

شناسائی مولکولی و آنالیز فیلوژنی زوانتارین‌ها بر اساس نشانگر ITS- rDNA در جزیره لارک، خلیج فارس

- معصومه ولیزاده تالارپشتی: گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
- الهه علی‌عسگری: گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
- آتوسا نوری‌کوپائی*: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، صندوق پستی: ۱۴۵۱۵ /۷۷۵

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۵

چکیده

راسته Zoantharia (Zoantharian) یکی از راسته‌های بسترزی شاخه گزنده‌سانان (Cnidarian) می‌باشد که پراکنش وسیعی در مناطق آبسنگی خلیج فارس دارند. مطالعه حاضر اولین بررسی تنوع زیستی این راسته با استفاده از نشانگر هسته‌ای (ITS- rDNA) در خلیج فارس می‌باشد. بدین منظور پانزده کلنی جمع‌آوری شده از جزیره لارک از آزمایشگاه بیولوژی دریا واحد علوم و تحقیقات تهران تهیه شد. DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت Bio Basic INC استخراج شد. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی زوانتارین جهت تکثیر قطعه ژنی ITS- rDNA انجام شده و محصولات به دست آمده توالی‌یابی شدند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA5 و MrBayes آنالیز شدند. نتایج بررسی فیلوژنی توالی‌های به دست آمده از نشانگر هسته‌ای حاکی از وجود سه گونه *Palythoa aff. mutuki*, *Zoanthus sansibaricus* و *Palythoa tuberculosa* در این منطقه می‌باشد که بررسی پیشین با استفاده از نشانگر میتوکندریایی را تأیید کرد. از آنجایی که ITS کپی‌های متعدد اینتراژنومیک دارد و در نتیجه دارای تنوع بالایی می‌باشد، برخلاف نشانگرهای میتوکندریایی نمی‌توان به‌عنوان DNA barcode استفاده شود ولی استفاده از آن به یقین می‌تواند در تأیید صحت اطلاعات به دست آمده از نشانگرهای میتوکندریایی بسیار کارآمد باشد. توالی‌های به دست آمده از نمونه‌های خلیج فارس تفاوت قابل ملاحظه‌ای با توالی‌های نمونه‌های مشابه در سایر مناطق جهان داشتند. در این راستا بایستی تأثیر شرایط اکولوژیک خلیج فارس بر جهش ژنی در زوانتارین‌ها بررسی گردد.

کلمات کلیدی: ITS-rDNA، زوانتارین، *Palythoa tuberculosa* و *Palythoa aff. mutuki* *Zoanthus sansibaricus*



مقدمه

زوانتارین‌ها (Zoantharia) یک راسته از رده Anthozoa می‌باشند که اغلب به صورت کلنی یافت می‌شوند (Shackleton و Haddon، ۱۸۹۱). این گزنده‌سانان بسترزی به داشتن دو ردیف تتاکل و یک سیفونوگلیف منفرد شکمی شناخته شده‌اند. زوانتارین‌ها به صورت کلنی هستند و پلیپ‌های آن‌ها به وسیله بافت نرمی به نام کونانشیم به هم متصلند (Sinniger و همکاران، ۲۰۰۵). اغلب با ذخیره شن و ماسه در مزوگله خود سبب استحکام ساختار بدنی‌شان می‌شوند. زوانتارین‌ها در مناطق بین جزر و مدی و زیر جزر و مدی نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری حضور دارند و بی‌مهره غالب در این مناطق می‌باشند (Todd و Reimer، ۲۰۰۹). بنابراین مطالعه پراکنش و تنوع زوانتارین‌ها به منظور درک بهتر اکوسیستم آن‌ها، امری ضروری می‌باشد. شناسائی زوانتارین‌ها هم‌چون اغلب گونه‌های جانوری سال‌ها با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک صورت می‌گرفت. لیکن هیچ‌گاه ویژگی‌های مورفولوژیک توانایی شناسایی دقیق و قاطعانه زوانتارین‌ها را نداشتند. تنوع مورفولوژیک بالای درون گونه‌ای (Reimer و همکاران، ۲۰۰۴؛ Burnett و همکاران، ۱۹۹۷؛ ۱۹۹۴)، تغییرات ریختی پلیپ و کلنی تحت شرایط محیطی (Burnett و همکاران، ۱۹۹۷)، ناممکن بودن تهیه مقطع بافت به سبب پوشش شن و ماسه (Reimer و همکاران، ۲۰۱۰) و نبود معیارهای صحیح جهت تفکیک گونه‌ها از مهم‌ترین مشکلات شناسائی مورفولوژیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پانزده نمونه جمع آوری شده از زوانتارین‌های جزیره لارک (شکل ۱) که پیش از این شناسائی‌های مولکولی با استفاده از نشانگرهای میتوکندریائی روی آن‌ها انجام شده است (Noori Koupaei و همکاران، ۲۰۱۵)، از آزمایشگاه بیولوژی دریا واقع در مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی واحد علوم و تحقیقات تهران تهیه شد (جدول ۱). ایستگاه‌های نمونه‌برداری در شکل ۲ نشان داده شده است. آزمایشات در تابستان و پائیز ۱۳۹۴ انجام گرفت.

