

اثر ترکیبات پروتئینی مخاط شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* بر تکامل جنینی ماهی گورخری *Danio rerio*

مریم حامدی شهرکی^۱، صابر خداپنده^{۲*}، جعفر سیف آبادی^۲، شهلا همتی^۱، سحر شعبانی پنبه چوله^۱

^۱ کارشناسی ارشد، زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

^۲ دانشیار، زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۶/۰۱

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۷/۲۵

*نویسنده مسئول مقاله: skhoda@modares.ac.ir

چکیده

اثر ترکیبات پروتئینی مخاط شقایق دریایی، *Stichodactyla haddoni* بر مراحل رشد جنین ماهی گورخری *Danio rerio* بررسی شد. شقایق دریایی از ناحیه جزر و مدی جزیره هرمز جمع‌آوری و بعد از انجماد در دمای 160°C - به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از جداسازی مخاط و فریزدرای شدن، ترکیبات پروتئینی و پپتیدی با متانول ۱۰۰٪ استخراج شدند. غلظت پروتئین کل در ماده استخراج شده با دستگاه الیزا سنجیده و سپس غلظت‌های ۱/۲، ۳/۷ و ۷/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب مقطر از این ماده ساخته شد. مقدار ۲ میلی‌لیتر از هر غلظت به میکروچاهک‌هایی که هر کدام حاوی ۱۵۰ عدد تخم ماهی گورخری بود، با ۲ تکرار اضافه شد. نمونه شاهد نیز با ۲ تکرار که حاوی آب آکواریوم بود، در نظر گرفته شد. تخم‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و از روند تکامل جنینی هر ۶ تا ۱۲ ساعت عکس‌برداری شد. نتایج بیانگر روند عادی تکامل جنینی در تیمار شاهد در طول مدت بررسی بود، ولی تخم‌های تیمار شده در غلظت‌های ۳/۷ و ۷/۴ میلی‌گرم در کمتر از ۱۲ ساعت دژنره و سیاه شده از بین رفتند. همچنین، تخم‌های تیمار شده در غلظت ۱/۲ در ساعات اولیه دچار تأخیر در فاز رشد شده و در کمتر از ۷۲ ساعت از بین رفتند. مقایسه نتایج نشان داد که پروتئین‌های استخراج شده از مخاط این شقایق، بر روند تکامل جنینی در مراحل مختلف اثر داشته و می‌تواند در غلظت‌های بالا خیلی کشنده باشند و در غلظت‌های پایین سبب توقف رشد گردد.

کلید واژگان: ترکیبات پروتئینی، مخاط، شقایق فرشی، خلیج فارس، تکامل جنینی

مقدمه

آبزیان منابع مهمی از تولیدات طبیعی محسوب می‌شوند (Jha and Zi-rong., 2004). با توجه به تنوع زیستی بیشتر در محیط‌های آبی و همچنین شرایط متفاوت محیط‌های دریایی، تقریباً هر موجود زنده دریایی مولکول‌های ویژه با ساختاری منحصر به فرد تولید می‌کند، در نتیجه زمینه مناسبی را برای تولید مواد زیست فعال و توسعه داروهای زیستی فراهم می‌کند (Kijjoa and Ely et al., 2004). در سال‌های اخیر، هزاران ترکیب زیست فعال از جانوران دریایی مختلف مانند غلاف‌داران، مرجان‌های نرم، انواع نرم‌تنان، بریوزوها و سایر ارگانسیم‌های دریایی با خاصیت دارویی استخراج شده است (Haefner., 2003; Donia and Hamann., 2003). این ترکیبات معمولاً بسیار سمی بوده و نشانگر محیط به‌شدت رقابتی در این جانداران هستند (Chellaram and Edward., 2009). از جمله این موجودات می‌توان به شقایق‌های دریایی اشاره کرد.

شقایق‌های دریایی بی‌مهرگانی از شاخه مرجانیان و از موفق‌ترین و متنوع‌ترین اعضای رده آنتوزوا هستند و در همه زیستگاه‌های دریایی و در همه اعماق و عرض‌های جغرافیایی دیده می‌شوند (Daly et al., 2008). جنس *Stichodactyla* با نام عمومی شقایق‌های فرشی^۱ از جنس‌های معروف شقایق دریایی است که دارای صفحه پایایی گسترش یافته و چسبنده، مسطح، موج و صفحه دهانی گسترده با تانتاکل‌های زیاد و کوتاه در حاشیه است (Fautin., 2009). تانتاکول‌های شقایق‌های دریایی شامل سلول‌های ویژه‌ای هستند (نماتوسیت) که محل سنتز سموم

و ذخیره آن می‌باشند (Smith and Blumenthal., 2007). علاوه بر سم نماتوسیت‌ها، تانتاکول‌ها مقدار زیادی مخاط هم ترشح می‌کنند. بررسی‌ها نشان داده که مرجان‌ها استفاده‌های زیادی از مخاط در دفاع، تغذیه و جابه‌جایی دارند (Brown and Bythell., 2005). مخاط همچنین در فرایندهایی مانند مقاومت در برابر خشکی، حذف رسوب، فرایندهای کلسیفیکاسیون (کلسیمی شدن)، حفاظت در برابر خورشید، تولیدمثل، تبادل یونی و آب نیز نقش دارد. در مخاط شقایق دریایی به وجود کمپلکس لیپید، پروتئین و پلی ساکاریدهای پیچیده اشاره شده است (Brown and Bythell., 2005). شقایق دریایی از این مخاط برای از بین بردن شکار و همچنین راندن شکارچیان استفاده می‌کند (Mebs and Kaufenstein., 2005).

بررسی سمیت انواع مختلف مرجانیان به‌ویژه کورال‌های نرم و شقایق‌ها بسیار مورد توجه بوده است و تحقیقات زیادی در این زمینه انجام شده است. در تحقیقی وسیع درباره سمیت عصاره آبی ۱۳۶ گونه کورال نرم بر روی ماهی گامبوزیا، *Gambusia affinis*، پاسخ‌های متفاوتی از مرگ‌ومیر سریع تا آهسته و سطوح متنوعی از نکرورزیس تا اثرهای ناچیز از ماهی در برابر سم شقایق‌ها مشاهده شد (Coll et al., 1982). همچنین، عصاره خام سه گونه شقایق دریایی *S. haddoni*، *J. magnifica* و *P. sinensis* روی موش، با تغییرات شدید هیستوپاتولوژی پارانشیم کلیه و انقباض کلاف گلومرولی در کلیه همراه بوده است (Ravindran et al., 2010).

