

بررسی رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه با خواص دارویی در مرجان نرم همزیست *Sinularia flexibilis*

محمد کاظم خالصی\*

عضو هیأت علمی گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری

چکیده

بی‌مهرگان دریایی که به بستر می‌چسبند برای دفاع و سایر واکنش‌های ایمنی، از خود مواد سمی ترشح می‌کنند. در سال‌های اخیر، به دلیل استفاده زیستی و پزشکی از تولیدات این بی‌مهرگان، لزوم دسترسی به تولید انبوه آن‌ها، و موجودی محدود آن‌ها در زیستگاه‌های طبیعی بهره‌برداری پایدار از تولیدات مفیدشان را با مشکل جدی مواجه ساخته‌اند. از جمله راهکارهای گوناگون برای تولید انبوه این بی‌مهرگان، امکان پرورش گونه‌های مختلف و چگونگی تولید سموم یا همان متابولیت‌های ثانویه آن‌ها می‌باشد. در مقاله حاضر، نتایج اولیه پژوهش روی مرجان نرم همزیست گونه *Sinularia flexibilis* به عنوان غنی‌ترین گونه در جنس خود، در محیط آزمایشگاهی ارائه می‌گردد. با استفاده از مزیت افزایش غالب این گونه به‌روشن غیرجنسی قلمه زدن، قلمه‌هایی از مرجان مذکور تهیه و در تانک‌های پرورشی قرار داده شدند. با فراهم بودن کمترین شرایط محیطی یعنی نور و جریان آب و بدون تغذیه دستی، بازماندگی بالا (100٪) و رشد ویژه فزاینده ( $10^{-3} \times 21-17$  در روز) به مدت 16 هفته، با زمان دو برابرشدگی حداقل 6 هفته در قلمه‌های مرجان مشاهده شد. همچنین تولید متابولیت ثانویه عمده با نام فلکسی بیلاید در این گونه مرجان با غلظت  $0/25 \sim 0/1$  میلی‌گرم در گرم وزن خشک قلمه‌ها ادامه یافت. با بهره‌گیری از نتایج این پژوهش و با توجه به پتانسیل بالا و تنوع آبریان مشابه در آب‌های جنوب ایران، اهمیت زیست فناوری دریایی در بهره‌برداری پایدار از این منابع بالقوه مفید آشکار می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: مرجان نرم، نرخ رشد، متابولیت‌های ثانویه، فلکسی بیلاید.

شوند. همچنین، این گونه مرجان مواد محافظ درون سلولی با نام کلی اسیدهای آمینه شبه مایکوسپورین یا MAAs<sup>5</sup> تولید می کند که با فعالیت آنتی اکسیدانی، جانور را در برابر شدت زیاد نور و پرتو فرا بنفش محافظت می کند (Michalek-Wagner & Bowden, 2001). این مرجان نرم با نوعی جلبک تک سلولی از جنس دینوفلاژلها که عموماً زئوکسانتلا<sup>6</sup> نام دارند، زندگی همزیستی دارد و با هم یک موجود واحد یا هولوبیونت<sup>7</sup> را تشکیل می دهند. زئوکسانتلا بسته به گونه مرجان تا حدود 100٪ از مواد آلی حیاتی و انرژی مورد نیاز میزبان مرجانی خود را از راه جابجایی فرآورده های فتوسنتز به بدن مرجان تأمین می کنند و بدون حضور آنها این مرجان قادر به ادامه زندگی نیست (Khalesi, 2008). بنابراین، بیشتر مرجان های همزیست جهت بازماندگی و رشد به حداقل نور برای فرآیند فتوتروفی به وسیله زئوکسانتلا نیازمند هستند.

با بررسی شواهد موجود که نتیجه پژوهش روی ترکیبات فعال بالقوه دارویی حاصل از *S. flexibilis* بوده اند، ثابت شده است که بالاترین شمار تحقیقات صورت گرفته روی جنس *Sinularia* مربوط به این گونه بوده و برای بیشتر متابولیت های ثانویه آن، خاصیت

