شناسایی جنس *Lydia* (Brachyuran: Oziidae) براساس مطالعات مولکولی و فراساختاری اولین گونوپود جنس نر

- **فریده چناری***: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
- **سیدمحمدباقر نبوی**: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
- **محمدعلی سالاری**: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
- **احمد سواری**: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
- **حسین ذوالقرنین**: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٥ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٥

چکیده

جنس *Lydia* متعلق به زیرشاخه سخت‌پوستان و رده خرچنگ‌های حقیقی می‌باشد. تنها گونه‌ای از آن که در خلیج فارس یافت شده است *Lydia tenax* نام دارد. از آن‌جایی‌که در قلمرو دریایی گونه‌های شناسایی نشده به‌وفور وجود دارند روش شناسایی سنتی مبتنی بر ویژگی‌های مورفولوژیک شناسایی آن‌ها را با مشکل مواجه می‌کند. اخیرا ژن COI برای شناسایی و تعیین حد و مرز گونه‌ای کاربرد فراوانی دارد به همین منظور از نشانگر مولکولی ژن COI و همچنین فراساختار اولین گونوپود جنس نر استفاده شد برای اینکه احتمال وجود گونه‌های مخفی در میان ٣ مورفوتایپ این گونه نشان داده شود. بنابراین از گونه منسوب به Lydia tenax از سواحل صخره‌ای استان بوشهر نمونه‌برداری انجام شد. سپس اولین گونوپودهای جنس نر، جداسازی شده و با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) مورد عکس‌برداری قرار گرفتند. جهت مطالعات مولکولی DNA نمونه‌ها با استفاده از روش فنل-کلروفروم استخراج و قطعه ژنی زیر واحد یک سیتوکروم اکسیداز میتوکندری (COI) تکثیر و توالی‌یابی شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد توالی نوکلئوتیدی این قطعه ژنی میتوکندریایی (COI) در نمونه‌های مورد بررسی یکسان نیست و از این ٣ مورفوتایپ نمونه *Lydia* sp.FCH با بقیه مورفوتایپ‌ها تفاوت بیش‌تری را نشان داد و در کلادی جداگانه قرار گرفت. مطالعه دقیق فراساختار اولین گونوپود جنس نر در ٣ مورفوتایپ، نیز تفاوت‌هایی را در قسمت راسی نشان داد. بررسی حاصل نشان داد، زمانی که تشخیص گونه‌ها به‌دلیل شباهت‌های زیاد مورفولوژی مشکل است، بررسی‌های فراساختار اولین گونوپود جنس نر و شناسایی براساس ژن COI در تفکیک گونه‌ها سودمند خواهد بود.

کلمات کلیدی: *Lydia tenax*، مولکولی، COI، فراساختاری، گونوپود، خلیج فارس

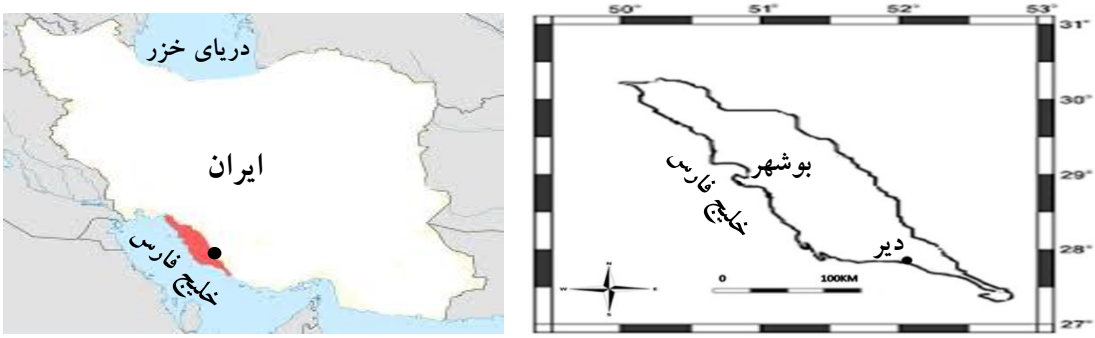
* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: chenari_bio@yahoo.com