در بین تمامی ماهیان، فقط جنس‌های *Amphiprion* و *Premnas* دارای ابزارهایی برای مقابله با دفاع مؤثر شقایق‌های دریایی می‌زبان از جنس *Stichodactyla* و *Heteractis*، *Entacmaea* و *Macroactyla*

1. Sea carpet

Cryptodendrum برای جلوگیری از تخلیه نماتوسیت‌های سمی و مقاومت در برابر فعالیت‌های دافع و کشندگی بالقوه ترشحات سمی مخاط هستند (Mebis, 2009)، و سایر ماهی‌ها در برابر این سموم آسیب‌پذیرند. باوجود مطالعات متعدد پیرامون تأثیرات نوروکسیکی، کاردیوتوکسیکی و هپاتوتوکسیکی سموم شقایق‌های دریایی در ارگان‌های داخلی جانوران، اثرهای شان در مراحل جنینی مکتوب نشده است. بنابراین در تحقیق حاضر اثرهای این سموم روی رشد جنینی ماهی گورخری (به‌عنوان نمونه) بررسی گردید.

ماهی گورخری، *Danio rerio*، از خانواده Cyprinidae دارای مزایای منحصربه‌فردی است، از جمله مقاوم بودن، اندازه کوچک، کوتاه بودن مدت زمان تولید نسل (کمتر از دو ماه)، تخم‌ریزی مکرر و زیاد، توسعه جنین در خارج از بدن مادر، جنین‌هایی با کوریون شفاف و امکان مشاهده مراحل رشد جنینی، و نفوذپذیری جنین‌ها به مولکول‌های کوچکی که در طی دوره انکوباسیون به محیط اضافه می‌شود (Belyaeva et al, 2002؛ Grunwald and Eisen, 2002؛ Hill et al, 2005؛ Yang et al, 2009؛ Kalueff and Cachat, 2011). از این‌رو امروزه از این ماهی به‌عنوان یک مدل تحقیقاتی بسیار مهم در مطالعات بیولوژیک، فیزیولوژیک، ژنتیکی، مولکولی، داروسازی و پزشکی به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود (Kimmel et al., 1995؛ Hill, 2000؛ Gerlai et al., 2000؛ Belyaeva et al., 2009؛ Yang et al., 2009؛ Struhle et al., 2012؛ Kalueff and Cachat., 2011).

مواد و روش

نمونه‌برداری از شقایق‌های فرشی در بهمن ماه ۱۳۹۲ در ناحیه شرقی ایستگاه اسکله جزیره هرمز (۱' ۲۷° تا ۶' ۰°

۲۷ عرض شمالی و ۲۵' ۵۶° تا ۳۰' ۵۶° طول شرقی) و شناسایی آنها با استفاده از کلید شناسایی (Häussermann., 2004) انجام شد. سپس صفحه دهانی ۱۰ عدد شقایق دریایی هم‌اندازه پس از برش، در کیسه فریزر و نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۱۶۰°C- نگهداری شدند. مخاط صفحه دهانی شقایق‌ها پس از دفریز شدن با قاشق به آرامی از سطح آنها جدا و توزین شده و در پتری‌دیش ریخته شده و به مدت ۴۸ ساعت فریزدرای شدند. در ادامه، ۲ گرم از مخاط خشک توزین و در ۳۰ میلی‌لیتر متانول ۱۰۰٪ هموژن شده و پروتئین کل آن استخراج شد. برای تهیه نمودار استاندارد از سرم آلبومین گاوی، ۴ میلی‌گرم از پودر BSA در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و به‌عنوان استوک از آن غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰، ۶۴۰، ۱۲۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. برای رسم نمودار استاندارد رقت‌های مختلف از غلظت‌های تهیه شده در سه تکرار تهیه گردید و به ۲۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌های تهیه شده ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد افزوده شد و پس از انکوبه شدن به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق هر نمونه با سه تکرار به درون میکروپلیت منتقل و جذب در دستگاه الیزا در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت و منحنی استاندارد رسم گردید. سپس رقت‌های متفاوتی از نمونه‌های استخراج شده نیز با ۳ تکرار تهیه شد و مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه به ۱۰۰۰ میکرولیتر با برادفورد مخلوط گردید و مانند نمونه‌های استاندارد جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شده و به‌وسیله منحنی استاندارد میزان پروتئین کل محاسبه گردید (Ebada et al., 2008). پس از سنجش میزان پروتئین توسط دستگاه الیزا (Bradford., 1976)، غلظت‌های ۱/۲، ۳/۷ و ۷/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از آن جهت تیمار تخم‌های ماهی ساخته شد.

میکروسکوپ نوری نیکون مجهز به دوربین المپیوس (۱۲ مگاپیکسل) هر ۶ تا ۱۲ ساعت انجام گرفت.

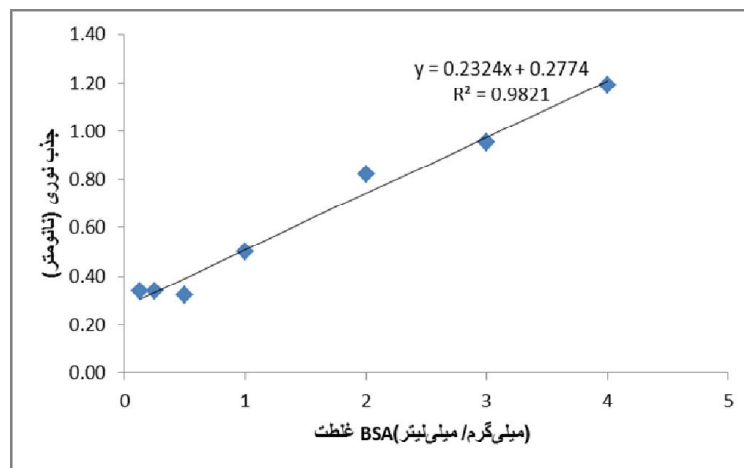
نتایج

نتایج سنجش پروتئین

میزان پروتئین کل با استفاده از نمودار استاندارد تهیه شده از BSA اندازه‌گیری (نمودار ۱)، و میزان پروتئین کل در عصاره استخراجی ۵/۹ میلی‌گرم/میلی‌لیتر استوک محاسبه شد.

