

بررسی روابط فیلوژنتیک پرتاران جنس *Perinereis* در سواحل دیلم، بوشهر، دیر و بندرعباس در خلیج فارس

سارا امیری^۱، پرگل قوام مصطفوی^{۲*}، سید محمدباقر نبوی^۳، محمدحسن شاه حسینی^۴

- ۱- گروه علوم دریایی، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.
۲- گروه علوم دریایی، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، پست الکترونیکی: mostafavi_pa@srbiau.ac.ir
۳- گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران.
۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۹/۲۷

* نویسنده مسوول

تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲۰

چکیده

پرتاران علاوه بر اهمیت اکولوژیک در زنجیره غذایی دریایی، جهت پایش اکوسیستم‌ها و ارزیابی استرس محیطی جایگاه ویژه‌ای دارند. از بارکدینگ DNA میتوکندریایی و توالی یابی ژن COI جهت مقایسه واگرایی‌های نوکلئوتیدی در این مطالعه جهت آنالیز مولکولی پرتاران جنس *Perinereis* (خانواده Nereididae) استفاده شد. آنالیز ۵۰ نمونه توالی یابی شده در این تحقیق، ۳۹ توالی ژنی جدید و ۱۱ توالی با قرابت ۱۰۰ درصد با رکوردهای ژن بانک از پرتاران *Perinereis* را آشکار نمود و میزان واگرایی‌های بین گونه‌ای ۱/۸ برابر فواصل درون گونه‌ای مشاهده گردید (۱/۹۶ درصد نسبت به ۳/۵۲ درصد). آنالیزهای فیلوژنتیک نشان داد که بسیاری از گونه‌های پرتاران *Perinereis* مشاهده شده سواحل خلیج فارس، قرابت ژنتیکی بالایی با گونه‌های مشابه در آب‌های مناطق دیگر جهان نداشتند. بررسی میزان شباهت ژنتیکی مشخص گردید که پرتاران *Perinereis* مستقر در سواحل استان بوشهر قرابت ژنی نسبتاً بالایی با یکدیگر داشته و با جنس *Perinereis* مستقر در بندرعباس تا حدودی متفاوت بودند ولی این تفاوت‌ها عمدتاً در حد زیرگونه‌ای بوده و به لحاظ ساختار گونه‌ای، پرتاران *Perinereis* در سواحل ایستگاه‌های دیلم، بوشهر، دیر و بندرعباس واگرایی ژنتیکی اندکی نسبت به یکدیگر داشتند.

کلمات کلیدی: پرتاران، *Perinereis*، COI، بارکدینگ، خلیج فارس.

۱. مقدمه

کنند و لاروآنها به و عنوان شاخص طبیعی اکوسیستم‌های آبی و همچنین جهت بهبود کیفیت رسوبات بتیک و پایش آلاینده‌ها نیز اهمیت دارند (Jiang & Liu, 2008). جنس *Perinereis* با ۸۳ گونه از متنوع‌ترین جنس‌های کرم‌های نرئید است (Read and Fauchald, 2019). حضور این جنس قبلاً در طی تحقیقات پیشین در خلیج فارس و دریای عمان گزارش شده است (سلیمانی راد و همکاران، ۱۳۹۲؛ دریا و همکاران، ۱۳۹۵؛

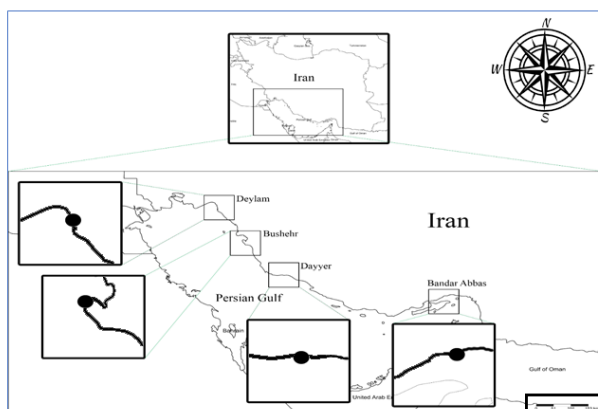
خانواده Nereididae (Blainville, 1818) از رده پرتاران از شاخه حلقویان Annelida با دارا بودن ۴۵ جنس و ۶۹۰ گونه (Read and Fauchald, 2019) و از متنوع‌ترین خانواده‌های پرتاران به شمار می‌آید (Hutchings & Fauchald, 2000). نرئیدیده‌های دریازی معمولاً در نزدیکی مصب رودها زندگی می‌کنند و لاروآنها به و عنوان شاخص طبیعی اکوسیستم‌های آبی و همچنین جهت بهبود کیفیت رسوبات بتیک و پایش آلاینده‌ها نیز اهمیت دارند (Jiang & Liu, 2008). جنس *Perinereis* با ۸۳ گونه از متنوع‌ترین جنس‌های کرم‌های نرئید است (Read and Fauchald, 2019). حضور این جنس قبلاً در طی تحقیقات پیشین در خلیج فارس و دریای عمان گزارش شده است (سلیمانی راد و همکاران، ۱۳۹۲؛ دریا و همکاران، ۱۳۹۵؛

محیطی بر روند گونه زایی و ارزیابی قرابت ژنتیکی پرتاران خلیج فارس کاربرد داشته باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱ نمونه برداری

این بررسی در سواحل بین جزر و مدی بوشهر، دیر، دیلم و بندرعباس بر روی پرتاران در سه منطقه بالا، میان و پایین بین جزرومدی صورت گرفت و نتایج آن ثبت گردید.



شکل ۱: موقعیت ایستگاه‌های نمونه برداری بر روی نقشه

نمونه برداری در سواحل بین جزر و مدی بندرعباس، بندر بوشهر، بندر دیلم و دیر بر روی پرتاران به صورت ماهانه از فروردین سال ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ در طول یک سال در زمان جزر کامل انجام شد و نتایج آن ثبت گردید. جمع آوری نمونه‌ها به صورت ۳ تکرار در هر منطقه بالا بین جزرومدی، میان بین جزرومدی و پایین بین جزرومدی با پرتاب کوادرات ۵۰ در ۵۰ سانتی متر به صورت تصادفی انجام شد، ناحیه زیرین کوادرات با استفاده از دستگاه مغزه گیر (Corer) دستی با مساحت ۰/۰۱ متر مربع تا عمق ۱۲ سانتیمتر حفاری شد. جداسازی اولیه در محل نمونه برداری توسط الک ۵۰۰ میکرون صورت گرفت و جمعا ۳۰۸ نمونه کرم پرتار جمع آوری شدند.

