جداسازی DNA با استفاده از روش CTAB از گونه شقایق دریایی *Anemonia sp.Anem* در خلیج‌فارس

صبا حسینی[1*]
حسین ذوالقرنین[2]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دریا دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر-دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی.
۲. عضو هیئت علمی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر-دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی

***مسئول مکاتبات:**
saba.hoseyny@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۲
کد مقاله: ۱۳۹۳۰۴۰۲۲۲
این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.

چکیده

شقایق‌های دریایی از راسته (*Actiniaria*) گروهی از آبزیان دریایی هستند که اکثر گونه‌های آن ساکن صخره‌های مناطق گرمسیری هستند. این مطالعه در آبان ماه ۱۳۹۲ انجام شد. هدف از این مطالعه استخراج DNA جهت انجام مطالعات مولکولی از شقایق دریایی گونه *Anemonia sp. PG* از خلیج‌فارس و بررسی مشکلات ناشی از استخراج DNA در شقایق‌ها بود. در این تحقیق جداسازی DNA با استفاده از روش CTAB از شقایق دریایی گونه *Anemonia sp. PG* انجام شد که با تغییراتی در پروتکل استخراج استاندارد و بهینه کردن آن همراه بوده است و نهایتاً مقادیر زیادی از DNA خالص و باکیفیت و عاری از هرگونه آلودگی، مانند پلی ساکارید (موکوپلی ساکارید)، که می‌تواند در انواع مختلف تجزیه‌وتحلیل‌های مولکولی مورداستفاده قرار بگیرد، به دست آمد . نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز، اسپکتوفتومتر و تعیین توالی بخشی از ژنوم، نشان‌دهنده کیفیت مطلوب DNA استخراجی از شقایق دریایی *Anemonia sp. PG* بود. *مزیت این روش ساده بودن، ارزان بودن، اجتناب از استخراج ژنوم همزیست شقایق و همچنین حذف آلودگی‌های موکوپلی ساکاریدی* می‌باشد که به علت این آلودگی‌ها بسیاری از روش‌های بیوشیمیایی استاندارد برای جداسازی اسید نوکلئیک در برخی موجودات دریایی مانند اعضای شاخه مرجانیان مؤثر نیست.

واژگان کلیدی: استخراج DNA، *Anemonia sp. PG* ، خلیج‌فارس، CTAB.

مقدمه

اولین قدم در مهندسی ژنتیک جداسازی و خالص‌سازی DNA است (Nicholl, 1996). استخراج DNA مهم‌ترین نیاز در اجرای تحلیل‌های ژنتیکی، مانند تشخیص جهش و پی بردن به‌توالی و عملکرد بخش ویژه‌ای از ژنوم است (Nasiri *et al*., 2005). موفقیت‌های ناشی از استخراج مناسب DNA به خلوص عالی و غلظت بالای DNA استخراج‌شده وابسته است. معمولاً کیفیت DNA با عواملی مانند عدم آلودگی ناشی از RNA، پروتئین، لیپید و سایر ساختارهایی که برای آنزیم تک پلیمراز (Tag polymerase) در واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) و آنزیم‌های برشی مزاحمت ایجاد می‌کند، سنجیده می‌شوند (D"Angelo *et al*., 2007).

شقایق‌های دریایی جانورانی با اسکلت پولیپی ساده می‌باشند و در محیط زیستی که سرشار از موجودات زنده متنوع و مهمی هست، زندگی می‌کنند (Shick, 1991). شقایق‌های دریایی به‌صورت کلنی زندگی می‌کنند. از اجتماع این جانوران آب سنگ‌ها، صخره‌ها و جزایر مرجانی به وجود می‌آید. آب گرم خلیج‌فارس و عمق مناسب آن به‌گونه‌ای است که محیط مناسبی برای رشد و تکثیر مرجان می‌باشد (برنا، ۱۳۹۱). شقایق دریایی یک پولیپ بی‌پایه است که به سطح زیرین خود به‌وسیله دیسک پایه با چسب متصل می‌شود، و دارای بدنی ستونی شکل است که به دیسک دهانی ختم می‌شود. دارای تانتاکول در بافت دهانی هستند که تعداد آن‌ها از چند عدد تا ۱۰۰ ها عدد متفاوت است و اندازه آن‌ها نیز از حدود ۴

