شناسایی جنس *Metopograpsus* (brachyuran: Grapsidae) با تاکید بر مطالعات مولکولی و فراساختاری

- **فریده چناری***: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، صندوق پستی: ٦٤١٩٩-٤٣١٧٥
- **سیدمحمدباقر نبوی**: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، صندوق پستی: ٦٤١٩٩-٤٣١٧٥
- **محمدعلی سالاری**: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، صندوق پستی: ٦٤١٩٩-٤٣١٧٥
- **احمد سواری**: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، صندوق پستی: ٦٤١٩٩-٤٣١٧٥
- **حسین ذواالقرنین**: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، صندوق پستی: ٦٤١٩٩-٤٣١٧٥

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٤ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٤

چکیده

جنس *Metopograpsus* شامل ٦ گونه در جهان است که دو گونه از آن‌ها که به‌طور معمول در خلیج فارس وجود دارد شامل گونه‌های *Metopograpsus messor* و *Metopograpsus thukuhar* می‌باشند. این دو گونه از لحاظ مورفولوژی بسیار مشابه بوده در نتیجه براساس مورفولوژی شناخت آن‌ها بسیار گیج‌کننده است. وجود گونه‌های مخفی و هم‌نیا در میان سخت‌پوستان دریایی بسیار رایج است. هدف مطالعه حاضر بررسی این نکته بود که آیا ٦ مورفوتایپ گونه‌های جنس *Metopograpsus* از لحاظ ژنتیکی متفاوت هستند یا خیر، بنابراین نشانگر مولکولی ژن COI با تاکید بر فراساختار اولین گونوپود جنس نر بررسی شد تا روابط تکاملی را در میان گونه‌های این جنس نشان داده شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد توالی نوکلئوتیدی این قطعه ژنی میتوکندریایی (COI) در تمام نمونه های مورد بررسی یکسان نیست و از این ٦ مورفوتایپ گونه *Metopograpsus* sp.PGE با بقیه مورفوتایپ‌ها تفاوت بیش‌تری را نشان داد و در کلادی جداگانه قرار گرفت. مطالعه فراساختار قسمت راسی اولین گونوپود جنس نر نشان داد، تفاوت‌هایی در قسمت راسی این اندام در ٦ مورفوتایپ رنگی دیده می شود. آن‌چه از این بررسی حاصل شد نشان داد، زمانی‌که تشخیص گونه‌ها به‌دلیل شباهت‌های زیاد مورفولوژی مشکل است، بررسی‌های فراساختار اولین گونوپود جنس نر و شناسایی براساس ژن COI در تفکیک گونه‌ها بسیار مفید است.