مقدمه

اخیراًدراثر فعالیت‌های بشر مانند صیدبی‌رویه و ورودآلاینده‌های مختلف به سواحل، جمعیت خرچنگ‌ها در معرض خطر نابودی قرار گرفته است. بنابراین لزوم اطلاعاتی راجع به زیست‌شناسی، بوم‌شناسی و شناسایی آن‌ها، کمک زیادی به حفظ و باسازی جمعیت آن‌ها خواهد کرد(سعیدپور، ۱۳۷۳). طبقه‌بندی سیستماتیک خرچنگ‌های خانواده Oziidae نیاز به مطالعات گسترده‌ای دارد و در ارتباط با مطالعات مولکولی در این خانواده بررسی‌های اندکی صورت گرفته است. آنالیز سیستماتیک مولکولی توسط Lai و همکاران (۲۰۱۴) در ارتباط با فیلوژنی این خانواده نشان داد خانواده Oziidae منشا مونوفیلتیک ندارند و حتی منشا گونه‌های یک جنس در این خانواده، نیز متفاوت می‌باشد. آن‌ها بیان کردند این مساله می‌تواند نشان‌دهنده ضعف طبقه‌بندی سنتی در شناسایی موجودات باشد که صرفا از ویژگی‌های ریختی برای شناسایی گونه‌ها استفاده می‌کند. زیرخانواده Oziinae شامل دو جنس می‌باشند که جنس *Lydia* با داشتن تنها یک گونه شناخته‌شده در خلیج فارس یکی از آن‌ها است. این جنس دارای دو گونه به‌نام *Lydia tenax* و *Lydia annulipes* در جهان می‌باشد که به‌دلیل شباهت‌های مورفولوژیک زیاد، تمایز آن‌ها از هم بسیار دشوار است. محققان رده‌بندی سنتی، تنها روش شناسایی این دو گونه را از یکدیگر تفاوت تعداد گرانول‌های ریز بر روی کلیپدها و کاراپاس آن‌ها ذکر کردند و بیان داشتند تعداد این گرانول‌ها در *Lydia tenax* نسبت به گونه *Lydia annulipes* بیش‌تر است. گونه *Lydia tenax* اولین‌بار در مناطق ایرانی سواحل صخره‌ای خلیج فارس توسط Stephensen (۱۹۴۶) شناسایی شد و سپس Naderloo و همکارانش (۲۰۱۲) وجود این گونه را از این مناطق تایید کرده و بیان داشتند محدوده پراکنش این جنس قسمت‌های غربی اقیانوس هند می‌باشد. گونه‌های مخفی و شناسایی نشده در قلمرو دریایی به فراوانی دیده می‌شوند که شناسایی بر پایه ویژگی‌های مورفولوژیک تشخیص آن‌ها را با مشکل مواجه می‌کند (Knowlton، ۱۹۹۳). گونه‌های مرموز یا مخفی به گونه‌هایی اطلاق می‌شود که از لحاظ مورفولوژی بسیار شبیه بوده اما از لحاظ ژنتیکی متفاوتند. برای غلبه بر چنین مسایلی، در حال حاضر روشی استاندارد مبتنی بر توالی‌یابی ژن COI میتوکندری که در حدود ۶۵۰bp می‌باشد، به‌عنوان ابزاری سودمند برای شناسایی موجودات و تعیین مرز میان گونه‌ها به‌کار می‌رود. در دسترس بودن پرایمر جهانی، نرخ بالای تکامل مولکولی و فقدان جهش های حذف و اضافه نسبت به ژن‌های دیگر آن را به‌عنوان یک روش بارکدینگ جهانی تبدیل کرده است (Hebert و همکاران، ۲۰۰۳). از طرفی دیگر مورفولوژی تزیینات راسی گونوپود (اندامی تغییر شکل یافته از پاهای شنا است، که برای انتقال اسپرم در حین جفت‌گیری به‌کار می‌رود) به‌عنوان ویژگی مهم در مطالعات سیستماتیک در خرچنگ‌ها مطرح می‌باشد و اشکال مختلف گونوپود، مدرکی در تکامل این زائده در خرچنگ‌های حقیقی است بنابراین در این مطالعه به موازات مطالعات مولکولی ساختار اولین گونوپود (اندامی تغییر شکل یافته از پاهای شنا است، که برای انتقال اسپرم در حین جفت‌گیری به‌کار می‌رود) جنس نر نیز توسط میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت. توصیف اولیه گونوپود خرچنگ‌های حقیقی به بررسی آن‌ها در زیر میکروسکوپ‌های تشریحی و لوپ محدود بود و در مطالعات اندکی تنها از میکروسکوپ الکترونی (SEM) برای مشاهده جزئیات ساختاری آن‌ها استفاده شده است (Chen و همکاران ۲۰۰۷؛ Rorandelli و همکاران، ۲۰۰۸). در این مطالعه برای اولین‌بار سه مورفوتایپ گونه *Lydia tenax* با تفاوت‌های اندکی در کاراپاس برای بررسی وجود گونه‌های مخفی با توجه به فراساختار مورفولوژی اولین گونوپود جنس نر و با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز COI مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورفوتایپ متفاوت از گونه *Lydia tenax* با توجه به اختلاف اندک در شکل کاراپاس در آبان ماه ۱۳۹۳ از مناطق جزر و مدی سواحل صخره‌ای استان بوشهر در ایستگاه بندر دیر (اولی جنوبی، ″۵۰ ′۱۹ °۲۷، ′۱۵ ″۵۶ °۵۱) شناسایی و جمع‌آوری شدند (شکل‌های ۱ و ۲). در محل از نمونه‌ها جهت شناسایی مورفولوژیک عکس تهیه شد و سپس با کنار زدن قسمت اپرکولوم شکمی، اولین گونوپودهای خرچنگ‌های نر، به‌وسیله پنس جدا شدند و در فرمالین ۱۰٪ برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی قرار گرفتند. نمونه‌ها در اتانول مطلق فیکس شده و برای انجام مطالعات مولکولی به آزمایشگاه علوم‌دریایی خرمشهر منتقل شدند. برای بررسی مورفولوژی گونوپودهای فیکس شده توسط میکروسکوپ الکترونی، در ابتدا بر روی هات پلیت به‌مدت نیم‌ساعت دهیدراته و خشک گردیدند و سپس با پوششی از فلز طلا رنگ‌آمیزی شد. از میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ(SEM) مدل VEGATS5136 ساخت کشور آلمان، برای عکس‌برداری از نمونه‌ها استفاده شد.