استخراج DNA با استفاده از کیت Bio Basic INC انجام شد. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) جهت تکثیر قطعه ژنی ITS- rDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی زوانتارین‌ها، آغازگر پیشین (3'-GT GGA GAG TTA CAT GAT CTT-5') و آغازگر پسین (3'-ATT TGAGCT-5') (Reimer و همکاران، ۲۰۰۷c) انجام گرفت. هر واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتری با استفاده از Master Mix شرکت Ampliqon انجام گردید. برنامه حرارتی برای واکنش مورد نظر شامل: مرحله واسرشته‌سازی اولیه: ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و مرحله واسرشته‌سازی: ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله الحاق: ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط: ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و نهایتاً مرحله بسط نهائی: ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و تعداد چرخه‌ها ۳۳ چرخه در نظر گرفته شد. محصولات تکثیر شده (PCR) به همراه مارکر سایز ۱۰۰bp بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی رنگ DNA Safe Green الکتروفورز شدند. پس از ثبت تصاویر

زوانتارین‌ها (Zoantharia) یک راسته از رده Anthozoa می‌باشند که اغلب به صورت کلنی یافت می‌شوند (Shackleton و Haddon، ۱۸۹۱). این گزنده‌سانان بسترزی به داشتن دو ردیف تتاکل و یک سیفونوگلیف منفرد شکمی شناخته شده‌اند. زوانتارین‌ها به صورت کلنی هستند و پلیپ‌های آن‌ها به وسیله بافت نرمی به نام کونانشیم به هم متصلند (Sinniger و همکاران، ۲۰۰۵). اغلب با ذخیره شن و ماسه در مزوگله خود سبب استحکام ساختار بدنی‌شان می‌شوند. زوانتارین‌ها در مناطق بین جزر و مدی و زیر جزر و مدی نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری حضور دارند و بی‌مهره غالب در این مناطق می‌باشند (Todd و Reimer، ۲۰۰۹). بنابراین مطالعه پراکنش و تنوع زوانتارین‌ها به منظور درک بهتر اکوسیستم آن‌ها، امری ضروری می‌باشد. شناسائی زوانتارین‌ها هم‌چون اغلب گونه‌های جانوری سال‌ها با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک صورت می‌گرفت. لیکن هیچ‌گاه ویژگی‌های مورفولوژیک توانایی شناسایی دقیق و قاطعانه زوانتارین‌ها را نداشتند. تنوع مورفولوژیک بالای درون گونه‌ای (Reimer و همکاران، ۲۰۰۴؛ Burnett و همکاران، ۱۹۹۷؛ ۱۹۹۴)، تغییرات ریختی پلیپ و کلنی تحت شرایط محیطی (Burnett و همکاران، ۱۹۹۷)، ناممکن بودن تهیه مقطع بافت به سبب پوشش شن و ماسه (Reimer و همکاران، ۲۰۱۰) و نبود معیارهای صحیح جهت تفکیک گونه‌ها از مهم‌ترین مشکلات شناسائی مورفولوژیک می‌باشد.