میلی‌متر تا نزدیک ۲ متر متفاوت می‌باشد، اما قطر بیشتر آن‌ها بین ۱/۸ تا ۳ سانتی‌متر می‌باشد. البته چندگونه پلاژیک وجود دارند که به‌صورت متصل نیستند. آن‌ها دارای یک اتاق گاز در داخل دیسک پدالی خود هستند که به‌وسیله آن می‌توانند به‌صورت شناور در آب باشند (Frazao *et al.*, 2012). باوجود بسیاری از تکنیک‌های توسعه‌یافته برای جداسازی DNA الگو و استفاده از آن برای PCR (Saiki *et al.*, 1998) استخراج DNA از شقایق دریایی به دلیل حضور Zooxanthellea به‌عنوان همزیست مشکل است (Pinto *et al.*, 2000).

هدف از این مطالعه بررسی مشکلات ناشی از استخراج DNA در شقایق دریایی گونه ، *Anemonia sp. PG* بود. در این تحقیق جداسازی DNA با استفاده از روش CTAB از شقایق دریایی گونه ، *Anemonia sp. PG* انجام شد که با تغییراتی در پروتکل استخراج استاندارد و بهینه کردن آن همراه بوده است. Pinto و همکاران در سال ۲۰۰۰ استخراج DNA از بافت پایه شقایق دریایی را بر مبنای روش CTAB انجام داده‌اند که این روش در مطالعه بر روی شقایق خلیج‌فارس جواب نمی‌داد.

Allen و همکاران در سال ۲۰۰۶ با تغییراتی درروش CTAB موفق به جداسازی سریع DNA درزمانی کمتر از ۵ – ۶ ساعت در بافت گیاهی شدند. Stefanik و همکاران در سال ۲۰۱۳ روشی را برای جداسازی DNA، از *Nematostella vectensis* را که از شاخه Cnidaria و راسته Actiniaria می‌باشد را دریافته خود شرح داده‌اند. بااینکه نسبت به استفاده از کیت روش ارزان‌تری می‌باشد، اما روش استفاده‌شده در این مطالعه بسیار به‌صرفه‌تر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

عملیات نمونه‌برداری از گونه شقایق دریایی *Anemone sp PG* با غواصی و در آبان ۱۳۹۲ از جنوب جزیره لارک واقع در استان هرمزگان (شهرستان قشم) (E " ۰ ´۲۱ °۵۶ ,N " ۰ ´۵۱ °۲۶) انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده درون الکل ۹۶ درصد نگه‌داری و سپس به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل شدند.

در این مطالعه برای جداسازی DNA از روش CTAB استفاده شد که با اندکی تغییر و بهینه‌سازی در پروتکل شرح داده‌شده توسط Chen و همکاران (۱۹۹۵) جداسازی DNA از شقایق دریایی گونه *Anemone sp PG* انجام شد. در این مطالعه از دیسک پایی شقایق دریایی برای استخراج DNA استفاده گردید. ابتدا قطعه‌ای حدود ۵۰–۱۰۰ میلی‌گرم جدا شد و برای کاهش آلودگی DNA شقایق، با جلبک هم‌زیستش (Zooxanthelea) قطعه موردنظر چند بار با الکل شستشو داده و قبل از استخراج به مدت ۲ ساعت به‌منظور برداشت الکل اضافی انکوبه شدند. قطعات به‌وسیله نیتروژن مایع پودر و سپس ۶۳۰ میکرو لیتر از بافر CTAB (CTAB ۱ درصد، Tris-Base PH: 7.5 ۱۰۰ میلی مولار ، NaCl ۷۰۰ میلی مولار، EDTA ۵۰ میلی مولار، ۲-مرکاپتواتانول ۱۴۰ میلی مولار) و ۷۰ میکرو لیتر از SDS ۱۰ درصد از پیش گرم شده با دمای (۶۵ درجه سانتی‌گراد) و همچنین ۱۵ میکرو لیتر پروتئیناز K به آن افزوده گردید و به مدت ۱۲ الی ۱۸ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری و سپس ۲۴۰ میکرو لیتر از NaCl ۵ مولار و ۳ میکرو لیتر بتا–مرکاپتواتانول به آن اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. پس از لیز شدن کامل نمونه، ۲۵۰ میکرو لیتر کلروفرم به آن اضافه و به مدت ۱۵–۱۰ دقیقه به‌صورت دستی تکان داده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (Centurion Scientific Ltd) شدند. این مرحله برای از بین بردن آلودگی پروتئینی یک‌بار دیگر تکرار شد. فاز رویی را به یک میکروتیوب انتقال داده و ۷۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانول سرد (۲۰– درجه سانتی‌گراد) به آن اضافه و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس فاز رویی را دور ریخته و با ۵۰۰ میکرو لیتر اتانول ۷۰ درصد پلت (رسوب) را شستشو داده و نهایتاً صبر کرده تا پلت با جریان هوا خشک گردد. این فرآیند معمولاً به مدت ۲ ساعت طول کشید (Chen, *et al.*, 1995).