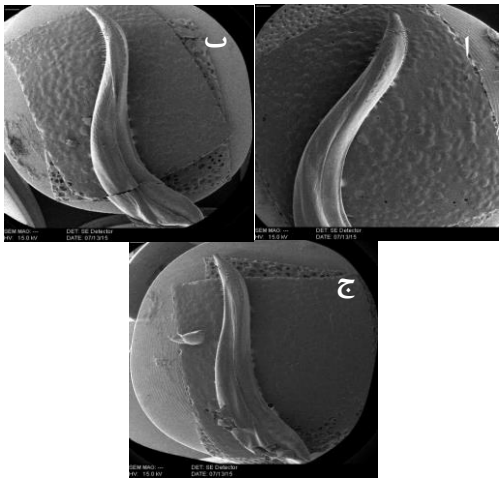


شکل۱: موقعیت جغرافیایی منطقه نمونه‌برداری

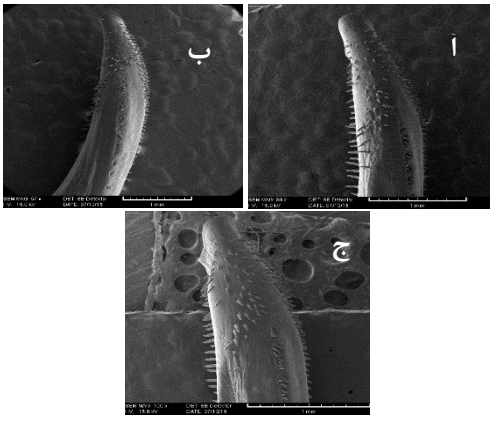
به‌منظور شناسایی مولکولی استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفرم انجام شد (Hillis و همکاران، ۱۹۹۶). کیفیت و کمیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ تعیین گردید. سپس با استفاده از آغازگرجهانی (Folmer و همکاران، ۱۹۹۴) (LCO1490 5′-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3′, HCO2198 5′-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3′) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر قطعه ژنی سیتوکروم اکسیداز I (COI) انجام شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل بافر (1X)، ۱میلی مولار Mgcl2، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۵ پیکومول از هر آغازگر رفت و برگشت، ۱/۵Uآنزیم Tag DNA Polymerase و ۲۰-۳۰ نانوگرم DNA الگو صورت گرفت. برنامه حرارتی برای واکنش موردنظر شامل: مرحله واسرشته‌سازی اولیه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه و مرحله واسرشته‌سازی: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله الحاق: ۴۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط: ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ دقیقه و نهایتاً مرحله بسط نهائی: ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه و تعداد ۳۵ چرخه درنظر گرفته شد. محصولات تکثیر شده به‌همراه سایز مارکر۱۰۰bp بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و توسط safe stain رنگ‌آمیزی شدند. محصولات PCR مناسب، جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردیدند.

