شناسایی مورفوتایپ‌های رنگی گونه *Leptodius exaratus* (Brachyuran: Xanthidae) بر اساس مطالعات مولکولی و میکروسکوپ الکترونی

فریده چناری[1*]، سیدمحمدباقر نبوی[1]، محمد علی سالاری[1]، احمد سواری[1]، حسین ذوالقرنین[1]

chenari_bio@yahoo.com

۱ - گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۶

چکیده

بر اساس مطالعات مورفولوژی، *Leptodius exaratus* تنها گونه شناخته شده از جنس Leptodius است که تاکنون در سواحل صخره‌ای خلیج فارس یافت شده است. از آنجایی که وجود گونه‌های مخفی در میان سخت‌پوستان دریایی بسیار رایج است، هدف مطالعه حاضر، بررسی احتمال شناسایی گونه‌های مخفی در میان ۸ مورفوتایپ رنگی است که در مطالعات مورفولوژیک به عنوان گونه *Leptodius exaratus* شناسایی شده بودند. بدین منظور، از ۸ الگوی رنگی منسوب به گونه *Leptodius exaratus* از سواحل صخره‌ای استان بوشهر نمونه‌برداری انجام شد. سپس اولین گونوپودهای جنس نر، جداسازی شده و با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) عکسبرداری شدند. 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 که توالی نوکلئوتیدی این قطعه ژنی میتوکندریایی (COI) در تمام مورفوتایپ‌های رنگی بر هم منطبق نمی‌باشند 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. این نتایج نشان می‌دهد که تمامی نمونه‌ها احتمالاً متعلق به یک گونه نمی‌باشند و در میان آنها گونه‌های پنهان وجود دارند. شواهد مولکولی همچنین نشان داد، توالی ۸ مورفوتایپ رنگی *Leptodius exaratus* از خلیج فارس و توالی ثبت شده این گونه از اندونزی در کلادهایی جداگانه قرار گرفته‌اند. شناسایی بر اساس مورفولوژی اولین گونوپود جنس نر توسط میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) و ژن COI روش‌های تحقیق کارآمدی در مطالعه حاضر بودند.

