مجله علمی شیلات ایران ۳۰ (٤) ۱۶۱-۱۷۱ (DOI): 10.22092/ISFJ.2021.125320
(DOR): 20.1001.1.10261354.1400.30.4.13.4

مقاله علمی – پژوهشی:

شناسایی مولکولی خرچنگ گرد *Epixanthus frontalis* (Brachyuran: Oziinae) از سواحل صخره ای استان بوشهر با استفاده از روش بارکدگذاری DNA

فریده چناری*[۱]، سید محمدباقر نبوی[۱]، سیامک یوسفی سیاه‌کلرودی[۲]، محمدعلی سالاری[۱]، احمد سواری[۱]، حسین ذوالقرنین[۱]

*chenari_bio@yahoo.com

۱-دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی. خرمشهر. ایران
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۹

چکیده

گونه *Epixanthus frontalis* تنها گونه از جنس *Epixanthus* در خلیج فارس است که دارای الگوهای رنگی مختلف می‌باشد. ازآنجایی‌که وجود گونه‌های مخفی در میان سخت‌پوستان دریایی بسیار رایج است، هدف مطالعه حاضر شناسایی دقیق و بررسی احتمال گونه‌های مخفی در میان نمونه‌های حاضر است. به همین منظور از ۴ الگوی رنگی منسوب به گونه *frontalis* *E.* از سواحل صخره‌ای استان بوشهر نمونه‌برداری انجام شد. سپس اولین گونوپودهای جنس نر، جداسازی گردیدند و با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد عکس‌برداری قرار گرفتند. جهت مطالعات مولکولی، DNA نمونه‌ها با استفاده از روش تغییر یافته 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 تمام مورفوتایپ‌های رنگی بر هم منطبق نیستند و این نتایج در توپولوژی درختان تکاملی برای هر دو آنالیز (Maximum likelihood, Bayesian) منعکس شد. مطالعه فراساختار قسمت راسی اولین گونوپود جنس نر نیز نشان داد، تفاوت‌هایی اساسی در قسمت راسی این اندام در برخی مورفوتایپ‌های رنگی دیده می‌شود. بررسی حاصل نشان داد، با وجود اینکه نمونه‌های مورد مطالعه از نظر خصوصیات ریخت‌شناسی به عنوان یک گونه شناسایی شده‌اند، ممکن است متعلق به گونه‌های جداگانه باشند که این فرآیند مستلزم بررسی‌های بیشتر با سایر نشانگرهای مولکولی می‌باشد.