کلمات کلیدی: *Metopograpsus*، مولکولی، COI، فراساختار، گونوپود، خلیج فارس

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: chenari_bio@yahoo.com

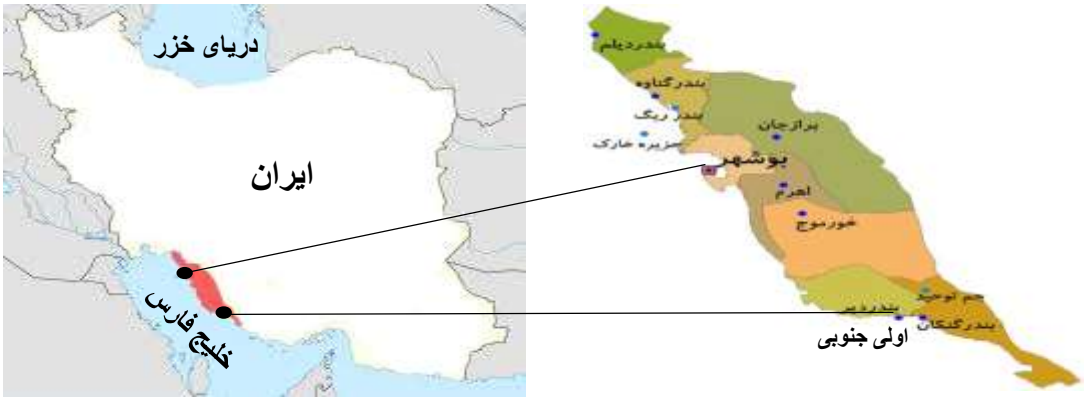
مقدمه

خرچنگ‌های حقیقی ۱۷٪ از کل سخت‌پوستان را تشکیل می‌دهند و به‌علت ارزش غذایی بالا، مقادیر فراوان پروتئین و مواد معدنی، استخراج کیتین و کیتوزان برای کاربردهای دارویی، شیمیایی و هم‌چنین به‌عنوان منبع غذای زنده در جهان بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (سعیدپور، ۱۳۷۳). اخیراً در اثر فعالیت‌های بشر مانند صید بی‌رویه و ورود آلاینده‌های مختلف به سواحل، جمعیت خرچنگ‌ها در معرض خطر نابودی قرار گرفته است. بنابراین لزوم اطلاعاتی راجع به زیست‌شناسی، بوم‌شناسی و شناسایی خرچنگ‌ها، کمک زیادی به حفظ و باسازی جمعیت آن‌ها خواهد کرد. پلی‌مورفیسم رنگی و الگوهای رنگی مختلف (Palma و همکاران، ۲۰۰۳) در بسیاری از خرچنگ‌های حقیقی به‌خصوص در مراحل جوانی آن‌ها (Bedini، ۲۰۰۲؛ Hogarth، ۱۹۷۸) و یا در گونه‌هایی که دارای اندازه بدنی کوچکی هستند (Pessani و Tirelli، ۲۰۰۶)، بیش‌تر دیده می‌شود. با وجود این، دانستن این مطلب که آیا تنوع رنگی در نتیجه تاثیر متقابل ژنتیک و محیط می‌باشد و یا این‌که هر کدام از فاکتورها به تنهایی در تنوع تاثیر می‌گذارند، مستلزم شناسایی دقیق گونه‌ای می‌باشد (Palma و Steneck، ۲۰۰۱). خانواده گرپسیده یکی از مهم‌ترین گروه‌های خرچنگ‌های حقیقی خلیج فارس هستند که شامل ۴ خانواده، ۹ جنس و ۱۲گونه می‌باشند. طبقه‌بندی سیستماتیک خرچنگ‌های خانواده گرپسیده نیاز به مطالعات گسترده‌ای دارد، آنالیزهای سیستماتیک مولکولی توسط Schubart و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که خانواده گرپسیده منشا مونوفیلتیک ندارند. جنس *Metopograpsus* شامل ۶ گونه است (Ng و همکاران، ۲۰۰۸) که دو گونه از آن‌ها که در آب‌های خلیج فارس به‌طور معمول وجود دارد شامل گونه‌های *Metopograpsus messor* و *Metopograpsus thukuhar* می‌باشند. این دو گونه از لحاظ مورفولوژی شباهت بسیار زیادی به‌هم دارند در نتیجه براساس مورفولوژی شناخت آن‌ها بسیار گیج‌کننده است (Yamindago و همکاران، ۲۰۰۳). شناسایی آن‌ها براساس تفاوت‌های جزئی ظاهری در شکل کاراپاس و اولین گونوپود جنس نر انجام می‌گیرد (Paulay، ۲۰۰۷). در قلمرو دریایی گونه‌های مخفی و شناسایی نشده به وفور وجود دارند که روش شناسایی سنتی مبتنی بر ویژگی‌های مورفولوژیک شناسایی آن‌ها را با مشکل مواجه می‌کند (Knowlton، ۱۹۹۳). برای غلبه بر چنین مسایلی، در حال حاضر روشی استاندارد مبتنی بر توالی ژن COI میتوکندری که در حدود ۶۵۰bp می‌باشد، به‌عنوان ابزاری سودمند برای شناسایی موجودات و تعیین مرز میان گونه‌ها به‌کار می‌رود. براساس تغییراتی که در ژن COI در گونه‌های مختلف ایجاد می‌شود، این نشانگر به‌عنوان ابزاری دقیق برای شناسایی، طبقه‌بندی و معرفی گونه‌های جدید مطرح می‌باشد (Costa و همکاران، ۲۰۰۷). در این مطالعه الگوهای رنگی مختلف از این گونه‌ها با توجه به فراساختار مورفولوژی اولین گونوپود جنس نر و با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز COI مورد بررسی قرار گرفت برای این‌که نشان داده شود آیا همه مورفوتایپ‌های رنگی متعلق به یک گونه می‌باشند یا در میان آن‌ها گونه‌های پنهان نیز وجود دارد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل های مولکولی و بررسی فراساختار مورفولوژی اولین گونوپود نشان داد در میان آن‌ها گونه‌های مخفی و پنهان وجود دارد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۶ مورفوتایپ متفاوت با الگوی های رنگی مختلف از جنس *Metopograpsus* در آبان ماه ۱۳۹۳ از مناطق جزر و مدی سواحل صخره‌ای استان بوشهر در دو ایستگاه بندر دیر (اولی جنوبی) و بندر بوشهر شناسایی و جمع‌آوری شدند (شکل ۱). 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. سپس، نمونه‌ها در اتانول مطلق فیکس شده و برای انجام مطالعات مولکولی به آزمایشگاه علوم دریایی خرمشهر منتقل شدند. برای بررسی مورفولوژی گونوپودهای فیکس شده توسط میکروسکوپ الکترونی، در ابتدا بر روی هات‌پلیت به مدت نیم‌ساعت دهیدراته و خشک گردیدند و سپس با پوششی از فلز طلا مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفتند. از میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) مدل VEGATS۵۱۳۶ برای عکس‌برداری از نمونه‌ها استفاده شد.