تخم‌های لقاح یافته پس از جمع‌آوری و شست‌وشو در آب آکواریوم، با متیلن بلو، و محلول نمکی ۱٪ و فرمالین ۰/۰۵٪ ضدعفونی شدند. سپس ۱۵۰ عدد تخم به هر میکروچاهک در میکروپلیت‌های ۲۴ خانه‌ای ریخته شده و با ۲ میلی‌لیتر از هر غلظت از مخاط در دو تکرار تیمار شدند. نمونه شاهد نیز در ۲ تکرار با آب آکواریوم در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌های حاوی تخم‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شده و عکس‌برداری با

جذب نوری (نانومتر)	غلظت BSA (Mg/ml) (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)
۱/۱۹	۴
۰/۹۵	۳
۰/۸۲	۲
۰/۵۰	۱
۰/۳۲	۰/۵
۰/۳۴	۰/۲۵
۰/۳۴	۰/۱۲۵



نمودار ۱ سمت چپ: غلظت و جذب نوری محلول‌های استاندارد (آلبومین سرم گاوی)، سمت راست: نمودار استاندارد و

معادله خط

شاهد و گروه‌های تیمار شده با غلظت ۱/۲ و ۳/۷ تغییر خاصی مشاهده نشد (شکل‌های 2a-2c). با گذشت ۱۲ ساعت از لقاح، در حالی‌که جنین‌ها مرحله گاسترولا را سپری کرده و وارد مرحله segmentation شده بودند، در نمونه‌های شاهد و غلظت ۱/۲ میلی‌گرم، اولین قطعه بدن شیاردار شده و رشد قطعات بدن ادامه داشت (شکل‌های 3a,3b). در تیمار ۷/۴ میلی‌گرم نیز جنین‌ها به دژنره شدن (شکل 3c) و پخش در کوریون به‌صورت نقاط سیاه روی آوردند (شکل‌های 3d, 3e).

مشاهدات میکروسکوپی

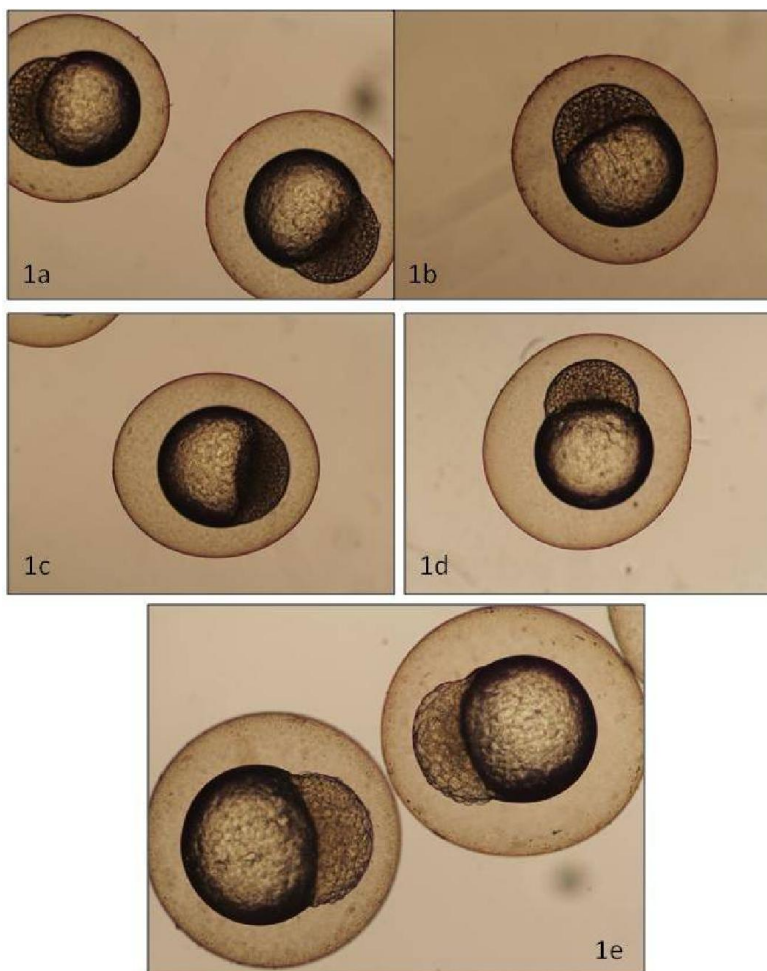
مشاهدات میکروسکوپی ۳ ساعت پس از لقاح بیانگر تقسیم سلولی و تشکیل توده سلولی (بلاستولا) در بخش قطب جانوری تخم در گروه شاهد و سه تیمار بدون تفاوتی آغاز شد و جنین در حال رشد بود (شکل‌های 1a-1e). در ادامه، مشاهدات نشان داد که ۶ ساعت پس از لقاح، سلول‌ها در تیمار ۷/۴ میلی‌گرم شروع به سیاه و دژنره شدن کردند (شکل‌های 2d, 2e)، این در حالی بود که در گروه

فاز تأخیر همچنان در تیمارهای غلظت ۱/۲ میلی گرم وجود داشت (شکل 5f) و برخی از جنین‌های این تیمار از بین رفته بودند.