واژه‌های کلیدی: *Leptodius exaratus*، مولکولی، COI، گونوپود، خلیج فارس

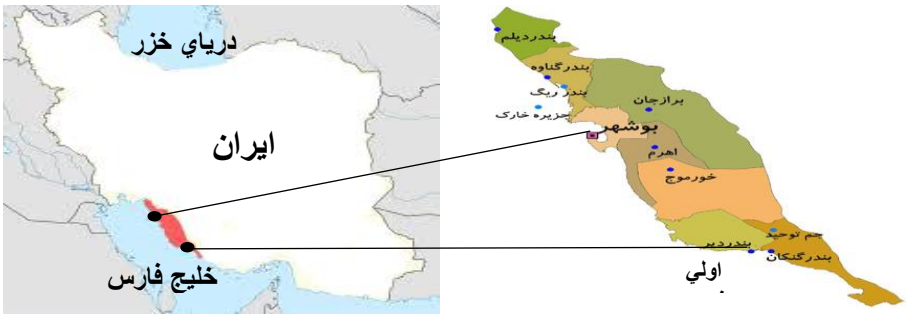
*نویسنده مسئول

مقدمه

آرایه‌شناسی گونه *Leptodius exaratus* بسیار پیچیده می‌باشد و بارها تحت بازبینی‌های متعدد قرار گرفته است که با تعریف گونه‌های جدید در سالهای اخیر همراه بوده است. جنس *Leptodius* دارای ۱۲ گونه می‌باشد که محدوده پراکنش آنها مناطق جزر و مدی و زیر جزر و مدی منطقه هند-غرب اقیانوس آرام معرفی شده است (Ng *et al*., 2008). اولین بار Stimpson (۱۹۰۷) تاکسونومی گونه *Leptodius exaratus* را بررسی کرد و توانست هفت مورفوتایپ از قسمت غربی اقیانوس آرام (جنوب ژاپن و چین) شناسایی کند. اخیراً محققان زیادی اختلافات فاحشی را بین جمعیت‌های این گونه از قسمت-های مرکزی و غربی اقیانوس هند و غرب اقیانوس آرام مشاهده کرده‌اند (Lee *et al*., 2013; Trivedi *et al*., 2015). شناسایی این گونه به‌علت شباهت ریختی به دیگر گونه‌های این جنس، اندازه کوچک و چند شکلی رنگ آن بسیار دشوار بوده و از گذشته بسیار مورد بحث بوده است. تنوع شکلی و الگوهای رنگی مختلف (Palma *et al*., 2003). ارزیابی تنوع زیستی در درجه اول بر اساس ویژگی‌های ظاهری نه تنها با سختی‌های فراوانی همراه است بلکه این امکان وجود دارد که تعداد موجودات را کمتر یا بیشتر از حد تنوع زیستی موجود تخمین بزنند (Lefe´bure *et al*., 2006). مراحل متعدد زندگی از تخم تا لارو، دو شکلی‌جنسی و انعطاف‌پذیری فنوتیپی در موجودات دریایی بطور فراوانی اتفاق می‌افتد و شناسایی آن‌ها را بر اساس ساختارهای ریختی با مشکل مواجه می-کند. بنابراین، آرایه شناسان برای رفع این مشکل به تشخیص گونه‌ها بر اساس روش‌های سیستماتیک مولکولی پرداخته‌اند تا از سردرگمی و شک در تشخیص گونه‌ها رها شوند (Radulovici *et al*., 2010). طی سال‌های اخیر، بارکد گذاری DNA، به عنوان روشی برای شناسایی تاکسون‌ها به شکل چشمگیری در میان تاکسونومیست‌ها، اکولوژیست‌ها و زیست‌شناسان تنوع زیستی مورد توجه قرار گرفته است (Hebert *et al*., 2003). در حال حاضر، بسیاری از محققان تأکید دارند که تلفیقی از روش‌های ریختی دقیق بر اساس میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM)، سیستماتیک مولکولی و سایر مشخصات ظاهری، بهترین روش برای شناسایی و تعیین گونه‌های جدید است (Gibbs, 2009). هدف مطالعه حاضر، بررسی احتمال شناسایی گونه‌های مخفی در میان ۸ الگوی رنگی است که در مطالعات ریختی به عنوان گونه *Leptodius exaratus* شناسایی شده بودند. به همین دلیل برای اولین بار الگوهای رنگی از گونه *Leptodius exaratus* با تاکید بر فراساختار ریختی اولین گونوپود جنس نر و با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز COI بررسی شدند.