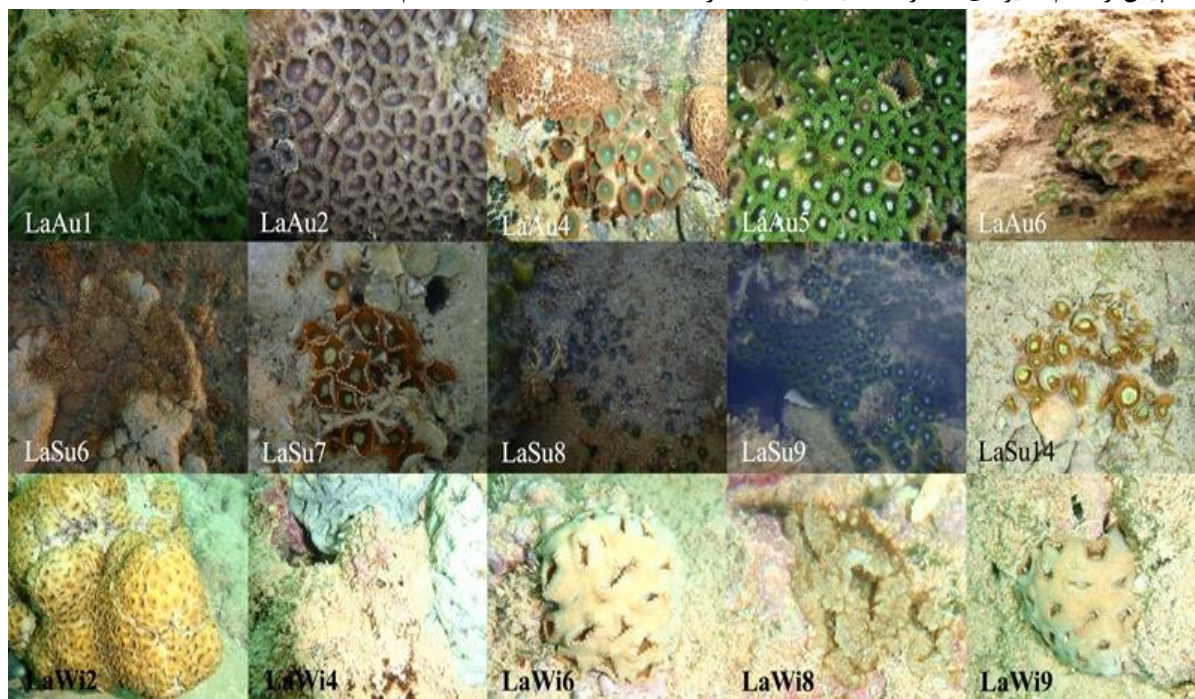
اکنون دو دهه از مطرح شدن روش‌های ژنتیک مولکولی می‌گذرد و استفاده از روش‌های فیلوژنتیک مولکولی راه نوینی برای سامان‌دهی به تاکسونومی زوانتارین‌ها گشوده است. روش‌های مولکولی برای تفکیک گونه‌های بین بی‌مهرگان دریائی به کار می‌رود. مطالعات ژنتیکی نشان داده است که برخی گونه‌های متفاوت در واقع یک گونه با ویژگی‌های مورفولوژیک متفاوت هستند (Knowlton، ۲۰۰۰). بازنگری مجدد گونه‌های زوانتارین‌ها با استفاده از فیلوژنی نشانگرهای مولکولی DNA، شناسایی خانواده‌ها (Sinniger و همکاران، ۲۰۱۰؛ Reimer و همکاران، ۲۰۰۷a)، جنس‌ها (Sinniger و همکاران، ۲۰۱۳؛ ۲۰۱۰؛ Fujii و Reimer، ۲۰۱۰) و گونه‌های جدید (Noori Koupaei و همکاران، ۲۰۱۵؛ Sinniger و Haussermann، ۲۰۰۹) از این راسته جانوری را به‌دنبال داشته است.