بسیاری از بی مهرگان چسبیده<sup>1</sup> دریایی مانند مرجان های نرم جهت مقابله با رقیبان و شکارچیان، مواد سمی ترشح می کنند که از نظر پزشکی، در درمان سرطان اهمیت دارند. امروزه به دلیل استفاده پزشکی-زیستی<sup>2</sup> از این بی مهرگان دریایی و تقاضای روز افزون برای دسترسی تجاری به مواد مفید آنها، از اهم موارد در بیوتکنولوژی دریایی می باشد. مرجان نرم گونه *Sinularia flexibilis*<sup>3</sup> مواد سمی ترشح می کند که دارای فعالیت های بالقوه ضد سرطانی، قارچ کشی و باکتری کشی می باشند (Aceret et al., 2001). دیترپن های<sup>4</sup> مترشحه این مرجان که عمده ترین آنها سینیولاریولاید، سینیولارین، دی هایدرو سینیولارین، سینیولاریولن، سینیوفلکسین، سینیوفلکسی بیلین، سینیوفلکسولاید، دی هیدروفلکسی بولاید، فلکسی بیولاید، و فلکسی بیلاید می باشند (Anjaneyulu & Sagar, 1992؛ Alino et al., 1996؛ Anjaneyulu et al., 1998؛ Duh et al., 1998؛ Mayer & Gustafson, 2004). با داشتن خواص دارویی گوناگون (علاوه بر خواص ذکر شده در بالا) از جمله به عنوان محرک های قلبی و عروقی و نیز مواد ضد التهابی می توانند به عنوان داروهای جدید مطرح

<sup>4</sup> Diterpenes

<sup>5</sup> Mycosporine-like Amino Acids

<sup>6</sup> Zooxanthellae

<sup>7</sup> Holobiont

<sup>1</sup> Sessile

<sup>2</sup> Biomedical

<sup>3</sup> *Sinularia flexibilis*: Anthozoa, subclass Octocorallia, order Alcyonacea, family Alcyoniidae

بهره‌جویی از این ویژگی‌های با ارزش، یکی از راهکارهایی که با آن می‌توان بخشی از وزن زنده مورد نیاز مرجان را برای پژوهش‌های بیوتکنولوژیک فراهم کرد، پرورش محصور این بی‌مهرگان همراه با بالابردن دانش پایه برای نیازهای رشدی آن‌ها در محیط بسته می‌باشد. این کار مستلزم فنون پیشرفته آبی پروری و همچنین کاربرد تیمارهای زیستی ویژه گونه مرجان به منظور رشد بهینه و تولید مطلوب متابولیت‌های مورد نظر می‌باشد. بنابراین، در پژوهش حاضر چگونگی رشد و امکان بیوستنز متابولیت ثانویه (سم) عمده *S. flexibilis* با نام فلکسی بیلاید<sup>4</sup> (Aceret et al., 2001) در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد.

#### مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دریا واقع در دانشگاه واگنینگن کشور هلند انجام شد. مرجان نرم گونه *Simularia flexibilis* از مرکز نگهداری آن‌ها واقع در باغ وحش برگر<sup>5</sup> شهر آرنهم هلند تهیه شد. در این باغ وحش، توده‌های این مرجان در آب °C 26 با شوری 34 درصد نگهداری می‌شوند. چون این توده‌ها از یک کلنی واحد اصلی ریشه می‌گیرند، از نظر ژنتیکی یکسان<sup>6</sup> هستند. با انتقال نمونه‌های مرجان به آزمایشگاه بیوتکنولوژی

ضد سرطانی گزارش شده است (Khalesi et al., 2008). به علت توجه فزاینده در بهره‌برداری از این مواد جهت کاربردهای پزشکی، دارویی و صنعتی، انجام تحقیقات برای گسترش مواد مفید مرجان یاد شده به صورت فرآورده‌های دارویی و صنعتی در آینده، و تقاضای روزافزون برای چنین منبع بالقوه‌ای از مواد سمی دارویی به منظور بازبینی آن‌ها و نیز انجام مطالعات تخصصی، ممکن است به بهره‌برداری بیش از حد از منابع طبیعی مرجان منجر گردد. بر این اساس، توسعه مواد درمانی از این مرجان در آینده نیازمند راهکارهای پایدار جهت بهره‌برداری در دراز مدت خواهد بود.

