

معرفی کلاد D زوگرانتله به عنوان همزیست غالب با مرجانهای سخت ناحیه جزر و مدي جزیره هنگام

کریمی، ا.، قوام مصطفوی، پ.، شاه حسینی، م.ح. و فاطمی، س.م.ر.، ۱۳۸۹. معرفی کلاد D زوگرانتله به عنوان همزیست غالب با مرجانهای سخت ناحیه جزر و مدي جزیره هنگام. مجله بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، سال دوم، شماره اول، صفحات ۱۷-۱۱.

چکیده

الناز کریمی^{۱*}، پرگل قوام مصطفوی^۲،
محمد حسن شاه حسینی^۳ و سید محمد
رضا فاطمی^۴

۱. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
۲. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
۳. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس.

^{*} نویسنده مسئول مکاتبات
karimi.2362@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۱/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۲/۲۴

تشکیل آبسنگهای مرجانی به علت همزیستی نوعی تازکدار تک سلولی به نام زوگرانتله (*Zooxanthellae*) با مرجانها می باشد که عمدها متعلق به جنس *Symbiodinium* بوده و نقش بسیار مهمی را در پدیده سفید شدگی بر عهده دارد. این تک سلولی ها و میزان آنها مرجانها در برابر شرایط استرس زای محیطی مانند شوری، درجه حرارت بالا، درجه حرارت کم، نور زیاد و کدورت می توانند از خودشان مقاومت نشان دهند. در این تحقیق ۳ گونه مرجان *Cyphastrea serailia* از حوضچه های جزو مدي *Coscinaraea columnata*, *Anomastrea irregularis*, وجود کلاد مقاوم D طبیعی به نظر می رسد.

واژگان کلیدی: زوگرانتله های همزیست، مرجانهای سخت، جزیره هنگام، خلیج فارس.

است. تنها مطالعه صورت گرفته در سواحل ایرانی خلیج فارس بر روی زوگرانتله های مرجانهای سخت غالب اطراف جزیره کیش و لارک بوده که در این مطالعات کلاد D و C90 به عنوان کلادهای غالب گزارش شده است(*Mostafavi et al., 2007*). همچنین بر روی مرجانهای نرم در سواحل شمالی خلیج فارس در جزیره لارک کلاد D به عنوان غالب گزارش شده است (آزادبادی، ۱۳۸۸). در سواحل جنوبی خلیج فارس نیز مطالعاتی بر روی زوگرانتله های مرجانهای سخت انجام شد که کلاد D، کلاد غالب در این ناحیه بوده است. کلاد A و C نیز در برخی گونه ها یافت شده است (*Baker et al., 2004*).

آبسنگهای خلیج فارس بدلیل قرار گیری در خارج از مرز جغرافیایی ۲۳/۵ درجه ی استوایی دارای ویژگی های خاصی هستند. شرایط سخت زندگی در خلیج فارس به دلیل بالا بودن میزان شوری، درجه ی حرارت و کدورت، مرجان ها را دچار استرس زیادی کرده است (*Baker et al., 2004*) که در این شرایط رشد آبسنگها محدود می شود.

مقدمه

آبسنگهای مرجانی نشانه ای از سازش بین مرجان های آهکی و جلبک های تک سلولی دو تازکی از جنس *Symbiodinium* است که به این جلبکها در اصطلاح زوگرانتله (*Zooxanthellae*) گفته می شود. ارتباط همزیستی بین مرجانها و جلبکهای تک سلولی همزیست، مرجانهای آبسنگ ساز را قادر می سازد تا توان تولید مواد آلی و تولید کربنات کلسیم در پیکره ای آبسنگ مرجانی را داشته باشند (*Trench, 1986*). با توجه به مناطق ژئومی متفاوت در زوگرانتله ها آنها را در ۸ کلاد دسته بندی کرده اند (A-H) که این کلادها در شاخه های متنوعی از جانوران مانند گزنه سانان، نرمتنان، روزنه داران دیده می شوند (*Van Oppen, 2004*).