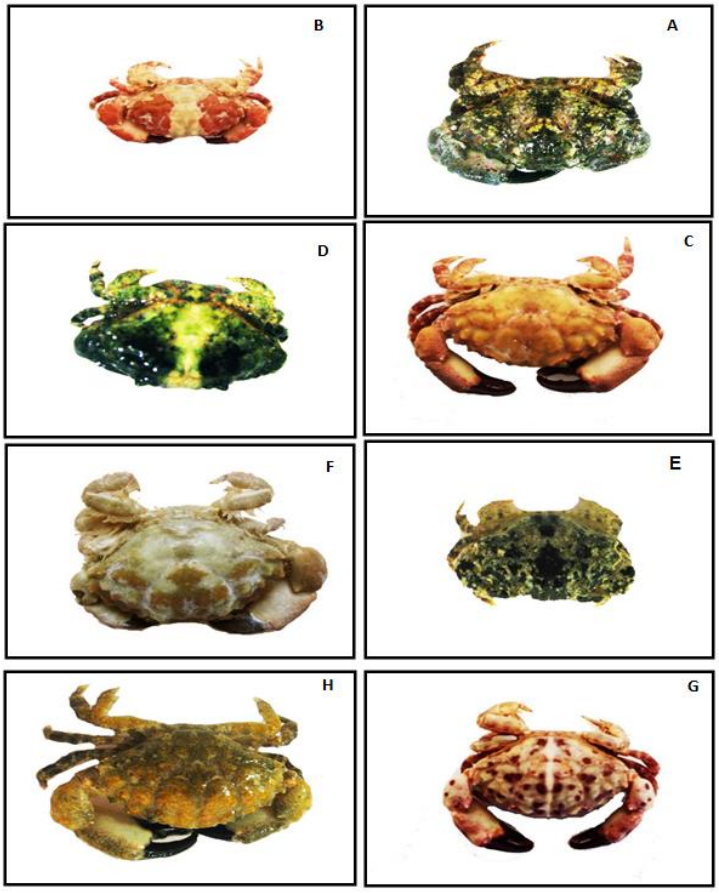
مواد و روش کار

در این مطالعه، ۸ نمونه با رنگ‌های مختلف متعلق به گونه *Leptodius exaratus* در آبان ماه ۱۳۹۳ از مناطق جزر و مدی سواحل صخره‌ای استان بوشهر از دو ایستگاه بندر دیر (اولی جنوبی با مختصات ″۵۶′۲۷ °۵۱ شمالی و ″۱۹′۵۰ °۲۷ شرقی) نمونه‌های (۴-۱) و بندر بوشهر (″۵۶′۶۶ °۲۸ شرقی و ″۸۲′۵۸ °۵۰ شمالی) نمونه‌های (۸-۴) جمع آوری و شناسایی شدند (شکل‌های ۱ و ۲). در محل، از نمونه‌ها جهت شناسایی ریختی عکس تهیه شد و سپس با کنار زدن قسمت اپرکولوم شکمی، اولین گونوپودهای خرچنگ‌های نر جدا شدند و سپس در فرمالین ۱۰% با میکروسکوپ الکترونی بررسی شدند. برای شناسایی ریختی از ویژگی‌هایی همانند شکل کاراپاس، ابعاد و برجستگی‌های آن، شکم و فرورفتگی‌های آن، وجود یا فقدان بندهای شکمی و وضعیت قطعات شکمی، وضعیت قرار گیری چشم ها روی سر و وضعیت ماگزیلی‌پدها و اندام تناسلی گونوپود استفاده شد (Ng *et al*., 2008; Naderloo and Sari, 2007). سپس نمونه‌ها در اتانول مطلق فیکس و برای انجام مطالعات مولکولی به آزمایشگاه دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل شدند.



شکل ۱: مناطق نمونه‌برداری: بندر بوشهر و بندردیر (اولی جنوبی)

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



شکل ۲: هشت نمونه رنگی گونه (A-H) *Leptodius exaratus*

Figure 2: Egith color specimens of *Leptodius exaratus* (A-H).