نمونه‌های پرتاران جداسازی شده ابتدا به ظرف حاوی 8% $MgCl_2$ و آب دریا منتقل شدند تا بیهوش شده و خروج آرواره‌ها امکان پذیر شود. سپس نمونه‌ها با اتانول ۹۰ درصد فیکس و پس از انتقال به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دریایی مرکز تحقیقات

(Ahmed Al-Omari, 2011; Bonyadi-Naeini et al., 2017). ابزار مولکولی هر روزه اهمیت بیشتری در شناسایی مرزهای بین گونه‌ای، بررسی کیفیت تنوع زیستی و نمایان کردن پراکنش گروه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد (Neal et al., 2018; Malakauskas et al., 2016; Sun et al., 2018). تحقیقات زیادی با تمرکز بر تاکسون‌ها به بررسی تغییرات DNA میتوکندریایی (mtDNA) پرداخته‌اند و مشخص کرده‌اند که این گونه بررسی‌ها به جهت جدا کردن گونه‌های پرتاران نزدیک به هم بسیار ارزشمند هستند (برای مثال Barroso et al., 2009; Bleidorn et al., 2006; Nygren & Pleijel, 2011; Glover et al., 2005; Rice et al., 2008). روش پیشگام بارکد DNA با هدف فهرست کردن تنوع زیستی جهانی از طریق ارتباط داده‌های توالی‌ها با گونه‌های مرتبط در جریان است (Ratnasingham & Hebert, 2007; Hebert et al., 2003). ناحیه ی بارکدینگ شامل قطعه ی ۶۵۰ جفت بازی از ژن میتوکندریایی COI می‌باشند. بارکدینگ متداولاً برای شناسایی گونه‌های موقت در گروه‌هایی که تاکسونومی ناقصی دارند استفاده شده است (برای مثال Floyd et al., 2002; Smith et al., 2005; al., 2002). تفاوت‌های مورفولوژیک، اکولوژیک و رفتاری مرتباً با بررسی بیشتر تاکسون‌های متمایز مشخص شده است (برای مثال Hebert et al., 2004). بارکدینگ مخصوصاً در سیستم‌های دریایی پرکاربرد بوده است (Radulovici et al., 2010).

در مواردی که مراحل حیاتی و تولید مثلی متفاوت است و یا مواردی که گونه‌ها در طی نمونه برداری آسیب دیده‌اند، شناسایی تاکسون‌های حتی مشهور نیز در این شرایط دشوار می‌گردد (Knowlton, 1993). بنابر این بارکد‌ها امکان مقایسه ی سریع تاکسون‌های مختلف در مناطق جغرافیایی گسترده را فراهم کرده و پتانسیل عظیمی برای ارزیابی پیوستگی ژنتیکی و رد گیری الگوهای زیست جغرافیایی در سطح گسترده دارد. در حالی که تحقیقات زیادی کارایی COI را در جداسازی گونه‌ای تایید کرده‌اند (Barroso et al., 2009; Nygren & Pleijel, 2011; Rice et al., 2009; Olson et al., 2009; Pleijel et al., 2009; et al., 2008). هدف این پژوهش، بررسی روابط فیلوژنتیک پرتاران جنس *Perinereis* با بهره‌گیری از تکنیک بارکدینگ DNA و توالی‌یابی ژن COI بوده است و در طی آن واگرایی‌های نوکلئوتیدی اعضای این جنس در سواحل دیلم، بوشهر، دیر و بندرعباس مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این پژوهش می‌تواند در تحلیل اثر فاکتورهای

یک سیکل یک دقیقه ای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۵ سیکل ۴۰ ثانیه ای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه ۷۲ درجه سانتیگراد، ۳۵ سیکل ۴۰ ثانیه ای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۴۰ ثانیه ۵۱ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه ۷۲ درجه سانتیگراد و آخرین مرحله ۵ دقیقه ۷۲ درجه سانتیگراد بود.

کیفیت محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز E-Gel با آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. توالی یابی دو طرفه توسط نرم افزار BigDye V1.3 با دستگاه DNA آنالیزور ABI 3730xl در شرکت Macrogen در کشور کره جنوبی انجام شد (www.macrogen.com). توالی ها با استفاده از نرم افزار ChromasPro v6.2 محصول شرکت Technelysium (www.technelysium.com) خطایابی و برش داده شده و با تکنیک ClastalW در نرم افزار MEGA v7.0 مرتب شدند (www.megasoftware.net). توالی های ژن COI به دست آمده با استفاده از سرویس BLAST پایگاه NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) با ژنوم ارگانسیم‌های همولوژی ۱۰۰٪ در این پایگاه مورد مقایسه قرار گرفتند. توالی‌های به دست آمده در این تحقیق در بانک ژن با شماره های دسترسی PG101826 تا PG101876 ثبت موقت شده اند.

۴-۲ آنالیز فیلوژنتیک

از نرم افزار PAUP4 جهت ترسیم درخت بیشینه صرفه جویی یا Maximum Parsimony (MP) استفاده شد و در مورد تمامی جایگاه های حاوی اطلاعات پارسیمونی، شاخص ثبات (consistency index)، شاخص نگهداری (retention index) و شاخص مرکب (composite index) محاسبه شدند. جهت بررسی حدود اطمینان شاخه‌ها، از آزمون Bootstrap با هزار تکرار استفاده شد و درصد درخت های تکرار که تاکسون های مرتبط را در کلاسترهای مشابه قرار داده اند محاسبه گردید. طول شاخه ها در مقیاسی رسم شدند که هر واحد طول برابر فاصله تکاملی در درخت فیلوژنی باشد.

۵-۲ انجام محاسبات

از شاخص تشابه Bray-Curtis در نرم افزار Microsoft Excel 2016 جهت بررسی میزان شباهت ایستگاه‌های نمونه برداری بر

طب گرمسیری خلیج فارس دانشگاه علوم پزشکی بوشهر در اتانل ۷۰ درصد نگهداری شدند. جهت بررسی، نمونه های پرتار به مدت ۴۵ دقیقه با محلول رزبنگال ۱ گرم بر لیتر اضافه رنگ آمیزی و سپس شناسایی و شمارش آنها انجام گرفت.

