

## شناسایی 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 نوری کوپایی\*: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، صندوق پستی: 14515 /775

تاریخ پذیرش: مرداد 1395

تاریخ دریافت: اردیبهشت 1395

### چکیده

راسته *Zoantharia* (Zoantharian) یکی از راسته‌های بسترزی شاخه گزنه‌سانان (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 *Zoanthus sansibaricus*، *Palythoa aff. mutuki* و *Palythoa tuberculosa* در این منطقه می‌باشد که بررسی پیشین با استفاده از نشانگر میتوکندریایی را تأیید کرد. از آن جایی که ITS کپی‌های متعدد اینتراژنومیک دارد و در نتیجه دارای تنوع بالایی می‌باشد، برخلاف نشانگرهای میتوکندریایی نمی‌توان به عنوان 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، *Zoanthus sansibaricus*، *Palythoa aff. mutuki* و *Palythoa tuberculosa*

### مقدمه

زوانتارین‌ها به منظور درک بهتر اکوسیستم آن‌ها، امری ضروری می‌باشد. شناسایی 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 (Burnett و همکاران، 1994، 1997؛ Reimer و همکاران، 2004)، تغییرات ریختی پلیپ و کلنی تحت شرایط محیطی (Burnett و همکاران، 1997)، ناممکن بودن تهیه مقطع بافت به سبب پوشش شن و ماسه (Reimer و همکاران، 2010) و نبود معیارهای صحیح جهت تفکیک گونه‌ها از مهمترین مشکلات شناسایی مورفولوژیک می‌باشد.

زوانتارین‌ها (*Zoantharia*) یک راسته از رده Anthozoa می‌باشند که اغلب به صورت کلنی یافت می‌شوند (Haddon و Shackleton، 1891). این گزنه‌سانان بسترزی به داشتن دوردیف تتناکل و یک سیفونوگلیف منفرد شکمی شناخته شده‌اند. زوانتارین‌ها به صورت کلنی هستند و پلیپ‌های آن‌ها به وسیله بافت نرمی به نام کونانشیم به هم متصل‌اند (Sinniger و همکاران، 2005). 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 نیمه-گرمسیری حضور دارند و بی‌مهره غالب در این مناطق می‌باشند (Todd و Reimer، 2009). بنابراین مطالعه پراکنش و تنوع

در مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی واحد علوم و تحقیقات تهران تهیه شد (جدول 1). ایستگاه‌های نمونه‌برداری در شکل 2 نشان داده شده است. آزمایشات در تابستان و پائیز 1394 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 (5'-CTT GAT CAT TTA GAG GGA GT-3') و آغازگر پسین (5'-CGG AGA TTT CAA ATT TGAGCT-3') (Reimer و همکاران، 2007c) انجام گرفت. هر واکنش در حجم 25 میکرولیتری با استفاده از Master Mix شرکت Ampliqon انجام گردید. برنامه حرارتی برای واکنش مورد نظر شامل: مرحله واسرشته‌سازی اولیه: 94 درجه سلسیوس به مدت 5 دقیقه و مرحله واسرشته‌سازی: 45 درجه سلسیوس به مدت 1 دقیقه، مرحله الحاق: 52 درجه سلسیوس به مدت 1 دقیقه، مرحله بسط: 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه و نهایتاً مرحله بسط نهایی: 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه و تعداد چرخه‌ها 33 چرخه در نظر گرفته شد. محصولات تکثیر شده (PCR) به همراه مارکر سایز 100bp بر روی ژل آگارز 1/5 درصد حاوی رنگ DNA Safe Green الکتروفورز شدند. پس از ثبت تصاویر ژل‌ها توسط دستگاه Gel Documentation، اندازه و کیفیت نمونه‌ها مشخص گردید. نهایتاً محصولات PCR مناسب جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