یکی از مناطق دنیا که مطالعه روی زوانتارین‌ها آن در سال‌های اخیر آغاز شده است، خلیج فارس می‌باشد. خلیج فارس منطقه‌ای نیمه-گرمسیری است و جوامع آبسنگی مرجانی در اغلب جزایر ایرانی آن حضور دارند. در نتیجه زوانتارین‌ها در این منطقه پراکنش گسترده‌ای دارند. نوسانات دمایی و شوری بالای خلیج فارس (Fadlallah و Coles،

برنامه MrModeltest (Nylander, ۲۰۰۴) و بر اساس معیار اطلاعاتی AIC (Akaike Information Criterion) مدل‌های مناسب برای داده‌های مورد نظر، انتخاب شدند. طبق این آزمون مدل GTR (General- Reversible) G+Time (Rodriguez و همکاران، ۱۹۹۰) برای توالی‌های ITS انتخاب شد. آنالیز ML برای داده‌های به دست آمده همراه با توالی مرجع با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 (Tamure و همکاران، ۲۰۱۲) و تعداد بوت استرپ ۱۰۰۰ انجام گرفت. آنالیز Bayesian نیز با نرم‌افزار MrBayes نسخه ۳/۲ (Ronquist و Huelsenbeck، ۲۰۰۳) انجام شد.

ژل‌ها توسط دستگاه Gel Documentation، اندازه و کیفیت نمونه‌ها مشخص گردید. نهایتاً محصولات PCR مناسب جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

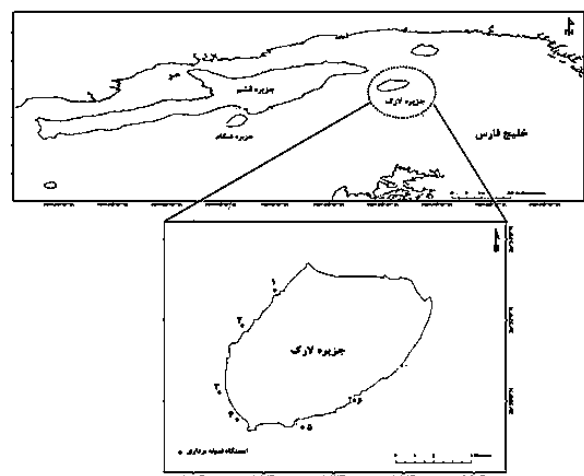
توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار CLUSTALW (Thompson و همکاران، ۱۹۹۴) با یکدیگر هم‌ردیف گردیدند. جهت شناسایی نمونه‌ها از توالی‌های ثبت شده در بانک ژن جهانی استفاده شد. آنالیز فیلوژنی پس از تشکیل ماتریس داده‌ها، با استفاده از روش بیشینه احتمال (Maximum Likelihood) و روش Bayesian انجام شد. پیش از انجام آنالیزهای ML و Bayesian با استفاده از نسخه ۲/۳



شکل ۱: تصویر زوئانتارین‌های بررسی شده در مطالعه حاضر

نتایج

پانزده محصول به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز طولی حدود ۱۰۰۰ bp داشتند. توالی‌های حاصل از محصولات PCR با توالی‌های گزارش شده پیشین هم‌ردیف (align) شدند. هم‌ردیفی توالی‌ها نشان داد که نمونه‌های LaSu14, LaSu7, LaWi8, LaWi4 بر یکدیگر منطبق بودند. نمونه‌های LaSu6, LaWi9, LaWi6, LaWi2 بیش‌ترین شباهت را با توالی‌های *Palythoa tuberculosa* (DQ997893, DQ997931, KM032402) نشان دادند، نمونه‌های LaSu9, LaSu8, LaAu2, LaAu6, LaAu5, LaAu1, AB214152, AB14154) *Zoanthus sansibaricus* را به گونه (AB214151, AB214145) دارا بودند. پس از ترسیم درخت دو کلا



