

부산 기장에서 채집된 말미잘의 분자생물학적 방법을 이용한 동정

유상준 · 김도형*

부경대학교 수산생명의학과

Molecular Identification of a Sea Anemone (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria) Obtained in Gijang, Busan

Sang Joon Yoo and Do-Hyung Kim*

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

In this study, we tried to identify a sea anemone collected from the coast of Gijang, Busan. The anemone was morphologically similar to species belonging to the genus *Anthopleura*, but its morphological characteristics did not allow for confirmed identification to species level. Multiple genes from mitochondrial cytochrome oxidase III, 12S and 16S rRNA, and nuclear 18S and 28S rRNA, were amplified for multilocus sequence typing (MLST) analysis using genomic DNA extracted from the sampled anemone and a different primer set. Based on the MLST analysis, the anemone obtained in this study was identified as *Anthopleura artemisia*. Also, the sequence of internal transcribed spacer-2 was most closely related to *A. artemisia*, indicating that this single region might be useful for anemone identification. This study shows significance of molecular identification for sea anemones, and will be helpful in studies of sea anemone identification using genotyping-by-sequencing.

Key words: Sea anemone, Actiniaria, Molecular identification, *Anthopleura artemisia*, Multilocus sequence typing

서론

말미잘(order Actiniaria)은 강장동물(Cnidaria)의 산호충강(class Anthozoa)에서 가장 많은 종을 포함하는 부류로서 매우 다양한 수심과 지역의 해양환경에 서식한다(Daly et al., 2008). 말미잘은 에너지를 수층에서 저서로 운반하고 저층에서 대사물질, 배우체와 수정체를 수층으로 방출하는 수층-저층 연결고리(benthic-pelagic coupling)라는 매우 중요한 역할을 한다(Daly et al., 2008). 말미잘은 대략 1,200종으로 구성되어 있고 해부학적인 공통과생형질(synapomorphy)이 없는 특징이 있다(Rodriguez et al., 2015). 말미잘은 몸체(column)와 촉수(tentacle)의 크기 등 외형과, 장간막(mesenteries) 근육의 형태나 배열 등의 형태적 다양성이 매우 크다(Reft and Daly, 2012). 말미잘은 산호류와 같이 와편모조류(dinoflagellate)와 공생하는 독립영양생물부터 와편모조류와 공생 관계 없이 심해에서 촉수를 이용해 포식하여 생존하는 종속영양생물까지 다양한 생태적 특징을 보인다(Reft and Daly, 2012). 말미잘은 최초 Stephenson (1922)에 의해 Endocoelanthaeae, Nynantheae 및 Protantheae

의 3개의 아목으로 분류 되었으며, Carlgren (1949)에 의해 Ptychodactaria이 아목에 추가되어 현재 4개의 아목 체계를 갖추었다. 이 중 Nynantheae는 형태학과 생태학적 측면에서 매우 다양한 약 1,100종의 말미잘을 포함하고 있으며, 나머지 3개의 아목은 상대적으로 적은 수의 종으로 구성 되어 있다 (Daly et al., 2008; 2010; Rodriguez and Daly, 2010; Rodriguez et al., 2012). 최근까지도 말미잘의 아목 간의 구분을 위해 Carlgren (1949)의 분류법이 사용되고 있으며, 각 아목에 속하는 종이 갖는 특유의 기관이나 형태학적 특징을 비교하는 방법을 사용하고 있다(Fautin et al., 2013). 하지만 이런 형태학적 특징만으로는 속(genus) 수준의 동정도 어렵다. 사실 말미잘의 분류는 형태학적 특징에 바탕을 둔 통일된 계통발생학적 근거가 부족하기 때문에(Daly et al., 2008) 염기서열을 이용한 유전학적 분류 체계가 매우 중요해지고 있다(Daly et al., 2010).

국내에서 해변말미잘목은 1962년 최초로 보고된 후, 꽃해변말미잘속(*Anthopleura*)에 속하는 *Anthopleura japonica*, *A. midori*, *A. pacifica* (Song, 1984) 및 *A. kurogane* (Song, 1992) 이 보고 되었고, 각 종에 대한 국명은 각각 다음과 같다. 갈색꽃

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0447>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 50(4) 447-452, August 2017

Received 7 June 2017; Revised 14 July 2017; Accepted 27 July 2017

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5945 Fax: +82. 51. 629. 5938