انواع مختلف *Symbiodinium* فیزیولوژی متفاوتی داشته و این مسئله نقش مهمی در بقاء مرجانها ایفا می کند (*Baker, 2003*). امروزه بیشتر مطالعات مربوط به تنوع زیستی *Symbiodinium* در دریایی کارائیب و اقیانوس آرام انجام شده

Symbiodinium به عنوان هدف اصلی از انجام این تحقیق در نظر گرفته شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری از سواحل بین جزر و مدی جزیره هنگام با تأکید بر سواحل صخره‌ای واقع در "٥٤°٤٠' ٥٥°٣٦' تا ٥٥°٥٥' طول شرقی و "٤٣°٣٦' ٤١°١٥' عرض شمالی در تابستان ۱۳۸۸ انجام گرفت (شکل ۱). برای انجام این تحقیق ابتدا جنسهای مورد نظر دارای زوگزانتله، شناسایی شده سپس نمونه برداری انجام شد و گونه‌های مرجان جمع آوری شده عبارتند از:

Cyphastrea serailia و *Faviidae* *Coscinaraea* *Anomastrea irregularis* *Siderastreidae* *columna* گونه‌های مربوط به خانواده *Cyphastrea serailia* گونه مرجان ۳ کلني مجزا انتخاب واژ هر کلني ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شدند و در آنجا با کمک بافر (NaCl 0.4M, EDTA50 mM, pH=8) DNAB و دستگاه شست و شو با هوا (Air Brush) توده لرج زوگزانتله جدا شد و در لوله‌های فالکون های ۵۰ میلی متر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند برای استخراج DNA ابتدا نمونه‌ها ساتریفوژ شدند و تشکیل دو فاز متفاوت را دادند، سپس به قسمت ته نشین شده بافر DNAB و سدیم لوریل سولفات یا سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱۰٪ اضافه شدند پاره شود سپس به آنها پروتئیناز K اضافه کرده و داخل بن ماری گذاشته تا دیواره های سلولی کرده و ۱/۵ ساعت داخل بن ماری گذاشته تا دیواره های سلولی جلبک پاره شود سپس به آنها پروتئیناز K اضافه کرده و داخل بن ماری گذاشته و سپس ازروش CTAB و کلروفرم برای انجام عمل استخراج استفاده شد (Baker, 2001).

DNA مورد نظر جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز مورد استفاده قرار می گیرد. ژن هدف در اینجا زیر واحد بزرگ ریبوزومی هسته ای (Large subunit rRNA LSU) می باشد و با استفاده از پرایمر های اختصاصی با ترافق زیر واکنش PCR انجام گرفت :

Mos Forward (ATA TAA GTA AGC GGA GGA AAA G)
Mos Reverse (CTT TCG GGT CCT AAC ACA CAT G)

تغییرات شدید حرارتی، از جمله گرم شدن بیش از حد آب دریا از جمله عواملی است که باعث ایجاد محیطی استرس زا برای میزان و همزیست تک سلولی اش می شود. در این حالت امکان جدا شدن زوگزانتله از مرجان‌ها که منجر به پدیده‌ی سفیدشدن (Bleaching) و مرگ میزان می‌گردد وجود دارد. (Hoegh-Guldberg, 1999) بزرگترین پدیده سفید شدگی و مرگ و میر مرجانها مربوط می شود به ال نینو سالهای ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸ که طی این دوره آبسنگهای مرجانی زیادی را تحت تاثیر خود قرار داد (Wilkinson, 2000). بررسی‌ها نشان داده است که *Symbiodinium* ها میتوانند نظر فیزیولوژی و سازش با محیط متفاوت عمل کنند که احتمالاً ناشی از تفاوت در گونه‌های میزان باشد (Huang et al., 2006). شواهد نشان می دهد که *Symbiodinium* کلاد D نسبت به سایر کلادهای مشاهده شده در مرجان‌ها به درجه حرارت بالا مقاوم تر می باشد (Rowan, 2004). مقاوم بودن این کلاد نسبت به حرارت بالا، منجر به این فرضیه شده است که پراکندگی این کلاد در آبسنگ‌های مرجانی که در معرض سفید شدگی ناشی از استرس حرارتی قرار داشته‌اند، بالاتر می باشد (Chen et al., 2003).