پلت خشک‌شده را که حاوی DNA است در ۵۰ تا ۱۰۰ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر حل کرده و به مدت یک‌شب در دمای محیط قرار داده تا به‌خوبی حل گردد. برای جلوگیری از آلودگی‌های ناشی از پلی ساکارید DNA استخراجی به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق و از محصول رقیق‌شده به‌عنوان DNA الگو برای فرآیند PCR استفاده گردید.

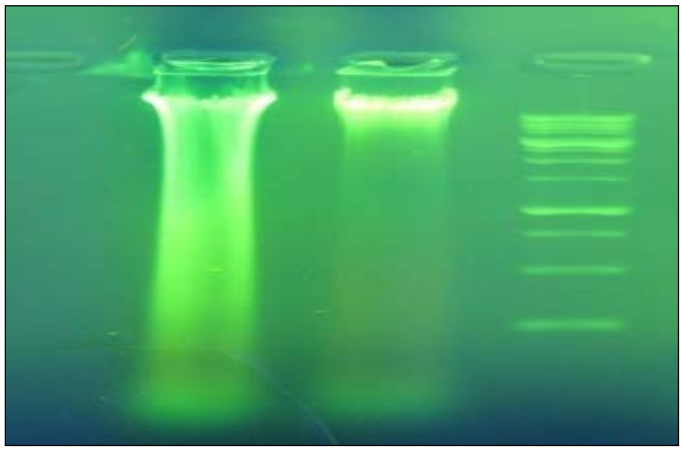
برای PCR ۱ میکروگرم DNA الگو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۷/۷ میکرو لیتر آب، ۲/۵ میکرو لیتر 10x PCR Buffer، ۰/۵ میکرو لیتر dNTP ۱۰ میلی مول، ۱ میکرو لیتر MgCl2 ۵۰ میلی مول، ۱ میکرو لیتر Primer F (۱۰ پیکومول بر میکرو لیتر)، ۱ میکرو لیتر Primer R (۱۰ پیکومول بر میکرو لیتر) و ۰/۳ میکرو لیتر Tag DNA Polymerase در دستگاه ترمال سایکلر (BIO-RAD) قرار داده شد که پروفایل حرارتی آن به شرح زیر می‌باشد:

۱ سیکل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ سیکل (۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۴۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و ۱ سیکل هم به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

محصول PCR را در ژل آگارز ۱ درصد و با استفاده از Safe stain رنگ‌آمیزی شد. سپس نتیجه به‌وسیله دستگاه مستندساز ژل (Herolab uvT-20 M/W) مشاهده و محصولات PCR در دستگاه توالی یاب DNA خودکار توالی یابی گردید.

نتایج

استخراج DNA خالص و باکیفیت از شقایق دریایی گونه، *Anemonia sp. PG* انجام شد که عاری از آلودگی‌هایی که برای PCR مزاحمت کند، بود. کمیت DNA در طیف‌سنج Eppendorf اندازه‌گیری شد و A260/A280 آن ۱/۸ بود. کیفیت DNA نیز با استفاده از ۲ میکرو لیتر از هر نمونه که در ژل آگارز ۱ درصد رنگ‌آمیزی شد، مشخص گردید و با توجه به شکل ۱ مشاهده شد که نمونه هیچ نشان‌هایی از تخریب نداشته است.