وابستگی این مرجان به نور جهت کسب انرژی بازماندگی و رشد از طریق فتوتروفی زئوکسانتلا، ضمن آنکه نیاز به تغذیه آن را در محیط پرورشی به حداقل می‌رساند، از نظر اقتصادی نیز به صرفه خواهد بود. به علاوه، افزایش طبیعی این جانور به روش‌های غیرجنسی جوانه‌زنی<sup>1</sup>، شکافتگی<sup>2</sup> و نیز از راه قلمه‌زدن<sup>3</sup> صورت می‌گیرد؛ روش اخیر این امکان را فراهم می‌سازد تا از یک کلنی مولد مرجان تعداد زیادی قطعات کوچک یا قلمه‌های قادر به رشد را جدا کرد و پرورش داد، بدون این که به کلنی اولیه آسیبی وارد شود (Soong & Chen, 2003; Connel, 1973). با

<sup>4</sup> Flexibilide

<sup>5</sup> Buggers' zoo, Arnhem

<sup>6</sup> Clone

<sup>1</sup> Budding

<sup>2</sup> Fission

<sup>3</sup> Fragmentation

مدت 112 روز (16 هفته) اندازه‌گیری شد. برای توزین هفتگی نمونه‌ها، هر صفحه کوچک سوراخدار پی وی سی که قلمه به آن چسبیده بود پس از زدودن مواد خارجی از صفحه، با ترازوی دیجیتال (دقت  $\pm 0/01$  میلی‌گرم) دارای رشته متصل به قلاب در زیر آب، سه بار وزن شد (وزن شناور<sup>۲</sup>) و در صورت مشابه بودن اوزان حاصله ثبت می‌شد. با توزین قلمه‌ها در هر هفته، تفاوت در اوزان هفتگی قلمه‌ها با کسر وزن صفحات پایه (که قبلاً سنجیده شده بود)، به‌عنوان افزایش وزن قلمه‌های مرجان برآورد شد. با استفاده از اوزان شناور قلمه‌ها، نرخ رشد ویژه ( $\mu$  در روز) با فرمول  $\mu = (\ln W_2 - \ln W_1) / \Delta t$  محاسبه گردید که در آن  $W_2$  = وزن در انتهای هر هفته و  $W_1$  = وزن در ابتدای هر هفته ( $\Delta t$ ) می‌باشد. زمان دوبرابر شدگی<sup>۳</sup> نیز با رابطه  $\ln^{-1} 2 \times \mu$  (Vago et al., 1997) برآورد شد.

#### استخراج و مقدارسنجی فلکسی بیلاید

نمونه‌های مرجان پس از خشک انجمادی<sup>۴</sup> و تعیین وزن خشک آنها، بر طبق روش (Michalek-Wagner & Bowden, 1997) مورد استخراج قرار گرفتند. به طور خلاصه، بافت خرد شده مرجان سه بار با

دریا در دانشگاه واگنینگن هلند، این نمونه‌ها در تانک‌های ویژه<sup>۱</sup> محستوی ۱۳۰۰ لیتر آب شور با شوری  $34 \pm 0/4$  درصد و دمای  $25/8 \pm 0/2$  °C نگهداری شدند. به لحاظ اهمیت جریان آب در رشد این جانوران (Khalesi et al., ۲۰۰۵)، جریان آب متلاطم ( $\sim 6 \text{ cm s}^{-1}$ ) به‌طور پیوسته در تانک برقرار گردید و جریان کم و بیش یکنواخت آن در سرتاسر تانک به وسیله جریان سنج SENA RC2 تعیین شد. در بالای تانک با فاصله 55 سانتیمتر، یک لامپ هالید با بازده بالا (10000, VHO) نصب گردید و برای 12 ساعت روشنایی، 12 ساعت تاریکی تنظیم شد. شدت نور در نقاط مختلف تانک به وسیله نورسنج LI-COR, Li250 سنجیده شد و دامنه آن از 50 تا  $400 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$  متغیر بود. این شدت‌های نوری برای رشد مرجان قبلاً مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Tsai & Liu, 2005). از کلنی اولیه برش‌های قلمه‌ای تهیه، روی صفحات کوچک پی وی سی چسبانده و در نقاط مختلف تانک به صورت 8 گروه 3 تایی قرار داده شدند (تعداد کل = 24 قلمه). قلمه‌های مرجان طی 1-2 هفته به پایه‌ها چسبیدند و پس از آن، به مدت چند هفته واکنش، سازگاری با محیط جدید و رشد آن‌ها مورد بازبینی قرار گرفت.