۲-۲ شناسایی مورفولوژیک

تمام کرم های پرتار با استفاده از لوپ (Olympus, SZ6045, Japan) و میکروسکوپ نوری (مدل CETI، ساخت بلژیک) شمارش و شناسایی شدند. جداسازی نمونه ها در حالی انجام شد که در الکل غوطه ور بودند و از آنجا که لامپ میکروسکوپ باعث تبخیر الکل میشود مرتباً به آن الکل اضافه شد بطوری که در الکل غوطه ور بمانند. برای شناسایی ریخت شناسی پرتاران در حد جنس از بخش جلویی بدن، تعداد و نحوه قرار گیری زوائد با بهره گیری از کلیدهای رایج تاکسونومی مورفولوژیک صورت پذیرفت (Fauchald, 1977; Hartman, 1965; Beesley et al., 2000. Hutchings & Fauchald, 2000; Day, 1967; Fauchald & Rouse, 1997; Rouse & Pleijel, 2008).

۳-۲ استخراج و تکثیر ژن COI

پس از جداسازی و شناسایی مورفولوژیک نمونه های متعلق به جنس *Perinereis*، نمونه ها جهت انجام مطالعات مولکولی در الکل ۷۰ درصد درون فالکون های آماده فیکس شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. استخراج DNA با پروتکل CTAB-کلروفرم شرح داده شده توسط Chen و همکاران (۱۹۹۵) انجام شد. به منظور بارکدینگ بخش ۸۱۵ جفت بازی از ژن میتوکندریایی COI جهت بررسی سیستماتیک مولکولی نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (مارک LongGene، مدل A200) با استفاده از پرایمر یونیورسال LCO1490 HCO2198 تکثیر گردید (Folmer et al., 1994). واکنش های PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Trehalose، ۲ میکرولیتر آب مقطر، ۱/۲۵ میکرومول بافر 10x PCR، ۰/۶۲۵ میکرومول MgCl₂(50 mM)، ۰/۱۲۵ میکرومول از هر پرایمر (۱۰ میکرومول)، ۰/۰۶۲۵ میکرولیتر dNTPs (10 mM)، ۰/۰۶ میکرولیتر تک پلی مراز و ۲ میکرولیتر از نمونه DNA صورت پذیرفت (Carr et al., 2011). پروفایل گردش حرارتی شامل

طی عملیات استخراج DNA و تکثیر ژن COI از ۷۳ نمونه به دست آمده، ۲۳ نمونه DNA با کیفیت نامطلوب به دست آمدند که از مجموعه داده حذف شدند و در نهایت ۵۰ توالی ژن COI به دست آمده و توالی یابی شد.

توالی‌های بدست آمده در مطالعه حاضر، با توالی‌های موجود نمونه‌های مشابه که برای ژن COI در بانک جهانی GenBank ثبت شده بود تطبیق و مقایسه شد. نتایج مقایسه توالی‌های به دست آمده نشان دهنده همولوژی نوکلئوتیدی ۱۰۰ درصد تعداد ۱۱ توالی با پرتاران *Perinereis* ثبت شده در بانک ژنی بوده است (جدول ۱). در خصوص ۳۹ توالی COI دیگر، هیچ سابقه قبلی مشابه ثبت شده در بانک ژنی یافت نشد و مقایسه نوکلئوتیدی، قرابت‌های ۹۲ تا ۹۹ درصد با داده‌های GenBank را نشان داد که تحت عنوان تاکسون‌های موقت (Provisional) معرفی شدند.

از نمونه‌های متعلق به جنس *Perinereis* sp. ۹ توالی، شامل ۱ توالی از منطقه بندرعباس (*Perinereis* sp.-2017-H)، ۴ توالی از منطقه بوشهر (*Perinereis* sp.-2017-A,D,E,G) و ۳ توالی از منطقه دیلم (*Perinereis* sp.-2017-B-C-F) و ۱ توالی از منطقه دیر (*Perinereis* sp.-2017-I) به دست آمد.

درخت فیلوژنی رسم شده در نتیجه آنالیز روابط تکاملی به روش بیشینه صرفه جویی، نشان داد که تاکسون‌های *Perinereis* sp.-2017-D-E-F با یکدیگر متطابق بودند و تشکیل یک کلاد را دادند و با هم رابطه خوهری دارند که با ارزش‌های بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد حمایت شده‌اند. نمونه‌های *Perinereis* sp.-2017-E-F-D از دیلم و بوشهر در تمامی آنالیزهای فیلوژنتیک درون یک کلاد مجزا قرار گرفته‌اند که زیرشاخه کلاد *Perinereis* sp.-2017-C-A-B از دیلم و بوشهر بوده که توالی‌های A-B-C با بوت‌استرپ ۹۸ درصد حمایت می‌شوند.

هیچکدام از رکوردهای ژن بانک با *Perinereis* sp.-2017-E- با F-D-A-C-B رابطه خوهری نداشتند. همچنین کلادی که شامل نمونه‌های *Perinereis* sp.-2017-G-H-I بود با رکوردهای ثبت شده از اقیانوس هند، سواحل Goa در غرب هندوستان با شماره دسترسی KX525494.1، KX525495.1 و KX525496.1 در یک کلاد قرار گرفتند و با هم رابطه خوهری دارند که با بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد پشتیبانی می‌شود.

حسب ساختار گونه‌ای استفاده شد. واگرایی‌های ژن COI بر اساس مدل K2P برای نواحی بارکد شده جنس و گونه‌های بدست آمده با استفاده از آزمون رگرسیون معادله‌ی خط در نرم افزار EstimateS 9.0.1 محاسبه گردید. جهت مقایسه تعداد نمونه‌های جدید (موقت) و سابقاً ثبت شده در بانک ژنی از آنالیز منحنی حجم (Rarefaction Curve) در نرم افزار Microsoft Excel 2016 استفاده شد. از آزمون شباهت Chao Sorensen در نرم افزار IBM SPSS 21 به منظور بررسی شباهت ساختار گونه‌ای یک به یک ایستگاه‌های مورد مطالعه استفاده شد.