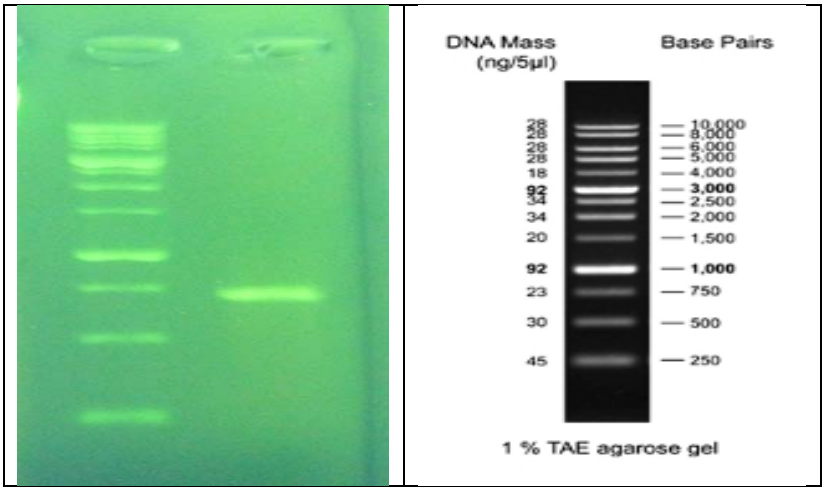
شکل ۱: ارزیابی DNA استخراج‌شده شقایق *Anemonia sp. PG* به روش CTAB بر روی ژل آگارز ۱ درصد.

در این تحقیق از پرایمرهای زیر برای PCR استفاده شد.

پرایمر MTR:5´GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG F

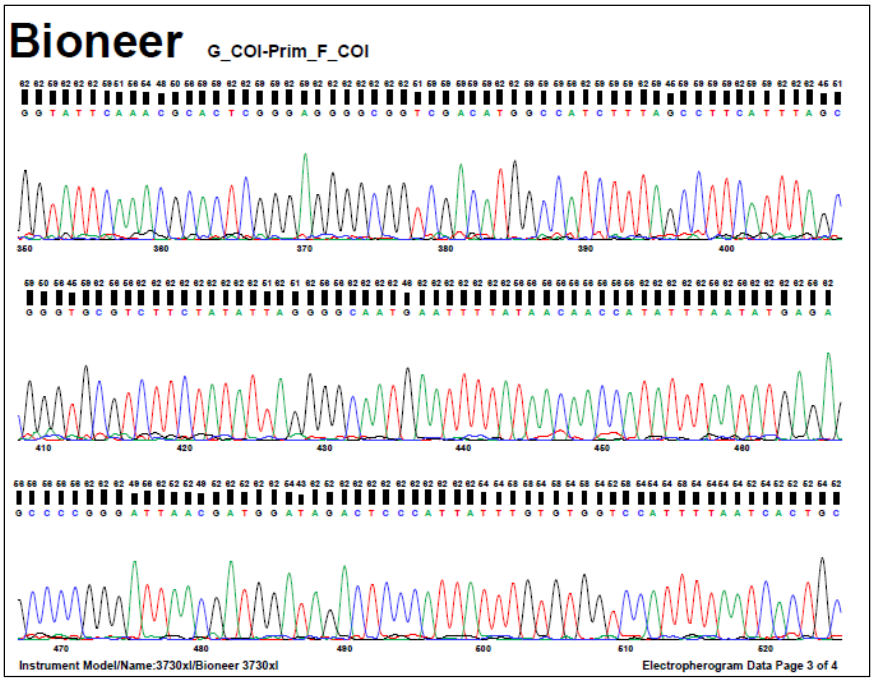
پرایمر MTR: 5´-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA R

کیفیت PCR با توجه به رنگ‌آمیزی با استفاده از Safe stain از محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد مشخص و سپس نتیجه به‌وسیله دستگاه مستندساز ژل (Herolab uvT-20 M/W) مشاهده گردید که شکل ۲ نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز بودن PCR است.



شکل ۲: ارزیابی محصول PCR شقایق *Anemonia sp. PG* بر روی ژل آگارز ۱ درصد.

تعیین توالی ژنوم توسط شرکت تکاپوزیست به روش توالی یابی خودکار و توسط دستگاه Automated sequencing 3700 ABI machine انجام و در شکل ۳ ارائه گردید که دیاگرام حاصل از توالی دارای پیک‌های تیز (شارپ) و فاقد نویز می‌باشد که نشان‌دهنده کیفیت DNA استخراجی می‌باشد.