نرخ رشد تک تک قلمه‌های مرجان در همه گروه‌ها (میکروکلنی‌ها) به‌طور هفتگی به

<sup>3</sup> Doubling time

<sup>4</sup> Freeze-drying

<sup>1</sup> Eco-deco sys., Dymico-Model 1000

<sup>2</sup> Buoyant weight

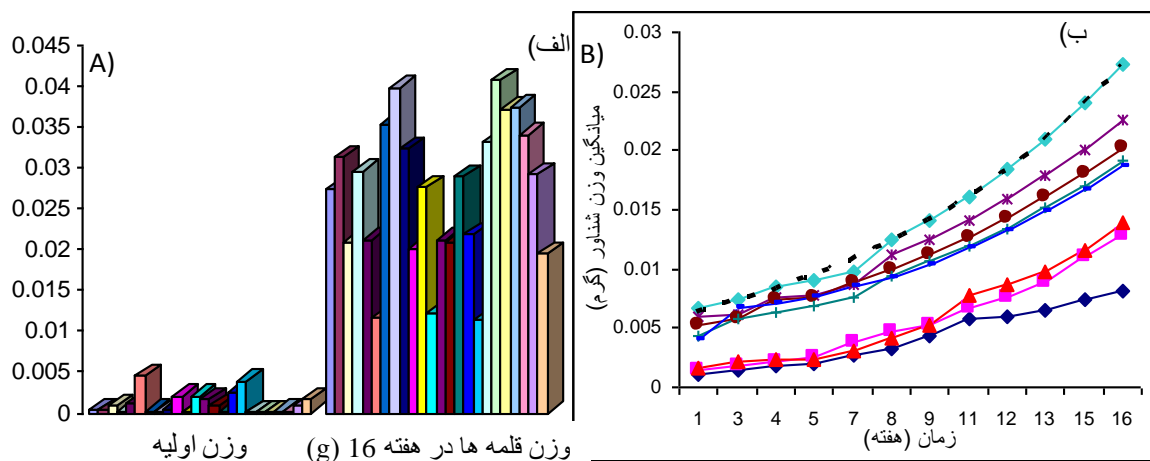
مرجان در شرایط آزمایشگاهی در طول 16 هفته می‌باشند. با استفاده از وزن‌های شناور، نرخ رشد ویژه قلمه‌ها ( $\mu$  در روز) برابر با  $17-21 \times 10^{-3}$  در روز برآورد گردید که در مقایسه با مقادیر  $1-2 \times 10^{-3}$  در روز برای مرجان‌های سخت در محیط طبیعی (Vago et al., 1997) بسیار بالاتر بود. در چند هفته اول بررسی رشد قطعات مرجان، نرخ رشد آن‌ها کمی افزایش یافت که شاید به علت مصرف انرژی جهت ترمیم آسیب بافتی ناشی از برش آن‌ها باشد. بنابراین، با توجه به نیاز قلمه‌های تازه برش یافته به یک دوره بازیافت، فرآیند طبیعی رشد در قلمه‌های زودتر چسبیده، قاعدتاً بایستی با سرعت بیشتری شروع شده باشد. بنابراین، روند کلی رشد قلمه‌های مرجان در این مطالعه ظاهراً به دامنه آسیب وارده ناشی از برش آن‌ها، مدت زمان بازیافت، و اندازه نسبی اولیه آن‌ها بستگی داشته است. همچنین، ممکن است گروه‌هایی که شدت نور کمتری ( $< 100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) بسته به محل استقرارشان در تانک دریافت کردند، رشد کمتری داشتند. کاهش رشد در نور کم (بسته به گونه) برای برخی از مرجان‌های همزیست گزارش شده است (Durant, 2006).

دیکلرومتان<sup>1</sup> در فواصل زمانی 2 ساعت، 5 ساعت و 3 روز استخراج و پس از آمیخته شدن با هم، با دستگاه HPLC (ستون: Prevail Phenyl, Eluent: 50% Acetonitril, 50% MilliQ, UV at 210 nm) فرآیند کمی سنجی صورت گرفت. برای این کار، طیف‌های جذبی و زمان‌های بازجذب ماده با فلکسی بیلاید استاندارد، دریافتی از پروفیسور بروس بودن (دانشگاه جیمزکوک - کوئینزلند، استرالیا)، تطبیق شدند. نتایج حاصل از تجزیه HPLC به صورت درصد فلکسی بیلاید در هر گرم وزن خشک مرجان بیان شده‌اند.