لغات کلیدی: سیتوکروم اکسیداز میتوکندری، فراساختار، گونوپود، خلیج فارس

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

مقدمه

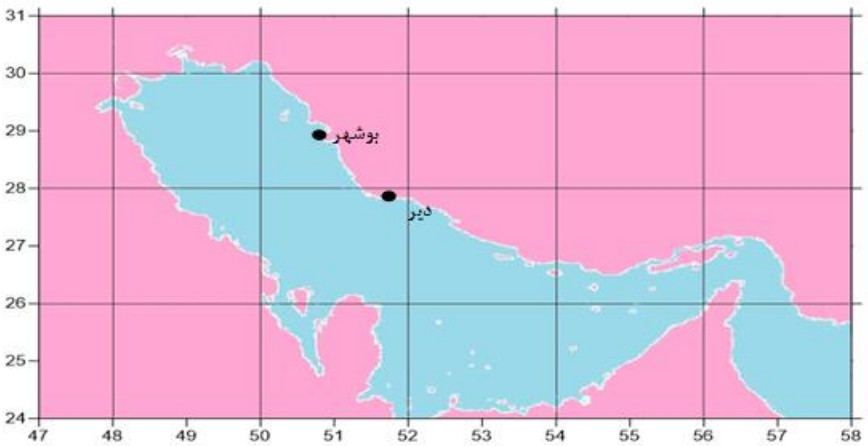
خرچنگ‌های حقیقی ۱۷٪ از کل سخت پوستان را تشکیل می‌دهند و به علت ارزش غذایی بالا، مقادیر فراوان پروتئین و مواد معدنی، استخراج کیتین و کیتوزان برای کاربردهای دارویی، شیمیایی و نیز به عنوان منبع غذای زنده در جهان بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Ng *et al*., 2008). فعالیت‌های بشر مانند صید بی‌رویه و ورود آلاینده‌های مختلف به سواحل، جمعیت خرچنگ‌ها در را در معرض خطر نابودی داده است. بنابراین، جمع‌آوری اطلاعات راجع به زیست‌شناسی، بوم شناسی و شناسایی خرچنگ‌ها، کمک زیادی به حفظ و باسازی جمعیت آنها خواهد کرد (Radulovici *et al*., 2010). پلی‌مورفیسم رنگی و الگوهای رنگی مختلف (Palma *et al*., 2003) در بسیاری از خرچنگ‌های حقیقی به‌خصوص در مراحل جوانی (Hogarth, 1978; Bedini, 2002) یا در گونه‌هایی که دارای اندازه بدنی کوچکی هستند (Pessani, and Tirelli, 2006)، بیشتر دیده می‌شود. ارزیابی تنوع زیستی بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک با سختی‌های فراوانی همراه است. در نتیجه، این امکان وجود دارد که تعداد موجودات کمتر یا بیشتر از حد تنوع زیستی محسوب گردد (Lefe´bure *et al*., 2006). مراحل زندگی متعدد از تخم تا لارو، دو شکلی جنسی و انعطاف‌پذیری فنوتیپی در خرچنگ‌ها به طور فراوانی اتفاق می‌افتد و شناسایی آنها را بر اساس ساختارهای ریخت‌شناسی با مشکل مواجه می‌کند. بنابراین، تاکسونومیست‌ها برای رفع این مشکل جهت تشخیص گونه‌ها از روش‌های سیستماتیک مولکولی استفاده می‌کنند (Radulovici *et al*., 2010). برای غلبه بر چنین مسائلی، در حال حاضر روشی استاندارد مبتنی بر توالی ژن COI میتوکندری که در حدود ۶۵۰bp می‌باشد، به عنوان ابزاری سودمند برای شناسایی موجودات و تعیین مرز گونه‌ها به‌کار می‌رود (Hebert *et al*., 2003). DNA بارکدینگ نه تنها ابزاری برای شناسایی دقیق گونه‌ها محسوب می‌شود بلکه برای معرفی و تعیین مرز گونه‌ها نیز کارآمد خواهد بود (Hebert *et al*., 2003). در آبهای سواحل ایرانی خلیج فارس بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک، تنها گونه‌ای از جنس *Epixanthus* که به ثبت رسیده است، گونه *Epixanthus frontalis* می‌باشد که برای اولین بار Heller (۱۸۶۱) از جزیره خارک گزارش نمود. وی این گونه را به نام گونه جدید با عنوان *Epixanthus kotchii* معرفی کرد، ولی بعدها مشخص شد این گونه همان گونه *E. frontalis* می باشد که از سایر نقاط جهان نیز گزارش شده است. بنابراین، به نام گذشته تغییر نام داده شد. سپس Stephenson (۱۹۴۶)، Apel (۲۰۰۱) و Naderloo (۲۰۱۱) وجود این گونه تایید کردند و بیان داشتند این گونه تنها گونه از جنس *Epixanthus* در خلیج فارس می‌باشد که به طور معمول در مناطق جزر و مدی زیستگاه‌های صخره‌ای و سنگی دیده می‌شود. در حال حاضر، بسیاری از محققان تاکید دارند که تلفیقی از روش‌های مورفولوژی دقیق بر اساس میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، سیستماتیک مولکولی و سایر مشخصات ظاهری بهترین روش برای شناسایی و کشف گونه‌های جدید است (Dayrat, 2005; Gibbs, 2009). از آنجایی‌که وجود گونه‌های مخفی در میان سخت‌پوستان دریایی بسیار رایج است، هدف مطالعه حاضر شناسایی دقیق و بررسی احتمال گونه‌های مخفی در میان نمونه‌های حاضر است.

مواد و روش کار

در این مطالعه۴ مورفوتایپ متفاوت با الگوی‌های رنگی مختلف از گونه *E. frontalis* در آبان ۱۳۹۳ با توجه به زمان حداکثر جزر آب و به صورت گشت در منطقه بین جزرومدی سواحل صخره‌ای استان بوشهر در دو ایستگاه بندر دیر (اولی جنوبی) و بندر بوشهر صورت پذیرفت (شکل۱). جهت شناسایی مورفولوژیک نمونه‌ها، ویژگی‌هایی مانند شکل کاراپاس، ابعاد و برجستگی‌های آن، شکل و ضخامت چنگال‌ها، شکل و ضخامت و فرورفتگی‌های روی پاها، وجود یا فقدان بندهای شکمی و وضعیت قطعات شکمی، وجود برجستگی‌های خارمانند و مومانند روی شکم و بازوها، وضعیت قرارگیری چشم‌ها

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

روی سر و وضعیت ماگزیلی‌پدها مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی از کلیدهای شناسایی خلیج فارس (Stephenson, 1961; Apel, 2001; Naderloo and Sari, 2007) و کلید شناسایی هند-آرام (Ng *et al.*, 2008) استفاده شد. سپس با کنار زدن قسمت اپرکولوم شکمی، اولین گونوپودهای خرچنگ‌های نر، بوسیله پنس جدا شدند و در فرمالین ۱۰٪ برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی قرار گرفتند (Abele, 1971). سپس نمونه‌ها در اتانول مطلق فیکس و برای انجام مطالعات مولکولی به آزمایشگاه علوم دریایی خرمشهر منتقل شدند. جهت بررسی مورفولوژی گونوپودهای فیکس شده با میکروسکوپ الکترونی، در ابتدا بر هات پلیت به مدت نیم ساعت دهیدراته و خشک گردیدند و سپس با پوششی از فلز طلا مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفتند (Abele, 1971). تهیه تصاویر الکترونی در دانشکده فنی دانشگاه تهران با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مدل VEGATS5136 انجام گردید.