شکل ۳: نتایج حاصل از توالی یابی بخشی از ژن COI در گونه *Anemonia sp. PG* خلیج‌فارس.

توالی نوکلئوتیدی و پروتئین حاصل از آن به‌صورت توالی‌های جدید به ترتیب با شماره‌های AB933643.1 و BAO79525.1 ثبت گردید (شکل ۴). این‌گونه بانام *Anemonia sp. PG* تحت جنس *Anemonia* قرار گرفت.

Anemonia sp. PG mitochondrial cox1 gene for cytochrome oxidase subunit 1, complete cds

GenBank: AB933643.1

GenBank Graphics

```
>gi|633896293|dbj|AB933643.1| Anemonia sp. PG mitochondrial cox1 gene for
cytochrome oxidase subunit 1, complete cds
ATGTTAATAAGATTGGAGTTGTCTGCCCCTGGGACTATGTTAGGGGACGACCATCTTTATAATGTCATAG
TGACGGCGCACGCCTTTATTATGATTTTTTTCCTAGTAATGCCAGTAATGATAGGAGGGTTTGGTAATTG
GTTAGTACCACTATATATTGGCGCCCCTGATATGGCCTTTCCACGATTAAACAATATTAGTTTTTGGTTA
CTTCCTCCTGCGCTTATACTATTATTAGGCTCTGCCTTTGTTGAGCAAGGAGTAGGAACTGGGTGGACAG
TTTATCCTCCTCTTTCTGGTATTCAAACGCACTCGGGAGGGGCGGTCGACATGGCCATCTTTAGCCTTCA
TTTAGCGGGTGCGTCTTCTATATTAGGGGCAATGAATTTTATAACAACCATATTTAATATGAGAGCCCCG
GGATTAACGATGGATAGACTCCCATTATTTGTGTGGTCCATTTTAATCACTGCCTTTTTATTATTACTTT
CCCTACCAGTTTTAGCGGGTGGAATAACCATGCTTTTAACAGATAGGAATTTTAATACAACTTTCTTTGA
CCCAGCAGGGGGTGGAGACCCCATCTTATTCCAACAATTATTTTAA
```

cytochrome oxidase subunit 1 (mitochondrion) [Anemonia sp. PG]

GenBank: BAO79525.1

GenPept Identical Proteins Graphics

```
>gi|633896294|dbj|BAO79525.1| cytochrome oxidase subunit 1 (mitochondrion)
[Anemonia sp. PG]
MLIRLELSAPGTMLGDDHLYNVIVTAHAFIMIFFLVMPVMIGGFGNWLVPLYIGAPDMAFPRLNNISFWL
LPPALILLLGSAFVEQGVGTGWTVYPPLSGIQTHSGGAVDMAIFSLHLAGASSILGAMNFITTIFNMRAP
GLTMDRLPLFVWSILITAFLLLLSLPVLAGGITMLLTDRNFNTTFFDPAGGGDPILFQQLF
```

شکل ٤: توالی‌های ثبت‌شده بخشی از ژن و پروتئین COI در بانک داده NCBI.

بحث و نتیجه‌گیری

سیستماتیک را در شقایق دریایی تنها با چند صفت مورفولوژیکی مشخص می‌کنند (Fautin and Smith, 1997; MC commas, 1991). داده‌های مورفولوژیکی به‌تنهایی برای شناسایی کافی نمی‌باشند و داده‌های مولکولی در این زمینه کمک می‌کند (Janies *et al.*, 2011). در مطالعات اخیر نشان داده‌شده است ژن میتوکندری یا ژن‌های هسته‌ایی می‌توانند در توسعه روابط مورفولوژیکی به‌کاربرده شوند (Perseke *et al.*, 2008 and 2010). استفاده از ویژگی‌های مولکولی باعث بهبود و روشن شدن روابط فیلوژنتیک میان جنس‌ها و گونه‌ها می‌شود و از نشانگرهای مولکولی DNA برای پاسخ به پرسش‌های تکاملی در شقایق‌های دریایی استفاده می‌شود (Finnerty and Matindale, 1997; Pont-kingdom *et al.*, 1994). روش ارائه‌شده در این مقاله یک روش ساده و سریع است که نیاز به مواد شیمیایی گران‌قیمت و ابزار دقیق ندارد و در طول تاریخ نیز مؤثر بودن آن به اثبات رسیده است، (Elias *et al.*, 2004; Doyle and Doyle, 1990) در این مطالعه با مقایسه و همچنین تغییراتی در پروتکل اصلی، موفق به دست‌یابی DNA باکیفیت بالا که بتوان از آن در مطالعات مولکولی بهره جست، شدیم که احتمالاً از این روش بتوان در سایر مرجانیان (دارای موکوس) نیز استفاده کرد.