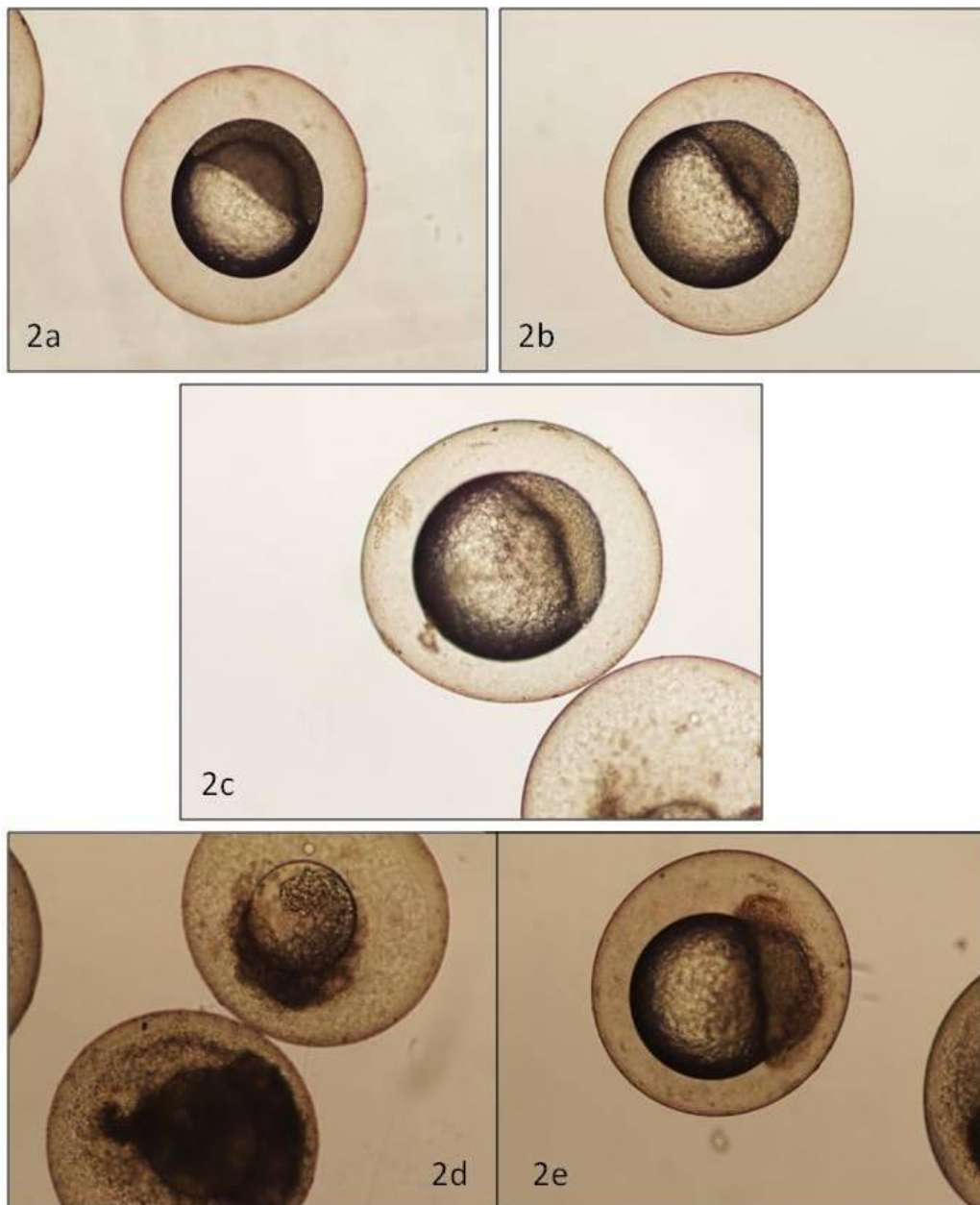
در نهایت با گذشت ۷۲ ساعت از لقاح، رشد جنینی در گروه شاهد به مرحله تفریح رسیده و لاروها یکی یکی با شکافتن کوریون خارج شدند (شکل‌های 5c, 5e)، ولی همه جنین‌ها در تیمار ۱/۲ همانند دو تیمار قبلی از بین رفتند (شکل 5g).

با گذشت ۲۴ ساعت از لقاح تخم‌ها، جنین‌های گروه شاهد، مرحله segmentation را پشت سر گذاشته و وارد مرحله فارینگولا شدند (شکل‌های 4a, 4b)، این در حالی است که در گروه تیمار ۱/۲ میلی گرم یک تأخیر در فاز رشد به چشم می‌خورد (شکل 4c) و در تیمارهای ۷/۴ و ۳/۷ میلی گرم تمامی جنین‌های دژنره شده و از بین رفتند (شکل‌های 4e, 4d).

با گذشت ۳۶ و ۴۸ ساعت از لقاح، جنین در گروه شاهد به مرحله pharyngula رسیده (شکل‌های 5a, 5b) و