۲- آنالیز فیلوژنتیکی

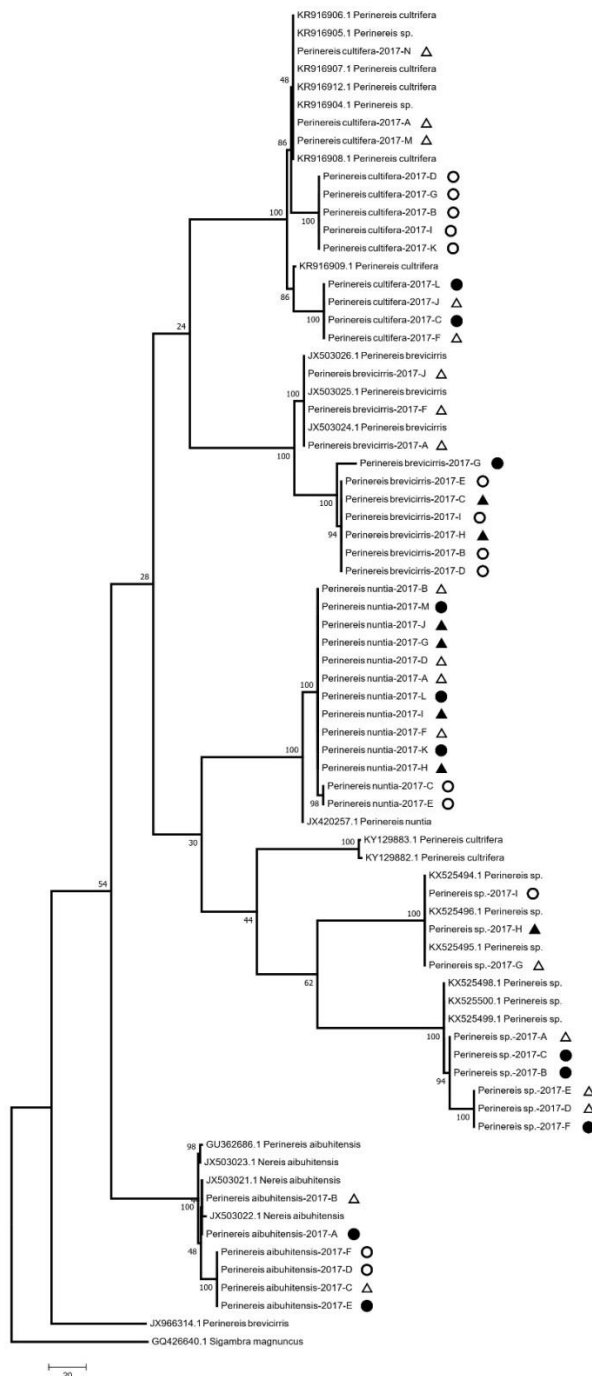
از آنجا که هدف این تحقیق بررسی میزان شباهت و تفاوت ژنتیکی پرتاران متعلق به جنس *Perinereis* در مناطق مورد مطالعه بود و تغییرات ژنتیکی این ارگانسیم‌ها در طول سال هدف این تحقیق نبوده است، نتایج صرفاً بر اساس موقعیت مکانی ارائه شدند. به طور کلی آنالیز روابط تکاملی بر روی ۵۰ توالی نوکلئوتیدی انجام شد که در طی ترسیم درخت‌های فیلوژنتیک تمامی جایگاه‌های حاوی جای خالی و فاقد داده حذف شدند و نهایتاً ۵۶۹ موقعیت در داده‌هایی مورد بررسی قرار گرفتند. فاصله‌های تکاملی با استفاده از روش پارسیمونی و مدل K2P محاسبه شده و هر واحد بیانگر تعداد تغییرات در هر جایگاه می‌باشد. از گونه‌ی *Sigambra magnuncus* از خانواده‌ی Pilargidae با شماره دسترسی GQ426640.1 از آب‌های اقیانوس اطلس، به عنوان برون‌گروه استفاده شد. درخت فیلوژنی رسم شده در نتیجه آنالیز روابط تکاملی بر اساس روش بیشینه صرفه جویی در شکل ۲ نمایش داده شده است.

۳. نتایج و بحث

از ۳۰۸ نمونه برداشت شده از ایستگاه‌های تعیین شده در بوشهر، دیلم، بندرعباس و دیر، ۲۷۳ کرم پرتار بودند که ۲۵۶ نمونه قابل شناسایی در حد جنس با استفاده از میکروسکوپ و لوپ بودند. از ۲۵۶ نمونه بررسی شده، ۲۱۲ نمونه عضو خانواده Nereididae بودند و نهایتاً با بررسی کلیدهای مورفولوژیک، ۷۳ نمونه متعلق به جنس *Perinereis* شناسایی گردید.

جدول ۱: نتایج تطابق توالی های ژن COI به دست آمده در بانک ژنی NCBI

جنس	گونه	تعداد تاکسون با همولوژی +۱۰٪	تعداد تاکسون با همولوژی ۹۲ تا ۹۹٪	تعداد در هر سایت			
				بندرعباس	بوشهر	دیلم	دیر
<i>Perinereis</i> sp.		۳	۶	۱	۴	۳	۱
<i>Perinereis</i>	<i>aihuhitensis</i>	۲	۴	-	۲	۲	۲
<i>Perinereis</i>	<i>brevicirris</i>	۳	۷	۲	۳	۱	۴
<i>Perinereis</i>	<i>cultrifera</i>	۳	۹	-	۵	۲	۵
<i>Perinereis</i>	<i>nuntia</i>	-	۱۳	۴	۴	۳	۲



شکل ۲: روابط تکاملی جنس *Perinereis* با استفاده از روش بیشینه صرفه جویی (Maximum Parsimony). نشانه گذاری تاکسون ها بر اساس ایستگاه نمونه برداری: مثلث سفید علامت بوشهر، مثلث سیاه علامت بندرعباس، دایره سفید علامت دیر و دایره سیاه علامت دیلم.

منطقه چین با شماره دسترسی‌های KY129883.1 و KY129882.1 رابطه خواهری و یا مونوفیلیتیک نداشته و با توالی-های ژن بانک مرتبط با سواحل جنوبی اروپای اطلس قرابت بیشتری را نشان دادند. توپولوژی درختان تکاملی نشان داد نمونه-های برداشت شده از ایستگاه‌های نمونه برداری ۳ کلاد مجزا تشکیل دادند و در هر کلاد ارتباط خواهری با یکدیگر داشتند. تمامی توالی‌های مرتبط با *Perinereis cultrifera* منشأ مونوفیلیتیک داشتند. این گونه دارای یک زیرگونه است ولی از آنجا که در بانک ژنی ثبت نشده است امکان مقایسه توالی‌های به دست آمده با زیرگونه این گونه وجود نداشت.