شکل ۱: مناطق نمونه‌برداری:در شمال غرب خلیج فارس (بندر بوشهر و بندر دیر)
Figure 1: Sampling areas: Bushehr and Dayer Port (Sourthern Oli)

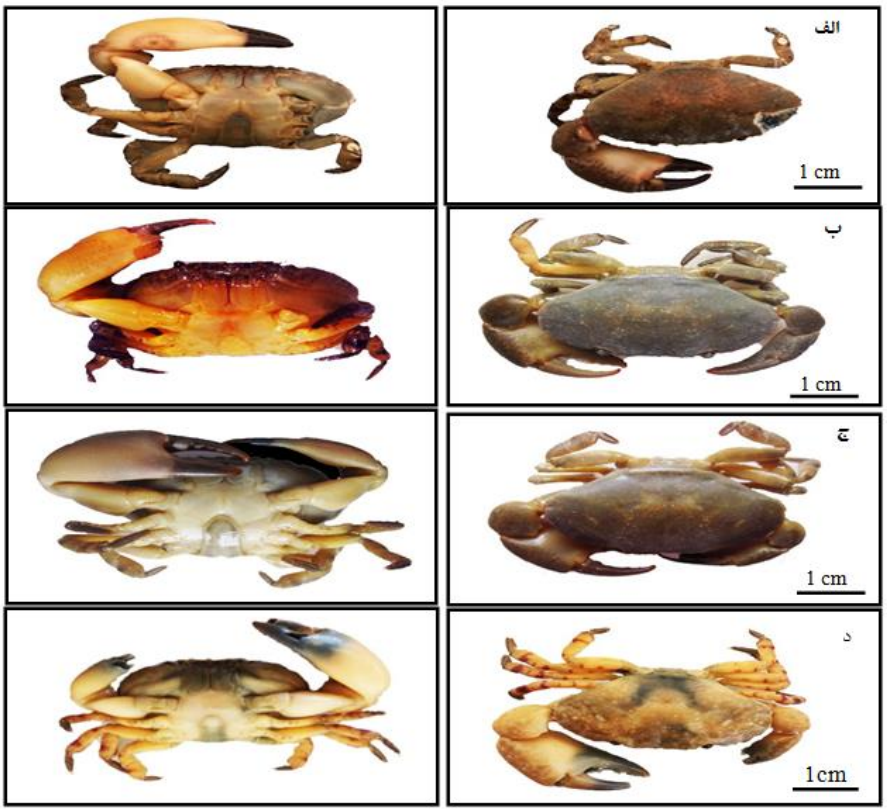
برای شناسایی مولکولی استخراج DNA از ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده CTAB ۲٪ (۱۰۰ mMTrisHCl، Mm ۲۰Ctab، ۱.۴M NaCl، ۲۰ M EDTA) استفاده گردید و سپس باقیمانده استخراج با روش فنل-کلروفروم انجام شد. کیفیت و کمیت با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ تعیین گردید. سپس با استفاده از آغازگرجهانی (Folmer *et al.*, 1994) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر قطعه ژنی سیتوکروم اکسیداز I (COI) انجام شد. هر واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل بافر (1X)، ۱ میلی مولار Mgcl2، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۵ پیکومول از هر آغازگر رفت و برگشت، ۱/۵U آنزیمTag DNA Polymerase و ۳۰-۲۰ نانوگرم DNA الگو انجام گرفت. برنامه حرارتی برای واکنش موردنظر شامل: مرحله واسرشته‌سازی اولیه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و مرحله واسرشته‌سازی: ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله الحاق: ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط: ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ دقیقه و نهایتاً مرحله بسط نهائی: ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه و تعداد ۳۵ چرخه در نظر گرفته شد. محصولات تکثیر شده به همراه سایز مارکر ۱۰۰bp بر ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و با safe stain رنگ‌آمیزی شدند (Yamindago *et al.*, 2013). محصولات PCR مناسب، جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردیدند. درخت فیلوژنی تجزیه و تحلیل ماتریس داده‌ها بر

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

ماکزیمم احتمال (Maximum likelihood) با استفاده از نرم افزا Mega6 (Tamura *et al.*, 2013) و روش احتمال پسین (Posterior probablity) با استفاده از روش بایزین و نرم افزار Mrbayes3.2.5 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) انجام گردید. درخت فیلوژنی با استفاده از توالی‌های به‌دست آمده و چندین توالی از گونه‌های دیگر خانواده Oziinae بر پایه گونه *P. pelagicus* ترسیم شد.