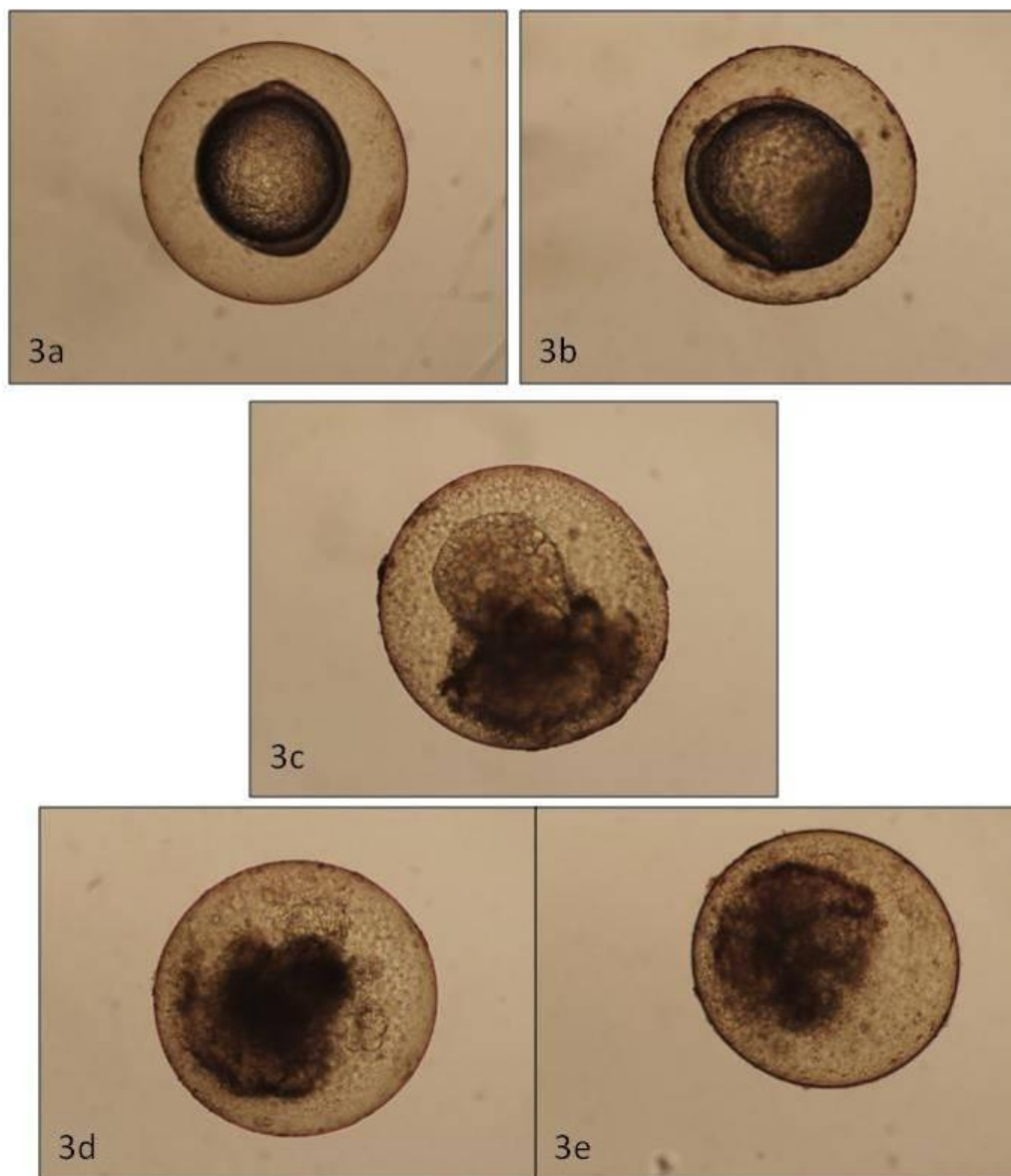


شکل ۱ تکامل جنینی در تخم ماهی گورخری در مرحله بلاستولا (۳ ساعت پس از لقاح) در نمونه‌های شاهد و تیمار با غلظت‌های مختلف از مخاط شقایق دریایی (برحسب میلی‌گرم / میلی‌لیتر) (با بزرگ‌نمایی ۴۰×): (a و b) نمونه شاهد، (c) تیمار با غلظت ۱/۲، (d) تیمار با غلظت ۳/۷، (e) تیمار با غلظت ۷/۴. سلول‌ها در حال تقسیم بوده و تغییری در روند تکامل جنینی دیده نمی‌شود.



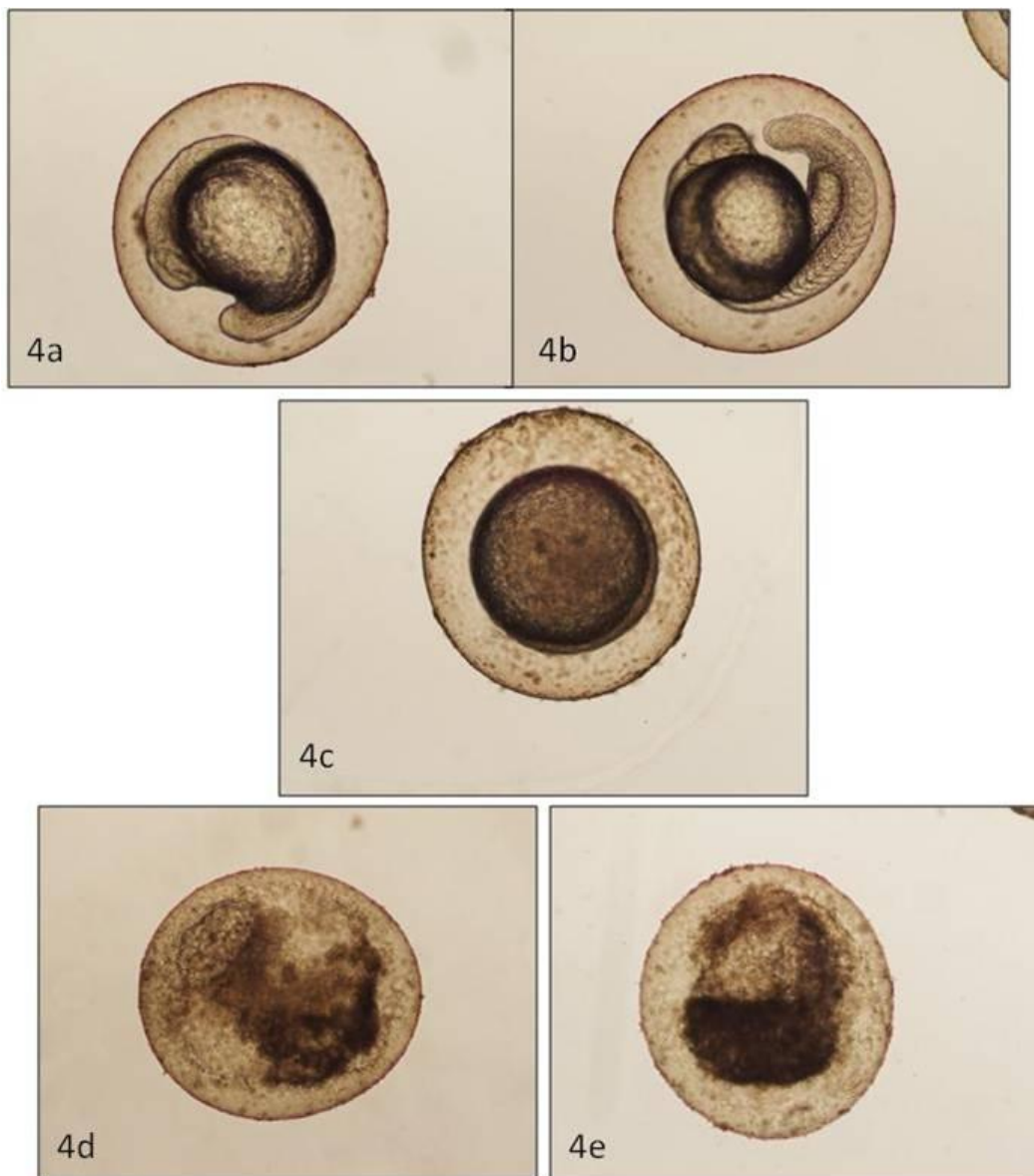
شکل ۲ تکامل جنینی در تخم ماهی گورخری در مرحله گاسترولا (۶ ساعت پس از لقاح) در نمونه‌های شاهد و تیمار با غلظت‌های مختلف از مخاط شقایق دریایی (برحسب میلی‌گرم / میلی‌لیتر) (با بزرگ‌نمایی ۴۰×): (a) نمونه شاهد، (b) تیمار با غلظت ۱/۲، (c) تیمار

با غلظت ۳/۷، d و e) تیمار با غلظت ۷/۴ سلول‌ها در حال تقسیم بوده و رشد جنینی ادامه دارد. سطح مشترک بین بلاستودرم و پری‌پلاست تبدیل به یک منحنی شده و تغییری در روند تکامل جنینی در گروه شاهد و گروه تیمار شده با غلظت ۱/۲ و ۳/۷ دیده نمی‌شود، ولی جنین‌های تیمار شده با غلظت ۷/۴ با دژتره شدن سلول‌ها، سیاه رنگ شده و تغییر شکل داده‌اند.