## نتایج و بحث

**رشد مرجان:** داده‌های حاصل از افزایش وزن در مقایسه با وزن اولیه قلمه‌های مرجان نرم *S. flexibilis* و میانگین افزایش وزن آن‌ها به شکل نمودار رشد ارائه شده است (شکل 1، الف و ب). بررسی افزایش رشد هفتگی قلمه‌ها در آزمایشگاه به مدت 16 هفته نشان داد که این گونه در سامانه پرورشی بسته قادر به رشد بود و افزایش وزن قابل توجهی در تمام گروه‌ها (کلنی‌ها) دیده شد. نتایج همچنین بیانگر بازماندگی مطلق (100٪، n= 24) قلمه‌های

<sup>1</sup> Dichloromethane



شکل 1- الف) مقایسه وزن اولیه و وزن نهایی (هفته 16)، و ب) میانگین اوزان شناور قلمه‌های *S. flexibilis* در تمام گروه‌ها در طول 16 هفته در شرایط آزمایشگاهی.

Figure 1- A) Comparison of initial and final (week 16) weights, and B) average of buoyant weights of fragments of *S. flexibilis* in all groups during 16 weeks under laboratory conditions.



شکل 2- الف) ازدیاد *اس. فلکسی بیلوس* از راه شکافتگی و جدایی رشته حاصله در پایه کلنی؛ ب) ازدیاد از طریق جوانه های رویشی در جوانب پایینی قلمه ها پس از کم و بیش 2 ماه که با پیکان مشخص شده اند.

Figure 2- A) Propagation of *S. flexibilis* through fission and separation of the resultant colony in the base. B) Vegetative propagation of fragments through budding (marked with arrows) after 2 months.

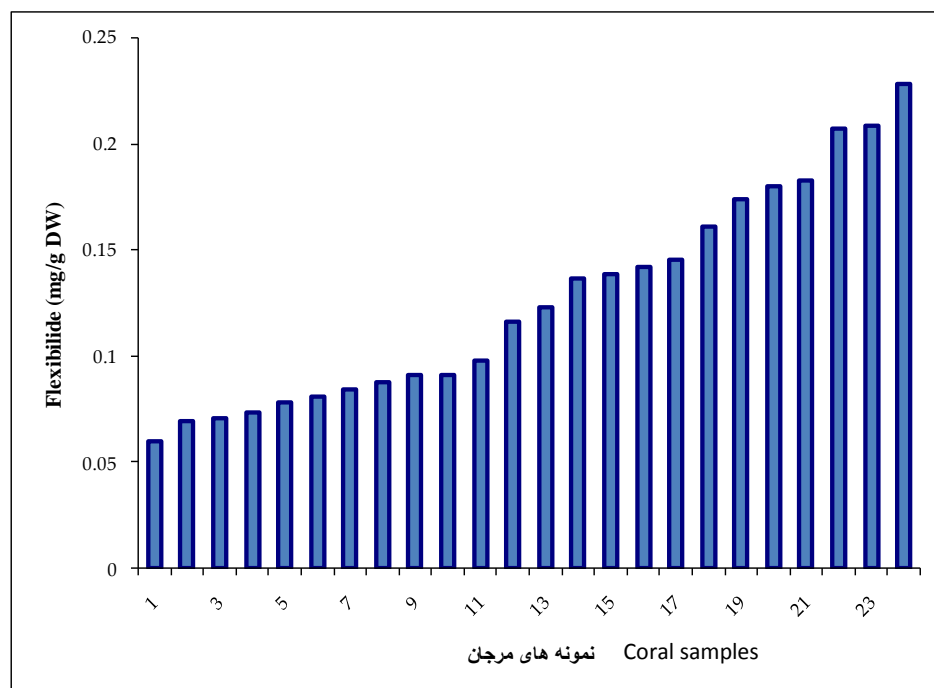
بازماندگی سایر مرجان‌های پرورش یافته، بیانگر سازگاری کامل و توان پرورشی این گونه می باشد. برای برخی از مرجان‌های سخت (دارای اسکلت آهکی) که در محیط طبیعی پرورش داده شدند، نرخ‌های بازماندگی 32٪، 15٪، و 8٪ پس از 17 ماه گزارش شده (Highsmith, 1982؛ Connel, 1973). در یک مورد، نرخ بازماندگی مشابه (98-100٪) برای مرجان سخت *Acropora formosa* پس از 18 ماه در محیط طبیعی گزارش شده است (Okubo, 2005). همچنین، مدت زمان دو برابر شدن وزنی قلمه‌های این گونه به مدت حداقل 6 هفته در مقایسه با زمان مذکور در گونه‌ای از مرجان سخت به مدت 36 هفته در محیط طبیعی (Edmunds & Davies, 1986) بسیار کوتاه تر بود. بنابراین، به نظر می‌رسد صرف نظر از ویژگی‌های گونه‌ای و ژنتیکی، پرورش مرجان در محیط پرورشی مهارشده (بسته) عامل مؤثری در رشد مطلوب و بازماندگی بالای *S. flexibilis* در شرایط آزمایشگاهی بوده است.