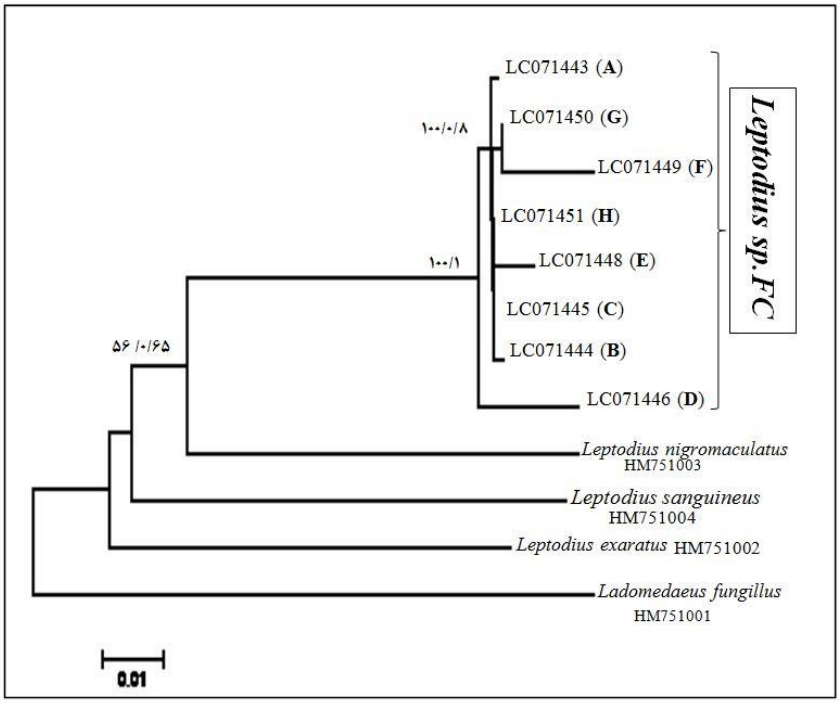
برای بررسی ریختی گونوپودهای فیکس شده توسط میکروسکوپ الکترونی، ابتدا آنها روی هات پلیت به مدت نیم ساعت دهیدراته و خشک گردیدند و سپس با پوششی از فلز طلا رنگ‌آمیزی شدند. از میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) مدل VEGATS5136 برای عکس-برداری از نمونه‌ها استفاده شد. برای ارزیابی مولکولی و استخراج DNA، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت عضله پا را جدا شد و پس از هموژن کردن، ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده CTAB ۲% (CTAB, NaCl 1.4مولار، TrisHCL ۱۰۰میلی مولار، EDTA ۲۰ میلی مولار) به آن اضافه گردید و باقیمانده استخراج با روش فنل-کلروفروم انجام شد. سپس با استفاده از پرایمر (LCO1490 5′-GGT CAA CAA) ATC ATA AAG ATA TTG G-3′, HCO2198 5′-TAA ACT TCA GGG TGA (Folmer *et al.*, 1994) (CCA AAA AAT CA-3′ 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 $MgCl_2$، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۵ پیکومول از هر آغازگر رفت و برگشت، ۱/۵ U آنزیم Tag DNA Polymerase و ۳۰-۲۰ نانوگرم DNA الگو بود. برنامه حرارتی برای واکنش موردنظر شامل مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی راد به مدت ۲ دقیقه، مرحله واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله الحاق در دمای ۴۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه و نهایتاً مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانت گراد به مدت ۷ دقیقه بود و تعداد ۳۵ چرخه در نظر گرفته شد. محصولات تکثیر شده به همراه سایز مارکر bp ۱۰۰ 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. توالی‌ها برای اولین بار از منطقه خلیج فارس گزارش شده است. توالی‌های بدست آمده با نرم‌افزار CLC Sequence viewer به توالی‌های اسیدآمینه ترجمه شدند و در ژن بانک جهانی ثبت گردیدند. سایر توالی ها ثبت شده از همین جنس نیز از سایت BOLD System و NCBI استخراج شدند. تجزیه و تحلیل ماتریس داده‌ها شامل ماکزیمم احتمال (Maximum Likelihood) با استفاده از مدل K2P در نرم افزار Mega6 (Tomura *et al.*, 2013) محاسبه شدند. آنالیز Bayesian با نرم افزار MrBayes 3.2.5 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) انجام شد. حمایت شاخه‌ها در روش Bayesian با اعداد مربوط به احتمال پسین بیان می‌گردد. درخت فیلوژنی با استفاده از توالی‌های بدست آمده و چندین توالی از گونه‌های دیگر جنس *Leptodius* بر پایه برون گروه *Ladomedaeus fungillus* (HM۷۵۱۰۰۱) ترسیم شد. هدف قرار دادن برون گروه مقایسه بهتر گونه‌های نزدیک به هم با گونه‌ای است که از لحاظ ژنتیکی با گونه مورد مطالعه تفاوت بیشتری دارد. این اقدام، صحت کار را بالا می‌برد و مقایسه را راحت‌تر می‌کند.

نتایج

مقایسه توالی‌های بدست آمده از ۸ نمونه نشان داد که توالی‌ها در بعضی نمونه‌ها به طور کامل بر هم منطبق نیستند و توالی نمونه‌های ۴، ۵ و ۶ در مقایسه با توالی نمونه‌های دیگر دارای جایگاه‌های حذف و تفاوت‌های نوکلئوتیدی می‌باشند (شکل ۳). این توالی‌ها در بانک داده‌های جهانی NCBI با دریافت شماره پذیرش بترتیب (۱-۸) (A) (LC۰۷۱۴۴۳)،(B) (LC۰۷۱۴۴۴)، (C) (LC۰۷۱۴۴۵)، (D) (LC۰۷۱۴۴۶)، (E) (LC۰۷۱۴۴۸)، (F) (LC۰۷۱۴۴۹)، (G) (LC۰۷۱۴۵۰) و (H) (LC۰۷۱۴۵۱) ثبت گردیدند.