E-mail address: dhkim@pknu.ac.kr

해변말미잘, 풀색꽃해변말미잘, 태평양꽃해변말미잘, 김정꽃해변말미잘. 이전 연구에서 꽃해변말미잘속 말미잘은 일반적으로 내만의 조간대에서 서식하며 공통적으로 외측 몸체에 기질의 부착을 위한 돌기(stark)가 열을 지어 잘 발달 되어 있고, 몸체(column)의 크기와 촉수의 배열, 족반(pedal disk)과 방사성인두(actinopharynx)의 형태와 장간막의 배열 등을 이용하여 형태적으로 구분하였다. 그러나 4개의 종을 서로 비교 분석하지 않고 위의 공통으로 존재 하는 형태학적 특징 만으로 각 종을 명확하게 구분하는 것은 어렵다. 또한 우리나라에 서식하는 말미잘을 유전학적 방법을 이용하여 동정하고 그 분포 특성을 밝힌 연구는 매우 드물다. 그러므로 이번 연구의 목적은 최근 말미잘의 분류와 동정에 사용되는 분자생물학적인 방법을 이용하여 국내에 서식하는 말미잘을 동정하였고 기존의 형태학적 특징에 기반한 분류학적 위치와 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

말미잘 시료의 채집

동정 대상 말미잘은 부산시 기장군 학리(N35°, 15'; E129°, 14')의 조간대 암반에 부착되어 있는 말미잘을 채집하였다. 시료는 운반하여 멸균 해수로 세척 후 염도 35‰, 수온 18°C, pH 8.1의 인공해수(Artificial seawater, Kent, USA)에 순치 하

였다.

Genomic DNA의 분리 및 PCR

Genomic DNA는 채집 된 말미잘의 촉수, 촉수기둥(tentacle column), 입, 강장 그리고 표피 조직 일부(0.1±0.32 g)를 절취 하여, 인공해수로 세척 한 뒤, 1.5 mL 튜브에 넣고 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen Corporation, Santa Clarita, CA)를 사용 하여 DNA를 추출 하였다. 1시간의 lysis 반응 시간을 제외하고는 제공된 설명서와 Geller and Walton (2001) 및 Rodriguez and Daly (2010; 2014)의 방법에 따랐다.

말미잘로부터 추출한 DNA를 이용하여 해수 말미잘의 분류와 동정에 일반적으로 사용하는(Daly et al., 2008; Daly et al., 2010; Rodriguez et al., 2012; 2014) 미토콘드리아(mtDNA)의 Cytochrome oxidase III (COIII), 12S rRNA (12S) 및 16S rRNA (16S)와 염색체(nrDNA)의 18S rRNA (18S)와 28S rRNA (28S)의 타겟 부분을 증폭하였다. MyCycler (Bio-rad, Hercules, CA)을 사용하여 PCR을 하였다. 또한 internal transcribed spacer-2 (ITS2)도 PCR하여 말미잘의 동정에 유용한지 확인하고자 하였다. 사용한 primer와 PCR 조건은 Table 1에 나타내었다. PCR을 통해 증폭시킨 산물은 각 1 µL씩 아가로스겔 1%에 로딩하여 Mpid-2 plus (Takara, Japan)에서 25분 동안 전기영동하여 확인 한 후 AccuPrep™ PCR Purification Kit (Bioneer, Korea)

Table 1. Primer sets and PCR conditions used in this study

Set No	Target region	Marker	Sequence (5'-3')	Cycling Profile	Reference
1	Cytochrome oxidase III (mtDNA)	COIII-F COIII-R	CATTTAGTTGATCCTAG-GCCTTGACC CAAACCACATCTACAAAAT-GCCAATATC	(95°C for 2 m) [(95°C for 30 s)(46°C for 45s)(72°C for 1 m)] x 30 (72°C for 5 m)	Geller and Walton, 2001
2	12S rRNA (mtDNA)	ANTMT12S-F ANTMT12S-R	AGCCACACTTTCAGTGAACAAGG GTTCCCYWYCYCTYACYAT-GTTACGAC	(95°C for 4 m) [(94°C for 30 s)(50°C for 1 m)(72°C for 2 m)] x 4 [(94°C for 30 s)(55°C for 1 m)(72°C for 2 m)] x 30 (72°C for 5 m)	Chen et al., 2002
3	16S rRNA (mtDNA)	ANEM16SA ANEM16SB	CACTGACCGTGATAATG-TAGCGT CCCCATGGTAGCTTTTATTCG	(95°C for 2 m) [(95°C for 30 s)(60°C for 30s)(72°C for 1 m)] x 30 (72°C for 5 m)	Geller and Walton, 2001
4	Internal transcribed spacer-2 (nrDNA)	itsD ITS-2rev2	GTGAATTGCAGAACTCCGTG CCTCCGCTTACTTATATGCTT	(95°C for 7 m) (94°C for 45 s)(52°C for 45 s) (72°C for 45 s) x 35 (72°C for 5 m)	Stat et al., 2009 Pochon and Ruth, 2010
5	18S rRNA (nrDNA)	ss5 ss3z	GGTGATCCTGCCAGTAGT-CATATGCTTG AGCACTGCGTCAGTCG-GAATATTCACCGG	(95°C for 2 m) [(95°C for 1 m)(54°C for 1 m)(72°C for 2 m)] x 30 (72°C for 5 m)	Rowan et and Powers, 1991 Geller and Walton, 2001
6	28S rRNA (nrDNA)	LSU D1-D2 fw1 LSU D1-D2 rev1	AGCGGAGGAAAAGAACTA TACTAGAAGGTTTCGATTAGTC	(95°C for 5 m) [(94°C for 30 s)(45°C for 1 m)(65°C for 12 m)] x 30 (72°C for 10 m)	Sonnenberg et al, 2007

