

مقاله علمی - پژوهشی:

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

فریده چناری^{*}^۱، سید محمدباقر نبوی^۱، سیامک یوسفی سیاهکلروdi^۲، محمدعلی سالاری^۱، احمد سواری^۱
^۱حسین ذوالقرنین

^{*}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-پیشوایان، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوایان، ایران

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۹

چکیده

گونه گونه از جنس *Epixanthus frontalis* تنها در خلیج فارس است که دارای الگوهای رنگی مختلف می‌باشد. از آنجایی که وجود گونه‌های مخفی در میان سخت پوستان 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. frontalis* از سواحل صخره‌ای استان بوشهر نمونه برداری انجام شد. سپس اولین گونوپودهای جنس نر، جداسازی گردیدند و با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد عکس برداری قرار گرفتند. جهت مطالعات مولکولی، DNA نمونه‌ها با استفاده از روش تغییر یافته فل-کلروفروم استخراج و قطعه ژنی زیر واحد یک سیتوکروم اکسیداز میتوکندری (COI) تکثیر و توالی یابی شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد، توالی نوکلوتوتیدی این قطعه ژنی میتوکندریایی (COI)، در تمام مورفوتابیپ‌های رنگی بر هم منطبق نیستند و این نتایج در توپولوژی درختان تکاملی برای هر دو آنالیز (Maximum likelihood, Bayesian) معنکس شد. مطالعه فراساختار قسمت راسی اولین گونوپود جنس نر نیز نشان داد، تفاوت‌هایی اساسی در قسمت راسی این اندام در برخی مورفوتابیپ‌های 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

مقدمه

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* می‌باشد 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 مدي زیستگاه‌های صخره‌ای و سنگی دیده می‌شود. در حال حاضر، بسیاری از محققان تأکید 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; Lefebvre et al., 2006). از آنجایی که 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.

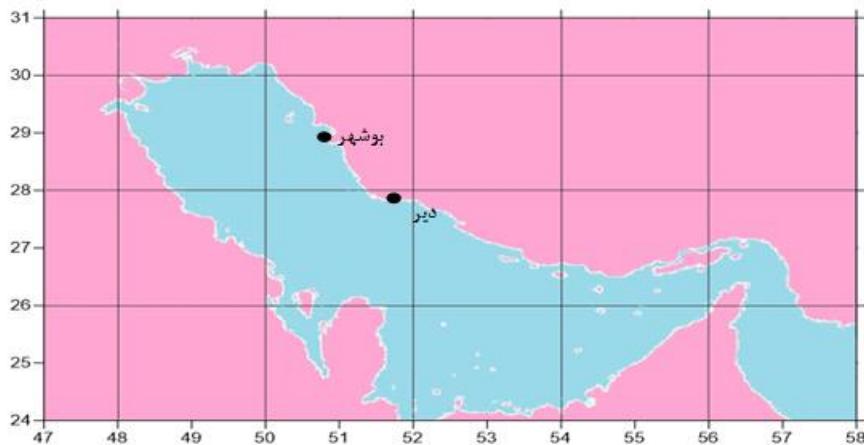
مواد و روش کار

در این مطالعه^۴ مورفوتابیپ 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 (شکل ۱). جهت شناسایی مورفولوژیک نمونه‌ها، ویژگی‌هایی مانند شکل کاراپاس، ابعاد و برجستگی‌های آن، شکل و ضخامت چنگال‌ها، شکل و ضخامت و فرورفتگی‌های روی پاهای، وجود یا فقدان بندهای شکمی و وضعیت قطعات شکمی، وجود برجستگی‌های خارمانند و مومانند روی شکم و بازوها، وضعیت قرارگیری چشمها

خرچنگ‌های حقیقی ۱۷٪ از کل سخت‌پوستان 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 به خصوص 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 (Lefebvre et al., 2006). مراحل زندگی متعدد از تخم تا لارو، دو شکلی جنسی و انعطاف‌پذیری فنتوپیپی 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 ۶۵ bp می‌باشد، به عنوان ابزاری سودمند برای شناسایی موجودات و تعیین DNA (Hebert et al., 2003) مرسک گونه‌ها به کار می‌رود (Hebert et al., 2003). بارکدینگ نه تنها ابزاری برای شناسایی دقیق گونه‌ها محسوب می‌شود بلکه برای معرفی و تعیین مرسک گونه‌ها نیز کارآمد خواهد بود (Hebert et al., 2003).

آزمایشگاه علوم دریایی خرمشهر منتقل شدند. جهت بررسی مورفولوژی گونوبدهای 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.