از نمونه‌های متعلق به گونه‌ی *Perinereis aibuhitensis* مجموعاً ۶ توالی که ۲ توالی شامل *Perinereis aibuhitensis* - 2017-A-E از منطقه ی بوشهر و ۲ توالی از منطقه ی دیر *Perinereis aibuhitensis* - 2017-D-F به دست آمدند. تاکسون-های *Perinereis aibuhitensis* و *Perinereis aibuhitensis* - 2017-B هر کدام کلاد منفرد جداگانه نسبت به سایر تاکسون‌ها تشکیل دادند. تاکسون‌های *Perinereis aibuhitensis* - 2017-D-C-E-F با یکدیگر یک کلاد تشکیل داده و با بوت استرپ ۱۰۰ درصد پشتیبانی می شوند و همچنین با تاکسون ژن بانک همین گونه از منطقه کره جنوبی با شماره دسترسی JX503021.1 رابطه مونوفیلیتیک داشتند.

از نمونه‌های متعلق به گونه‌ی *Perinereis brevicirris*، ۱۰ توالی به دست آمد که از این میان سه توالی *Perinereis brevicirris* - 2017-A-F-J برداشت شده از منطقه بوشهر، یک توالی *Perinereis brevicirris* - 2017-G برداشت شده از منطقه دیلم، ۴ توالی *Perinereis brevicirris* - 2017-D-E-B-I برداشت شده از منطقه دیر و ۲ توالی *Perinereis brevicirris* - 2017-C-H برداشت شده از منطقه بندرعباس به دست آمدند. درخت فیلوژنی رسم شده نشان داد که نمونه‌های *Perinereis brevicirris* - 2017-D-E-B-I-C-H در یک کلاد مجزا قرار گرفتند و با هم رابطه خواهری دارند و این روابط با ارزش بوت استرپ بالا ۹۴ درصد حمایت شده‌اند. این توالی‌ها با هیچ‌یک از تاکسون‌های ژن بانک تشکیل کلاد مشترک ندادند. تاکسون-*Perinereis brevicirris* - 2017-G از سایر تاکسون‌های برداشت شده جدا شده و تشکیل کلاد مونوفیلیتیک داد. تاکسون‌های *Perinereis brevicirris* - 2017-A-F-J با تاکسون‌های مربوط به آب‌های کره جنوبی با

درخت‌های فیلوژنی رسم شده برای جنس *Perinereis* نشان داد که تاکسون‌های *Perinereis nuntia* - 2017-C-D-E-F-G-H از مناطق بوشهر، بندرعباس، دیر و دیلم تشکیل یک کلاد را دادند و با هم رابطه خواهری دارند و با ارزش بوت استرپ ۱۰۰ درصد پشتیبانی می‌شوند. کلاد مذکور با توالی برگرفته شده از بانک ژنی با شماره دسترسی JX420257.1 از استرالیا کلاد مونوفیلیتیک تشکیل دادند. تاکسون‌های *Perinereis nuntia* - 2017-C-E از منطقه دیر در تمامی آنالیزهای فیلوژنتیک درون یک کلاد مجزا قرار گرفته اند و با بوت استرپ ۹۸ درصد حمایت می‌شوند.

توپولوژی درختان تکاملی نشان داد نمونه‌های برداشت شده از ایستگاه‌های نمونه برداری، قرابت ژنتیکی با یکدیگر داشتند. با این وجود هیچ‌کدام از توالی‌های به دست آمده با رکورد ژن بانک گونه *P. nuntia* رابطه خواهری نداشته و در یک کلاد مشترک قرار نگرفتند. تمامی گونه‌های *Perinereis nuntia* منشأ مونوفیلیتیک داشتند. این گونه دارای ۴ زیر گونه میباشد ولی از آنجا که رکوردهای ثبت شده زیرگونه‌ها در بانک ژنی یافت نشد نمیتوان نتایج به دست آمده در این تحقیق را به آنها نسبت داد.

از نمونه‌های متعلق به گونه‌ی *Perinereis cultrifera*، مجموعاً ۱۲ توالی به این ترتیب که ۵ توالی *Perinereis cultrifera* - 2017-M-N-A-F-J از منطقه بوشهر، ۲ توالی از منطقه ی دیلم *Perinereis cultrifera* - 2017-C-L و ۵ توالی از منطقه ی دیر *Perinereis cultrifera* - 2017-B-K-I-G-D به دست آمد. تاکسون‌های مرتبط با نمونه‌های برداشت شده از دیر *Perinereis cultrifera* - 2017-B-K-I-G-D با یکدیگر متطابق بودند و تشکیل یک کلاد را دادند و با هم رابطه خواهری دارند که با ارزش بوت استرپ ب ۱۰۰ درصد حمایت شده‌اند. همچنین تاکسون‌های مرتبط با نمونه‌های *Perinereis cultrifera* - 2017-F-J-C-L با یکدیگر منطبق بودند و تشکیل یک کلاد را دادند که با ارزش‌های بوت استرپ ۱۰۰ درصد حمایت شده‌اند. آنالیز فیلوژنتیک نشان داد که تاکسون‌های *Perinereis cultrifera* - 2017-A-M-N به دلیل شباهت بیشتر با رکوردهای ثبت شده KR916904.1، KR916906.1، KR916907.1، KR916908.1، KR916905.1 و KR916912.1 در بانک ژنی برگرفته شده از سواحل جنوبی اروپای اطلس در یک کلاد قرار گرفتند و با بوت استرپ ۷۴ درصد پشتیبانی شدند. شایان ذکر است که هیچ‌کدام از توالی‌های مورد مطالعه با تاکسون‌های بانک ژنی مرتبط با

در این تحقیق با سایر مطالعات مشابه بر روی پرتاران تطابق دارد و در سایر تحقیقات نیز واگرایی بین گونه ای اندکی در سایر جنس های پرتاران گزارش شده است (برای مثال Glover et al., 2005; Bastrop & Blank, 2006; Rice et al., 2008). (Jolly et al., 2006; Chevaldonne et al., 2002).

علاوه بر این، ۱/۸ برابر بودن میانگین واگرایی ژنتیک بین گونه ای نسبت به درون گونه ای و عدم مشاهده واگرایی های حد واسط نشان می دهد بازکد های COI قابلیت تمایز بالایی برای پرتاران دارند. در این تحقیق کلادهای موقت با واگرایی های اندک بین کلاسی معرفی شدند. بعنوان مثال *Perinereis sp.*- 2017-A-B-C با الگوی واگرایی اندک احتمالاً بیانگر حضور نسل جوانی از مجموعه ای از گونه های اخیراً مجزا شده، تولد زیرگونه های جدید، حضور هیبریدهای موقت، یا واگرایی طبیعی درون برخی گونه ها بیشتر از سایر گونه ها در مناطق مورد مطالعه باشند. انشقاق های جدید همراه شده با الگوهای پراکنشی پیچیده در طی زمان، شناسایی مراحل اولیه گونه زایی را بسیار دشوار می کند.

