بیان ژن *dnmt1* در تیمارهای با شدت بالاتر میدان مغناطیسی، به‌ویژه ۱/۲ تسلا، نشان‌دهنده فعال شدن سیستم نگهداری متیلاسیون DNA در پاسخ به تغییرات محیطی است. *dnmt1* نقش کلیدی در حفظ الگوهای متیلاسیون طی همانندسازی DNA دارد و تغییر در بیان آن معمولا نشان‌دهنده بازتنظیم اپی‌ژنتیکی ژنوم است (Wischhusen et al., 2020). در آزادماهیان و قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز گزارش شده است که شرایط محیطی تنش‌زا مانند تغییرات دما و محدودیت غذایی می‌تواند بیان *dnmt1* را تغییر دهد (Wischhusen et al., 2020). با این حال، مطالعاتی که اثر آب مغناطیسی را بر این ژن بررسی کرده باشند، بسیار محدود هستند. بنابراین یافته‌های حاضر می‌تواند به عنوان یکی از نخستین شواهد در این زمینه مطرح شود.

بیان ژن *gh1* نیز تحت تاثیر تیمارهای مغناطیسی قرار گرفت و در برخی تیمارها، به‌ویژه ۰/۵ تسلا در مرحله تخم چشم‌زده و ۱/۲ تسلا در مرحله لاروی، افزایش معنی‌داری مشاهده شد. هورمون رشد (GH) از مهم‌ترین عوامل تنظیم رشد در ماهیان است و تغییر در بیان ژن *gh1* معمولا با تغییر در نرخ رشد و بهره‌وری غذایی همراه است (Mori et al., 2007). مطالعات انجام شده بر روی کپور معمولی و تیلاپیای نیل نشان داده است که استفاده از آب مغناطیسی موجب بهبود رشد و ضریب تبدیل غذایی می‌شود (Abdelkhalek et al., 2021). یافته‌های حاضر نشان می‌دهد که بخشی از این اثرات می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت مسیرهای ژنتیکی مرتبط با رشد باشد.

از نظر مکانیسم اثر، فرض می‌شود که آب مغناطیسی با تغییر در آرایش مولکولی آب، شبکه پیوندهای هیدروژنی، کشش سطحی و حلالیت گازها، شرایط بهتری برای تبادل یونی، انتقال اکسیژن و تعادل اسمزی فراهم می‌کند. این تغییرات می‌تواند محیط سلولی مناسب‌تری برای رشد و تنظیم فعالیت ژنی ایجاد کند. در میگوی سفید غربی نیز گزارش شده است که آب مغناطیسی موجب بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش استرس اکسیداتیو و

افزایش بقا می‌شود (Zhu et al., 2022). این موضوع نشان می‌دهد که اثرات آب مغناطیسی در گروه‌های مختلف آبزیان می‌تواند الگوهای مشترکی داشته باشد.

نتایج PCA نیز جدایش مشخص تیمارها را بر اساس الگوهای متیلاسیون نشان داد و تایید کرد که آب مغناطیسی موجب بازآرایی گسترده اپی‌ژنتیکی در سطح ژنوم شده است. این یافته اهمیت زیادی دارد، زیرا نشان می‌دهد پاسخ به آب مغناطیسی محدود به چند جایگاه خاص نبوده و می‌تواند در مقیاس ژنومی رخ دهد. چنین الگوهایی در مطالعات اپی‌ژنتیکی روی ماهی گورخری و مداکا (*Oryzias latipes*) نیز در پاسخ به عوامل محیطی مشاهده شده است (Paknejad et al., 2019).

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که آب مغناطیسی شده می‌تواند به عنوان یک عامل محیطی موثر، الگوی متیلاسیون DNA و بیان ژن‌های مرتبط با متیلاسیون و رشد را در مراحل اولیه رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان تغییر دهد. شدت میدان مغناطیسی نقش مهمی در نوع پاسخ داشت، به طوری که شدت ۰/۵ تسلا بیشتر با افزایش متیلاسیون کامل و شدت ۱/۲ تسلا با افزایش بیان ژن‌های *dnmt1* و *gh1* همراه بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که آب مغناطیسی احتمالا از طریق مسیرهای اپی‌ژنتیکی در تنظیم رشد و بقا نقش دارد.