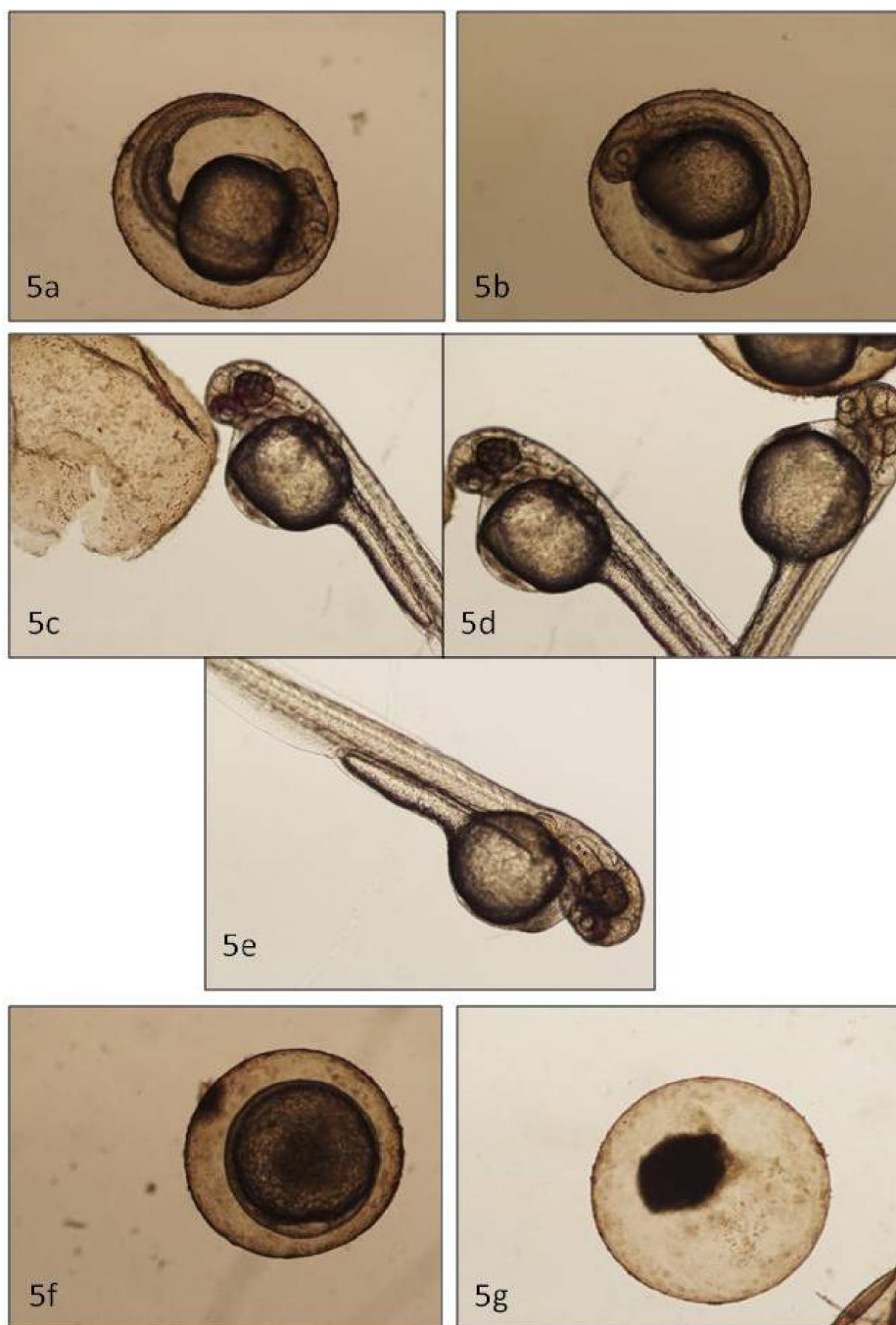


شکل ۳ تکامل جنینی در تخم ماهی گورخری در مرحله سیگمانتاسیون (۱۲ ساعت پس از لقاح) در نمونه‌های شاهد و تیمار با غلظت‌های مختلف از مخاط شقایق دریایی (برحسب میلی‌گرم / میلی‌لیتر) (با بزرگ‌نمایی ۴۰): (a) نمونه شاهد، (b) تیمار با غلظت ۱/۲، (c) تیمار با غلظت ۳/۷، d و e) تیمار با غلظت ۷/۴. سلول‌ها در حال تقسیم بوده، رشد و قطعه قطعه شدن جنینی در گروه

شاهد و تیمار با غلظت ۱/۲ ادامه دارد، ولی جنین‌های تیمار شده با غلظت ۳/۷ و ۷/۴ با دژنره شدن، سیاه رنگ شده و جنین‌ها در حال متلاشی شدن هستند.



شکل ۴ تکامل جنینی در تخم ماهی گورخری ۲۴ ساعت پس از لقاح ادامه داشت. انتهای سیگماتاسیون سپری شده و مرحله فارینگولا در نمونه‌های شاهد دیده می‌شود (برحسب میلی‌گرم / میلی‌لیتر). (a و b) نمونه شاهد، (c) تیمار با غلظت ۱/۲، (d) تیمار با غلظت ۳/۷، (e) تیمار با غلظت ۷/۴. رشد جنینی در ماهیان تیمار شده با غلظت ۱/۲ متوقف شده است و جنین‌های تیمار شده با غلظت‌های ۳/۷ و ۷/۴ دژنره شده، سلول‌ها از بین رفتند.



شکل ۵ تکامل جنینی در تخم ماهی گورخری ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از لقاح. (a-e) نمونه شاهد، (f) تیمار با غلظت ۱/۲ پس از ۴۸ ساعت، (g) تیمار با غلظت ۱/۲ پس از ۷۲ ساعت. در نمونه‌های شاهد مرحله فارینگولا و تفریح در نمونه‌های شاهد دیده می‌شوند. توقف رشد جنینی و در نهایت دژنره شدن سلول‌ها و مرگ جنینی در تیمار غلظت ۱/۲ دیده می‌شود.