نتایج

شناسایی مورفولوژی گونوپود: نتایج بررسی فراساختار گونوپود، نشان داد به‌طورکلی گونوپود در این گونه دارای ساختاری تنومند و تا حدودی سینوسی شکل است که خارهای انبوهی در قسمت یک چهارم بخش دیستال آن قابل مشاهده است. تفاوت در شکل راسی گونوپود تا حدودی می‌تواند بیانگر جدایی سه نمونه از یکدیگر باشد. قسمت راسی گونوپود نمونه *Lydia* sp. MB، حالت کشیده‌تری نسبت به دو نمونه دیگر دارد. این قسمت در نمونه *Lydia* sp.MS کوتاه‌تر و عریض‌تر و در نمونه *Lydia* sp.FCH شکل دهانه راسی به‌طور ویژه‌ای متفاوت می‌باشد.



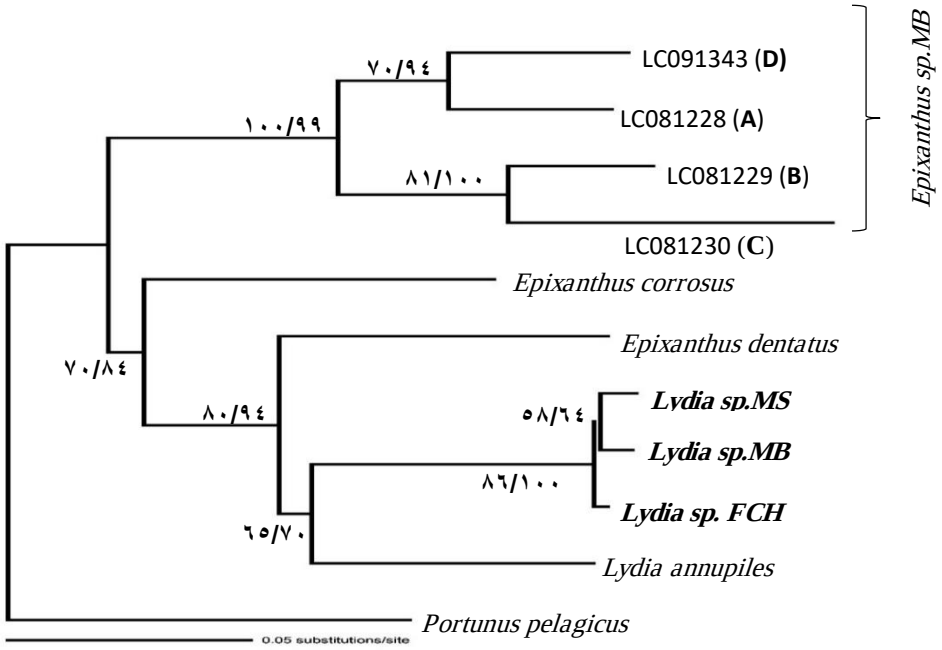
شکل ۲: تصاویر کلی فراساختار گونوپود مورفوتایپ‌های الف) *Lydia* sp.MS، ب) *Lydia* sp.MB ج) *Lydia* sp.FCH



شکل۳: فراساختارقسمت راسی گونوپود نمونه‌های الف) *Lydia* SP.MS، ب) *Lydia* SP.MB، ج) *Lydia* SP.FCH