شکل ۲: ایستگاه‌های نمونه‌برداری در جزیره لارک

جدول ۱: نام نمونه‌ها و نتایج شناسایی آن‌ها با استفاده از

نشانگرهای میتوکندریایی و نشانگر هسته‌ای

نام نمونه‌ها	شناسایی نمونه‌ها با استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی (Noori و Koupaei و همکاران، ۲۰۱۵)	شناسایی نمونه‌ها با استفاده از نشانگر هسته‌ای
LaAu1	<i>Zoanthus sansibaricus</i>	<i>Zoanthus sansibaricus</i>
LaAu2	<i>Zoanthus sansibaricus</i>	<i>Zoanthus sansibaricus</i>
LaAu5	<i>Zoanthus sansibaricus</i>	<i>Zoanthus sansibaricus</i>
LaAu6	<i>Zoanthus sansibaricus</i>	<i>Zoanthus sansibaricus</i>
LaSu8	<i>Zoanthus sansibaricus</i>	<i>Zoanthus sansibaricus</i>
LaSu9	<i>Zoanthus sansibaricus</i>	<i>Zoanthus sansibaricus</i>
LaSu6	<i>Palythoa tuberculosa</i>	<i>Palythoa tuberculosa</i>
LaWi2	<i>Palythoa tuberculosa</i>	<i>Palythoa tuberculosa</i>
LaWi6	<i>Palythoa tuberculosa</i>	<i>Palythoa tuberculosa</i>
LaWi9	<i>Palythoa tuberculosa</i>	<i>Palythoa tuberculosa</i>
LaWi4	<i>Palythoa aff. mutuki</i>	<i>Palythoa aff. mutuki</i>
LaWi8	<i>Palythoa aff. mutuki</i>	<i>Palythoa aff. mutuki</i>
LaSu7	<i>Palythoa aff. mutuki</i>	<i>Palythoa aff. mutuki</i>
LaSu14	<i>Palythoa aff. mutuki</i>	<i>Palythoa aff. mutuki</i>
LaAu4	<i>Palythoa aff. mutuki</i>	<i>Palythoa aff. mutuki</i>

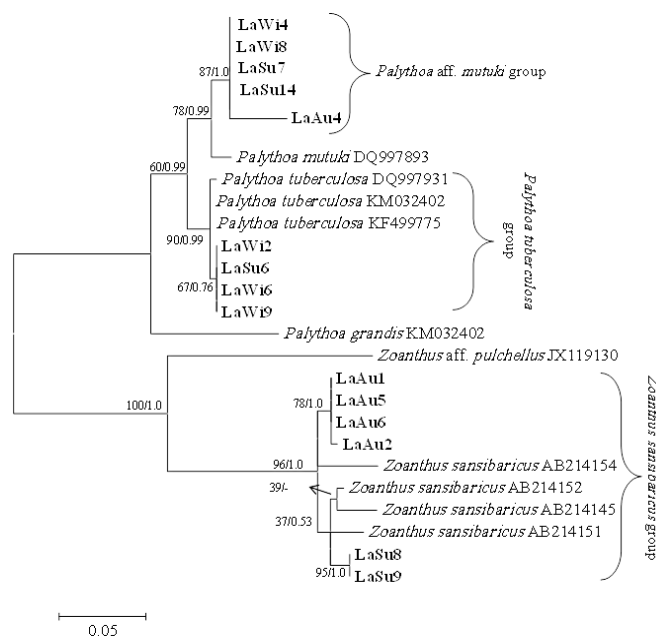
جنس *Zoanthus* و *Palythoa* از یکدیگر تفکیک شدند. دو کلاد *Zoanthus* و *Palythoa* با اعتبار ۱۰۰۰ و احتمال پسین‌پشتیبانی را تشکیل دادند. کلاد گونه *Palythoa aff. mutuki* با اعتبار ۸۷٪ و احتمال پسین‌پشتیبانی شدند. گونه *Palythoa mutuki* (DQ997893) در پایه این کلاد قرار داشت. توالی‌های حاصل از نمونه‌های LaWi2، LaSu6، LaWi9، LaWi6، LaSu6، LaWi9، LaWi6، *Palythoa tuberculosa* کلاد مشترک تشکیل دادند که با اعتبار ۹۰٪ و احتمال پسین‌پشتیبانی شدند. توالی‌های حاصل از نمونه‌های LaSu8، LaSu9 کاملاً بر یکدیگر منطبق بودند و توالی‌های LaAu2، LaAu1، LaAu6، LaAu5 نیز به یکدیگر شباهت کامل داشتند. مجموع این توالی‌ها با توالی‌های گزارش شده از گونه *Zoanthus sansibaricus* کلاد مشترک تشکیل دادند که با اعتبار ۹۶٪ و احتمال پسین‌پشتیبانی شدند (شکل ۳). نتایج نهایی شناسایی گونه‌ها در جدول ۱ ذکر گردیده است.