روی سر و وضعیت مأگزیلی پدها مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی از کلیدهای شناسایی خلیج فارس (Stephenson, 1961; Apel, 2001; Naderloo and Ng *et al.*, 2007) و کلید شناسایی هند-آرام (Sari, 2007) استفاده شد. سپس با کنار زدن قسمت اپرکولوم شکمی، اولین گونوبدهای 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



شکل ۱: مناطق نمونه‌برداری در شمال غرب خلیج فارس (بندر بوشهر و بندر دیر)

Figure 1: Sampling areas: Bushehr and Dayer Port (Southern Oli)

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 الحق: 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 ۱۰۰ bp بر ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و با safe stain (Yamindago *et al.*, 2013) PCR مناسب، جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردیدند. درخت فیلوزنی تجزیه و تحلیل ماتریس داده‌ها بر

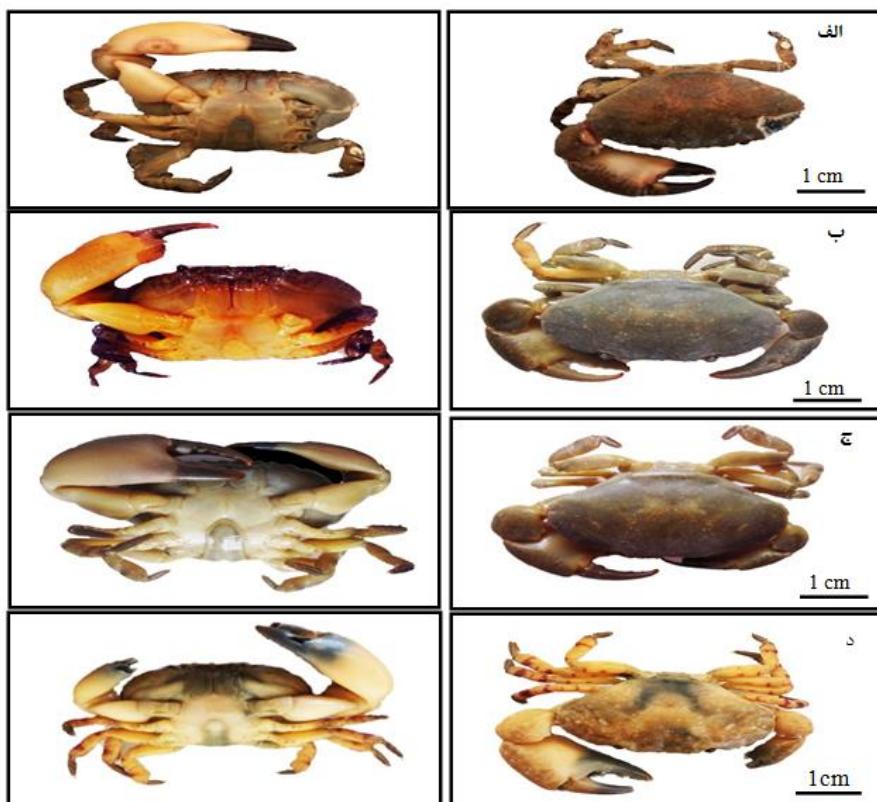
برای شناسایی مولکولی استخراج DNA از ۶۰۰ میکرومتری بافر لیزکننده CTAB ۰.۲٪ mMTrisHCl (۱۰۰ M NaCl, ۰.۲ M EDTA, ۰.۴ M Ctab) استفاده گردید و سپس باقیمانده استخراج با روش فنل-کلروفروم انجام شد. کیفیت و کمیت با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ تعیین گردید. سپس با استفاده از آغازگرجهانی (Folmer *et al.*, 1994) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر قطعه ژنی سیتوکروم اکسیداز I (COI) انجام شد. هر واکنش در حجم ۲۵ میکرومتری شامل بافر (۱X)، ۱ میلی مolar dNTP، ۰.۲ میلی مolar MgCl₂، ۵ پیکومول از هر آغازگر رفت و برگشت، ۱/۵ U آنزیم Tag DNA Polymerase و ۳۰-۳۰ نانوگرم DNA الگو انجام گرفت. برنامه حرارتی

مستقیم یا تا حدودی سینوسی شکل است. در نمای کلی به نظر 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 (شکل ۳). 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 نوک تیز بخش رأسی در نمونه‌های C و B به طور واضحی از دو نمونه دیگر بلندتر است.