نتایج مولکولی: توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار CLC sequncer viewer به توالی‌های اسیدآمینه ترجمه شدند. سپس دربانک داده جهانی NCBI به‌عنوان نمونه‌هایی با نام‌های فعلی *Lydia sp.FCH* (LC۰۳۴۱۹۳)، *Lydia sp.MB-2015* (LC۰۸۱۲۳۱)، *Lydia sp.MS* (LC091344)، برای اولین‌بار از منطقه خلیج فارس ثبت گردیدند. درخت فیلوژنی تجزیه و تحلیل ماتریس داده‌ها براساس روش‌های ماکزیمم پارسیمونی (Maximum Parsimony) با استفاده از نرم‌افزار PAUP (Swofford، ۲۰۰۲)، ماکزیمم احتمال (Maximum Likelihood) با استفاده از نرم افزار Mega6 (Tamuraو همکاران، ۲۰۱۲) انجام گردید. درخت فیلوژنی با استفاده از توالی‌های به‌دست آمده و چندین توالی از گونه‌های دیگر زیرخانواده Oziinae بر پایه گونه *Portunus pelagicus* ترسیم شد.

نتیجه محاسبات فیلوژنی و روابط تکاملی (ML, MP) برای ۱۰ توالی ژن COI از خانواده Oziinae الگوی توپولوژی یکسانی را برای درختان تکاملی نشان دادند. نتایج اختلافات ژنتیکی در توپولوژی درختان تکاملی منعکس شد (شکل۴). توپولوژی درختان تکامل نشان داد کلاد مربوط به سه نمونه *Lydia* مطالعه حاضر با گونه *Lydia annulipes* رابطه خواهری دارد و این روابط مونوفیلتیک با ارزش بوت استراپ بالا(MP=۷۰، ML=۶۵)حمایت‌شده‌اند. نمونه *Lydia sp.FCH* با ارزش بوت استرپ بالا (MP=۱۰۰، ML=۸۶) از دو مورفوتایپ‌های خواهری خود جدا شد و در کلادی جداگانه قرار گرفت. نمونه‌های *Lydia sp.MS* و *Lydia sp.MB* نیز خوشه‌ای جداگانه را با ارزش بوت استراپ متوسط (MP=۶۴، ML=۵۸) تشکیل دادند.



شکل ۵: درخت Maximum parsimony و Maximum likelihood خانواده Oziidae. درصدهای بوت استراپ از ۱۰۰۰ درخت روی گره‌ها نشان داده شده است (ML/MP)

بحث

از آن‌جایی‌که وجود گونه‌های مخفی و پنهان در میان سخت‌پوستان دریایی بسیار رایج است، به‌همین منظور از نشانگر مولکولی ژن COI با تاکید بر فراساختار اولین گونوپود جنس نر استفاده شد برای این‌که احتمال وجود گونه‌های مخفی در میان ۳ مورفوتایپ این گونه نشان داده‌شود. DNAبارکدینگ روشی مفید برای شناسایی و تخمین گونه‌های مخفی می‌باشد (Will و همکاران، ۲۰۰۵). سه مورفوتایپ مطالعه حاضر که از نظر مورفولوژی سنتی تحت نام *Lydia tenax* شناسایی شده بودند، برای بررسی‌های دقیق در ابتدا بر اساس تفاوت‌های بسیار کم و نامحسوس در شکل کاراپاس از هم تفکیک شدند (شکل۲) و سپس، توسط نشانگر COI توالی‌های آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. به‌دلیل عدم وجود توالی از گونه *Lydia tenax* در بانک ژن، امکان بررسی صحت مطالعات مورفولوژیک که ۳ مورفوتایپ حاضر را به