بحث

پس از توالی‌یابی قطعه ژنی هسته‌ای ITS حضور سه گونه از زوانتارین‌های جزیره لارک در خلیج فارس تأیید شد. این توالی‌ها در مقایسه با توالی‌های میتوکندریایی تنوع بسیار بالاتری را نشان داد. هم‌ردیفی این توالی‌ها با توالی‌های گزارش شده پیشین نشان داد که گونه‌های گزارش شده از خلیج فارس تفاوت قابل ملاحظه‌ای در توالی قطعه ژنی (ITS-rDNA) با توالی‌های گزارش شده از این گونه‌ها در مناطق دیگر دارند، درحالی‌که توالی‌های میتوکندریایی دو گونه *Zoanthus sansibaricus* و *Palythoa tuberculosa* با توالی‌های به‌دست آمده از این گونه‌ها در سایر مناطق جهان کاملاً منطبق بودند (Noori Koupaei و همکاران، ۲۰۱۴؛ ۲۰۱۵).

قرار دادن توالی‌های به‌دست آمده از نشانگر هسته‌ای و رسم درخت فیلوژنی بر مبنای آن‌ها توانست ارتباط بین گونه‌ها را آشکار کند. درخت فیلوژنی ترسیم شده هر سه گونه *Zoanthus Palythoa aff. mutuki*، *Palythoa tuberculosa* و *sansibaricus* استراپ (اعتبار) و احتمال پسین (شکل ۳) حمایت شد.

با توجه به این‌که توالی‌های هر سه گونه بیان شده با توالی‌های پیشین کاملاً منطبق نبودند، ترسیم درخت فیلوژنی نشان داد که نمونه‌های *Zoanthus sansibaricus* و *Palythoa tuberculosa* با توالی گزارش پیشین یک کلاد را تشکیل دهند و نمونه‌های *Palythoa aff. mutuki* با یکدیگر کلادی جداگانه را تشکیل دادند و گونه



شکل ۳: درخت Maximum Likelihood از قطعه ژنی ITS-rDNA

نام نمونه‌های مطالعه حاضر به صورت پررنگ و نام گونه‌های شاهد به صورت ایتالیک همراه با شماره مسلسل آن‌ها در بانک ژنی مشخص گردیده است. درصدای بوت استراپ (اعتبار) حداکثر احتمال از ۱۰۰۰ درخت/احتمال پسین بر روی شاخه‌ها نشان داده شده است.