تفاوت در زیستگاه ها در مورد برخی از تاکسون ها مشهود بود؛ برای مثال در منطقه بندرعباس *Perinereis nuntia* مشاهده گردید ولی *Perinereis cultrifera* وجود نداشت. نتایج مشابه در خصوص جنس های *Eteone* از خانواده Phyllodocidae و *Ophelia* از خانواده Opheliidae در تحقیقات Carr و همکاران (2011) به دست آمده است و در تحقیق آنها نیز در برخی مناطق جغرافیایی نزدیک به هم، اعضاء هر دو جنس همراه با هم مشاهده نشدند در حالی که در بیشتر ایستگاه ها با هم گزارش شده بودند. از دلایل بروز چنین تفاوت‌هایی در میان اعضاء متعلق به یک جنس یا گونه میتوان به خصوصیات متفاوت ژنتیکی در میان آنها اشاره کرد. به عنوان مثال Rice و همکاران (۲۰۰۸) در سواحل کالیفرنیا، فلوریدا و Maine امریکای شمالی نشان دادند که تبارهایی از گونه *Polydora cornuta* تولید مثل مجزا دارند که نشان از آغاز روند گونه زایی و یا تولد زیرگونه‌ها می‌تواند باشد.

همچنین تحقیقات دیگری در مورد گونه *Hediste japonica* نشان داده است که اعضاء این گونه می‌توانند چرخه زیستی متفاوت نسبت به هم داشته باشند (Sato & Masuda, 1997). در تحقیقات Sato و Matsuda مشخص شد که از میان ۱۴ جایگاه ایزوزایم بررسی شده در اعضاء گونه *H. japonica*

شماره دسترسی‌های JX503024.1، JX503025.1 و JX503026.1 رابطه خواهری نشان دادند که با ارزش بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد حمایت می‌شوند.

۱-۳ تحلیل واگرایی ژن COI

بررسی میانگین فاصله نوکلئوتیدی بر اساس مدل دو پارامتری Kimura (K2P) نشان داد که فواصل نوکلئوتیدی درون جنسی ۱/۸ برابر فواصل درون گونه‌ای بوده است (۱/۹۶ نسبت به ۳/۵۲). در طی آنالیزهای فیلوژنی، تعداد تاکسون های به دست آمده در هر کلاستر بین ۲ تا ۱۴ عدد متغیر بود. تاکسون های مورد مطالعه در بیشتر موارد دو یا چند کلاستر انشقاق یافته داشتند که حداکثر واگرایی درون کلاستری آنها بین ۰ تا ۴/۴ درصد بوده است. ضمناً هیچ یک از گونه های به دست آمده با گونه دیگر کلاستر مشترک تشکیل ندادند.

بر اساس کلاسترنندی تاکسون های مربوط به نمونه های هر ایستگاه، می توان مشاهده نمود که بیشترین شباهت زیستی بر اساس ترکیب گونه‌ای بین ایستگاه های بوشهر و دیر و کمترین تشابه زیستی میان ایستگاه های دیر و بندرعباس بوده است. همچنین میتوان مشاهده نمود که ایستگاه های دیلم و بندرعباس ساختار گونه‌ای متفاوت نسبت به سایر ایستگاه ها داشتند. لذا بر اساس میزان تشابهات زیستی مشاهده شده، میتوان مناطق نمونه برداری را به سه دسته بوشهر-دیر، دیلم و بندرعباس تقسیم بندی نمود.

از ۵۰ نمونه شناسایی شده در این تحقیق ۳۹ توالی فاقد رکورد قبلی در ژن بانک بوده و برای نخستین بار بارکدگذاری شدند. کلاسترهای بارکد شامل گونه های موقت در بیشتر موارد، نشان دهنده مرزهای گونه‌ای مشخص و شفاف بوده است. با وجود اینکه گونه های نام برده شده اغلب شامل بیش از یک گونه موقت بوده اند، کلاسترها به سادگی شناسایی شده و عمدتاً از گونه های دیگر به وضوح فاصله داشتند. توالی های بارکدی در مورد بیشتر گونه های بدست آمده تفاوت داشته است به این ترتیب که بیشترین واگرایی بین گونه ای ۳/۵ درصد و مربوط به گونه *Perinereis cultrifera* بوده است که نشان می دهد توالی-های به دست آمده، بطور طبیعی کلاسترهایی فشرده با تغییرات اندک را تشکیل داده‌اند چرا که مقادیر واگرایی توالی ها زیاد نبوده است. مقادیر واگرایی توالی‌های بین گونه‌ای گزارش شده