### مقدارسنجی فلکسی بیلاید: در شکل

3، مقادیر استخراج شده متابولیت ثانویه عمده *S. flexibilis* بر اساس میلی‌گرم در هر گرم وزن خشک قلمه‌ها نشان داده شد.

رویش جوانه‌های جانبی در سطح قلمه-ها عموماً نزدیک به پایه مشاهده شد (شکل 2 ب) که در محیط طبیعی نیز گزارش شده است (Bastidas et al., 2004). پیدایش جوانه‌ها در این گونه به‌عنوان ابزاری جهت افزایش غیرجنسی پیشنهاد شده است (Fautin, 2002). همچنین در این مطالعه، پدیده شکافتگی در کلنی‌های اصلی *S. flexibilis* رخ داد (شکل 2 الف) که با انشعاب رشته‌ای از قاعده کلنی شروع می‌شود و پس از مدتی با رشد بیشتر و چسبیدن به کف، از پایه اصلی جدا شده، کلنی مستقلی را ایجاد می‌کند.

بروز این دو پدیده علاوه بر اینکه بیانگر رفتار طبیعی رشد این گونه در محیط پرورشی است، نشان دهنده توانایی مرجان در دو برابر ساختن وزن خود با بهره‌گیری از انواع **ساختارها** امکانات می‌باشد. افزایش صعودی وزن بدن و نیز ویژگی جوانه‌زنی در این مرجان، منجر به بروز ریخت شاخه‌ای می‌شود که بیانگر رشد نمایی است و به‌طور پیوسته ادامه می‌یابد (Sanchez, 2002). این مزیتی است که در تولید انبوه این گونه جهت تأمین ماده زنده لازم برای مطالعات و کاربردهای بیوتکنولوژیکی اهمیت به‌سزایی دارد. بازماندگی مطلق (100٪) تمامی قلمه‌ها و نیز کلنی‌های اصلی *S. flexibilis* در طول مدت 4 ماهه مطالعه در مقایسه با



شکل 3- غلظت فلکسی بیلاید در قلمه‌های (n= ۲۴) مرجان نرم *S. flexibilis* در شرایط آزمایشگاهی.  
Figure 3- Flexibilide content in the fragments of the soft coral *S. flexibilis* under laboratory conditions.

اندازه قلمه‌ها، ممکن است به علت میزان تنش ناشی از دستکاری آن‌ها در موقع برداشت باشد. عامل احتمالی دیگر، نوع حلال بکار رفته در این مطالعه (دی‌کلرومتان) برای استخراج فلکسی بیلاید می‌باشد؛ انتخاب حلال مناسب جهت بازیابی متابولیت‌های ثانویه در موجودات دریایی حائز اهمیت است. برای مثال، Cavalcanti و همکاران (2008) با کاربرد دی‌کلرومتان- متانول و استون نتایج متفاوتی را به دست آوردند. همچنین در چندین پژوهش، مخلوطی از این حلال‌ها و نیز اتانول استفاده شد (Siamopoulou et al., 2004). داده‌های منتشر نشده نگارنده (Khalesi, 2007) نیز نشان

دامنه غلظت این ماده از 0/1 تا 0/25 میلی‌گرم در هر گرم از وزن خشک قلمه‌های مرجان متغیر بود. حد بالای این غلظت‌ها برابر با مقادیر یاد شده برای متابولیت‌های ثانویه این گونه در محیط طبیعی می‌باشد (Michalek-Wagner & Bowden, 1997). با این وجود، مقادیر کمتر فلکسی بیلاید در این پژوهش که از قلمه‌های کوچک (4-6 سانتیمتر) استفاده شد ممکن است مطابق با این یافته باشند که غلظت متابولیت‌های ثانویه اصلی در *S. flexibilis* بسته به اندازه کلنی آن فرق می‌کند (Maida et al., 1993). تفاوت‌های موجود در شکل 3، علاوه بر تأثیر احتمالی