عنوان این گونه معرفی کرده بودند فراهم نشد. تنها توالی موجود برای این جنس در ژن بانک گونه *Lydia annulipes* بود که در ترسیم درخت فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفت و طبیعتاً بدون تطابق کامل با توالی ثبت شده از کشور تایوان، بیش‌ترین تطابق را با این نمونه‌ها نشان داد. نمونه‌های *Lydia sp.MB* و *Lydia sp.MS* تطابق زیادی را با هم نشان دادند و در درخت فیلوژنی (ML,MP) با هم درکلادی مشترک قرار گرفتند که با ارزش بوت استراپ و احتمال پسین بالا حمایت شدند (شکل ۴). نمونه *Lydia sp.FCH* با مقداری اختلاف در کلادی جداگانه قرار گرفت و در نهایت هر سه نمونه با گونه *Lydia annulipes* منشا مونوفیلیتک نشان دادند. نتایج مطالعات مولکولی نشان داد ۳ مورفوتایپ می‌توانند متعلق به گونه‌های جداگانه باشند. کاراپاس در همه نمونه‌ها بسیار شبیه بود و بنابراین به موازات مطالعات مولکولی به بررسی فراساختار مورفولوژی اولین گونوپود جنس نر پرداخته شد برای این‌که بتوان تفاوت‌های احتمالی را در انطباق با جدایی ژنتیکی بررسی کرد زیرا گونوپود اندامی است که به‌میزان اندکی تحت تاثیر تغییرات محیطی قرار می‌گیرد (Chambers و همکاران، ۱۹۸۰) و قسمت راسی آن دارای اشکال و ساختارهای ظریفی می‌باشد، که این ساختارهاو تغییرات خاص‌در آن‌ها ارزش تاکسونومیکی دارند (Moyano و همکاران، ۲۰۱۱). در مطالعه حاضر بررسی فراساختار گونوپود نمونه‌هابا میکروسکوپ‌الکترونی‌توانست تا حدودی تفاوت‌های واضحی را در میان آن‌ها آشکار سازد. در دهانه راسی نمونه *Lydia sp.FCH* تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشهود بود (شکل۳) که سبب جدایی آن از دو مورفوتایپ دیگر شد. در مطالعه‌ای که Gillikin (۲۰۰۴) در ارتباط با سیستماتیک جنس *Perisesarma* انجام داده بود نیز بیان کرد تنها خمیدگی بیش‌تر در قسمت راسی گونوپود یک مورفوتایپ می‌تواند معرف شناسایی گونه‌ای جدید باشد. بر این اساس احتمال دارد بر خلاف تصور که این مورفوتایپ‌ها را یک گونه معرفی کرده بودند، می‌توانند به‌عنوان گونه‌های جداگانه مطرح باشند. محققان بیان داشتند یکی کردن گونه‌ها براساس نشانگر DNA میتوکندری به تنهایی و صرف‌نظر از مطالعات جدایی تولیدمثلی و یا سایر تمایزات مورفولوژیکی همیشه برای اثبات جدایی گونه‌ها کافی نیست (Lee، ۲۰۰۴؛ Moritz و Cicero، ۲۰۰۴) و برای شناسایی دقیق گونه‌ها آنالیزهای بیش‌تر با استفاده ازویژگی‌های‌مورفومتریک و ریخت‌شناسی نیز ضروری می‌باشد (Harrison و Hanley، ۲۰۰۵). Hiller و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند ترکیبی از داده‌های مورفولوژی و مولکولی قطعاً اطلاعات بیش‌تری در بازسازی و ترسیم درختان تکاملی در ده‌پایان خواهد داد. مطالعه حاضر نشان داد زمانی که شناسایی گونه‌های مخفی بر مبنای مورفولوژی برای شناختن مرز گونه‌ها ناکافی است، شناسایی خرچنگ‌های حقیقی براساس مورفولوژی دقیق اولین گونوپود جنس نر و هم‌چنین نشانگرهای ژنتیکی برای قرار دادن صحیح گونه‌ها در جایگاه اصلی خود، مفید خواهد بود. بنابراین تلفیقی از روش‌های مورفولوژی دقیق براساس میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM)، سیستماتیک مولکولی و دیگر مشخصات ظاهری نشان داد احتمال گونه‌زایی در این گونه وجود دارد که بیان نظر قطعی مستلزم بررسی با نشانگرهای بیش‌تر و تعداد نمونه‌های بیش‌تر می‌باشد.

منابع

۱. **سعیدپور، ب.، ۱۳۷۳.** شناسایی خرچنگ‌های منطقه جزر و مدی خلیج چابهار و سواحل اطراف آن. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ۱۲۱ صفحه.

۲. **Abele, L.G., 1971.** Scanning electron photomicro-graphs of brachyuran gonopods. Crustaceana. Vol. 21, pp: 217-219.

۳. **Chambers, C.L.; Payne, J.F. and Kennedy, M.L., 1980.** Geographic variation in the first pleopod of the form I male dwarf crayfish, Cambarellus puer Hobbs (Decapoda: Cambaridae). Crustaceana. Vol. 38, pp: 169-177.

۴. **Chen, W.; Cheng, J.; Chen, T. and Hsu, M.J., 2007.** A comparison of the micromorphology of the G1 of freshwater crabs of the genus *Geothelphusa* (Brachyura, Potamidae) from Taiwan. Crustaceana. Vol. 80, pp: 861-889.