نتایج

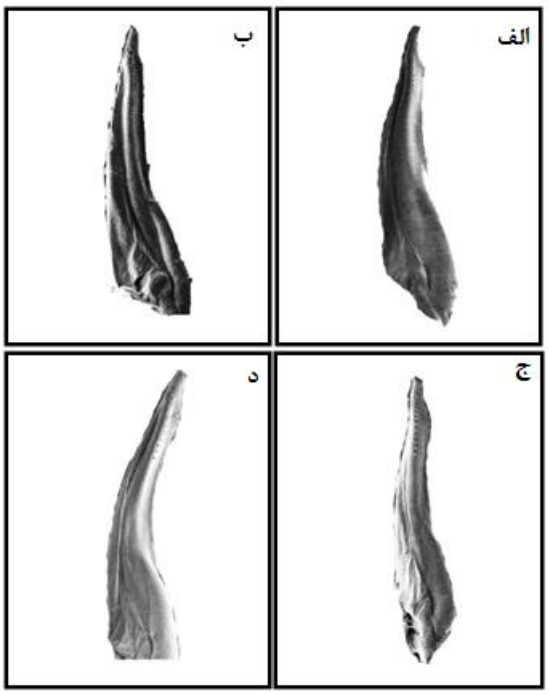
چهار نمونه رنگی گونه *E. frontalis* در شکل (۲) نشان داده شده است. شناسایی موفولوژی فراساختار گونوپود: نتایج بررسی فراساختار گونوپود نشان داد که به طور کلی گونوپود در این نمونه‌ها دارای ساختاری تنومند، مستقیم یا تا حدودی سینوسی شکل است. در نمای کلی به‌نظر می‌رسد، دارای سه قسمت طولی واضح است که روی بخش برآمدگی میانی خارهایی ردیف شده‌اند که تا قسمت یک سوم ابتدایی بخش دیستال کشیده شده‌اند. بخش نوک تیز راسی گونوپود با تزیینات خارمانندی پوشیده شده است. در حاشیه جانبی بخش دیستال نیز خارهایی وجود دارد (شکل۳). در بررسی فراساختار نمونه‌های رنگی مختلف این گونه، تغییراتی واضح در شکل رأسی گونوپود برخی نمونه‌ها مشاهده شد که عبارت است از: در نمونه A و D قسمت نوک تیز رأسی نسبت به دو نمونه دیگر اندازه کوتاهتری دارد. تعداد خارهای حاشیه داخلی در نمونه D کمتر است و طرز قرارگیری خارهای پراکنده در انتهای بخش نوک تیز همه نمونه‌ها تفاوت دارد. قسمت نوک‌تیز بخش رأسی در نمونه‌های C وB به طور واضحی از دو نمونه دیگر بلندتر است.



شکل۲: نمونه‌های رنگی خرچنگ گونه *E. frontalis* (سطح پشتی و شکمی)

Figure 2: Color images of *E. frontalis* (dorsal and abdominal surface)

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]



شکل۳: تصاویر کلی فراساختار گونوپود نمونه‌های Epixanthus sp. MB - 2015، الف) A، ب) B، ج) C، د) D
Figure 3: Overview of Gonopod Ultrastructure Samples 2015 Epixanthus sp. MB -, a) A, b) B, c) C, d) D

در گونوپود نمونه B، دو ویژگی منحصربه‌فرد مشاهده می‌شود. اولاً، سه قسمت طولی گونوپود به‌راحتی از هم قابل تشخیص هستند و برآمدگی میانی برجسته‌تر به‌نظر می‌رسد. دوماً، سه خار در انتهای بخش رأسی در قسمت میانی به طرز خاصی درکنار هم قرار گرفته‌اند (شکل‌های ۳ و۴). گونه C، گونوپود باریک‌تر و کشیده‌تری نسبت به سایر نمونه‌ها دارد و فرورفتگی حاشیه جانبی در قسمت ابتدای بخش دیستال نامشخص بوده و وجود ندارد (شکل۴).