در این مطالعه کار بر روی مرجانهای شمالی خلیج فارس که در منطقه‌ی جزرومدی جزیره هنگام واقع شده اند انجام شده است و از آنجایی که شناسایی دقیق جلبک‌های همزیست فقط از طریق روش‌های مولکولی امکان پذیر است، در این تحقیق از روش‌های مولکولی برای شناسایی زوگزانتله‌های همزیست با مرجان‌های سخت در برکه‌های جزرومدی هنگام استفاده شده است. هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی *Symbiodinium* در گونه‌های مرجانی جزر و مدی جزیره هنگام در مقایسه با سایر سلاله‌های جوامع مرجانی سراسر جهان است و با توجه به اهمیت زوگزانتله در پدیده سفید شدگی جوامع مرجانهای آبسنگ ساز و به منظور روابط زیستی بین مرجانهای آبسنگ ساز و جلبک‌های همزیست آنها در خلیج فارس و همچنین چگونگی پایداری و بقا مرجانها در برابر شرایط نامساعد و سخت زیست محیطی، تعیین و شناسایی تک سلولی‌های دو تاژکی از جنس

گرفت. سپس محصول PCR بدست آمده بر روی ژل آگارز ۱/۵ % در کنار سایز مارکر فرمنتاس (100 bpDNA Ladder) Mostafavi et al., 2007) الکتروفوروز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد)

تعیین ترادف DNA در هر دو جهت با استفاده ازروش ختم زنجیره (Dideoxy Chain Termination) وتوسط کمپانی ماکروژن در کشور کره انجام شد. سکانس های مورد استفاده در اینجا عبارتند از :

(AJ620941 , AJ620942 , DQ312326 , DQ312327 , DQ312324 , DQ312323)
 (DQ312325 , DQ312322 , DQ312315)
 (AY684264 , AF060899)
 (AJ830916 , AJ830912 , AJ830914)
 (AJ872107 , AJ872108)
 (AJ830907 , AJ830906)

ها بر اساس نرم افزارهای Clustal X و PAUP مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.



شکل ۱: نقشه منطقه مورد بررسی در شمال جزیره هنگام

بدون هیچ گونه باند اضافی می باشد باندهای بدست آمده از ۳ گونه مرجان تقریباً یکسان و در حدود (+ + +) دیده شد (شکل ۳).

از نتایج درخت MP (Maximum Parsimony) مشخص گردید که : ضریب سازگاری (Consistency Index) CI برابر است با ۰/۶۹۸ و ضریب گروه پذیری (Retention Index) RI برابر است با ۰/۸۸۰ (شکل ۴). با انجام آزمایشات مشخص گردید که هر سه گونه دارای کلاد D می باشد و یکی

نتایج

DNA های استخراج شده از جلبک های همزیست با ۳ *C. columnata* ، *A. irregularis* ، *C. serailia* خالص بوده و قادر پروتئین در چاهک می باشد و برای انجام واکنش PCR مناسب می باشد (شکل ۲).

پس از انجام شدن واکنش PCR بر روی ژن RNA ۲۸s ریبوزومی *Symbiodinium* محصلوی به اندازه ۷۸۰ جفت باز برای پرایمرهای MOS بدست آمد که کاملاً خالص بوده و

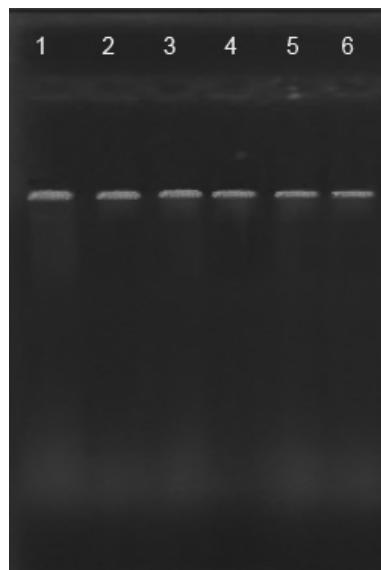
معرفی کلاد D زوگزانتله به عنوان همزیست غالب با مرجانهای سخت ناحیه جزرومدی جزیره هنگام

از ویژگی های این کلاد سازش در برابر شوری و نوسانات فصلی درجه حرارت سطح دریا است.