을 이용하여 정제 하였으며, ABI Prism 3730 xl DNA Analyzer (PE Applied Biosystems, USA)를 사용하여 sequencing을 실시 하였다.

염기서열 수집 및 분석

현재 데이터베이스에 있는 것과 이번 연구에서 나온 염기서열을 분석하기 NCBI 데이터베이스로부터 5개 유전자(COIII, 12S, 16S, 18S 및 28S) 염기서열이 모두 존재하는 44개의 속을 대표하는 각 종의 염기서열을 수집하였으며(Table 2), 이를 MUSCLE 프로그램(Robert et al., 2004)을 이용하여 동일한 크기로 정렬(alignment)하였다(Table 2). 각 유전자의 길이는 Table 2 (Parsimony informative characters)에 나타내었다. 본 연구에서 얻어진 염기서열을 포함하여 45종의 각 유전자 염기서열을 MEGA 7을 이용하여 결합하였으며(concatenated sequence), Kimura 2-parameter로 1,000번의 bootstrap value를 샘플링을 하여 계통수(Neighbor-Joining tree)를 작성하였다.

Table 2. Results of parsimony analysis of each data set and concatenated sequence

Marker or data set	Marker un-aligned length	# Parsimony Informative Characters (% informative)
COIII (mtDNA)	450	410 (91.11%)
12S rRNA (mtDNA)	800	686 (88.13%)
16S rRNA (mtDNA)	400	459 (98.25%)
18S rRNA (nuclear)	1800	1704 (94.67%)
28S rRNA (nuclear)	1200	828 (74.75%)
concatenated sequence (5 target genes)	4650	4295 (88.37%)

결과 및 고찰

본 연구의 채집 말미잘은 조건대에서 부착 생활을 하기 위해 발판(pedal disc)이 잘 발달 했으며, 무게 6.6 g과 지름 2.2 cm의 크기(Fig. 1)로 촉수 주변으로 소낭(marginal spherules)이 관찰 되었다. 또한 몸통(column) 상부 쪽으로부터 수직 열로 발달 된 돌기(stark)가 도드라졌으며, 5줄의 원형으로 배치된 촉수는 가장 안쪽의 원에서 촉수 2개씩, 12쌍으로 구성되어 육방산 호아강(Hexacorallia)의 특징을 잘 나타내었다. 형태와 서식지로 볼 때, 국내 해변에서 흔하게 발견되는 꽃해변말미잘류(*Anthopleura*)로 판단되었다. 특히 형광 녹색을 띠는 몸체와 돌기의 색은 Song (1984; 1992)에 의해 보고 된 풀색꽃해변말미잘(*Anthopleura midori*)의 특징을 나타내었으나, 촉수가 자색으로 기존 보고된 풀색해변말미잘과는 차이가 있었다. 이러한 형태학적 특징은 국내 미 보고 종인 *Anthopleura artemisia*와도 매우 유사하여 한 종으로 특정할 수는 없었다. 1958년 Uchida와 Muramatsu (1958)에 의해 명명된 *A. midori*는 현재 World register of marine species (WoRMS, <http://www.marinespecies.org>)에는 등재되어 있지 않고 synonym으로 *A. anjunae* Den Hartog and Vennam (1993)라는 종명이 수용되고 있는 것을 확인할 수 있다. 그러나 현재 NCBI에는 *A. anjunae*의 염기서열은 없고 모두 *A. midori*의 것만 등재되어 있어 본 연구에서도 이 종의 염기서열을 비교하는데 사용하였다.