۴. **Haddon, A.C. and Shackleton, A.M., 1891.** A revision of the British Actiniae, Part 2. The Zoantheae. Royal Dublin Society. Vol. 4, pp: 609-672.
۵. **Knowlton, N., 2000.** Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia*. Vol. 420, pp: 73-90.
۶. **Noori Koupaei, A.; Ghavam Mostafavi, P.; Fallah Mehrabadi, J. and Fatemi, S.M.R., 2014.** Molecular diversity of coral reef-associated zoanthids off Qeshm Island, northern Persian Gulf. *International Aquatic Research*. Vol. 6, pp: 1-10.
۷. **Noori Koupaei, A.; Mostafavi, P.G.; Fallah Mehrabadi, J.; Fatemi, S.M.R. and Dehghani, H., 2015.** Diversity of shallow water zoantharians in Hengam and Larak Islands, in the Persian Gulf. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. pp: 1-11. FirstView.
۸. **Nylander, J., 2004.** MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. ۲.
۹. **Pous, S.; Carton, X. and Lazure, P., 2004.** Hydrology and circulation in the Strait of Hormuz and the Gulf of Oman-Results from the GOGP99 Experiment: 2. Gulf of Oman. *Journal of Geophysical Research: Oceans* (1978–2012). 109 p.
۱۰. **Reimer, J.D. and Fujii, T., 2010.** Four new species and one new genus of zoanthids (Cnidaria: Hexacorallia) from the Galapagos. *ZooKeys*. Vol. 42, pp: 1-36.
۱۱. **Reimer, J.D.; Nakechi, S.; Hirose, M.; Hirose, E. and Hashiguchi, S., 2010.** Using hydrofluoric acid for morphological investigations of zoanthids (Cnidaria: Anthozoa): a critical assessment of methodology and necessity. *Marine Biotechnology*. Vol. 12, pp: 605-617.
۱۲. **Reimer, J.D.; Ono, S.; Fujiwara, Y.; Takishita, K. and Tsukahara, J., 2004.** Reconsidering *Zoanthus* spp. diversity: molecular evidence of conspecificity within four previously presumed species. *Zoological Science*. Vol. 21, pp: 517-525.
۱۳. **Reimer, J.D.; Sinniger, F.; Fujiwara, Y.; Hirano, S. and Maruyama, T., 2007a.** Morphological and molecular characterisation of *Abyssoanthus nankaiensis*, a new family, new genus and new species of deep-sea zoanthid (Anthozoa: Hexacorallia: Zoantharia) from a north-west Pacific methane cold seep. *Invertebrate Systematics*. Vol. 21, pp: 255-262.
۱۴. **Reimer, J.D. and Todd, P.A., 2009.** Preliminary molecular examination of zooxanthellate zoanthid (Hexacorallia, Zoantharia) and associated zooxanthellae (*Symbiodinium* spp.) diversity in Singapore. *Raffles Bulletin of Zoology*. Vol. 22, pp: ۱۰۳-۱۲۰.
۱۵. **Reimer, J.D.; Takishita, K.; Ono, S. and Maruyama, T., ۲۰۰۷b.** Diversity and evolution in the zoanthid genus *Palythoa* (Cnidaria: Hexacorallia) utilizing nuclear ITS-rDNA. *Coral Reefs*. Vol. 26, pp: 399-410.
۱۶. **Reimer, J.D.; Takishita, K.; Ono, S.; Tsukahara, J. and Maruyama, T., 2007c.** Molecular evidence suggesting intraspecific hybridization in *Zoanthus* (Anthozoa: Hexacorallia). *Zoological Science*, Vol. 24 pp: 346-359.
- در پایه این کلاد قرار داشت. نشانگر ITS با تنوع بسیار بالای خود نتوانست گونه‌ها را به درستی از یکدیگر تفکیک کند، لیکن با رسم درخت فیلوژنی به سبب تفکیک گونه‌ها در کلادهای اصلی تا حدودی مرزهای گونه‌ای مشخص شد. پیش از این Reimer و همکاران (۲۰۰۷b، ۲۰۰۷c) نیز با مطالعه روی این نشانگر در دو جنس *Zoanthus* و *Palythoa* تنوع بالای درون گونه‌ای این قطعه ژنی را بیان کردند. به همین دلیل در اغلب مطالعات فیلوژنیک نشانگر هسته‌ای همراه با دو نشانگر میتوکندریایی بررسی می‌گردد. از آنجایی که ITS کپی‌های متعدد اینتراژنومیک دارد و در نتیجه دارای تنوع بالایی می‌باشد، برخلاف نشانگرهای میتوکندریایی نمی‌توان از آن به عنوان DNA barcode استفاده کرد ولی استفاده از آن به یقین می‌تواند در تأیید اطلاعات به دست آمده از نشانگرهای میتوکندریایی بسیار کارآمد باشد.
- گونه *Palythoa* aff. *mutuki* گونه‌ای جدید بوده که برای اولین بار توسط Noori Koupaei و همکاران (۲۰۱۵) و با استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی شناسایی و گزارش شد. استفاده از نشانگر هسته‌ای و ترسیم درخت فیلوژنی براساس آن نشان داد که نمونه‌های *Palythoa* aff. *mutuki* کلادی مستقل از یکدیگر را تشکیل دادند. در نتیجه تاکنون دو نشانگر میتوکندریایی با نرخ تکاملی آهسته و یک نشانگر هسته‌ای با نرخ تکاملی سریع صحت جدید بودن این گونه را اثبات کرده‌اند.
- در پایان بایستی مجدداً این نکته را یادآور شد که توالی‌های نشانگر ITS- rDNA تفاوت قابل ملاحظه‌ای با توالی‌های گونه‌های مشابه در سایر مناطق جهان داشتند که برای پی بردن به علل این امر بایستی تأثیر شرایط اکولوژیک خلیج فارس بر جهش ژنی در زواتارین‌ها بررسی گردد.