1,2 : *Cyphastrea serailia*

3,4 : *Anamastrea irregularis*

5,6 : *Coscinaraea columnna*



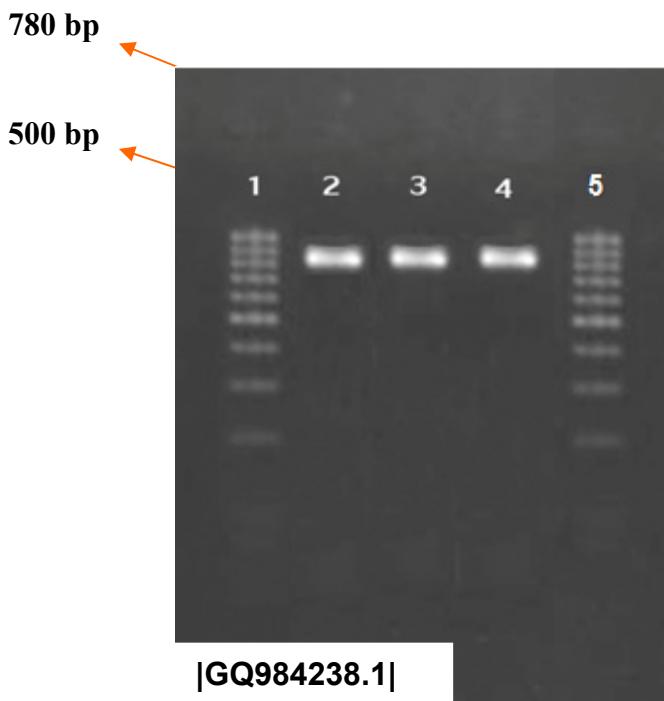
شکل ۲: استخراجی از زوگزانتله مرجانهای سخت (دو بار تکرار)

1, 5: Ladder 100 bp

2: *Coscinaraea columnna*

3: *Cyphastrea serailia*

4: *Anamastrea irregularis*



شکل ۳: محصولات PCR حاصل از زوگزانتله مرجانهای سخت

کلاد ها کلاد D بیشترین مقاومت را دارد و این طور گزارش شده است که ترتیب مقاومت کلادها به صورت زیر می باشد $A < B < C < D$ (Glynn, 2006). غالب بودن کلاد D در خلیج فارس می تواند نشانی از سازش این کلاد در برابر فاکتورهای نامساعد محیطی آبهای خلیج فارس باشد. در نتیجه غالبیت کلاد D در خلیج فارس که تحت تأثیر تغییرات شدید دمایی و محیط خشک اطرافش است دور از ذهن نمی باشد.

آبسنگهای مرجانی در خلیج فارس به دلیل قرار گیری در عرضهای جغرافیایی بالا تحت تأثیر درجه ی حرارت زیاد (Shinn, 1976 ; Downing, 1985 ; Coles and Fadlallah, 1991), شوری و کدورت هستند (Sheppard and Sheppard, 1991) و بیشتر در معرض سفید شدگی قرار می گیرند. آبسنگهای مرجانی ایران در طی سالهای ۱۹۹۶-۱۹۹۸ پس از بروز پدیده ی ال نینوی جهانی در معرض سفید شدگی شدیدی قرار گرفتند (Wilkinson, 2000) و همچنین در مرداد سال ۱۳۸۶ بر اثر افزایش ناگهانی دما، پدیده ی سفیدشدن عظیمی در آبهای شمال خلیج فارس رخ داد که تأثیر کمی بر روی جنوب خلیج فارس نیز داشته است.

باقی متفاوت مرجانها میتواند به مقاومت کلنجی مرجانها، مقاومت زوگرانتله و یا مقاومت هر دو بستگی داشته باشد (Brown et al., 2002). آیا غالبیت کلاد D در خلیج فارس می تواند به دلیل حضور این کلاد پس از پدیده ی سفیدشدن باشد؟ و یا آیا اینکه این کلاد قبل از پدیده ی سفیدشدن نیز به دلیل وجود شرایط استرس زا در خلیج فارس به عنوان همزیست غالب با مرجانها وجود داشته است؟ ولی چون در مورد شناسایی کلادها تا قبل از سال ۲۰۰۴ تحقیقی بر روی خلیج فارس صورت نگرفته در نتیجه نمی توانیم به درستی جواب سوالات را بدھیم.