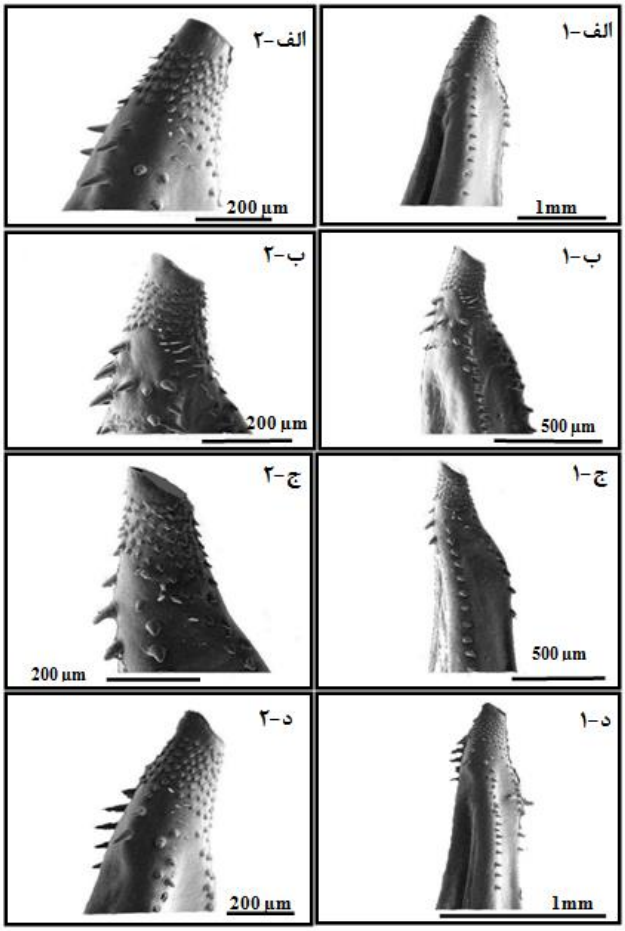
شناسایی ژنتیکی

تطبیق توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در ژن بانک جهانی NCBI نشان داد که تاکنون هیچ توالی از این گونه برای ژن COI ثبت نشده است. توالی‌های به‌دست آمده در بانک داده جهانی NCBI با دریافت شماره پذیرش با نام‌های فعلی *Epixanthus* sp.*MB*-2015(A) (LC۰۸۱۲۲۸)، *Epixanthus* sp.*MB*-2015(B) (LC۰۸۱۲۲۹)، *Epixanthus* sp.*MB*-2015(C)، *Epixanthus* sp.*MB*-2015(D) (LC۰۹۱۳۴۳) ثبت گردیدند. مقایسه توالی‌های به‌دست آمده از ۴ نمونه رنگی مختلف گروه مورفولوژی *E. frontalis* نشان داد که این توالی‌ها بر هم منطبق نیستند (شکل ۵).

نتایج روابط تکاملی

نتیجه محاسبات فیلوژنی و روابط تکاملی (ML, BI) برای ۷ توالی ژن COI از خانواده Oziinae با یک برون گروه به نام *Portunus pelagicus* (KM۵۲۸۱۲۷) الگوی توپولوژی یکسانی را برای هر سه درخت تکاملی نشان دادند. نتایج اختلافات ژنتیک در توپولوژی درختان تکاملی منعکس شد (شکل۵). گونه‌های *Epixanthus sp.MB* (A-D) کلادی مشترک را تشکیل دادند و این کلاد با ارزش‌های بسیار بالای بوت استراپ (ML=۹۹) و احتمال پسین قطعی (PP =۱) حمایت شد.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

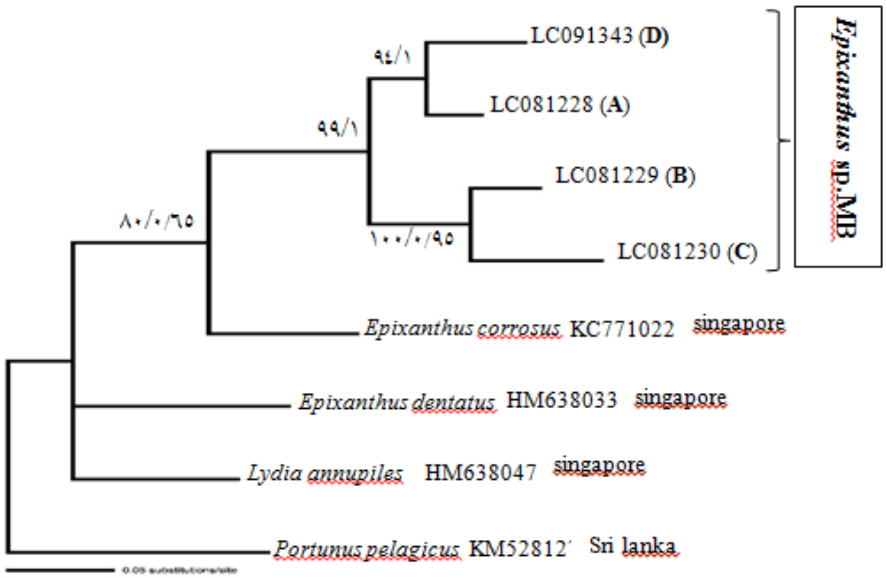


شکل ۴: فراساختارقسمت راسی گونوپود نمونه‌های Epixanthus sp.MB-2015 الف) A، ب) B، ج) C، د) D توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره

Figure 4: Ultrastructure of the gonopod apex of specimens Epixanthus sp. MB-2015 a) A, b) B, c) C, d) D by electron microscopy

گونه‌های *Epixanthus sp.MB* (A) و *Epixanthus sp.MB* (D) با ارزش‌های بوت استراپ بالا (ML=۹۴) و احتمال پسین قطعی (PP=۱) با هم در یک کلاد و نمونه‌های *Epixanthus sp.MB* (B) و (C) *Epixanthus sp.MB* نیز با ارزش بوت استراپ بالا (ML=۱۰۰) و احتمال پسین بالا (PP=۰/۹۵) با هم درکلادی جداگانه قرار گرفتند. همچنین آنالیزها نشان دادند، کلاد مورفولوژیک *Epixanthus sp. MB* با گونه *Epixanthus corrosus* رابطه خواهری دارد و این روابط مونوفیلتیک با ارزش بوت استراپ نسبتاً بالا (ML=۸۰) و احتمال پسین متوسط (PP=۰/۶۵) حمایت شده‌اند. توپولوژی درختان تکاملی هیچ رابطه تکاملی برای کلاد مربوط به نمونه‌های *Epixanthus sp.MB* (A-D) با دو گونه *E dentatus* و *Lydia annulipes* نتوانست پیدا کند. به علت عدم وجود توالی از گونه *E. frontalis* در بانک ژن، امکان بررسی صحت مطالعات مورفولوژیک که ۴ مورفوتایپ این نمونه را با عنوان این گونه شناسایی کرده بودند، فراهم نشد.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]



شکل ۵: درخت Maximum likelihood و Baysian برای توالی COI در نمونه‌های Epixanthus . در صدهای بوت استراپ برای (ML) و احتمال توزیع پسین (Posterior Probability)، برای Baysian روی گره ها نشان داده شده است (PP).