شناسایی مولکولی و روابط تکاملی

در رسم درختان تکاملی برای بررسی تعیین روابط تکاملی در میان آنها، علاوه بر ۸ توالی ژن COI از سایر توالی‌های موجود ثبت شده در ژن بانک برای این جنس که ۴ توالی بودند نیز استفاده شد. نتیجه محاسبات فیلوژنی و روابط تکاملی (ML, BI) الگوی توپولوژی تقریبا یکسانی را برای هر سه درخت تکاملی نشان داد. نتایج اختلافات ژنتیکی در توپولوژی درختان تکاملی منعکس شدند. تمامی نمونه-های رنگی Leptodius sp. FC-2015 (A-H) کلاد مونوفیلتیک مشترک را تشکیل دادند و این کلاد با ارزش-های بوت استراپ بسیار بالا (ML=۱۰۰) و احتمال پسین قطعی (PP=۱) حمایت شد. با این حال نمونه (D) (LC۰۷۱۴۴۶)، از سایر مورفوتایپ‌های خواهری خود با ارزش‌های بوت استراپ بالا (ML=۱۰۰) و احتمال پسین قطعی (PP=۱) جدا شد. توپولوژی درختان تکامل نشان داد کلاد مربوط به Leptodius sp. FC-2015 (A-H) با گونه Leptodius nigromaculatus رابطه خواهری دارد و این روابط مونوفیلتیک با ارزش بوت استراپ متوسط (ML=۵۶) و احتمال پسین متوسط (PP=۰/۶۵) حمایت شده‌اند.



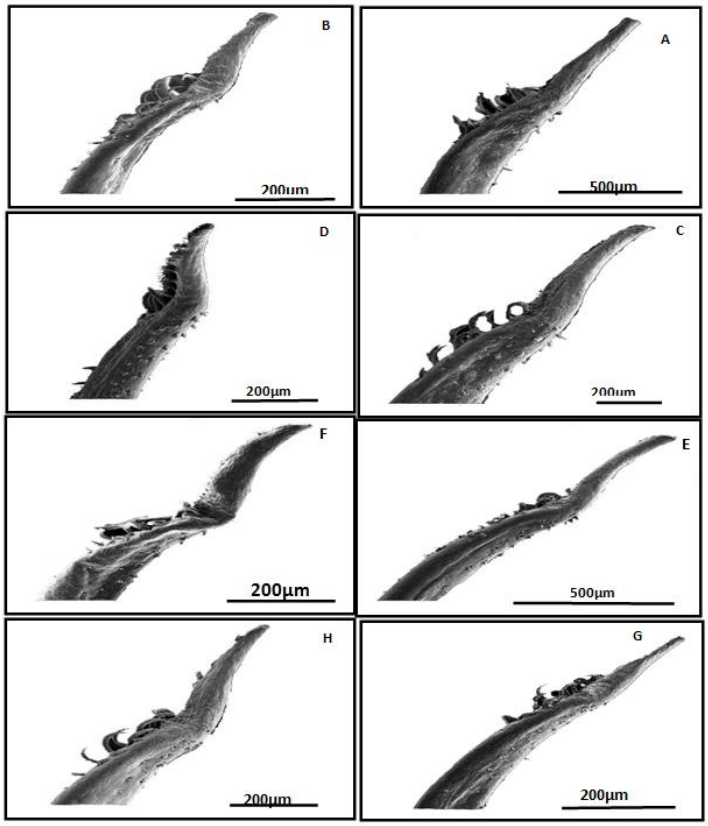
شکل ۳: درخت Maximum likelihood برای توالی COI در نمونه های *Leptodius*. ارزش درصدهای بوت استراپ برای ۱۰۰۰ تکرار (ML) و احتمال توزیع پسین (Posterior Probability) برای Bayesian، روی گره‌ها نشان داده شده است (ML/PP).

Figure 3: 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.

شناسایی مورفولوژی گونوپود

نتایج بررسی فراساختار گونوپود نشان داد که به طور کلی در این گونه گونوپود دارای ساختاری کشیده، استوانه‌ای و سینوسی شکل است. در محل اتصال لوب رأسی با بخش دیستال حالت منحنی شکلی ایجاد شده است که خارهایی روی آن دیده می‌شود. در قسمت لوب رأسی در زیر استریومیکروسکوپ بخش‌های کنگره داری دیده می‌شد که به سمت بیرون رشد کرده بودند. قسمت لوب رأسی در اکثر مورفوتایپ‌های این گونه حالت کشیده‌ای دارد. (شکل۴).