در این مطالعه مرجانهای نمونه برداری شده از حوضچه های موجود در پنهانه جزرو مدب می باشند که این مناطق دارای شرایط محیطی خاصی می باشند. موجوداتی که در این مناطق به سر می برند بایستی دارای یک سری از سازشهایی باشند تا بتوانند با استرسهای ناشی از زمان جزر مقابله کنند. استخرهای جزرومدی نمی توانند یک زیستگاه جزرو مدب را از خود نشان بدهند زیرا در زمان سیکل جزرومد در معرض هوا قرار نمی گیرند و مقداری آب دریا در گودالها باقی می ماند ولی با این حال فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی در استخرهای جزرو مدب تغییر می کند. سه فاکتور فیزیکی که در استخرهای جزرومدی بسیار متنوع است عبارتند از : دما، شوری، تراکم اکسیژن (Nybakken, 2000). در زمان جزر چیزی در حدود کمتر از یک متر آب بر روی مرجانهای نمونه

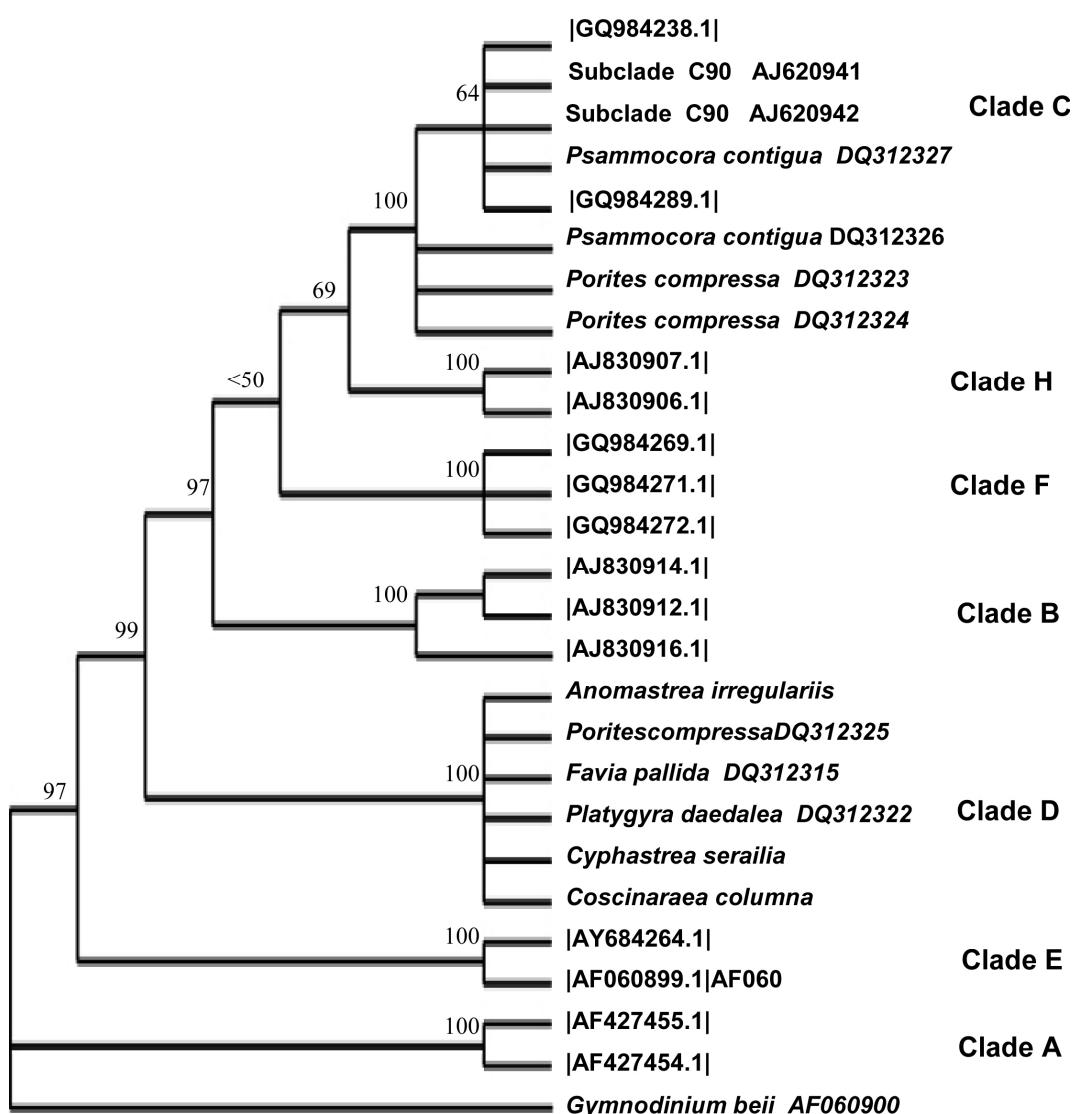
بحث و نتیجه گیری

مرجانهای آبسنگ ساز مورد مطالعه در حوضچه های جزو مدب جزیره هنگام که شامل گونه های C. serailia و A. irregularis, C. columnna هر سه دارای کلاد D می باشند که کلاد D غالب ترین جمعیت Symbiodinium ها را در این ناحیه داشته است. مطالعات قبلی در مورد کلادهای Symbiodinium که بر روی ۸ گونه Favia pallida, Cyphastrea microphthalmalma Turbinaria reniformes Acropora clathrata Pavona decussata Platygyra daedalea Porites compressa, Psammocora contigua جزایر کیش و لارک صورت گرفت مشخص نمود که در جزیره کیش کلادهای D و C غالب بوده است. همچنین در جزیره لارک ۵ گونه‌ی: A. pallida, C. microphthalmalma, P. compressa P. daedalea, clathrata گرفتند و کلاد D کlad غالب در این گونه ها بوده است (Mostafavi et al., 2007) های همزیست با گونه های مرجانی در حاشیه جنوبی خلیج فارس در سواحل عربستان توسط Baker و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد که مشخص گردید کلاد غالب در آبسنگهای مرجانی این ناحیه کلاد D می باشد که این کلاد در حدود ۶۳٪ از کل آبسنگهای مرجانی این ناحیه را پوشش می دهد و کلاد های A و C نیز شناسایی شدند (Baker et al., 2004). بر روی ۳ گونه sp. Sinularia erecta Sarcophyton minusculum از مرجانهای نرم غالب در جزیره لارک نیز شناسایی زوگرانتله های همزیست انجام شد که کلاد غالب در این گونه ها گزارش شد (آزادبادی، ۱۳۸۸).