منابع

Abd-El Azeem Z.M.A., Ahmed K.M., Abdelhay R.A., Mounes H.A.M., Al-Sagheer A.A., Abd El-Ghaffar H.A., Abd-Elhakim Y.M., Hassan B.A. and Abd El-Bary D.A. 2025. Interactive effects of dietary protein levels and magnetic water treatment on water quality, growth metrics, carcass composition, redox balance, enzymatic functions, and immune responses in *Oreochromis niloticus*. Animals, 15(16): 1–17 (2388). doi: 10.3390/ani15162388

Abdelkhalek N., Abdelhamid A.F.B., Rezk S., Mabrouk M. 2021. Effects of magnetic water and feeding rate on growth performance and immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Mansoura Veterinary Medical Journal, 22(3): 97–104. doi: 10.21608/mvmj.2021.88819.1071

Anastasiadi D. and Piferrer F. 2019. Epimutations in developmental genes underlie the onset of domestication in farmed European sea bass. Molecular Biology and Evolution, 36(10): 2252–2264. doi: 10.1093/molbev/msz278

Anastasiadi D., Diaz N. and Piferrer F. 2017. Small ocean temperature increases elicit stage-dependent changes in DNA methylation and gene expression in a fish, the European sea bass. Scientific Reports, 7(1): 1–12 (12401). doi: 10.1038/s41598-017-10861-6

Brownell C. 1980. Water quality requirements for first-feeding in marine fish larvae. II. pH, oxygen, and carbon dioxide. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 44(2): 269–283. doi: 10.1016/0022-0981(80)90159-8

Canosa F. and Bertucci J.I. 2023. The effect of environmental stressors on growth in fish and its endocrine control. Frontiers in Endocrinology, 14: 1–20 (1109461). doi: 10.3389/fendo.2023.1109461

Fatima J. and Siddique Y.H. 2025. Role of epigenetics in fisheries and aquaculture. P: 431–448. In: Ahmed I. and Ahmad I. (Eds.). Aquaculture: Enhancing Food Security and Nutrition. Springer, Switzerland. doi: 10.1007/978-3-031-92858-1_21

Fey D.P., Greszkiewicz M., Otremba Z. and Andrulewicz E. 2019. Effect of static magnetic field on the hatching success, growth, mortality, and yolk-sac absorption of larval Northern pike *Esox lucius*. Science of The Total Environment, 647: 1239–1244. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.427

Goll M.G. and Bestor T.H. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. Annual Review of Biochemistry, 74: 481–514. doi:

10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721

Granada L., Lemos M.F.L., Cabral H.N., Bossier P. and Novais S.C. 2018. Epigenetics in aquaculture-The last frontier. Reviews in Aquaculture, 10(4): 994–1013. doi: 10.1111/raq.12219

Hassan S.M., Sulaiman M.A., Madlul N.S., Fadel A.H. and Abdul Rahman R. 2019. Influence of continuous magnetic field exposure on water properties and subsequent effects on the growth performance, plasma biochemistry, nutritive value and liver histopathology of Jade Perch *Scortum barcoo* in a recirculating system. Aquaculture Research, 50(7): 1931–1941. doi: 10.1111/are.14080

Hassan S.M., Sulaiman M.A., Rahman R.A. and Kamaruddin R. 2018. Effects of long term and continuous magnetic field exposure on the water properties, growth performance, plasma biochemistry and body composition of tilapia in a recirculating aquaculture system. Aquacultural Engineering, 83: 76–84. doi: 10.1016/J.AQUAENG.2018.09.003

Hu F., Yin L., Dong F., Zheng M., Zhao Y., Fu S., Zhang W. and Chen X. 2021. Effects of long-term cadmium exposure on growth, antioxidant defense and DNA methylation in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquatic Toxicology, 241: 1–10 (106014). doi: 10.1016/j.aquatox.2021.106014

Irhayyim T., Beliczky G., Havasi M. and Bercsenyi M. 2020. Impacts of magnetic water treatment on water quality, feeding efficiency and growth performance of common carp in integrated recirculating aquaculture systems. Journal of Central European Agriculture, 21(2): 246–255. doi: 10.5513/JCEA01/21.2.2672

Jeltsch A. and Jurkowska R.Z. 2014. New concepts in DNA methylation. Trends in Biochemical Sciences, 39(7): 310–318. doi: 10.1016/j.tibs.2014.05.002