در بررسی فراساختار مورفوتایپ‌های مختلف این گونه تغییراتی واضح در شکل رأسی گونوپود برخی نمونه‌ها مشاهده شد. نمونه (D) ساختار گونوپود این نمونه تفاوت فاحشی نسبت به سایر مورفوتایپ‌ها دارد. قسمت لوب رأسی این نمونه، نسبت به دیگر نمونه‌ها کوتاهتر و عریض-تر است (شکل ۴-ج). در نمونه (E) بخش راسی گونوپود حالت کشیده‌تر و بلندتری نسبت به سایر نمونه‌ها دارد (شکل ۴-د).



شکل ۴: تصاویر میکروسکوپ الکترونی قسمت راسی گونوپود نمونه های (A-H) *Leptodius* sp. FC -2015

Figure 4: Electron microscope images of gonopod apical parts specimens of *Leptodius* sp. FC-2015 (A-H).

بحث

روش شناسایی گونه *Leptodius exaratus* به طور وسیعی از مناطق جزر و مدی و زیر جزر و مدی آب‌های اقیانوس هند و غرب آرام گزارش شده است. Lee و همکاران (۲۰۱۳) به شناسایی این گونه در این مناطق پرداختند و اظهار داشتند که با وجود پیچیدگی در شناسایی این گونه، محدوده پراکنش این گونه در شناسایی آن عامل کلیدی می‌باشد. آنها محدوده پراکنش این گونه را قسمت‌های غربی اقیانوس هند، خلیج فارس و دریای سرخ معرفی کردند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد، نمونه‌های رنگی در شاخه‌ای جداگانه نسبت به گونه مشابه خود از منطقه شرق اقیانوس هند (اندونزی) قرار گرفتند و لذا، با نام آزمایشی *Leptodius sp.FC-2015* (A-H) در ژن بانک جهانی ثبت شدند. درصد نتیجه آنالیزهای (ML و BI) درختان تکاملی نشان داد که مورفوتایپ‌های رنگی گونه Leptodius exaratus بطور کلی با هم مونوفیلتیک هستند. با این‌حال نمونه (D) به سبب داشتن شش نوکلئوتید متفاوت و پنج جایگاه حذف، بیشترین تفاوت را با دیگر نمونه‌ها نشان داد. Hennig (۱۹۹۶) بیان کرد که قابل قبول ترین روش برای تعیین مرز گونه ها بر اساس DNA بارکدینگ، تعیین حد و مرز گونه‌ها براساس درختان تکاملی می‌باشد. به گونه‌های مختلف یک جنس زمانی مونوفیلتیک گفته می‌شود که اعداد مربوط به ضریب بوت استراپ آن‌ها با میزان بالایی از آن شاخه حمایت کند. زمانی که یک گونه در شاخه‌ای جداگانه با ضریب حمایت بالا قرار بگیرد، نشان می‌دهد که متعلق به گونه‌ای جداگانه می‌باشد و در غیر این صورت نتیجه عکس خواهد شد (Monaghan *et al*., 2005). عطاران فریمان و موسوی (۱۳۹۲) و ایزدیان و همکاران (۱۳۹۵) نیز توسط روش بارکدگذاری DNA توانستند روابط نرمتنان خلیج فارس با دیگر نقاط جهان را شناسایی کنند. قرارگیری نمونه D در شاخه جداگانه با بوت استراپ و احتمال پسین بالا شاید بتواند تا حدودی جدایی ژنتیکی این نمونه‌ها را با سایر مورفوتایپ‌ها نشان دهد که قطعیت بیشتر این امر مبتنی بر بررسی های جامع تر با سایر نشانگرهای ژنتیکی می‌باشد. وجود گونه‌های مخفی و پنهان در سخت‌پوستان دریایی بسیار معمول است. گونه‌های مرموز یا مخفی به گونه‌هایی اطلاق می شود که از لحاظ مورفولوژی بسیار شبیه هستند اما از لحاظ ژنتیکی با هم متفاوت هستند. این گونه‌ها با تفاوت‌های ژنتیکی بسیار کم حتی می‌توانند سازگاری‌های اکولوژیک و رفتاری متفاوتی را نیز نشان دهند (Windsor *et al*., 2005). شناسایی این گونه به دلیل شباهت‌های ریختی به سایر گونه‌های این جنس بسیار مشکل بوده و از گذشته بسیار مورد بحث بوده است. Lee و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند که جمعیت هایی تحت نام این گونه که از قسمت شرقی اقیانوس هند و غرب اقیانوس آرام گزارش شده است. با توجه به بررسی-های دقیق اولین گونوپود جنس نر در واقع متعلق به گونه *Leptodius affinis* می اشند. رنگ گونه‌های گزارش شده در منطقه غرب قاره آسیا بسیار متغیر است و نمی-تواند ویژگی قابل اعتمادی برای تشخیص گونه‌ها باشد (Ng *et al*., 2008). Klaus و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند، ترکیبی از داده‌های مورفولوژی و مولکولی قطعاً به ما اطلاعات بیشتری در بازسازی و ترسیم درختان تکاملی در ده پایان خواهد داد. در بعضی موارد الگوهای رنگی مختلف از لحاظ ژنتیکی جدا هستند و ممکن است حتی معرف گونه‌های جداگانه‌ای باشند (Palma and Steneck, 2001). نتایج بررسی فراساختار با بررسی اولین گونوپود جنس نر در میان ۸ نمونه در بررسی های اولیه با استریو میکروسکوپ نیز توانست سبب تشخیص اختلاف بارز نمونه D از سایر نمونه‌ها شود. تفاوت بارز گونوپود این نمونه حالت کوتاهتر و عریض تر دهانه رأسی آن نسبت به سایر گونوپودها بود. بررسی‌های دقیق‌تر فراساختار با میکروسکوپ الکترونی (SEM) سبب ظاهرشدن تفاوت-های بارز میان گونوپودهای سایر مورفوتایپ‌های E و F نیز شد (شکل ۷). بر این اساس تفاوت‌هایی در مورفولوژی