일반적으로 말미잘의 4개 아목(suborder)의 분류 기준은 각 아목의 형태학적으로 특징이 이용되어 왔다. 예를 들어 장막 섬모(Mesenteric filament)의 경우 아목, Endocoelanthae와 Nynantheae에 특징적으로 존재하지만, Protantheae와 Ptychodactae에는 없다. 또한 장막의 특이적인 배열은 Endocoelanthae와 Ptychodactae에서만 보이는 특징이다(Calgren et

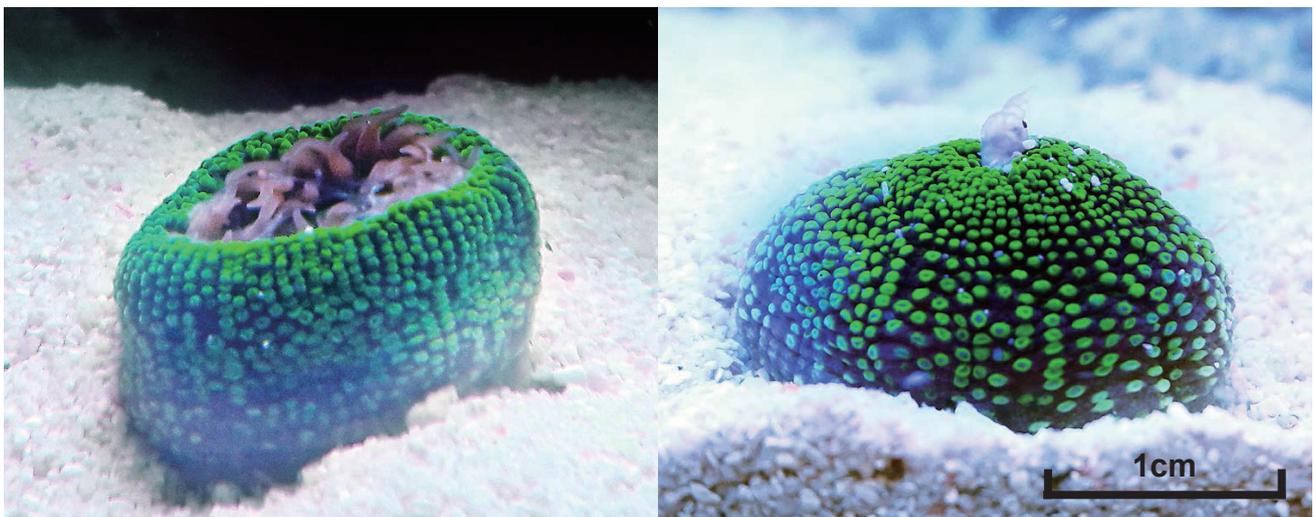


Fig. 1. Sea anemone *Anthopleura artemisia* used in this study.

및 *A. handi*)로 매우 제한적이라 향후 보다 많은 종의 분석이 필요할 것으로 사료된다.