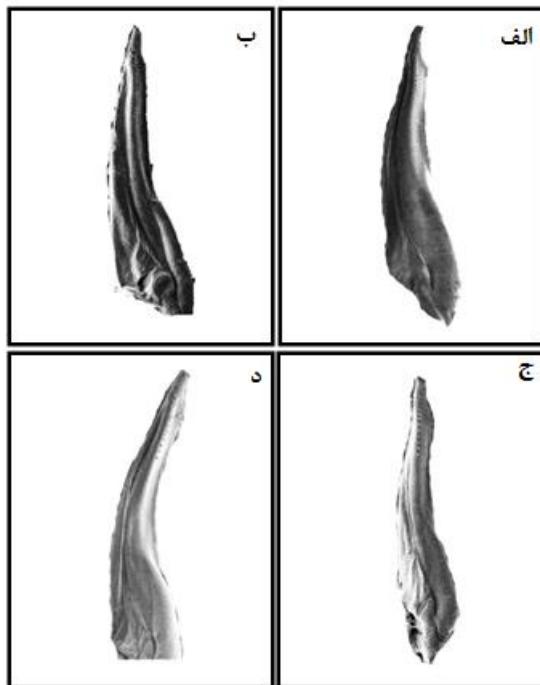
ماکزیمم احتمال (Maximum likelihood) با استفاده از نرم افزار Mega6 (Tamura *et al.*, 2013) و روش احتمال پسین (Posterior probability) با استفاده از روش بازیزن و Ronquist and Huelsenbeck, (MrBayes3.2.5) (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) انجام گردید. درخت فیلوجنی با استفاده از توالی‌های به دست آمده و چندین 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.



شکل ۲: نمونه‌های رنگی خرچنگ گونه *E. frontalis* (سطح پشتی و شکمی)
Figure 2: Color images of *E. frontalis* (dorsal and abdominal surface)



شکل ۳: تصاویر کلی فراساختار گونوپود نمونه های Epixanthus sp. MB - ۲۰۱۵ a) A, b) B, c) C, d) D
Figure 3: Overview of Gonopod Ultrastructure Samples 2015 Epixanthus sp. MB -, a) A, b) B, c) C, d) D

Epixanthus sp. MB- (LC. ۸۱۲۲۹) ۲۰۱۵(B)
Epixanthus sp. MB- ۲۰۱۵(D) ۲۰۱۵(C)
(LC. ۹۱۳۴۳) ثبت گردیدند. مقایسه توالی های به دست آمده از ۴ نمونه رنگی مختلف گروه مورفولوژی *E. frontalis* نشان داد که این توالی ها بر هم منطبق نیستند (شکل ۵).

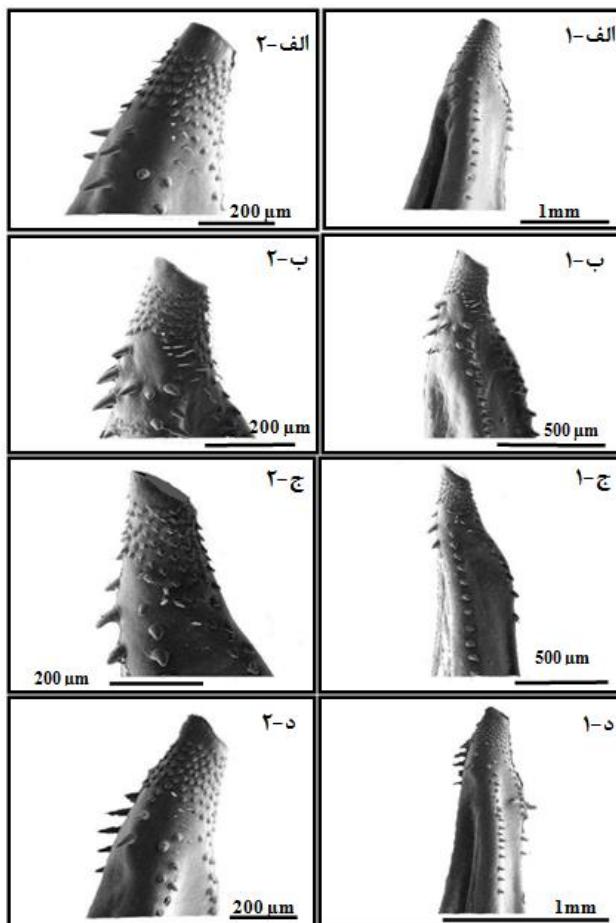
نتایج روابط تکاملی

نتیجه محاسبات فیلوزنی و روابط تکاملی (ML, BI) برای ۷ توالی ژن COI از خانواده Oziinae با یک بروون گروه به نام *Portunus pelagicus* (KM528127) الگوی تطبیق توالی های به دست آمده با توالی های موجود در ژن NCBI نشان داد که تاکنون هیچ توالی از این گونه برای ژن COI ثبت نشده است. توالی های به دست آمده در بانک داده جهانی NCBI با دریافت شماره پذیرش با نام های فعلی *Epixanthus* sp. MB- (LC. ۸۱۲۲۸) ۲۰۱۵(A)