فراساختار اولین گونوپود جنس نر، نتایج آنالیزهای مولکولی را تا حد زیادی تأیید کرد. توصیف اولیه گونوپود خرچنگ‌های حقیقی به بررسی آن‌ها با میکروسکوپ‌های تشریحی و لوپ محدود بود و در مطالعات اندکی از میکروسکوپ الکترونی (SEM) نیز برای مشاهده جزئیات ساختاری آنها استفاده شد (Rorandelli *et al*., 2008). گونوپودها به طور محدودی از تغییرات محیطی تاثیر می-پذیرند (Chambers *et al*., 1980) و قسمت رأسی گونوپود دارای اشکال و ساختارهای ظریفی می‌باشد که این ساختارها و تغییرات خاص در آنها ارزش تاکسونومیک دارند (Moyano *et al*., 2011). Kazmi و Moazzam (۲۰۱۲) با مطالعه در ارتباط با شناسایی جنس *Leptodius* در منطقه پاکستان اظهار داشتند که آنچه سبب جدایی دو گونه *Leptodius gracilis* و *Leptodius exaratus* می‌شود، اختلاف‌های ظریف در حالت منحنی و تعداد بیشتر قسمت قارچی شکل در گونه *Leptodius exaratus* می‌باشد. Katsunori و مطالعه حاضر نشان داد زمانی که شناسایی گونه‌های مخفی بر مبنای مورفولوژی برای شناختن مرز گونه‌ها ناکافی است، شناسایی خرچنگ‌های حقیقی بر اساس مورفولوژی دقیق اولین گونوپود جنس نر و همچنین نشانگرهای ژنتیکی برای قرار دادن صحیح گونه‌ها در جایگاه اصلی خود، مفید خواهد بود.

نتیجه گیری

تلفیقی از روش‌های مورفولوژی دقیق بر اساس میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM)، سیستماتیک مولکولی و سایر مشخصات ظاهری بهترین روش برای شناسایی گونه های جدید و پنهان در میان خرچنگ‌ها خواهد بود.

منابع

ایزدیان، منا.، ذوالقرنین، حسین.، نبوی، سید محمدباقر.، اشجع اردلان، آریا. و یوسفی سیاه کلرودی، سیامک.، ۱۳۹۵. شناسایی مولکولی و فیلوژنی گونه‌های جنس Nerita در سواحل صخره‌ای شمال خلیج فارس. مجله علمی شیلات ایران. ۲۵: ۱۷۱-۱۸۳.