بیالاید می‌باشد. با پرورش این گونه و مرجان های مشابه، البته با بالا بردن دانش لازم پیرامون زیست شناسی پرورشی آن‌ها، می‌توان بخشی از نیاز به تولید انبوه این جانوران را جهت بررسی‌ها و کاربردهای زیست فناوری برآورده نمود. با بهره‌گیری از یافته‌های این تحقیق و با توجه به توان بالقوه موجود در آب های جنوبی ایران از نظر گوناگونی مرجان ها و بی مهرگان مشابه، انجام پژوهش های گسترده در این زمینه می‌تواند راهگشای استفاده بیوتکنولوژیکی از این موجودات در آینده گردد.

#### تشکر و قدردانی

از پشتیبانی مالی دولت جمهوری اسلامی ایران برای انجام این تحقیق سپاسگزاری به عمل می‌آید. همچنین نگارنده از همکاری صمیمانه Fred van den End جهت آماده سازی آزمایشگاه و مواد تشکر می‌نماید.

داد که اتانول و متانول در استخراج فلکسی بیالاید کارآمدتر به نظر می‌رسند. گذشته از عوامل موثر در میزان استخراج فلکسی بیالاید در این پژوهش، این یافته مهم است که این گونه مرجان در شرایط پرورش آزمایشگاهی نیز قادر به بیوسنتز متابولیت ثانویه عمده خود به میزان قابل اندازه گیری می‌باشد؛ شناسایی عوامل تأثیرگذار در میزان ترشح این مواد نیاز به تحقیق بیشتری دارد.

#### نتیجه گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که پرورش *S. flexibilis* به عنوان نمونه شاخصی از مرجان‌های نرم با توانایی تولید ترکیبات زیستی مفید، در شرایط مهار شده امکان پذیر است. همچنین، این گونه با بازماندگی بالا و رشد مناسب در شرایط آزمایشگاهی قادر به تولید متابولیت ثانویه عمده خود با نام فلکسی

#### منابع

1. Aceret TL, Sammarco PW, Coll JC, Uchio Y (2001) Discrimination between several diterpenoid compounds in feeding by *Gambusia affinis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 128: 55-63.
2. Alino PM, Coll JC, Sammarco PW (1992) Toxic prey discrimination in a highly specialized predator *Chaetodon melannotus* (Block et Schneider): Visual vs. chemical cues. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 164: 209-220.
3. Anjaneyulu ASR, Sagar KS (1996) Flexibiolide and dihydroflexibiolide, the first trihydroxycembranolide lactones from the soft coral *Sinularia flexibilis* of the Indian Ocean. Natural Products Letters 9:127-135.
4. Anjaneyulu ASR, Sagar KS, Rao GV (1998) New cembranoid lactones from the Indian Ocean soft coral *Sinularia flexibilis*. Journal of Natural Products 60: 9-12.
5. Bastidas C, Fabricius KE, Willis BL (2004) Demographic aspects of the soft coral *Sinularia flexibilis* leading to local dominance on coral reefs. Hydrobiologia 530/531: 433-441.