میلی مول بر لیتر نیز مشاهده شده است (Bachmann, 2002). بدشکلی دم و سر پس از تیمار جنین با Valporic acid ۰/۱۲ میلی مول/لیتر نیز مشاهده شد. همچنین Bachmann یک تأخیر در رشد در جنین پس از تیمار تخم‌ها با دی اتیلن گلیکول دی متیل اتر (Diethyleneglycoldimethylethere) ۶۲/۲ میلی مول/لیتر را مشاهده کرد. در بررسی اثر ۸۰ میلی گرم در لیتر از ۲ و ۴- دی متیل فنول بر روی جنین این ماهی، تورم در ناحیه پریکاردیال و عدم تشکیل کیسه شنا مشاهده شد، در حالی که در نمونه‌های شاهد این ناهنجاری‌ها مشاهده نشد. همچنین جنین‌هایی که در معرض اتانول ۲٪ قرار گرفته بودند نیز دچار ناهنجاری در قسمت جمجمه و مغز شدند (Yang, 2009). تحقیقات Belyaeva و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که افزودن Doxorubicin در غلظت ۰/۰۸ میلی گرم در میلی لیتر به جنین ماهی گورخری منجر به کج‌شدگی دم و در ۰/۱ میلی گرم کج‌شدگی دم و ادم در ناحیه سر و قلب می‌شود؛ با افزایش غلظت به ۰/۲ میلی گرم، کج‌شدگی دم و ادم و تورم شدید در ناحیه قلب و کیسه زرده مشاهده شد.

حضور ترکیبات لیپیدی غنی از انرژی مانند استیل پالمیتات، تری گلیسریدها، استرهای wax، اسیدهای چرب آزاد (Benson and Muscatine, 1974؛ Crossland et al, 1980) و پپتیدها و پروتئین‌های مختلف (Krupp, 1985؛ Vacelet and Thomassim, 1991) در مخاط شقایق‌های دریایی گزارش شده است. نتایج این بررسی نشان داد که ترکیبات پروتئینی و پپتیدی موجود در مخاط شقایق دریایی حتی در غلظت‌های پایین قادر است از لایه پوششی جنین عبور کرده و سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. در غلظت‌های پایین این اثر می‌تواند تأخیر در روند رشد

بحث

تحقیقات متعدد نشان داد عصاره شقایق‌ها، ساختارسلولی (به‌ویژه مخاطی و پوششی) آبشش ماهیان تیمار شده را تغییر داده و با ایجاد اختلال در فیزیولوژی جانور (از جمله اختلال در کانال‌های یونی) سبب مرگ آن می‌شود (Pennings et al., Pawlik et al., 1995؛ Duffy and Paul., 1992, 1994).

از مدت‌ها پیش بررسی اثر سمیت انواع مختلف مرجانیان به‌ویژه مرجان‌های نرم و شقایق‌ها بسیار مورد توجه بوده است و تحقیقات زیادی در این زمینه انجام گرفته است. برای مثال، ماهی *Gambusia affinis* در برابر عصاره آبی خیسانده شده ۱۳۶ گونه مرجان نرم، پاسخ‌های متفاوتی از مرگ‌ومیر سریع تا آهسته و سطوح متنوعی از اثرهای نکروزیس تا اثرهای ناچیز را از خود نشان داد (Coll et al., 1982). همچنین، عصاره خام سه گونه از شقایق دریایی *P.sinensis* و *S.haddoni*، *H.magnifica* روی موش با تغییرات هیستوپاتولوژی و شدید در پارانشیم کلیه و انقباض کلاف گلمرولی همراه بوده است (Ravindran et al., 2010).

باوجود مطالعات متعدد روی آبزیان مختلف، اطلاعاتی پیرامون اثر ترکیبات موجود در مخاط شقایق دریایی روی تخم ماهیان و مراحل رشد جنینی برای مقایسه با تحقیق حاضر در دسترس نیست. اما اثر برخی ترکیبات شیمیایی روی روند رشد جنینی ماهی گورخری بررسی شده است. برای مثال، در بررسی P- tert- buthylphenol بر روی جنین این ماهی، کاهش تجمع رنگدانه‌ها (hypopigmentation) در چشم مشاهده شد (Schutle, 1997). کج‌شدگی از قسمت پشت یا پهلو بعد از تیمار جنین با Methylmercury chloride در غلظت ۰/۲۴

- Coll, J., Stephane, L., Sammarco, P., Williams, W., and Bakus, J. 1982.** Chemical defences in soft corals (Coelenterata: Octocorallia) of the great barrier reef: A study of comparative toxicities. *Marine Ecology, Progress Series*, 8: 271- 278.
- Crossland, C., Barnes, D., and Borowitzka, M. 1980.** Diurnal lipid and mucus production in the staghorn coral, *Acropora acuminata*. *Marine Biology*, 60 (2-3): 81-90.
- Daly, M., Chaudhuri, A., Gusmão, L., and Rodríguez, E. 2008.** Phylogenetic relationships among sea anemones (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48: 292-301.
- Donia, M., and Hamann, M. 2003.** Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet Infectious Diseases*, 3: 338-348.
- Duffy, J., and Paul, V. 1992.** Prey nutritional quality and the effectiveness of chemical defenses against tropical reef fishes, *Oecologia*, 90: 333-339
- Ebada, S., Edrada, R., Lin, W., and Proksch, P. 2008.** Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*, 3: 1820-1831.
- Ely, R., Supriya, T., and Naik, C.G. 2004.** Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 309: 121-127.
- Fautin, D. G. 2009.** Sea anemone (Cnidaria: Actinaria) of Singapore: Abundant and well-known shallow-water species. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 22: 121-143.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., and Rosenthal, A. 2000.** Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67: 773-782.
- Grunwald, D., and Eisen, J. 2002.** Headwaters of the zebrafish emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics*, 3: 717- 724.
- ایجاد کرده و در غلظت‌های بالا سبب لیز شدن سلول‌ها و دژنره شدن جنین گردد. با افزایش میزان غلظت پروتئین کل، شدت و سرعت تخریب جنین و دژنره شدن می‌یابد، بنابراین می‌توان گفت که علت سیاه و دژنره شدن جنین‌ها به دلیل وجود پروتئین‌های موجود در مخاط شقایق دریایی است. از آنجایی که مراحل اولیه زندگی موجودات به‌طور خاصی نسبت به ترکیبات شیمیایی و زیستی اعمال شده حساس است و نیز با توجه به این نتایج می‌توان گفت که از ترکیبات موجود در مخاط شقایق دریایی می‌توان در از بین بردن جنین موجودات مضر همچون مالاریا، آفات و حشرات مزارع، سوسک‌ها و... که سالیانه خسارات مالی فراوانی را به اقتصاد کشور و به کشاورزان وارد می‌کنند، استفاده کرد.
- منابع
- Bachmann, J. 2002.** Entwicklung und erprobung eines Teratogenitäts-screening testes mitembryonen des zebrafishlings *Danio rerio*. PhD thesis, Faculty of Forestry, Geo- and Hydrosciences, Dresden Technical University, 214 pp.
- Belyaeva, N., Kashirtseva, V., Medvedeva, N., Khudoklinova, Y., Ipatova, O., and Archakov, A. 2009.** Zebrafish as a model system for biomedical studies. *Biomedical Chemistry*, 3: 343- 350.
- Benson, A. A., and Muscatine, L. 1974.** Wax in coral mucus: Energy transfer from corals to reef fish. *Limnology Oceanography*, 19: 810- 814.
- Bradford, M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72.1: 248-254.
- Brown, B., and Bythell, J. 2005.** Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Marine Ecology Progress Series*, 296: 291-309.
- Chellaram, C., and Edward, J. K. P. 2009.** Anti-inflammatory potential of coral reef associated gastropod, *Drupa margariticola*. *Indian Journal of Science and Technology*, 2 (2): 75-77.