Figure 5: Maximum likelihood tree of COI sequences for specimens of *Leptodius* sp. Values at percentages bootstrap for 1000 repetitions and the posterior probabilities on the nodes has been shown

بحث

با توجه به تنوع مورفولوژیک و اکولوژیک سخت‌پوستان، شناسایی آنها بر اساس روش‌های ریخت‌شناسی بسیار مشکل می‌باشد (Costa and Carvalho, 2007). در آبهای سواحل ایرانی خلیج فارس بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک تنها گونه‌ای از جنس *Epixanthus* که به ثبت رسیده، گونه *Epixanthus frontalis* می‌باشد. این جنس دارای سه گونه در جهان می‌باشد که بر اساس یافته‌های Heller (۱۸۶۱) شناسایی آنها بر اساس کاراپاس و دندانه‌های حاشیه جلویی- جانبی آن صورت می‌گیرد. Heller (۱۸۶۱) بیان داشت گونه *E. frontalis* دارای کاراپاسی با سطحی صاف می‌باشد که در حاشیه جلویی-جانبی دارای ۴ لوب است و این ویژگی سبب شناسایی آن از سایر گونه‌های این جنس می‌گردد. با توجه به اظهارات محققان پیشین و نیز تطابق ویژگی‌های ظاهری، ۴ مورفوتایپ مطالعه حاضر متعلق به گونه *E. frontalis* می‌باشند. در بررسی‌های اولیه به‌نظر می‌رسید کاراپاس مورفوتایپ A از لحاظ شکل ظاهری اندکی با بقیه متفاوت است و حالت بیضی شکل کمتری دارد و کاراپاس در سایر نمونه‌ها بسیار شبیه بود. در مطالعه‌ای که Naderloo و Schubart (۲۰۱۰) بر جنس‌های *Parasesarma* و *Perisesarma* در خلیج فارس انجام دادند، بیان کردند اگرچه این دو گونه از لحاظ شکل ظاهری بسیار شبیه هستند، ولی اختلاف در وجود یا عدم وجود دندان‌های جلویی-جانبی سبب تفکیک این دو گونه از یکدیگر می‌شود. بنابراین، به منظور شناسایی دقیق این نمونه‌ها از روش DNA بارکدینگ (COI) استفاده شد. DNA بارکدینگ قادر است گونه‌هایی را که دارای خصوصیات مورفولوژیک مشابه (گونه های خواهری) می باشند، از هم تفکیک کند (Hebert *et al*., 2003). نتایج مولکولی مطالعه حاضر نشان داد این توالی‌ها به طور کامل بر یکدیگر منطبق نیستند و ممکن است ۴ مورفوتایپ متعلق به گونه‌های جداگانه‌ای باشند و در میان آنها گونه‌های ناشناخته وجود داشته باشند. توالی از گونه مورد نظر در بانک ژن ثبت نشده بود و آنالیزهای فیلوژنی درختان تکاملی، تنها نشان داد نمونه‌های مطالعه حاضر با