6. Cavalcanti DN, Vasconcelos MA, Pinto GAC, de Rezende CM, Pereira RC, Teixeira VL (2008). Effects of storage and solvent type in a lipophilic chemical profile of the seaweed *Dictyota menstrualis*. *Brazilian Journal of Oceanography* 56, 1: 51-57.
7. Connell JE (1973) Population ecology of reef building corals, In Jones OA, Endeans R, (Eds.), *Biology and geology of coral reefs*. Academic Press, London, pp. 205– 245.
8. Duh CY, Wang SK, Tseng HK, Sheu JH, Chiang MY (1998) Novel cytotoxic cembranoids from the soft coral *Sinularia flexibilis*. *Journal of Natural Products* 26: 844-847.
9. Durant D (2006) Biological responses of two Caribbean reef-building corals to a pier-generated irradiance gradient. PhD Thesis. University of Puerto Rico.
10. Edmunds PJ, Davies PS (1986) An energy budget for *Porites porites* (Scleractinia). *Marine Biology* 92: 339-347.
11. Fautin DG (2002) Reproduction of Cnidaria. *Canadian Journal of Zoology* 80:1735–1754.
12. Highsmith RC (1982) Reproduction by fragmentation in corals. *Marine Ecology Progress Series* 7: 207–226.
13. 13 Khalesi MK (2008) *Ex situ* cultivation of the soft coral *Sinularia flexibilis* for biotechnological exploitation. Ph.D. Thesis. Wageningen University, Wageningen, the Netherlands.
14. Khalesi MK, Beeftink HH, Wijffels RH (2007) Flow-dependent growth in the zooxanthellate soft coral *Sinularia flexibilis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 351: 106–113.
15. Khalesi MK, Beeftink HH, Wijffels RH (2008) The soft coral *Sinularia flexibilis*: potential for drug development. *Proc. of Advances in Coral Husbandry in Public Aquaria*. Burgers' Zoo, Arnhem, the Netherlands. pp. 47-60.
16. Maida M, Carroll AR, Coll JC (1993) Variability of terpene content in the soft coral *Sinularia flexibilis* (Coelenterata: Octocorallia) and its ecological implications. *Journal of Chemical Ecology* 19: 2285-2296.
17. Mayer AMS, Gustafson KR (2004) Marine pharmacology in 2001–2: antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer* 40: 2676–2704.
18. Michalek-Wagner K, Bowden BF (1997) A natural algacide from soft coral *Sinularia flexibilis* (coelenterata, octocorallia, alcyonacea). *Journal of Chemical Ecology* 23: 259-273.
19. Okubo N, Taniguchi H, Motokawa T (2005) Successful methods for transplanting fragments of *Acropora formosa* and *Acropora hyacinthus*. *Coral Reefs* 24: 333–342.
20. Sanchez J.A (2002) Dynamics and evolution of branching colonial form in marine modular organisms. Ph.D Thesis. State University of New York at Buffalo.
21. Siamopoulou P, Bimplakis A, Iliopoulou D, Vagias C, Cos P, Berghe DV, Roussis V (2004) Diterpenes from the brown algae *Dictyota dichotoma* and *Dictyota linearis*. *Phytochemistry* 65: 2025-2030.
22. Soong K, Chen T (2003) Coral transplantation: regeneration and growth of *Acropora* fragments in a nursery. *Restoration Ecology* 11: 62–71.22.
23. Tsai CH, Liu LL (2005) Effects of light intensity on the morphology and physiology of the soft coral *Pachyclavularia violacea*. Master's Thesis. A publication of Institute of Marine Biology, National Sun Yat-sen University, Taiwan.
24. Vago R, Dubinsky Z, Genin A, Ben-Zion M, Kizner Z (1997) Growth rates of three symbiotic corals in the Red Sea. *Limnology and Oceanography* 42: 1814 -1819.

**A study on the growth and secondary metabolite production in the soft coral  
*Sinularia flexibilis* for biotechnological exploitations**

**Khalesi M.K.\***

Fisheries Department, University of Agricultural Sciences and Natural Resources

**Abstract**

Sessile marine invertebrates produce toxins to deter or kill predators and competitors. In recent years, biomedical exploitation of these bioproducts, organism availability for mass production, and limited stock in their natural habitats have been serious obstacles hindering benefit from these organisms. Cultivation of these invertebrates, is one of various approaches for producing the large biomass required. In this report, results of a preliminary study on the captive symbiotic soft coral *Sinularia flexibilis*, the richest species within its genus, are presented. Using asexual propagation of this species, fragments of the coral were established in a cultivation tank. These coral samples showed absolute survival (100%, n=24) within 16 weeks, high specific growth rates ( $17-21 \times 10^{-3} d^{-1}$ ), and a minimum doubling time of 6 weeks in the laboratory. In addition, biosynthesis of major bioactive compound of this species, flexibilide, continued in a range of 0.1-0.25 mg g<sup>-1</sup> dry weight. Considering high potential of the Iranian southern waters and the diversity of similar marine organisms, it is important to apply marine biotechnology for substantial exploitation of these potential resources.

**Keywords:** *Closed cultivation, Flexibilide, Sinularia flexibilis, Secondary metabolites, Specific growth rate.*

\* Corresponding author: M . K. Khalesi

Tel: 09101000625

Email: [khalesi46@gmail.com](mailto:khalesi46@gmail.com)