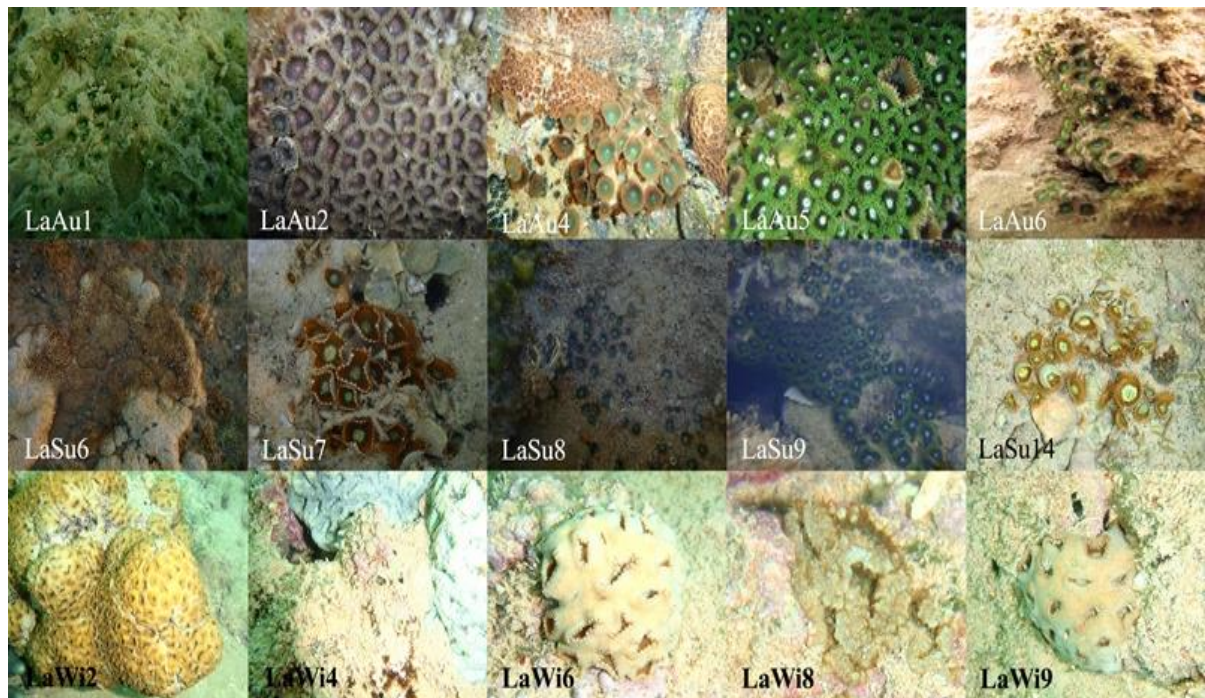
توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار CLUSTALW (Thompson و همکاران، 1994) با یکدیگر هم‌ردیف گردیدند. جهت شناسایی نمونه‌ها از توالی‌های ثبت شده در بانک ژن جهانی استفاده شد. آنالیز فیلوژنی پس از تشکیل ماتریس داده‌ها، با استفاده از روش بیشینه احتمال (Maximum Likelihood) و روش Bayesian انجام شد. پیش از انجام آنالیزهای ML و Bayesian با استفاده از نسخه 2/3 برنامه MrModeltest (Nylander، 2004) و بر اساس معیار اطلاعاتی AIC (Akaike Information Criterion) مدل‌های مناسب برای داده‌های مورد نظر، انتخاب شدند. طبق این آزمون مدل GTR (General-Time- Reversible) (Rodriguez و همکاران، 1990) برای توالی‌های ITS انتخاب شد. آنالیز ML برای داده‌های به دست آمده همراه با توالی مرجع با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 (Tamura و همکاران، 2012) و تعداد بوت استرپ 1000 انجام گرفت. آنالیز Bayesian نیز با نرم‌افزار MrBayes نسخه 3/2 (Ronquist و Huelsenbeck، 2003) انجام شد.

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 گونه‌ای بین بی‌مهرگان دریایی به کار می‌رود. مطالعات ژنتیکی نشان داده است که برخی گونه‌های متفاوت در واقع یک گونه با ویژگی‌های مورفولوژیک متفاوت هستند (Knowlton، 2000). بازنگری مجدد گونه‌های زوانتارین‌ها با استفاده از فیلوژنی نشانگرهای مولکولی DNA، شناسایی خانواده‌ها (Reimer و همکاران، 2007a؛ Sinniger و همکاران، 2010)، جنس‌ها (Reimer و Fujii، 2010؛ Sinniger و همکاران، 2010، 2013) و گونه‌های جدید (Sinniger و Haussermann، 2009؛ Noori Koupaei و همکاران، 2015) از این راسته جانوری را به دنبال داشته است.

یکی از مناطق دنیا که مطالعه روی زوانتارین‌ها آن در سال‌های اخیر آغاز شده است، خلیج فارس می‌باشد. خلیج فارس منطقه‌ای نیمه‌گرمسیری 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 (Sheppard و Sheppard، 1991؛ Coles و Fadlallah، 1991) همراه با ارتباطات محدود آبی از طریق تنگه هرمز (Pous و همکاران، 2004) این پیکره آبی نیمه بسته را تبدیل به اکوسیستم منحصر به فردی کرده است. از آنجایی که شرایط اکولوژیک سخت در خلیج فارس همواره بر تنوع زیستی این منطقه تأثیر گذاشته است لزوم مطالعه زوانتارین‌ها به عنوان سومین راسته بزرگ گزنه‌سانان امری ضروری به نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر مطالعاتی با هدف شناسایی مولکولی زوانتارین‌ها بر اساس نشانگرهای میتوکندریایی در ناحیه شمالی خلیج فارس صورت گرفته است (Noori Koupaei و همکاران، 2014)، از آنجائیکه نشانگرهای میتوکندریایی در آنتوزوان‌ها حفاظت شده می‌باشند، تنوع بالایی را نشان نمی‌دهند مطالعه حاضر با هدف تکمیل مطالعه پیشین برای اولین بار به بررسی زوانتارین‌های خلیج فارس با استفاده از نشانگر هسته‌ای می‌پردازد. نشانگر هسته‌ای از آنجایی که حفاظت شده نیست روابط فیلوژنتیک را با دقت بیشتری نشان می‌دهد.