predatory reef fish. I. Chemical deterrence. *Marine Ecology Progress Series*, 127: 183-194.

Pennings, S., Pablo, S., Paul, V., and Duffy, E. 1994. Effects of sponge secondary metabolites in different diets on feeding by three groups of consumers. *Experimental Marine Biology and Ecology*, 180: 137-149.

Ravindran, V., Kanan, L., and Venkateshvaran, K.V. 2010. Biological activity of sea anemone proteins: Toxicity and histopathology. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47: 1225-1232.

Schulte, C., 1997. Entwicklung und Validierung einer Methode zur Ermittlung der Toxizität von Chemikalien gegenüber Embryonen von *Brachydanio rerio*. PhD thesis, Faculty for Forestry, Geo and Hydrosciences, Dresden Technology University., 171 pp

Smith, J., and Blumenthal, K. 2007. Site-3 sea anemone toxins: Molecular probes of gating mechanisms in voltage-dependent sodium channels. *Toxicon*, 49: 159-170.

Struhle, U., Scholz S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., and Brauobeck, T. 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments, A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*, 33: 128- 132.

Vacelet, E., and Thomassin, B. 1991. Microbial utilization of coral mucus in long term in situ incubation over a coral reef. *Hydrobiologia*, 211: 19-32.

Yang, L., Ho, N., Alshut, R., Legradi, J., Weiss, C., Reischl, M., Mikut, R., Leibel, U., Muller, F., and Struhle, U. 2009. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reproductive Toxicology*, 28: 245- 253.

Haefner, M. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates, *Research Focus*, 8: 536-544.

Häussermann, V. 2004. Identification and taxonomy of soft-bodied hexacorals exemplified by Chilean Sea anemones; including guidelines for sampling, preservation and examination. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 84 (05): 931-936.

Hill, A., Teraoka, H., Heideman, W., and Peterson, R. 2005. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1): 6- 19.

Jha, R., and Zi-rong, X., 2004. Biomedical compounds from marine organisms, *Marine Drugs*, 2: 123-146.

Kalueff, V. A., and Cachat, J. M. 2011. Zebra fish models in neurobehavioral research. *Springer protocol, USA*, 293p.

Kijjoo, A., and Sawangwong, P., 2004. Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs*, 2: 73-82.

Kimmel, C., Ballard, W., Kimmel, S., Ullmann, B., and Schilling, T. 1995. Stages of Embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203: 253- 310.

Krupp, D. A. 1985. An immunochemical study of the mucus from the solitary coral, *Fungiascutaria* (Scleractinia, Fungiidae). *Bulletin of Marine Science*, 36: 163: 176.

Mebs, D., and Kaufenstein, S. 2005. Ichthyotoxicity caused by marine cone snail venoms?. *Toxicon*, 46: 355-356.

Mebs, D. 2009. Chemical biology of the mutualistic relationships of sea anemones with fish and crustaceans. *Toxicon*, 54(8): 1071- 1074.

Pawlikl, J., Chanasl, B., Toonen, R., and Fenical, W. 1995. Defenses of Caribbean sponges against



Effects of mucal proteins of sea anemone, *Stichodactyla haddoni*, on embryonic development of zebra fish, *Danio rerio*

Maryam Hamed Shahraiki¹, Saber Khodabandeh^{2*}, Jafar Seyfabadi², Shahla Hemmati¹, Sahar Shabani Panbehchooleh¹

1-M.Sc. Graduated, Department of Marine Biology, Tarbiat Modares University, Nur

2- Associate Prof., Department of Marine Biology, Tarbiat Modares University, Nur

*Corresponding author: skhoda@modares.ac.ir

Abstract

The effects of mucal proteins of sea anemone, *Stichodactyla haddoni*, on different stages of embryonic development of zebra fish (*D. rerio*) were examined. The sea anemone samples were collected from the intertidal areas of the Hormuz Island (Persian Gulf), and were frozen at -160 °C. Protein and peptide components were extracted by 100% methanol. Following the total protein assessment by ELISA, three concentrations (2.1, 3.7 and 7.4 mg/ml distil water) were prepared. From each concentration, 2 ml was added to the microplates containing 150 zebra fish eggs each, with 2 replications; microplates with normal aquarium water was also used as control group. The eggs were incubated for 72 hrs and the process of embryonic development was observed every 6 to 12 hours. Results showed that the embryonic development was normal in the control group, while the eggs treated with 3.7 and 7.4 mg/ml of mucal proteins degenerated and blackened in less than 12 hours. Also a delay in the phase of growth in embryonic development was observed in the group with 1.2 mg/ml of protein. Our results showed that the mucal proteins from this sea anemone can affect embryonic development rapidly, causing delayed growth at low concentration, and cell lysis and embryonic degeneration at high concentrations.

Keywords: Protein compounds, Mucus, Sea carpet, Persian gulf, Embryonic development