현재까지 말미잘에 대한 계통발생학적 체계가 부족하기 때문에 이 동물 분류군의 진화와 다양성에 대한 연구가 지지부진하였다(Daly et al., 2008). 기존의 생물 분류에 사용한 여러 분자 마커들이 말미잘에서는 유용하지 않고, 또한 현재 말미잘의 분류 체계 내에 형태학적으로 매우 다양한 생물이 속이나 과를 형성하고 있기 때문이다(Daly et al., 2008). 그럼에도 불구하고 다양한 분자 마커를 이용한 계통발생학 연구 및, 속이나 종을 잘 구분할 수 있는 마커 탐색 연구가 지속적으로 이뤄지고 있다(e.g., Daly et al., 2008; Daly et al., 2010; Rodriguez et al., 2012; 2014). 현재 말미잘의 계통발생학 연구를 위해 가장 널리 사용되는 분자 마커는 본 연구에서 사용한 미토콘드리아의 12S, 16S와 COIII 그리고 핵의 18S와 28S의 5개 유전자이며, 각 유전자를 단일로 사용하거나 연결하여 사용하고 있다. Eernisse and Kluge (1993)는 위 5개의 유전자를 합친 염기서열 데이터는 진화의 역사를 보다 정확히 보여줄 수 있다고 하였으며, 최근 발표된 말미잘의 분류 연구에도 널리 사용되고 있다(e.g., Daly et al., 2008; Daly et al., 2010; Rodriguez et al., 2012; 2014). 산호충강에 속하는 산호와 말미잘을 분류하기 위해 일반적으로 사용되었던 미토콘드리아의 cytochrome subunit I gene (COI)부위는 염기서열이 고도로 보존됨에 따라 염기서열의 변이(interspecific variability)가 너무 낮아 종을 구분하는 데는 유용하지 않다(Shearer et al., 2002; Flot et al., 2013). 그럼에도 Keshavmurthy et al. (2013)는 COI, 미토콘드리아의 단일 유전자를 이용하여 Stylophora 속의 종을 구분하였다. 이처럼 산호충강의 동물이라도 대상이 되는 속에 따라 변이가 충분하거나 그렇지 않음을 알 수 있다(Flot et al., 2008). 동일한 방법을 이용한 본 연구에서도 본 연구에 사용한 말미잘의 계통발생학적 관계가 속 수준(genus level)까지는 잘 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 위에서 참조한 여러 연구의 주장과 같이 이 분자 마커들을 이용하여 종 수준의 명확한 동정은 어려울 수 있다. 그러나 본 연구에 해당 마커들을 사용한 결과 *A. artemisia*와 염기서열의 동정이 가능하였다. 물론, 향후 이 속에 속하는 다른 여러 종과 비교가 추가적으로 필요할 것이다. 기존에 보고되었던 말미잘의 동정 연구의 경우 위에 거론한 모든 유전자의 염기서열이 등재되어 있지 않아 쉽게 비교하기가 어려워, 18S rDNA만으로만 동정한 연구 사례도 있다(Gilan et al., 2015).

기존의 형태학적 특징을 이용한 말미잘의 동정은 여러 측면에서 많은 문제점을 내포하고 있으며 속이나 과 수준에서도 뚜렷한 구분 기준이 없다. 그럼에도 불구하고 지금까지 우리나라 말미잘의 연구는 대부분 형태학적 특징만을 근거로 종을 보고 하였으며, 유전학적 방법을 이용한 말미잘의 동정 연구는 매우 드물다. 따라서 본 연구는 최근 말미잘 분류에 흔히 이용되는 5개의 house-keeping gene을 이용하여 대상 말미잘을 동정하였을 때 *Anthopleura*에 속하는 것을 알 수 있었으며 NCBI에 등재

된 이 속의 종 중에서는 *A. artemisia*와 가장 가까웠다. 형태학적 특징으로 Song (1984; 1992) 연구에 근거하면 풀색꽃 해변 말미잘(*Anthopleura midori*)과 가장 유사하였으나, WoRMS에 따르면 이 종명은 현재 통용되지 않으며, 국내에 보고 사례가 없는 *A. artemisia*와도 형태학적 차이가 크지 않아 유전학적 동정 없이 명확한 구분을 내릴 수 없었다. 그러므로 향후 우리나라에 서식하는 말미잘의 종 동정과 분포 특성 연구에 유전학적 방법이 필요할 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2015년)에 의하여 연구되었습니다.

References

- Carlgen O. 1949. A survey of the Ptychodactiaria, Corallimorpharia and Actiniaria. *Almqvist Wiksells boktr* 1, 1-121.
- Chen CA, Wallace CC and Wolstenholme J. 2002. Analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene supports a two-clade hypothesis of the evolutionary history of scleractinian corals. *Mol Phylogenet Evol* 23, 10-13. [https://doi.org/10.1016/s1055-7903\(02\)00008-8](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(02)00008-8).
- Daly M, Chaudhuri A, Gusmao L and Rodriguez E. 2008. Phylogenetic relationships among sea anemones (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria). *Mol Phylogenet Evol* 48, 292-301. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.02.022>.
- Daly M, Gusmao LC, Reft AJ and Rodriguez E. 2010. Phylogenetic signal in mitochondrial and nuclear markers in sea anemones. *Integrat Comparat Biol* 50, 1-18. <https://doi.org/10.1093/icb/icq081>.
- Flot JF, Licuanan WY, Nakano Y, Payri C, Cruaud C and Tiliier S. 2008. Mitochondrial sequences of Seriatopora corals show little agreement with morphology and reveal the duplication of a tRNA gene near the control region. *Coral Reefs* 27, 789-794. <https://doi.org/10.1007/s00338-008-0407-2>.
- Flot JF, Dahl M and André C. 2013. *Lophelia pertusa* corals from the Ionian and Barents seas share identical nuclear ITS2 and near-identical mitochondrial genome sequences. *BMC Res Notes* 6, 144. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-144>.
- Geller JB and Walton ED. 2001. Breaking up and getting together: evolution of symbiosis and cloning by fission in sea anemones (genus *Anthopleura*). *Evolution* 55, 1783. [https://doi.org/10.1554/0014-3820\(2001\)055\[1781:BUAGTE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1554/0014-3820(2001)055[1781:BUAGTE]2.0.CO;2).
- Gilan AF, Pegah J and Arash S. 2015. Morphology and phylogeny of the sea anemone *Stichodactyla haddoni* (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria) from Chabahar Bay. *Turk J Zool* 39, 998-1003. <https://10.3906/zoo-1310-4>.
- Hellberg and Michael E. 2006. No variation and low syn-

- onymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *BMC Evol Biol* 6, 24. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-24>.
- Keshavmurthy S, Yang S, Alamaru A, Chuang Y, Pichon M, Obura D, Fontana S, De Palmas S, Stefani F, Benzoni F, MacDonald A, Noreen AME, Chen C, Wallace CC, Pillay RM, Denis V, Amri AY, Reimer JD, Mezaki T, Sheppard C, Loya Y, Abelson A, Mohammed MS, Baker AC, Mostafavi PG, Suharsono BA and Chen CA. 2013. DNA barcoding reveals the coral “laboratory-rat”, *Stylophora pistillata* encompasses multiple identities. *Sci Rep* 3, 1520. <https://doi.org/10.1038/srep01520>.
- Pochon X, Pawlowski J, Zaninetti L and Rowan R. 2001. High genetic diversity and relative specificity among *Symbiodinium*-like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans. *Mar Biol* 139, 1069-1078. <https://doi.org/10.1007/s002270100674>.
- Pochon X and Ruth DG. 2010. A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai’i. *Mol phylogenet evol* 56, 492-497. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.03.040>.
- Reft A and Daly M. 2012. Morphology, distribution, and evolution of apical structure of nematocysts in Hexacorallia. *J Morphol* 273, 121-136. <https://doi.org/10.1002/jmor.11014>.
- Rodriguez E and Daly M. 2010. Phylogenetic relationships among deep-sea and chemosynthetic sea anemones: Actinoscyphiidae and Actinostolidae (Actiniaria: Mesomyaria). *PLoS ONE* 5, e10958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010958>.
- Rodriguez E, Barbeitos M, Daly M, Gusmao LC and Haussermann V. 2012. Toward a natural classification: phylogeny of acontiate sea anemones (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria). *Cladistics* 1, 1-18. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2012.00391.x>.
- Rodriguez, E, Barbeitos MS, Brugler MR, Crowley LM, Grajales A, Gusmao L and Daly M. 2014. Hidden among sea anemones: the first comprehensive phylogenetic reconstruction of the order Actiniaria (Cnidaria, Anthozoa, and Hexacorallia) reveals a novel group of hexacorals. *PLoS One* 9, e96998, 28-34. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096998>.
- Rowan R and Powers DA 1991. A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science* 251, 1348-1351. <https://doi.org/10.1126/science.251.4999.1348>.
- Shearer TL, Van OSL, Romano G and Wörheide. 2002. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Mol Ecol* 11, 2475-2487. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01652.x>.
- Song JI. 1984. A systematic study on the Korean Anthozoa 8. Actiniaria (Hexacorallia). *J Korean Res Instit Better Liv* 34, 69.
- Song JI. 1992. Systematic study on Anthozoa from the Korea Strait in Korea: subclasses Zoantharia and Ceriantipatharia. *Anim Syst Evol Divers* 8, 259-278.
- Sonnenberg, Rainer, Arne WN and Diethard T. 2007. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Front zool* 4, 6. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-4-6>.
- Stat M, Pochon X, Cowie R and Gates RD. 2009. Specificity in communities of *Symbiodinium* in corals from Johnston Atoll. *Mar Ecol Prog Ser* 386, 83-96. <https://doi.org/10.3354/meps08080>.
- Stephenson TA. 1922. On the classification of Actiniaria. Part III. – Definitions connected with the forms dealt with in Part II. *Q J Microscop Sci* 66, 247-319.
- Stoletzki N and Schierwater B. 2005. Genetic and color morph differentiation in the Caribbean sea anemone *Condylactis gigantea*. *Mar Biol* 147, 747-754. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-1620-y>.