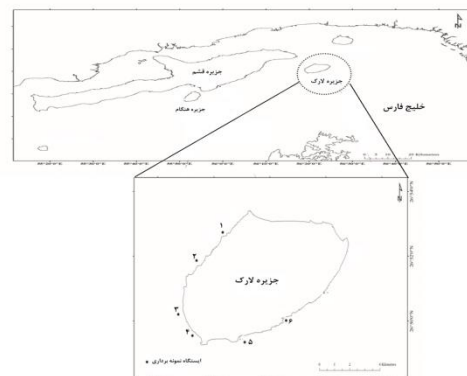
## مواد و روش‌ها

پانزده نمونه جمع آوری شده از زوانتارین‌های جزیره لارک (شکل 1) که پیش از این شناسایی‌های مولکولی با استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی روی آن‌ها انجام شده است (Noori Koupaei و همکاران، 2015)، از آزمایشگاه بیولوژی دریا واقع



شکل 1: تصویر زوانتارین‌های بررسی شده در مطالعه حاضر

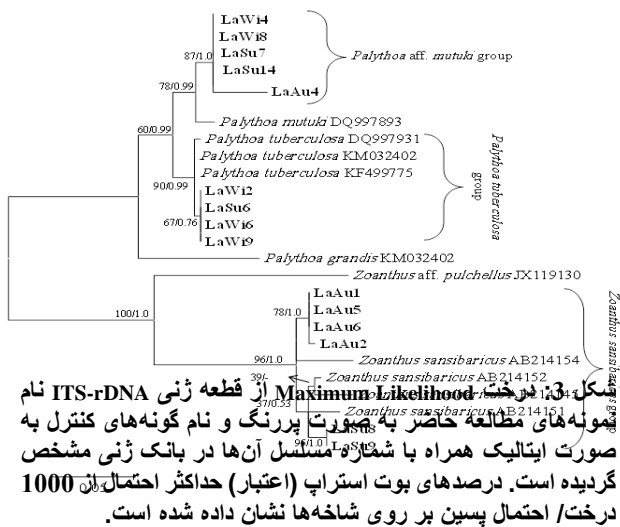
کلاد گونه *Palythoa* aff. *mutuki* با اعتبار 87 درصد و احتمال پسین 1 پشتیبانی شدند. گونه *Palythoa mutuki* (DQ997893) در پایه این کلاد قرار داشت. توالی‌های حاصل از نمونه‌های LaWi2، LaSu6، LaSu7، LaSu8، LaSu9، LaWi6، LaWi9، LaSu6، LaSu8 و احتمال پسین 0/99 پشتیبانی شدند. توالی‌های حاصل از نمونه‌های LaSu8، LaSu9 کاملاً بر یکدیگر منطبق بودند و توالی‌های LaAu1، LaAu2، LaAu5، LaAu6 نیز به یکدیگر شباهت کامل داشتند. مجموع این توالی‌ها با توالی‌های گزارش شده از گونه *Zoanthus sansibaricus* کلاد مشترک تشکیل دادند که با اعتبار 96 درصد و احتمال پسین 1 پشتیبانی شدند (شکل 3). نتایج نهایی شناسایی گونه‌ها در جدول 1 ذکر گردیده است.



شکل 2: ایستگاه‌های نمونه برداری در جزیره لارک

## نتایج

پانزده محصول به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز طولی حدود 1000 bp داشتند. توالی‌های حاصل از محصولات PCR با توالی‌های گزارش شده پیشین هم ردیف (align) شدند. هم ردیفی توالی‌ها نشان داد که نمونه‌های LaWi4، LaWi7، LaSu7، LaSu14 بر یکدیگر منطبق بودند. نمونه‌های LaWi2، LaWi6، LaWi9، LaSu6 بیشترین شباهت را با توالی‌های *Palythoa tuberculosa* (DQ997893، DQ997931، KM032402) نشان دادند، نمونه‌های LaAu1، LaAu5، LaAu6، LaAu2، LaSu8، LaSu9 نیز بیشترین شباهت را به گونه *Zoanthus sansibaricus* (AB214151، AB214145، AB214152، AB14154) دارا بودند. پس از ترسیم درخت دو کلاد جنس *Palythoa* و *Zoanthus* با اعتبار یکدیگر تفکیک شدند. دو کلاد *Palythoa* و *Zoanthus* با اعتبار 1000 و احتمال پسین 1 پشتیبانی شدند. نمونه‌های LaSu14، LaSu7، LaWi8، LaWi4