بسیاری از مرجانها برای بقاء خود وابسته به جلبک همزیست خودشان هستند ولی اگر این جلبک تحت تأثیر فشار و استرس در درجه حرارتی بالاتر از حد نرمال قرار گیرد بر مکانیسم فتوسنتری symbiodinium تأثیر مخربی گذاشته و منجر به از بین رفتن symbiodinium و در نتیجه باعث سفید شدن مرجان می شود (Jones et al., 1998) (Goulet, 2006) مقاومت کلادهای ژنوتیپی Symbiodinium نسبت به درجه حرارت های بالا متفاوت است (Loh et al., 1998). بر اساس آزمایشات انجام شده مشخص گردیده است که سیستم فتوسنتری کلاد D مقاومت بالاتری را در برابر حرارتی زیاد نسبت به سایر کلادها نشان می دهد (Coles and Brown, 2003) و در بین

داشتن کلاد مقاوم D در حوضچه های جزرومدی می توانند در برابر استرسهای ناشی از محیط در زمان جزر مقاومت داشته باشند. با توجه به این که تاکنون شناسایی کلادهای زوگزانتله های همزیست با مرجانها در حوضچه های جزرومدی در ایران و همچنین در سایر نقاط جهان صورت نگرفته و این تحقیق برای اولین بار است که انجام می شود در نتیجه بدلیل عدم وجود تحقیقات مشابه، در حال حاضر امکان مقایسه نتایج حاصله وجود ندارد.

برداری شده قرار داشته که با کاهش آب در زمان جزر در این برکه ها میزان نفوذ نور به آنها متفاوت خواهد بود و میزان دمای آب بالا خواهد رفت که این یکی از استرسهایی می باشد که مرجان با آن مواجه است و همانطور که نیز در بالا اشاره شد بالا رفتن دما سبب خارج شدن جلبک همزیست شده و موجب سفیدشدن و در نهایت مرگ میزان میشود. چون این موجودات ساعتی از شباهه روز را در مجاورت استرس های محیطی سپری می کنند بایستی بتوانند سازش خود را با داشتن کلاد مقاومی نشان دهند و گونه های مورد بررسی بخوبی نشان دادند که با



شکل ۴: درخت Maximum Parsimony از ژنتیپ های DNA ریبوزومی ۲۸S از مرجانهای جزیره هنگام (اعداد روی شاخه ها ارزش های Bootstrap حدود اطمینان کلادها را نشان می دهد)