در گونوپود نمونه B، دو ویژگی منحصر به فرد مشاهده می شود. اولاً، سه قسمت طولی گونوپود به راحتی از هم قبل تشخیص هستند و برآمدگی میانی برجسته تر به نظر می رسد. دوماً، سه خار در انتهای بخش رأسی در قسمت میانی به طرز خاصی در کنار هم قرار گرفته اند (شکل های ۳ و ۴). گونه C، گونوپود باریک تر و کشیده تری نسبت به سایر نمونه ها دارد و فرورفتگی حاشیه جانبی در قسمت ابتدای بخش دیستال نامشخص بوده و وجود ندارد (شکل ۴).

شناسایی ژنتیکی

تطبیق توالی های به دست آمده با توالی های موجود در ژن بانک جهانی NCBI نشان داد که تاکنون هیچ توالی از این گونه برای ژن COI ثبت نشده است. توالی های به دست آمده در بانک داده جهانی NCBI با دریافت شماره پذیرش با نام های فعلی *Epixanthus* sp. MB- (LC. ۸۱۲۲۸) ۲۰۱۵(A)

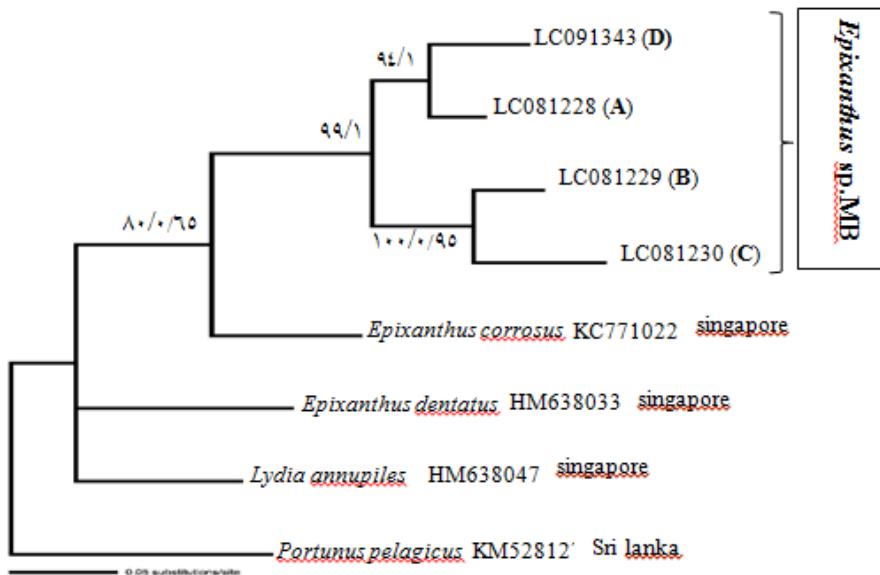


شکل ۴: فراساختار قسمت راسی گونوپود نمونه‌های Epixanthus sp.MB-2015 a) A, b) B, c) C, d) D توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره

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

شدیداند. توپولوژی درختان تکاملی هیچ رابطه تکاملی برای کلاد مربوط به نمونه‌های *Epixanthus sp.MB* (A-D) با *Lydia annulipes* و *E. dentatus* 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.

گونه‌های *Epixanthus* و *Epixanthus sp.MB* (A) و *sp.MB* (D) با ارزش‌های بوت استراپ بالا ($ML=94$) و احتمال پسین قطعی ($PP=1$) با هم در یک کلاد و نمونه‌های *Epixanthus* sp.MB (B) و (C) نیز با ارزش بوت استراپ بالا ($ML=100$) و احتمال پسین بالا ($PP=0.95$) با هم در کلادی جداگانه قرار گرفتند. همچنین آنالیزها نشان دادند، کلاد مورفولوژیک *Epixanthus sp. MB* با گونه *Epixanthus corrosus* رابطه خواهی دارد و این روابط مونوفیلیتیک با ارزش بوت استراپ نسبتاً بالا ($ML=80$) و احتمال پسین متوسط ($PP=0.65$) حمایت



شکل ۵: درخت Maximum likelihood و Bayesian برای توالی COI در نمونه‌های *Epixanthus*. در صدهای بوت استراتپ برای (ML) و احتمال توزیع پسین (PP). برای Bayesian روی گره‌ها نشان داده شده است.