جدول 1: نام نمونه‌ها و نتایج شناسایی آن‌ها با استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی و نشانگر هسته‌ای

نام نمونه‌ها	شناسایی نمونه‌ها با استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی (Noori Koupaei و همکاران، 2015)	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>

## 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، در حالی که توالی‌های میتوکندریایی دو گونه *Palythoa tuberculosa* و *Zoanthus sansibaricus* با توالی‌های به دست آمده از این گونه‌ها در سایر مناطق جهان کاملاً منطبق بودند (Noori Koupaei و همکاران، 2014، 2015). قرار دادن توالی‌های به دست آمده از نشانگر هسته‌ای و رسم درخت فیلوژنی بر مبنای آن‌ها توانست ارتباط بین گونه‌ها را آشکار کند. در درخت فیلوژنی ترسیم شده هر سه گونه *Palythoa tuberculosa*، *Zoanthus sansibaricus*، *Palythoa aff. mutuki* کلاسی جداگانه را تشکیل دادند و هر کلاسی با ارزش‌های بالایی از بوت استرپ (اعتبار) و احتمال پسین (شکل 3) حمایت شد. با توجه به این که 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 کلاسی را تشکیل دهند و نمونه‌های *Palythoa aff. mutuki* با یکدیگر کلاسی جداگانه را تشکیل دادند و گونه *Palythoa mutuki* (DQ997893) در پایه این کلاسی 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 کلاسه‌های اصلی تا حدودی مرزهای گونه‌ای مشخص شد. پیش از این Reimer و همکاران (2007b، 2007c) 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 آن جایی که ITS کپی‌های متعدد اینترژنومیک 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 در سال 2015 توسط Noori Koupaei و همکاران و با استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی شناسایی و گزارش شد. استفاده از نشانگر هسته‌ای و ترسیم درخت فیلوژنی بر اساس آن نشان داد که نمونه‌های *Palythoa aff. mutuki* کلاسی 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 زوانتارین‌ها 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. 121, pp: 153-160.
- 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: 231-237.
- Haddon, A.C. and Shackleton, A.M., 1891. A revision of the British Actinia, Part 2. The Zoantheae. Royal Dublin Society, Vol. 4, pp: 609-672.
- Knowlton, N., 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia*, Vol. 420, pp: 73-90.
- 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.

- genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 28, pp: 2731-2739.
25. **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.
  7. **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.
  8. **Nylander, J., 2004.** MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2.
  9. **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.
  10. **Reimer, J.D. and Fujii, T., 2010.** Four new species and one new genus of zoanths (Cnidaria: Hexacorallia) from the Galapagos. *ZooKeys*, Vol. 42, pp: 1-36.
  11. **Reimer, J.D.; Nakechi, S.; Hirose, M.; Hirose, E. and Hashiguchi, S., 2010.** Using hydrofluoric acid for morphological investigations of zoanths (Cnidaria: Anthozoa): a critical assessment of methodology and necessity. *Marine Biotechnology*, Vol. 12, pp: 605-617.
  12. **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.
  13. **Reimer, J.D.; Sinniger, F.; Fujiwara, Y.; Hirano, S. and Maruyama, T., 2007a.** Morphological and molecular characterisation of *Abyssozoanthus 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.
  14. **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: 103-120.
  15. **Reimer, J.D.; Takishita, K.; Ono, S. and Maruyama, T., 2007b.** Diversity and evolution in the zoanthid genus *Palythoa* (Cnidaria: Hexacorallia) utilizing nuclear ITS-rDNA. *Coral Reefs*, Vol. 26, pp: 399-410.
  16. **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.
  17. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. Vol. 19, pp: 1572-1574.
  18. **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.
  19. **Sheppard, C.R. and Sheppard, A.S., 1991.** Corals and coral communities of Arabia. *Fauna Saudi Arabia*, Vol. 12, pp: 3-170.
  20. **Sinniger, F. and Haussermann, V., 2009.** Zoanths (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 Evolution*, Vol. 9, pp: 23-36.
  21. **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.
  22. **Sinniger, F.; Ocana, O.V. and Baco, A.R., 2013.** Diversity of zoanths (Anthozoa: Hexacorallia) on Hawaiian seamounts: description of the Hawaiian gold coral and additional zoanths. *PLoS ONE*, Vol. 8, pp: 1-13.
  23. **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.
  24. **Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S., 2011.** MEGA5: molecular evolutionary