۴. نتیجه‌گیری

- در مقایسه مناطق نمونه برداری، در ایستگاه های دیر، دیلم، بوشهر و بندرعباس به ترتیب بیشترین توالی‌های با همولوژی کمتر از ۱۰۰ درصد بدست آمدند که نشان دهنده نیاز به مطالعات بیشتر و ثبت توالی های پرتاران این مناطق در ژن بانک می باشد.
- آنالیزهای فیلولژنتیک نشان داد که تعداد تاکسون های به دست آمده از جنس *Perinereis* در هر کلاستر بین دو تا ۱۴ عدد متغیر بود و همچنین ماکزیمم تغییرات درون کلاستری با افزایش تعداد افراد در هر کلاستر افزایش یافت. این نتایج نشان می دهد که با بیشتر شدن تعداد نمونه های توالی یابی شده، دقت تشخیص میزان واگرایی ژنتیکی نیز بالا می رود و نیاز به تحقیقات گسترده تر در منطقه مورد مطالعه را آشکار می نماید.
- با بررسی درخت های فیلولژی می توان دریافت بسیاری از گونه های پرتاران *Perinereis* مشاهده شده سواحل خلیج فارس، قرابت ژنتیکی بالایی با گونه های مشابه در آب های مناطق دیگر جهان همچون چین، کره جنوبی، استرالیا و اروپا دارند.
- وجود واگرایی های نوکلئوتیدی درون گونه ای همچنین مؤکد آن است که برخی پرتاران *Perinereis* در منطقه خلیج فارس که گمان می رفت از یک گونه واحد تشکیل شده باشند ممکن است در واقع شامل دو یا چند زیرگونه مجزا باشند.
- همچنین با بررسی میزان شباهت ژنتیکی در مناطق مورد مطالعه مشخص گردید که پرتاران *Perinereis* مستقر در سواحل استان بوشهر قرابت ژنی نسبتا بالایی داشته و با جنس *Perinereis* مستقر در بندرعباس تا حدودی متفاوت هستند ولی این تفاوت ها در حدی نیست که اشتقاق گونه ای را شاهد باشیم و واگرایی های ژنتیکی عمدتا در حد زیرگونه ای بوده اند. لذا می توان نتیجه گرفت به لحاظ ساختار گونه ای، پرتاران نرئیدیده در سواحل بوشهر، دیلم، دیر و بندر عباس قرابت ژنتیکی نسبتا زیادی با یکدیگر دارند. این همسانی نسبی جوامع پرتاران در مناطق مورد مطالعه، می تواند مؤکد این فرض باشد که جریان آبی خلیج فارس با کمک به پراکنش لارو پرتاران در سراسر برخی از نمونه‌ها در ۵ جایگاه کاملا تعویض آلل داشته‌اند و واگرایی مشخص ژنتیکی را نشان می‌دهند. در برخی تحقیقات دیگر مشخص گردید که حتی برخی اعضاء سیمپاتریک (در یک منطقه جغرافیایی مشترک) جنس *Dipolydora* تفاوت‌های اکولوژیک نشان می‌دهند (Manchenko & Radashevsky, 2002).
- نتایج واگرایی نوکلئوتیدی در ایستگاه های نمونه برداری نشان می دهند که تفاوت های ژنتیکی در میان پرتاران استان بوشهر با بندرعباس، در سطح گونه ای نبوده است و عمده این واگرایی ها در سطح زیرگونه ای می باشد؛ به این معنا که سطح واگرایی ژنتیکی در این مناطق آن چنان بالا نیست که منجر به اشتقاق گونه ای شده باشد. احتمال می رود علت این پدیده، نزدیکی نسبی ایستگاه های نمونه برداری و همچنین جریان آبی داخلی خلیج فارس از منطقه بندرعباس به سمت بوشهر باشد. از آنجا که لارو پرتاران قابلیت شنای آزاد داشته و ابزار اصلی حرکت این لاروها در حوضه های آبی جریانات آبی می باشند (Hernández-Guevara, 2005)، تشابه بالای گونه‌ای ایستگاه های استان بوشهر با یکدیگر و شباهت نسبی بندرعباس با ایستگاه های استان بوشهر، می تواند این احتمال را تقویت نماید که جریانات آبی در گردش میان این مناطق عاملی تأثیرگذار بر پراکنش گونه ای لارو نرئیدها در این مناطق بوده است.
- این فرضیه با نتایج پژوهش Marko در زمینه نقش تأثیرگذار لاروها در پراکنش جمعیتی شکم پایان دریایی سازگار است که در تحقیق خود نشان داد تغییرات های اکولوژیکی می تواند با تأثیر بر پراکنش لاروها باعث محدود شدن یا گسترده تر شدن الگوهای پراکنشی شود (Marko, 2004).
- در تحقیق صورت گرفته توسط Bush بر روی شناسایی و پراکنش پرتاران خانواده Cirratulidae در پاناما، بر تأثیر فاکتورهای اقلیمی همچون بارش و جریانات آبی در پراکنش لاروی این پرتاران تأکید شد و این نتایج با فرضیه تحقیق حاضر مبنی بر اثر چرخش جریان آبی خلیج فارس بر یکدست شدن تقریبی اعضاء جنس *Perinereis* به لحاظ ژنتیکی در مناطق مورد مطالعه تطابق دارد (Bush, 2006). هر چند نتایج تحقیق Bush بر اثر معنی دار فاکتورهای اکولوژیکی همچون اسیدیته، دما و اکسیژن محلول نیز تأکید شده است که بررسی آن بر لارو پرتاران خلیج فارس نیازمند تحقیقات بیشتر می‌باشد.

- Nereididae (Annelida: Phyllodoce) of the Persian Gulf and Gulf of Oman, including description of two new species and 11 new records. *Zootaxa*, 4244(1), 91 .
- Bush, L. (2006). Identification and Distribution of the Polychaete Family Cirratulidae from the Las Perlas Archipelago, Panama (thesis). Marine Resource Development and Protection. School of Life Sciences, Edinburgh .
- Carr, C. M., Hardy, S. M., Brown, T. M., Macdonald, T. A., & Hebert, P. D. N. (2011). A Tri-Oceanic Perspective: DNA Barcoding Reveals Geographic Structure and Cryptic Diversity in Canadian Polychaetes. *PLoS ONE*, 6-7.
- Chen, C., Odorico, D., Tenlohuis, M., Veron, J., & Miller, D. (1995). Systematic Relationships within the Anthozoa (Cnidaria: Anthozoa) Using the 5'-end of the 28S rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4(2), 175-183.
- Chevaldonne, P., Jollivet, D., Desbruyeres, D., Lutz, R. A., & Vrijenhoek, R. C. (2002). Sister-species of eastern Pacific hydrothermal vent worms (Ampharetidae, Alvinellidae, Vestimentifera) provide new mitochondrial COI clock calibration. *Cahiers De Biologie Marine*, 43, 367-370 .
- Day, J. H. (1967). A monograph on the Polychaeta of Southern Africa. London: British Museum (Natural History) .
- Fauchald, K. (1977). The polychaete worms. Definitions and keys to the orders, families and genera (Science Series). Los Angeles, USA: Natural History Museum of Los Angeles County .
- Fauchald, K., & Rouse, G. (1997). Polychaete systematics: Past and present. *Zoologica Scripta*, 26(2), 71-138 .
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., & Blaxter, M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 11(4), 839-850 .
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and این حوضه آبی، موجب پدیدار شدن جمعیتی نسبتاً یک دست از این ارگانسیم ها شده است.
- منابع**
- دریا، م. سجادی، م. و سوری نژاد، ا. (۱۳۹۵). تعیین میزان هم‌آوری، وزن، قطر تخمک و نسبت جنسی کرم پرتار *Perinereis nuntia* در آب‌های ساحلی خلیج فارس محدوده بندرعباس. توسعه آبی پروری. شماره ۳، ۹۳-۱۰۴.
- سلیمانی راد، آ. کامرانی، ا. کشاورز، م. بهره مند، م. و وزیر زاده، ا. (۱۳۹۲). مقیاسه تنوع و پراکنش پرتاران جاسک شرقی و غربی در منطقه حفاظت شده جاسک (دریای عمان). اقیانوس‌شناسی. شماره ۱۶، ۴۵-۵۳.
- Ahmed Al-Omari, N. H., (2011). A Guide to Polychaetes (Annelida) in Qatar Marine Sediments. Doha, Qatar: Environmental Studies Center Qatar University .
- Barroso, R., Klautau, M., Solé-Cava, A. M., & Paiva, P. C. (2009). *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae), the 'cosmopolitan' fireworm, consists of at least three cryptic species. *Marine Biology*, 157(1), 69-80 .
- Bastrop, R., & Blank, M. (2006). Multiple Invasions – A Polychaete Genus Enters the Baltic Sea. *Biological Invasions*, 8(5), 1195-1200 .
- Beesley, P., Ross, G., & Glasby, C. (2000). A recent overview of Polychaetes, and related groups including myzostomes (Myzostomida), pogonophorans (Pogonophora), echiurans (Echiura) and sipunculans (Sipuncula). *Polychaetes & Allies: The Southern Synthesis*, 12 .
- Bleidorn, C., Kruse, I., Albrecht, S., & Bartolomaeus, T. (2006). Mitochondrial sequence data expose the putative cosmopolitan polychaete *Scoloplos armiger* (Annelida, Orbiniidae) as a species complex. *BMC Evolutionary Biology*, 6-47.
- Bonyadi-Naeini, A., Rastegar-Pouyani, N., Rastegar-Pouyani, E., Glasby, C. J., & Rahimian, H. (2017).