در این تحقیق استخراج DNA از شقایق دریایی با سایر روش‌ها ناموفق بود و با روش CTAB بهینه‌شده استخراج را انجام و گام‌هایی برای دقت بیشتر، ازجمله خیساندن بافت، بهینه کردن میزان پروتئیناز K و بتا–مرکاپتواتانول و همچنین رقیق‌سازی به علت وجود مقادیر زیاد پلی ساکارید در شقایق‌ها انجام داده شد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بعضی از جزئیات در موفقیت پروتکل استخراج DNA تأثیرگذار است، مثل نوع بافت، خیساندن، هضم بافت و مدت‌زمانی که برای پروتئیناز K استفاده می‌شود تماماً برای به دست آوردن DNA باکیفیت بالا ضروری می‌باشند.

نوع بافت در موفقیت‌آمیز بودن تجزیه‌وتحلیل DNA اثر می‌گذارد. در گیاهان (Rogstad, 1992) پرندگان (Seutin *et al., 1991*) و حشرات (Altschmied *et al.*, 1997).

در مطالعات محققین دیگر از بافت پدالی برای اجتناب از تکثیر DNA Zooxanthelea استفاده‌شده است (Fautin and Smith 1997; Pinto *et al.*, 2000)، اما در این مطالعه وقتی از DNA استخراجی بافت پدالی استفاده شد PCR جواب نمی‌داد که شاید به این دلیل بود که چون بافت پدالی ساکن می‌باشد احتمالاً میزان میتوکندری آن نیز کم بوده است، درنتیجه میزان DNA میتوکندری در DNA استخراجی بسیار کمتر از DNA ژنومی بوده است و به دلیل اینکه در این مطالعه از پرایمر Universal سیتوکروم استفاده‌شده، جواب مورد انتظار را نمی‌داد. به همین دلیل در این تحقیق از بافت دهانی شقایق برای استخراج DNA استفاده شد و برای کاهش آلودگی DNA شقایق دریایی گونه، *Anemonia sp. PG* با جلبک‌های همزیستش (Zooxanthelea) بافت موردنظر چند بار با الکل شستشو داده شد.

مدت‌زمان و درجه حرارت مناسب جهت انکوباسیون با پروتئیناز K نیز یک عامل مهم برای موفقیت در استخراج DNA به‌حساب می‌آید و هرچند که در اکثر مطالعات دمای بین ۵۵ – ۶۵ درجه سانتی‌گراد را برای پروتئیناز K پیشنهاد داده‌اند (McMillan *et al.*, 1991; Lopez *et al.*, 1999; Romano and palumbi, 1997; Lopeze and Knowlton, 1997) اما پینتو در سال ۲۰۰۰ استفاده از غلظت نهایی ۱ نانوگرم / میلی‌لیتر از پروتئیناز K در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴–۴۸–۷۲ در ساعت را پیشنهاد دادند و آن‌ها اعلام داشتند که این مقدار و درجه حرارت برای لیز کامل بافت موردنظر کافی است و در مطالعه آن‌ها استفاده از درجه حرارت بالا برای انکوباسیون ناکارآمد بود (Pinto, *et al., 2000*).

یک نکته بسیار مهم در استخراج DNA از شاخه Cnidaria آلودگی با پلی ساکارید است که دست و پای محقق را در انجام مراحل بعدی (ازجمله PCR) در مطالعه مولکولی می‌بندد. آلودگی با پلی ساکارید ها در هنگام جداسازی اسید نوکلئیک مشکلات متعددی را ایجاد می‌کند، به‌عنوان‌مثال درنتیجه یک استخراج آلوده با پلی ساکارید، DNA نسبت به برش با آنزیم‌های محدودکننده مقاوم می‌شود. باوجود گسترش در

مطالعات مولکولی اما در این شاخه از موجودات به علت وجود مشکلات ناشی از پلی ساکاریدها کمتر از مطالعات مولکولی استفاده می‌شود و تحقیقات بر روش سنتی مانند آناتومی، بافت‌شناسی و روش‌های فراساختاری متکی است (Maniatis *et al*., 1982).