13. Huang, H., Dong, Z.J., Huang, L.M. and Zhang, J.B., 2006. Restriction fragment length polymorphism analysis of large subunit rDNA of symbiotic dinoflagellates from scleractinian corals in the Zhubi Coral reef of the Nansha Islands. *J Integr Plant Biol* 48:148-152.
14. Jones, R.J., Hoegh-Guldberg, O., Larkum, A.W.D. and Schreiber, U., 1998. Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO₂ fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant Cell Environ.* 21:1219-1230.
15. Loh, W.K.W., Carter, D. and Hoegh-Guldberg, O., 1998. Diversity of zooxanthellae from scleractinian corals of One Tree Island (The Great Barrier Reef). In: Greenwood JG, Hall NJ (eds). *Proceedings of the Australian Coral Reef Society's 75th Anniversary*, Heron Island-GBR. School of Marine Science, University of Queensland, Brisbane, pp 141-149.
16. Mostafavi, P.G., Fatemi, M.R., Shahhosseini, M.H., Hoegh-Guldberg, O. and Loh, W.K.W., 2007. Predominance of clade D *Symbiodinium* in shallow-water reef-building corals off Kish and Larak Islands (Persian Gulf, Iran). *Mar Biol* 153:25-34.
17. Nybakken, J.W., 2000. Marine Biology, An Ecological Approach. Addison Wesley. 481p.
18. Rown, R., 2004. Thermal adaption in reef coral symbionts. *Nature*. 430:742.
19. Shepperd, C. and Shepperd, A., 1991. Corals and coral communities of Arabia Fauna of Saudi Arabia, 12, 3-170.
20. Shinn, E.A., 1976. Coral reef recovery in Florida and the Persian Gulf. *Environ. Geol.* 1:241-254.
21. Trench, R.K., 1986. Dinoflagellates in non-parasitic symbioses. In: Taylor FJR (ed) *Biology of dinoflagellates*. Blackwell, Oxford, pp. 530- 570.
22. Van Oppen, M.J.H., 2004. Mode of zooxanthellae transmission does not affect zooxanthellae diversity in acroporid corals. *Mar Bio.l*, 144:1-7.
23. Wilkinson, C., 2000. The 1997-98 mass coral bleaching and mortality events: 2 years on. In:
24. Wilkinson, C.R., 2000. Status of coral reefs of the world. Australian Institute of Marine Science, Townsville, pp21-34.

منابع

1. آزاد بادی، س.، ۱۳۸۸. شناسایی کلادهای زوگزانتله های همزیست با مرجان های نرم غالب اطراف جزیره لارک، خلیج فارس، ایران، پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد، گروه بیولوژی دریا. صفحه ۵۹.
2. Baker, A.C., 2001. Reef corals bleach to survive change. *Nature*, 411:765-766.
3. Baker, A.C., 2003. Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: diversity, ecology and biogeography of *Symbiodinium*. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 34:661-689.
4. Baker, A.C., Starger, C.J., McClanahan, T.R. and Glynn, P.W., 2004. Corals' adaptive response to climate change. *Nature*. 430:741.
5. Brown, B.E., Downs, C.A., Dunne, R.P. and Gibb, S.W., 2002. Exploring the basis of thermotolerance in the reef coral *Goniastrea aspera*. *Mar Ecol Progr Ser* 242:119–129.
6. Chen, C.A., Lam, K.K., Nakano, Y. and Tsai, W.S., 2003. Stable association of a stress-tolerant zooxanthellae, *Symbiodinium* clade D, with the low-temperate tolerant coral *Ouastrea crispata*, (Scleractinia; Faviidae) in subtropical nonreef coral communities. *Zool Stud.* 42:540-550.
7. 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*. 9:231-237.
8. Coles, S.L., Brown, B.E., 2003. Coral bleaching capacity for acclimatization and adaptation. *Adv Mar Biol* 46:183–223.
9. Downing, N., 1985. Coral reef communities in an extreme environment: the northwest Arabian Gulf. In: Gabrie C. Salvat B. Lacroix C. Toffart, J.L. (eds). *Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress*, vol 6, Antenne Museum-EPHE Moorea, Tahiti, French Polynesia, pp. 343-348.
10. Glynn, P.W., 2006. Coral reef bleaching : facts , hypotheses and implication. *Global Change Biol* 2:495-509.
11. Goulet, D., 2006. Most corals may not change their symbionts. *Marine Ecology Progress in Series*, 321, 1-7.
12. Hoegh-Guldberg, O., 1999. Climate change, coral bleaching, and the future of the world's coral reefs. *Mar FreshW Res* . 50:839-866.