Kho J., Delgado M.L., McCracken G.R., Munden J. and Ruzzante D.E. 2024. Epigenetic patterns in Atlantic herring (*Clupea harengus*): Temperature and photoperiod as environmental stressors during larval development. Molecular Ecology, 33(1): 1–16 (e17187). doi: 10.1111/mec.17187

Krzemieniewski M., Teodorowicz M., Debowski M. and Pesta J. 2004. Effect of a constant magnetic field on water quality and rearing of European sheatfish *Silurus glanis* L. larvae. Aquaculture Research, 35(6): 568–573. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01054.x

Liu Z., Zhou T. and Gao D. 2022. Genetic and epigenetic regulation of growth, reproduction, disease resistance and stress responses in aquaculture. Frontiers in Genetics,

13: 1–22 (994471). doi: 10.3389/fgene.2022.994471

Makori A.J., Abuom P., Kapiyo R. and Anyona D.N. 2017. Effects of water physico-chemical parameters on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth in earthen ponds in Teso North Sub-County, Busia County. Fisheries and Aquatic Sciences, 20: 1–10 (30). doi: 10.1186/s41240-017-0075-7

Menon S.V., Kumar A., Middha S.K., Paital B., Mathur S., Johnson R., Kademan A., Usha T., Hemavathi K.N., Dayal S., Ramalingam N., Subaramaniyam U., Sahoo D.K. and Asthana M. 2023. Water physicochemical factors and oxidative stress physiology in fish, a review. Frontiers in Environmental Science, 11: 1–26 (1240813). doi: 10.3389/fenvs.2023.1240813

Mori T., Hiraka I., Kurata Y., Kawachi H., Mano N., Devlin R.H., Nagoya H. and Araki K. 2007. Changes in hepatic gene expression related to innate immunity, growth and iron metabolism in GH-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou*) by cDNA subtraction and microarray analysis, and serum lysozyme activity. General and Comparative Endocrinology, 151(1): 42–54. doi: 10.1016/j.ygcen.2006.11.012

Paknejad H., Enayat Gholampour T., Safari R. and Hossenifar S.H. 2019. Study of GH and ghrelin genes expression during the larvae developmental period in *Danio rerio*. Nova Biologica Reperta, 6(2): 148–154. doi: 10.29252/nbr.6.2.148

Pang X.F., Deng B.O. and Tang B.O. 2012. Influences of magnetic field on macroscopic properties of water. Modern Physics Letters (B), 26(11): 1–13 (1250069). doi: 10.1142/s0217984912500698

Perez-Figueroa A. 2013. MSAP: A tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data. Molecular Ecology Resources, 13(3): 522–527. doi: 10.1111/1755-0998.12064

Reyna-Lopez G.E., Simpson J. and Ruiz-Herrera J. 1997. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. Molecular and General Genetics, 253(6): 703–710. doi: 10.1007/s004380050374

Ruiz E., Leprieur F., Sposito G., Luthi M., Schmidlin M., Panfili J., Pellissier L. and Albouy C. 2025. Environmental DNA epigenetics accurately predicts the age of cultured fish larvae. Ecology and Evolution, 15(2): 1–16 (e70645). doi: 10.1002/ece3.70645

Salazar M., Joly S., Anglada-Escude G. and Ribas L. 2024. Epigenetic and physiological alterations in zebrafish subjected to hyper-

gravity. PloS One, 19(5): 1–21 (e0300310). doi: 10.1371/journal.pone.0300310

Salem M., Vallejo R.L., Leeds T.D., Palti L.Y., Liu P.S., Sabbagh A., Rexroad III C.E. and Yao J. 2012. RNA-Seq identifies SNP markers for growth traits in rainbow trout. PloS One, 7(5): 1–13 (e36264). doi: 10.1371/journal.pone.0036264

Schulz B., Eckstein R.L. and Durka W. 2013. Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies. Molecular Ecology Resources, 13(4): 642–653. doi: 10.1111/1755-0998.12100

Sidiq M.J., Khatei A., Bhat R.A.H. and Ganie P.A. 2026. Epigenetic dynamics: Environmental, nutriational, and metabolic controls on gene expression driving sustainable aquaculture. P: 243–258. In: Ishfaq Nazir M. and Ahmad I. (Eds.). Aquatic Genomics and Food Security: Integrative Approaches and Future Prospects. Springer Nature, Switzerland.