توانایی استخراج و خالص‌سازی اسید نوکلئیک برای مطالعه موجودات در سطح مولکولی اهمیت بسیار زیادی دارد. بااین‌حال در برخی از موجودات دریایی مانند اعضای شاخه مرجانیان که شامل هیدرها، شقایق دریایی، مرجان‌ها و عروس دریایی می‌باشد، بسیاری از روش‌های بیوشیمیایی استاندارد که برای جداسازی مولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها و اسید نوکلئیک هستند، مؤثر نیست دلیل آن نیز وجود موکوس (Muccopolysaccharides) در بافت این موجودات است. در بسیاری ازاین‌گونه‌ها موکوس به فراوانی تولید و ترشح می‌شود (از آن در تغذیه، تمیز کردن و محافظت در برابر خشک شدن استفاده می‌کنند) (Krupp, 1984). در برخی از گونه‌ها موکوس تا ۴۰ درصد از کربن ثابت و خالص روزانه به شمار می‌رود (Crossland *et al*., 1980) در استخراج DNA آلودگی با Muccopolysaccharides و نمک ممکن است PCR را مهار کند و برای حل این مشکل می‌توان DNA استخراجی را به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق کرد (Layton, 2012).

درنهایت با تحقیق در مورد مشکلات موجود در استخراج از شقایق دریایی و چگونگی رفع آن و انجام یک سری تغییرات کوچک که نتایج قابل‌توجهی را در به دست آوردن DNA باکیفیت از این جانداران به همراه داشت، DNA ی باکیفیت و عاری از آلودگی که بتوان از آن در انجام مطالعات مولکولی بهره جست، به دست آوریم که احتمالاً بتوان از این روش برای استخراج در سایر اعضای این شاخه بهره جست.

سپاسگزاری

نویسندگان از کلیه کارکنان و اساتید آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر کمال تشکر و قدردانی رادارند.

منابع

برنا، م. ۱۳۹۱. اکولوژی آبزیان خلیج‌فارس (با تأکید بر آب‌های بوشهر). انتشارات آیینه کتاب، تهران، ۱۸۰ ص.

Allen, G. C., Flores-Vergara, M. A., Krasynanski, S., Kumar, S. and Thompson, W. F., 2006. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. Nature Protocols, 1: 2320 – 2325.

Altschmied, J., Hornung, U., Schlupp, I., Gadau, J., Kolb, R. and Schartl, M., 1997. Isolation of DNA suitable for PCR for field and laboratory work. BioTechniques, *23*: 228-229.

Chen, C. A., Odorico, D. M., Lohuis, M. T., Veron, J. E. N. and Miller, D J., 1995. Systematic relationships within the *Anthozoa* (Cnidaria: Anthozoa) using the 5'-end of the 28S rDNA. Molecular Phylogenetics and Evolution, 4: 175-183.

Crossland, C. J., Barnes, D. J. and Borowitzka, M A., 1980. Diurnal lipid and mucus production in the staghnrn coral *Acropora acuminata*. Marine Biology, *60:* 81-90.

D´Angelo, F., Santillo, A., Sevi, A. and Albenzio, M., 2007. Technical note: A simple salting-out method for extraction from milk somatic cells: Investigation into the goat CS1S1 gene. J Dairy Science, 90: 3550-3552.

Doyle, J. J., Doyle, J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, v.12: 13-15.

Elias, M., Muhlen, G. S., Mckey, D., Roa, A. C. and Tohme, J., 2004. Genetic diversity of traditional South American landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. Economic Botany, v.58:.242-256.

Fautin, D. G. and Smith, D. R., 1997. Clonality as a taxonomic character of actinian species. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium*, Panamá, *2*: 1609-1612.

Finnerty, J. R. and Martindale, M. Q., 1997. Homeboxes in sea anemones (Cnidaria; Anthozoa): a PCR-based survey of *Nematostella vectensis* and *Metridium senile*. Biological Bulletin. 193: 62-76.

Frazao, B., Vasconcelos, V. and Antunes, A., 2012. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview. Marine Drugs, 10: 1812-1851.