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

گونه *E. corrosus* رابطه خواهری دارد و این روابط مونوفیلتیک با ارزش بوت استراپ نسبتاً بالا (ML=۸۰) و احتمال پسین متوسط (PP=۰/۶۵) حمایت شده‌اند. در قلمرو دریایی گونه‌های مخفی و شناسایی نشده به‌وفور وجود دارند که روش شناسایی با ویژگی‌های مورفولوژیک، شناسایی آنها را با مشکل مواجه می‌کند (Knowlton, 1993). Klaus و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند، با ترکیب داده‌های مورفولوژیک و مولکولی، قطعاً اطلاعات بیشتری در بازسازی و ترسیم درخت تکاملی ده‌پایان خواهد خواهد شد. بنابراین، در این تحقیق به همراه بررسی‌های ظاهری فراساختار مورفولوژی، اولین گونوپود جنس نر نیز مورد بررسی قرار گرفت. بررسی فراساختار با میکروسکوپ الکترونی (SEM) سبب ظاهر شدن تفاوت‌های بارز میان گونوپودهای نمونه‌های مطالعه حاضر شد. اختلافات ظریف در مورفولوژی این اندام که در بررسی با میکروسکوپ لوپ دیده نمی‌شود، در مطالعه فراساختار آن با تصاویر الکترونی مشهود بود و توانست در تشخیص گونه‌های نزدیک به‌هم مفید باشد. مطالعه مشابه Ponchunchoovong (۲۰۰۶) بر خرچنگ جنس *Esanthelphusa* نشان داد که استفاده از بررسی جزئیات گونوپود با میکروسکوپ الکترونی می‌تواند به شناسایی گونه‌های خرچنگ‌های ناشناخته کمک کند. Moyano (۲۰۱۱) بیان داشت، موفولوژی اولین گونوپود جنس نر می‌تواند فاکتور قابل اعتمادی برای شناسایی گونه‌ها و تشخیص گونه‌های نزدیک به‌هم شود. او بیان داشت قسمت رأسی اولین گونوپود جنس نر دارای تغییرات مشخصی در گونه‌های مختلف می‌باشد و به‌خصوص این ویژگی در خرچنگ‌های حقیقی ارزش تاکسونومیک دارد. این اندام تا حد زیادی پایدار و ثابت است و از تغییرات محیطی تاثیر نمی‌پذیرد. گونوپود در گونه‌های مختلف دارای تنوع مورفولوژیک بالایی است. به همین دلیل برای شناسایی و تشخیص گونه‌های نزدیک به‌هم از آن استفاده می‌شود (Bauer, 1986). در مطالعه Harrison (۲۰۰۴) که جهت شناسایی گونه‌های *Austinixa chacei* و *Austinixa behreae* انجام شد، دریافت با اینکه گونه‌ها از لحاظ مورفولوژی کاملاً مشابه بودند، با این‌حال، اختلافات فاحش در مورفولوژی اولین گونوپود جنس نر در آنها دیده شد و نتایج آنالیزهای مولکولی برای ژن COI در آنها این جدایی را تأیید کرد. مطالعه حاضر نشان داد با وجود اینکه نمونه‌های مورد مطالعه از نظر خصوصیات ریخت‌شناسی به عنوان یک گونه شناسایی شده‌اند، توالی نوکلئوتیدی این قطعه ژنی میتوکندریایی (COI)، در تمام مورفوتایپ‌های رنگی بر هم منطبق نیستند و این نتایج در توپولوژی درختان تکاملی برای هر دو آنالیز (Maximum likelihood, Bayesian) منعکس شد. عطاران فریمان و موسوی (۱۳۹۲) و ایزدیان و همکاران (۱۳۹۵) نیز با روش بارکدگذاری DNA توانستند روابط نرم‌تنان خلیج فارس را با با سایر نقاط جهان شناسایی کنند. تلفیقی از روش‌های مورفولوژی دقیق بر اساس میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM)، سیستماتیک مولکولی و سایر مشخصات ظاهری بهترین روش برای شناسایی و کشف گونه های جدید و پنهان در میان خرچنگ‌ها خواهد بود. بررسی حاصل نشان داد، با وجود اینکه نمونه‌های مورد مطالعه از نظر خصوصیات ریخت‌شناسی به عنوان یک گونه شناسایی شده‌اند ممکن است متعلق به گونه‌های جداگانه باشند که این فرآیند مستلزم بررسی‌های بیشتر با سایر نشانگرهای مولکولی می‌باشد.

منابع

ایزدیان، م.، ذوالقرنین، ح.، نبوی، س.م.ب.، اشجع اردلان، آ. و یوسفی سیاه کلرودی، س.، ۱۳۹۵. شناسایی مولکولی و فیلوژنی گونه های جنس *Nerita* در سواحل صخره ای شمال خلیج فارس. مجله علمی شیلات ایران.۲۵: ۱۸۳-۱۷۱.

عطاران فریمان، گ.، و موسوی پور، ی.، ۱۳۹۲. اولین بررسی فیلوژنتیکی گونه *Goniobranchus annulatus* (Mollusca :Nudibranchia) در آب‌های ناحیه زیر جزر و مدی خلیج چابهار براساس توالی ژن سیتوکروم اکسیدازC زیر واحد I . مجله علمی شیلات ایران. ۲۲: ۸۶-۷۷.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

Abele, L.G., 1971. Scanning electron photomicrographs of brachyuran gonopods. *Crustaceana*, 21:217-219.DOI: https://www.jstor.org/stable/20101832.

Apel, M., 2001. Taxonomie und Zoogeographie der Brachyura, Paguridea und Porcellanidae (Crustacea: Decapoda) des Persisch-Arabischen Golfes. Unpublished doctoral thesis, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a. M., 268 P.

Bauer, R.T., 1986. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 6:313–325. DOI:10.1163/193724086X00181.

Bedini, R., 2002. Colour change and mimicry from juvenile to adult: *Xantho poressa* (Olivi, 1792) (Brachyura, Xanthidae) and *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758) (Brachyura, Portunidae).*Crustaceana*, 75:703–710. DOI: 10.1163/156854002760202688.

Costa, F.O. and Carvalho, GR., 2007. The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of Fish. *Genomics, Society and Policy*, 3:52–56.

Dayrat, B., 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85: 407-415. DOI:10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x.

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. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–299.

Gibbs, J., 2009. Integrative taxonomy identifies new (and old) species in the *Lasioglossum* (*Dialictus*) *tegulare* (Robertson) species group (Hymenoptera, Halictidae). *Zootaxa*, 2032: 1-38. DOI: 10.5281/zenodo.186301.

Harrison, J.S., 2004. Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16s and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinixa* (Decapoda: Pinnotheridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 743–754. DOI:10.1016/S1055-7903(03)00250-1.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and deWaard, J.R., 2003. Biological identifications throught DNAbarcodes. *Proceedings of the Royal Society*, 270: 313–321. DOI:10.1098/rspb.2002.2218

Heller, C., 1861. Beiträge zur Crustaceen-Fauna des Rothen Meeres. I. Theil. Sitzungsberichte der mathematisch-naturwissenschaftlichen Klasse der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften Wien, 43: 297–374.

Hogarth, P.J., 1978. Variation in carapace pattern of juvenile. *Carcinus maenas*. *Marine Biology*, 44: 337–343.