Sifa L. and Mathias J.A. 1987. The critical period of high mortality of larvae fish- A discussion based on current research. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 5(1): 80–96. doi: 10.1007/BF02848526

Sudarti S., Qumairoh U. and Prihandono T. 2022. The effectiveness of exposure to magnetic fields of extremely low frequency 300T and 500T in inhibiting the proliferation of pathogenic bacteria to increase physical resistance of vannamei shrimp. Journal of Physics Conference Series, 2165(1): 1–12 (012038). doi: 10.1088/1742-6596/2165/1/012038

Townsend C.R., Silva L. and Baldisserotto B. 2003. Growth and survival of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) larvae exposed to different levels of water hardness. Aquaculture, 215(1): 103–108. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00168-0

Wischhusen P., Saito T., Heraud C., Kaushik S.J., Fauconneau B., Antony Jesu Prabhu P., Fontagne-Dicharry S. and Skjaerven K.H. 2020. Parental selenium nutrition affects the one-carbon metabolism and the hepatic DNA methylation pattern of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the progeny. Life, 10(8): 1–25 (121). doi: 10.3390/life10080121

Yap A.C.W., Lee H.S. and Loo J.L. 2025. Magnetic induction on pH, oxidation-reduction potential, conductivity and dissolved oxygen level of water and its properties: A state-of-the-art review. P: 279–309. In: Li P., He X., Wu J. and Elumalai V. (Eds.). Sustainable Groundwater and Environment: Challenges and Solutions. Springer

Nature, Switzerland. doi: 10.1016/j.nxmate.2025.101309

Yuan J.S., Reed A., Chen F. and Stewart C.N. 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics, 7: 1–12 (85). doi: 10.1186/1471-2105-7-85

Zhang X., Li Q., Kong L. and Yu H. 2017. DNA methylation changes detected by methylation-sensitive amplified polymorphism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in response to salinity stress. Genes and Genomics, 39(11): 1173–1181. doi: 10.1007/s13258-017-0583-y

Zhu C., Chen L., Zeng X., Sun Y., Jiao D., Liu M., Zheng M., Liu J. and Liu H. 2022. Effects of ultra high pressure-magnetic field treatment on protein properties and quality characteristics of stored shrimp (*Litopenaeus vannamei*). LWT- Food Science and Technology, 170: 1–11 (114070). doi: 10.1016/j.lwt.2022.114070

Aquatic Physiology and Biotechnology

Vol. 14, No. 1, Spring 2026

Research Paper

Molecular investigation of the epigenetic-based effects of magnetized water on the eyed egg and larva of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Mahdi Pourdavood[1], Amir Houshang Bahri[2], Flora Mohammadizadeh[2]*, Ali Reza Salarzadeh[2], Amir Reza Abed-Elmdoust[3]

DOI: 10.22124/japb.2026.32565.1582

Received: December 2025 Accepted: July 2026

Abstract

This study was conducted to investigate the effects of magnetized water on survival, growth, DNA methylation patterns, and the expression of growth- and methylation-related genes during the eyed-egg and larval stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Eyed-eggs and larvae were exposed to four treatments including control and magnetized water at magnetic field intensities of 0.2, 0.5 and 1.2 tesla. DNA methylation patterns were assessed using the MSAP technique, and relative expression of *dnmt1* and *gh1* genes were quantified by real-time PCR. The results revealed significant alterations in DNA methylation patterns among treatments. In the eyed-egg stage, the 0.5T treatment showed the highest total methylation and fully methylated loci, whereas the 1.2T treatment exhibited increased unmethylated and hemi methylated loci. Similar significant differences in methylation classes were observed during the larval stage. Gene expression analysis showed that *dnmt1* and *gh1* were upregulated under higher magnetic field intensities. The highest *dnmt1* expression was observed in larvae exposed to 1.2T, while the highest *gh1* expression was recorded in eyed-eggs under 0.5T treatment. Principal component analysis (PCA) further confirmed clear separation of treatments based on methylation profiles. Overall, the findings suggest that magnetized water can influence early biological processes in rainbow trout by modulating epigenetic patterns and growth-related gene expression, highlighting its potential as a non-chemical management tool in aquaculture.

Key words: *Magnetized Water, DNA Methylation, MSAP,* dnmt1, Oncorhynchus mykiss.

1- Ph.D. Student in Aquaculture and Breeding, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran.

2- Associate Professor in Department of Fisheries, Marine and Fisheries Technologies Research Center, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran.

3- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

*Corresponding Author: fmohammadi13@iau.ac.ir