- supports shared history and vicariant events. *Molecular Ecology*, 15(7), 1841–1855 .
- Knowlton, N. (1993). Sibling Species in the Sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1), 189–216 .
- Malakauskas, D. M., Snipes, R. B., Thompson, A. M., & Schloesser, D. W. (2016). Molecular evidence of undescribed *Ceratonova* sp. (Cnidaria: Myxosporea) in the freshwater polychaete, *Manayunkia speciosa*, from western Lake Erie. *Journal of Invertebrate Pathology*, 137, 49-53.
- Manchenko, G. P., & Radashevsky, V. I. (2002). Genetic differences between two siblings sympatric *Dipolydora* species (Polychaeta: Spionidae) from the Sea of Japan, and a new species description. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 82(2), 193-199 .
- Marko, P. B. (2004). Whats larvae got to do with it? Disparate patterns of post-glacial population structure in two benthic marine gastropods with identical dispersal potential. *Molecular Ecology*, 13(3), 597–611 .
- Neal, L., Taboada, S., & Woodall, L. C. (2018). Slope-shelf faunal link and unreported diversity off Nova Scotia: Evidence from polychaete data. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 138, 72-84.
- Nygren, A., & Pleijel, F. (2011). From one to ten in a single stroke – resolving the European *Eumida sanguinea* (Phyllodoceidae, Annelida) species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58(1), 132–141 .
- Olson, M. A., Zajac, R. N., & Russello, M. A. (2009). Estuarine-Scale Genetic Variation in the Polychaete *Hobsonia florida* (Ampharetidae; Annelida) in Long Island Sound and Relationships to Pleistocene Glaciations. *The Biological Bulletin*, 217(1), 86–94 .
- Pleijel, F., Rouse, G., & Nygren, A. (2009). Five colour morphs and three new species of *Gyptis* (Hesionidae, Annelida) under a jetty in Edithburgh, South Australia. *Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3, 294–299
- Glover, A. G., Goetze, E., Dahlgren, T. G., & Smith, C. R. (2005). Morphology, reproductive biology and genetic structure of the whale-fall and hydrothermal vent specialist, *Bathyrurila guaymasensis* Pettibone, 1989 (Annelida: Polynoidae). *Marine Ecology*, 26(3-4), 223–234 .
- Hartman, O. (1965). *Catalogue of the Polychaetous Annelids of the world*. Los Angeles, CA: The University of Southern California Press .
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences*, 270(1512), 313–321 .
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), 14812–14817 .
- Hernández-Guevara, N. A. (2005). Distribution and mobility of juvenile polychaeta in a sedimentary tidal environment = Verbreitung und Mobilität juveniler Polychaeten in sandigen Watten. Bremerhaven: Alfred-Wegener-Inst. für Polar- und Meeresforschung.
- Hutchings P. A., & Fauchald, K. (2000). Class Polychaeta. Definition and general description. In: Beesley PL, Ross GJB, Glasby CJ, eds. *Polychaetes and allies: The southern synthesis*. CSIRO Publishing. pp 1–3.
- Jiang, M. X., & Liu, M. H. (2008). Research progress of Nereididae. *Mar. Sci.*, 32, 82-86.
- Jolly, M. T., Viard, F., Gentil, F., Thiébaud, E., & Jollivet, D. (2006). Comparative phylogeography of two coastal polychaete tubeworms in the Northeast Atlantic

- Rouse, G. W., & Pleijel, F. (2008). *Polychaetes*. Oxford: Oxford University Press .
- Sato, M., & Masuda, Y. (1997). Genetic differentiation in two sibling species of the brackish-water polychaete *Hediste japonica* complex (Nereididae). *Marine Biology*, 130(2), 163–170 .
- Smith, M. A., Fisher, B. L., & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Biological Sciences*, 360(1462), 1825–1834 .
- Sun, Y., Wong, E., Ahyong, S. T., Williamson, J. E., Hutchings, P. A., & Kupriyanova, E. K. (2018). Barcoding and multi-locus phylogeography of the globally distributed calcareous tubeworm genus *Hydroides* Gunnerus, 1768 (Annelida, Polychaeta, Serpulidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127, 732-745.
- Zoologica Scripta, 38(1), 89–99 .
- Radulovici, A. E., Archambault, P., & Dufresne, F. (2010). DNA Barcodes for Marine Biodiversity: Moving Fast Forward? *Diversity*, 2(4), 450–472 .
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). BARCODING: Bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355-364 .
- Read, G., Fauchald, K. (Ed.) (2019). World Polychaeta database. Nereididae Blainville, 1818. Accessed through: World Register of Marine Species at: <http://www.marinespecies.org> on 2019-06-02.
- Rice, S. A., Karl, S., & Rice, K. A. (2008). The *Polydora cornuta* complex (Annelida: Polychaeta) contains populations that are reproductively isolated and genetically distinct. *Invertebrate Biology*, 127(1), 45–64.