Klaus, S., Schubart, C.D. and Brandis, D., 2006. Phylogeny, biogeography and a new taxonomy for the *Gecarcinucoidea*

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

Rathbun, 1904 (Decapoda: Brachyura). *Organisms Diversity & Evolution*, 6: 199-217. DOI: 10.1016/j.ode.2005.09.006.

Knowlton, N., 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 24:189-216.

Lefe´bure, T., Douady, C.J., Gouy, M. and Gibert, J., 2006. Relationship betwee morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40:435–447. DOI: 10.1016/j.ympev.2006.03.014.

Moyano, M.P.S., Gavio, M.A. and Cuartas, E.I., 2011. Copulatory system of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea: Brachyura: Majoidea). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91:1617-1625. DOI:10.1017/S0025315411000257.

Naderloo, R. and Sari, A., 2007. Subtidal crabs of the Iranian coast of the Persian Gulf: New collections and biogeographic considerations. *Aquatic Ecosystem Health, Management*, 10: 341-349.DOI: https://DOI.org/10.1080/14634980701514620.

Naderloo, R. and Schubart, C.D., 2010. Description of a new species of *Parasesarma* (Crustacea; Decapoda;Brachyura; Sesarmidae) from the Persian Gulf, based on morphological and genetic characteristics. *Zoologischer Anzeiger*, 249:33–43. DOI: https://DOI.org/10.1016/j.jcz.2010.01.003

Naderloo, R., 2011. Grapsoid crabs (Decapoda: Brachyura: Thoracotremata) of the Persian Gulf and the Gulf of Oman. *Zootaxa*, 3048:1-43. DOI:10.11646/zootaxa.3048.1.1

Ng, P.K.L., Guinot, D. and Davie, P.J.F., 2008. Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. Raffles Bulletin of Zoology. *Supplement*, 17:1–286.

Palma, A.T., Orrego, C. and Arriagada, M., 2003. Crypsis in early benthic phases of brachyuran Decapod crustaceans in central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 76:149-156. DOI:10.4067/S0716-078X2003000200002.

Pessani, D. and Tirelli, T., 2006. Chromatic patterns of the hermit crab *Calcinus tubularis* related to the occupied shell. *Hydrobiologia*, 557: 107-112. DOI:10.1007/1-4020-4756-8_13.

Ponchunchoovong, S., 2006. Spices identification of Thai-filed crab in the lower north-eastern region of Thailand. *Suranaree Journal of Science and Technology*, 13(3):245-249.

Radulovici, A., Archambault, P. and Dufresne, F., 2010. DNA Barcodes for marine Biodiversity: Moving Fast Forward. *Journal Diversity*, 2: 450-472. DOI: 10.3390/d2040450.

Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574. DOI:10.1093/bioinformatics/btg180.

Stephenson, W., 1961. Scientific results of marine investigations of the South China Sea and the Gulf of Thailand. Naga report, Scripps institution of oceanography, 38p. ID: (OCoLC) 421639432

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Version 6.0. DOI:10.1093/molbev/msw054.

Yamindago, A., Senanan, W. and Tangkrock-Olan, N., 2013. Verification on Morphological Identification of Grapsid Crabs Genus *Metopograpsus* H. Milne Edwards, 1853 from Chon Buri Province Using Partial Sequences of Mitochondrial 16S rRNA, 12S rRNA and Cytochrome c Oxidase Subunit I (COI) Genes. *Burapha Science Journal*, 1:181-193. DOI: https://DOI.org/10.1071/IS17034

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

Molecular identification of *Epixanthus frontalis* (Brachyuran: Oziinae) from the rocky shores of Bushehr province using DNA barcode method

Chenari F.[1*]; Nabavi S.M.B.i[1]; Yousefi Siahkalroodi S.[2]; Salari M.A.[1]; Savari A.; Zolgharnein H.[1]

[*]chenari_bio@yahoo.com

1-Khorramshahr university of Marine Science and Technology, khorramshahr, Iran
2- Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran

Abstract

Epixanthus frontalis is the only known species of the genus *Epixanthus* from the Persian Gulf which include color polymorphic specimens. Considering that cryptic species are common among crustaceans, the aim of this study was to identify the cryptic species complexes the collected samples from the Persian Gulf. For this purpose, 4 colorful morphotypes of *E. frontalis* collected from rocky shores along Bushehr province. Then the first male gonopods was separated and photographed by scanning electron microscopy (SEM). For molecular studies samples of DNA extracted by using phenol-chloroform and mitochondrial cytochrome oxidase subunit gene segment (COI) was PCR and sequenced. The results showed that the nucleotide sequence of this gene fragment of the mitochondrial (COI) is not identical in all colorful morphotypes. These results reflected in the evolution of tree topology for all two analyses (maximum likelihood, bayesian). The study of apical ultrastructure segments of the first male species showed that it can be seen fundamental differences in the apical organs in some colorful morphotypes. Results of this study indicated that although the specimens assigned to single species morphologically, they may belong to different species based on their genotype. Further molecular studies with specific markers are needed for molecular identifications.

Keywords: COI, Ultrastructure, Gonopod, Persian Gulf

[*]Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]