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

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 *Perisesarma* و *Parasesarma* 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. نمونه‌ها از روش DNA بارکدینگ قادر است گونه‌هایی را که دارای خصوصیات مورفوژیک مشابه (گونه‌های خواهری) می‌باشند، 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 مورفوتاپ 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 فیلوجنی درختان تکاملی، تنها نشان داد نمونه‌های مطالعه حاضر با

بحث

با توجه به تنوع مورفوژیک 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 مورفوژیک 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 دندانهای 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 مورفوتاپ مطالعه حاضر متعلق به گونه *E. frontalis* می‌باشند. در بررسی‌های اولیه به نظر می‌رسید کاراپاس مورفوتاپ A از لحاظ شکل ظاهری اندکی با

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 مورفوتابیپهای رنگی بر هم منطبق نیستند و این نتایج در تopolyozی 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 مورفوولوژی دقیق بر اساس میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM)، سیستماتیک مولکولی و سایر مشخصات ظاهری بهترین روش برای شناسایی و کشف گونه‌های 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 جدایانه باشند که این فرآیند مستلزم بررسی‌های بیشتر با سایر نشانگرهای مولکولی می‌باشد.

منابع

- ایزدیان، م.، ذوالقرنین، ح.، نبوی، س.م.ب..، اشجع ارلان، آ. و یوسفی سیاه کلروودی، س..، ۱۳۹۵ شناسایی مولکولی و فیلوژنی گونه‌های جنس *Nerita* در سواحل صخره‌ای شمال خلیج فارس. مجله علمی شیلات ایران. ۲۵: ۱۷۱-۱۸۳.
- عطاران فریمان، گ. و موسوی پور، ی..، ۱۳۹۲. اولین بررسی فیلوژنتیکی گونه *Goniobranchus annulatus* (Mollusca : Nudibranchia آبهای ناحیه زیر جزر و مدى خلیج چابهار براساس توالی ژن سیتوکروم اکسیداز C زیر واحد I . مجله علمی شیلات ایران. ۲۲: ۷۷-۸۶.

گونه *E. corrosus* رابطه خواهی دارد و این روابط مونوفیلتیک با ارزش بوت استراپ نسبتاً بالا ($ML=80$) و احتمال پسین متوسط ($PP=0.65$) حمایت شده‌اند. در قلمرو دریایی گونه‌های مخفی و شناسایی نشده بهوفور وجود دارند که روش شناسایی با ویژگی‌های مورفوولوژیک، شناسایی آنها را با مشکل مواجه می‌کند (Knowlton, 1993). Klaus و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند، با ترکیب داده‌های مورفوولوژیک و مولکولی، قطعاً اطلاعات بیشتری در بازسازی و ترسیم درخت تکاملی دهپایان خواهد خواهد شد. بنابراین، در این تحقیق به همراه بررسی‌های ظاهری فراساختار مورفوولوژی، 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 مورفوولوژی این اندام که در بررسی با میکروسکوپ لوب دیده نمی‌شود، در مطالعه فراساختار آن با تصاویر الکترونی مشهود بود و توانست در تشخیص گونه‌های نزدیک بهم مفید باشد. مطالعه مشابه Ponchunchoovong (۲۰۰۶) بر خرچنگ جنس *Esantherphusa* گونوپود با میکروسکوپ الکترونی می‌تواند به شناسایی گونه‌های خرچنگ‌های ناشناخته کمک کند. Moyano (۲۰۱۱) بیان داشت، مورفوولوژی اولین گونوپود جنس نر می‌تواند فاکتور قابل اعتمادی برای شناسایی گونه‌ها و تشخیص گونه‌های نزدیک بهم 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 مورفوولوژیک بالایی است. به همین دلیل برای شناسایی و تشخیص گونه‌های نزدیک بهم از آن استفاده می‌شود (Harrison, 1986). در مطالعه Bauer, 1986 (۲۰۰۴) که جهت شناسایی گونه‌های *Austinixa chacei* و *Austinixa behreae* انجام شد، دریافت با اینکه گونه‌ها از لحاظ مورفوولوژی کاملاً مشابه بودند، با این حال، اختلافات فاصله در مورفوولوژی اولین گونوپود جنس نر در

- 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 through 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*

- 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.
- Lefebvre, T., Douady, C.J., Gouy, M. and Gibert, J., 2006.** Relationship between 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

- 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: (OCOLOC) 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>

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.i¹; 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