۵. **Claridge, M.F.; Dawah, H.A.; and Wilson, M.R., (Eds.) ۱۹۹۷.** Species: The Units of Biodiversity. Chapman & Hall, London.

۶. **Dayrat, B., 2005.** Towards integrative taxonomy. Biol J Linnean Soc. Vol. 85, pp: 407-415.

۷. **Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; and Vrijenhoek, R., 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol. Vol. 3, pp: 294-299.

۸. **Gaston, K.J. and O'Neill, M.A., 2004.** Automated species identification: Why not? "Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. Vol. 359, pp: 655-667.

۹. **Gibbs, J., 2009.** Integrative taxonomy identifies new (and old) species in the *Lasioglossum* (*Dialictus*) *tegulare* (Robertson) species group (Hymenoptera, Halictidae). Zootaxa.Vol. 2032, pp: 1-38.

۱۰. **Harrison, J.S. and Hanley, P.W., 2005.** *Austinixa aidae* Righi, 1967 and *A. hardyi* Heard and Manning, 1997 (Decapoda: Brachyura: Pinnotheridae) synonymized, with comments on molecular and morphometric methods in crustacean taxonomy. J Nat His. Vol. 39, pp: 3649-3662.

۱۱. **Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. and deWaard, J.R., 2003.** Biological identifications throught DNA barcodes. Proc R Soc Lond [Biol]. Vol. 270, pp: 313-321.

۱۲. **Hennig, W., 1966.** Phylogenetic Systematics, University of Illinois Press, Urbana. 280 p.

۱۳. **Gillikin, A.P. and Schubart, C.D., 2004.** Ecology and systematics of mangrove crabs of the genus *Perisesarma* (Crustacea: Brachyura: Sesarmidae) from East Africa. Zool J Linnean Soc. Vol. 141, pp: 435-445.

۱۴. **Knowlton, N., 1993.** Sibling species in the sea. Annu Rev Ecol Evol Syst. Vol. 24, pp: 189-216.

۱۵. **Lai, J.L.; Thoma, B.P.; Clark, P.F.; Felder, D.L. and Ng, P.K., 2014.** Phylogeny of eriphioid crabs (Brachyura, Eriphioidea) inferred from molecular and morphological studies. Zool Scripta. Vol. 43, pp: 52-64.

۱۶. **Lee, M.S.Y., 2004.** The molecularisation of taxonomy. Inverse system. Vol. 18, pp:1-6.

۱۷. **Moritz, C. and Cicero, C., 2004.** DNA barcoding: promise and pitfalls. PLoS Biology. Vol. 2, pp: 1529-1531

۱۸. **Moyano, M.P.; Gavio, M.A. and Cuartas, E.I., 2011.** Copulatory system of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea: Brachyura: Majoidea). J. Mar. Biol. Assoc. U. K. Vol. 91, pp: 1617-1625.

۱۹. **Naderloo, R., 2011.** Grapsoid crabs (Decapoda: Brachyura: Thoracotremata) of the Persian Gulf and the Gulf of Oman. Zootaxa.Vol. 3048, pp:1-43.

۲۰. **Rorandelli, R.; Paoli, F.; Cannicci, S.; Mercati, D. and Giusti, F., 2008.** Characteristics and fate of the spermatozoa of *Inachus phalangium* (Decapoda, Majidae): description of novel sperm structures and evidence for an additional mechanism of sperm competition in Brachyura. J. Morphol. Vol. 269, pp: 259-271.

۲۱. **Radulovici, A.; Archambault, P. and Dufresne, F., 2010.** DNA Barcodes for marine Biodiversity: Moving Fast Forward. Journal Diversity. Vol. 2, pp: 450-472.

۲۲. **Stephensen, K., 1946.** The Brachyura of the Iranian Gulf. Danish Scientific Investigations in Iran, Part IV. E. Munksgaard, Copenhagen. Vol. 2, pp: 57-237.

۲۳. **Swofford, D., 2002.** PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

۲۴. **Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A. and Kumar, S., 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.

۲۵. **Will, K.W.; Mishler. B.D. and Wheeler, Q.D., 2005.** The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. Syst Biol. Vol. 54, pp: 844-851.