منابع

- Burnett, W.; Benzie, J.; Beardmore, J. and Ryland, J., 1994.** High genetic variability and patchiness in a common Great Barrier Reef zoanthid (*Palythoa caesia*). *Marine Biology*. Vol. ۱۲۱, pp: ۱۵۳-۱۶۰.
- Burnett, W.; Benzie, J.; Beardmore, J. and Ryland, J., 1997.** Zoanthids (Anthozoa, Hexacorallia) from the Great Barrier Reef and Torres Strait, Australia: systematics, evolution and a key to species. *Coral Reefs*. Vol. 16, pp: 55-68.
- Coles, S.L. and Fadlallah, Y.H., 1991.** Reef coral survival and mortality at low temperatures in the Arabian Gulf: new species specific lower temperature limits. *Coral Reefs*. Vol. 9, pp: ۲۳۱-۲۳۷.



۱۷. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. Vol. 19, pp: 1572-1574.
۱۸. **Rodriguez, F.; Oliver, J.; Marin, A. and Medina, J.R., 1990.** The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*. Vol. 142, pp: 485-501.
۱۹. **Sheppard, C.R. and Sheppard, A.S., 1991.** Corals and coral communities of Arabia. *Fauna Saudi Arabia*, Vol. 12, pp: 3-170.
۲۰. **Sinniger, F. and Haussermann, V., 2009.** Zoanthids (Cnidaria: Hexacorallia: Zoantharia) from shallow waters of the southern Chilean fjord region, with descriptions of a new genus and two new species. *Organisms, Diversity and Evolutio*. Vol. ۹, pp: ۲۳-۳۶.
۲۱. **Sinniger, F.; Montoya-Burgos, J.; Chevaldonne, P. and Pawlowski, J., 2005.** Phylogeny of the order Zoantharia (Anthozoa, Hexacorallia) based on the mitochondrial ribosomal genes. *Marine Biology*. Vol. 147, pp: 1121-1128.
۲۲. **Sinniger, F.; Ocana, O.V. and Baco, A.R., 2013.** Diversity of zoanthids (Anthozoa: Hexacorallia) on Hawaiian seamounts: description of the Hawaiian gold coral and additional zoanthids. *PLoS ONE*. Vol. 8, pp: 1-13.
۲۳. **Sinniger, F.; Reimer, J.D. and Pawlowski, J., 2010.** The Parazoanthidae (Hexacorallia: Zoantharia) DNA taxonomy: description of two new genera. *Marine Biodiversity*. Vol. 40, pp: 57-70.
۲۴. **Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S., 2011.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 28, pp: 2731-2739.
۲۵. **Thompson, J.D.; Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. Vol. 22, pp: 4673-4680.