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

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, 38:169-177. DOI: 10.1163/156854080X00607

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.

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

Kazem, B., Moazzam, M., 2012. Four New Records of Brachyurans from Pakistan. Pakistan journal of zoology, 44:1499-1505.

Klaus, S., Schubart, C.D. and Brandis, D., 2006. Phylogeny, biogeography and a new taxonomy for the Gecarcinucoidea Rathbun, 1904 (Decapoda: Brachyura). Organisms, Diversity and Evolution, 6:199-217. DOI: 10.1016/j.ode.2005.09.006

Lee, S.K., Mendoza, J.C.E., Ng, P.K.L. and Kim, W., 2013. On the identity of the indo-west pacific littoral xanthid crab, *Leptodius exaratus* (H.Milne Edwards, 1834) (crustacea: decapoda: brachyura: xanthidae). Raffles Bulletin of Zoology, 61:189–204. DOI: 10.1017/S175526721400133X

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 UK, 91:1617-1625. DOI: 10.1017/S0025315411000257

Monaghan, M.T., Balke, M., Gregory, T.R. and Vogler, A.P., 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 360:1925–1933. DOI: 10.1098/rstb.2005.1724

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: 10.1080/14634980701514620

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. and Steneck, R.S., 2001. Does variable coloration in juvenile marine crabs reduce risk of visual predation? Ecology, 82: 2961–2967. DOI: 10.1890/0012-9658.

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.

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. Journal of Morphology, 269:259–271. DOI: 10.1002/jmor.10566.

Stimpson, W., 1907. Report on the Crustacea (Brachyura and Anomura) collected by the North Pacific Exploring Expedition, 1853–1856. Smithsonian Miscellaneous Collections, 49:1–240.

Trivedi, J.N. and Vachhrajani, K.D., 2015. First record of brachyuran crab Leptodius affinis (DeHaan, 1835) (Crustacea: Decapoda:Xanthidae) from the western coast of India. Marine Biological Association of the United Kingdom, 8: 211-219.

Windsor, M. and Felder, D.L., 2009. Re-evaluation of species allied to Mithrax hispidus Decapoda: Brachyura: Majoidea: Mithracidae) based on three mitochondrial genes. Zootaxa, 2302:61–68. DOI: 10.1111/j.1096-3642.1931.tb02367.x.

Identifying color morphotypes of the species *Leptodius exaratus* (Brachyuran: Xanthidae) based on the molecular and electron microscopy studies

Chenari F.[1*], Nabavi S.M.B.[1], Salari M.A.[1], Ahmad Savari[1], Zolgharnein H.[1]

[*]chenari_bio@yahoo.com

1-Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

Abstract

According to morphological studies, *Leptodius exaratus* is one of the most common brachyuran species and the only known species of this genus which have been found in intertidal rocky shores along the Persian Gulf coast. Since the existence of hidden species among the crustacean species are very common, the aim of this study is to investigate the probability of hidden species identification among eight color morphotypes that were identified as *Leptodius exaratus* species in morphological studies. For this purpose, eight color morphotypes of *Leptodius exaratus* species were collected from rocky shores of Bushehr province. Then, the first male gonopods were separated and photographed by Scanning Electron Microscopy (SEM). For conducting molecular studies, DNA was extracted with a phenol-chloroform mixture and mitochondrial Cytochrome Oxidase subunit I (COI) gene was amplified and sequenced. The results showed that mitochondrial COI nucleotide sequences were not identical in all color morphotypes. These results were reflected in topology of evolutionary trees for both analyses (maximum likelihood, bayesian). Studying the ultrastructure of the apical segments of the first male gonopods showed fundamental differences in the apical organs of some color morphotypes. These results indicated that all samples did not belong to a single species and there were hidden species among them. Molecular evidence also showed that mitochondrial COI nucleotide sequences of eight color morphotypes of *Leptodius exaratus* from the Persian Gulf and the registered sequence of such species from Indonesia were in separate clusters. Identification based on the morphology of the first male gonopods using scanning electron microscopy (SEM) and the COI gene were useful research methods in the present study.

Keywords: *Leptodius exaratus*, Molecular, COI, Gonopod, Persian Gulf

[*]Corresponding author