Janies, D. A., Voight, J. R. and Daly, M., 2011. Echinoderm Phylogeny Including Xyloplax, a Progenetic Asteroid. Systematic Biology, 60 (4): 420-438.

Krupp, D. A., 1984. Mucus production by corals exposed during and extreme low tldc. Pac. Ser.. 38, I-I I. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook. I., 1982. *Molecular Cloning: A Lahoruiorv Manuul.* Vol. l-3. Cold Spring Harbor Press, New York.

Layton, K., 2012. Examining patterns of genetic variation in Canadian marine molluscs through DNA barcodes, A Thesis presented to The University of Guelph.

Lopez, J. V., Kersanach, R., Rehner, S. A., and Knowlton, N., 1999. Molecular determination of species boundaries in corals: genetic analysis of the *Montastrea annularis* complex using amplified fragment length polymorphisms and a microsatellite marker. Biological Bulletin, 196: 80-93.

Lopez, J. V. and Knowlton, N., 1997. Discrimination of species in the *Montastrea annularis* complex using multiple genetic loci. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium,* Panamá *2*: 1613-1618.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, I., 1982. Molecular Cloning*: A Lahoruiorv Manuul.* Vol. l-3. Cold Spring Harbor Press. New York.

McCommas, S. A., 1991. Relationships within the family Actiniidae (Cnidaria, Actiniaria) based on molecular characters. Hydrobiologia, 216/217: 509-512.

McMillan, J., Mahony, T., Veron, J. E. N. and Miller, J., 1991. Nucleotide sequencing of highly repetitive DNA from seven species in the coral genus Acropora (Cnidaria: Scleractinia) implies a division contrary to morphological criteria Marine Biology. 110: 323-327.

Nasiri, H., Forouzandeh, M., Rasaee, M. J. and Rahbarizadeh, F., 2005. Modified Salting-Out Method: High-Yield, High-Quality Genomic DNA Extraction from Whole Blood Using Laundry Detergent. J of Clinical Laboratory Analysis, 19: 229–232.

Nicholl, D. S. T., 1996. An Introduction to Genetic Engineering. Cambridge University Press; 1-30.

Perseke, M., Bernhard, D., Fritzsch, G., Brummer, F., Stadler, P. F. and Schlegel, M., 2010. Mitochondrial genome evolution in Ophiuroidea, Echinoidea, and Holothuroidea: insights in phylogenetic relationships of Echinodermata. Molecular Phylogenetics and Evolution, 56:201–211.

Perseke, M., Fritzsch, G., Ramsch, K., Bernt, M., Merkle, D., Middendorf, M., Bernhard, D., Stadler, P. F. and Schlegel, M., 2008. Evolution of mitochondrial gene orders in echinoderms. Molecular Phylogenetics and Evolution, 47:855–864.

Pinto, S. M., Fernandes-Matioli, F. M. C. and Schlenz, E., 2000. DNA extraction from sea anemone (Cnidaria: Actiniaria) tissues for molecular analyses. Genetics and Molecular Biology, 23, 3: 601-604.

Pont-Kingdon, G. A., Beagley, C. T., Okimoto, R. and Wolstenholme, D. R., 1994. Mitochondrial DNA of the sea anemone, *Metridium senile* (Cnidaria): prokaryote-like genes for tRNA-f-Met and small-subunit ribosomal RNA, and standard genetic specificities for AGR and ATA codons. J. Molecular Evolution,. 39: 387-399.

Rogstad, S. H., 1992. Saturated NACl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. Taxon 41: 701-708.

Romano, S. L. and Palumbi, S. R., 1997. Molecular evolution of a portion of the mitochondrial 16S ribosomal gene region in scleractinian corals. J. Molecular Evolution. 45: 397-411.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239: 487-491.

Seutin, G., White, B. N. and Boag, P. T., 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. Can. J. Zoology. 69: 82-90.

Shick, J. M., 1991. *A Functional Biology of Sea Anemones*. Chapman and Hall, London, pp. 395.
Stefanik, D. J., Wolenski, F. S., Friedman, L. F., Gilmore, T. D. and Finnerty, J. R., 2013. Isolation of DNA, RNA and protein from the starlet sea anemone *Nematostella vectensis*. Nature Protocols 8: 892–899.