برای شناسایی مولکولی استخراج DNAاز ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده ۲٪ CTAB (۱۰۰mMTrisHCl, ۲۰mM EDTA, ۱,۴ M NaCl, CTAB) استفاده شد 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 آغازگر جهانی (Folmer و همکاران، ۱۹۹۴) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر قطعه ژنی سیتوکروم اکسیداز I (COI) انجام شد. هر واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل بافر (۱X)، ۱میلی مولار $Mgcl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۵ پیکومول از هر



شکل۱: نقشه مناطق نمونه‌برداری: بندر بوشهر، بندر دیر (اولی جنوبی)

آغازگر رفت و برگشت، ۱/۵U آنزیم Tag DNA Polymerase و ۲۰-۳۰ نانوگرم DNA الگو بود. برنامه حرارتی برای واکنش مورد نظر 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 به همراه 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 کره‌جنوبی ارسال گردیدند. توالی‌ها برای اولین‌بار از منطقه خلیج فارس گزارش شده است. توالی‌های به‌دست آمده نوکلئوتیدی به‌دست آمده با نرم‌افزار CLC sequncer viewer به توالی‌های اسیدآمینه ترجمه شدند. پس از آن با دریافت شماره پذیرش در بانک داده جهانی NCBI به‌عنوان گونه‌های جدید با نام‌های فعلی *Metopograpsus sp.PG**A*** -۲۰۱۵ (LC۰۸۱۱۸۲)، *Metopograpsus sp.PG**B*** - ۲۰۱۵ (LC۰۸۱۱۸۳)، *Metopograpsus sp.PG**C*** -۲۰۱۵ (LC۰۸۱۱۸۴)، *Metopograpsus sp.PG**D*** -۲۰۱۵ (LC۰۸۱۱۸۵)، *Metopograpsus sp.PG**E*** -۲۰۱۵ (LC۰۸۱۱۸۶) و *Metopograpsus sp. HZ*-۲۰۱۵ ثبت گردیدند (شکل۲، الف، ب، ج، د، ه، و). درخت فیلوژنی تجزیه و تحلیل ماتریس داده‌ها براساس روش‌های ماکزیمم پارسیمونی (Maximum Parsimony) با استفاده از نرم‌فزار PAUP (Swofford، ۲۰۰۲)، ماکزیمم احتمال (Maximum Likelihood) با استفاده از نرم‌افزار Mega۶ (Tamura و همکاران، ۲۰۱۳) و روش احتمال پسین (Posterior probablity) با استفاده از روش بایزین و نرم‌افزار Mrbayes۳,۲,۵ (Ronquist و Huelsenbeck، ۲۰۰۳) انجام گردید. درخت فیلوژنی با استفاده از توالی‌های به‌دست آمده و چندین توالی از گونه‌های دیگر خانواده گرپسیده بر پایه گونه *Thalamita sima* ترسیم شد.

نتایج

شناسایی ژنتیکی: تطبیق توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در ژن بانک جهانی NCBI نشان داد تاکنون هیچ توالی از این جنس و گونه برای ژن COI ثبت نشده است. مقایسه توالی‌های به‌دست آمده از ۶ نوع مورفوتایپ مختلف گروه مورفولوژی *Metopograpsus messor* نشان داد این توالی‌ها بر هم منطبق نیستند و می‌توانند متعلق به گونه‌های جداگانه باشند.

شناسایی موفولوژی فراساختار گونوپود: به‌طورکلی گونوپود گونه‌های (**A-E,HZ**) *Metopograpsus sp.PG-۲۰۱۵* دارای ساختاری محکم، تنومند و ضخیم می‌باشد که در قسمت شکمی دارای کانال اسپرمی مارپیچی شکلی است. در قسمت راسی گونوپود این گونه دسته خارهای کیتنی شکل کوتاهی مشاهده می‌شود که به سمت بیرون به‌صورت منحنی شکلی جهت‌دار شده‌اند و در قسمت راسی دارای تارهای بلندی است که این تارها ناحیه پروکسیمال خلفی را به‌خصوص در حاشیه جانبی پوشش می‌دهند (شکل۳). در بررسی فراساختار مورفوتایپ‌های مختلف این گونه تغییراتی واضح در شکل راسی گونوپود مشاهده شد که به شرح زیر است:

Metopograpsus sp.PGA-۲۰۱۵: تفاوت بارز این گونه با دیگر گونه‌ها در قسمت راسی گونوپود وجود فرورفتگی عریض‌تری در

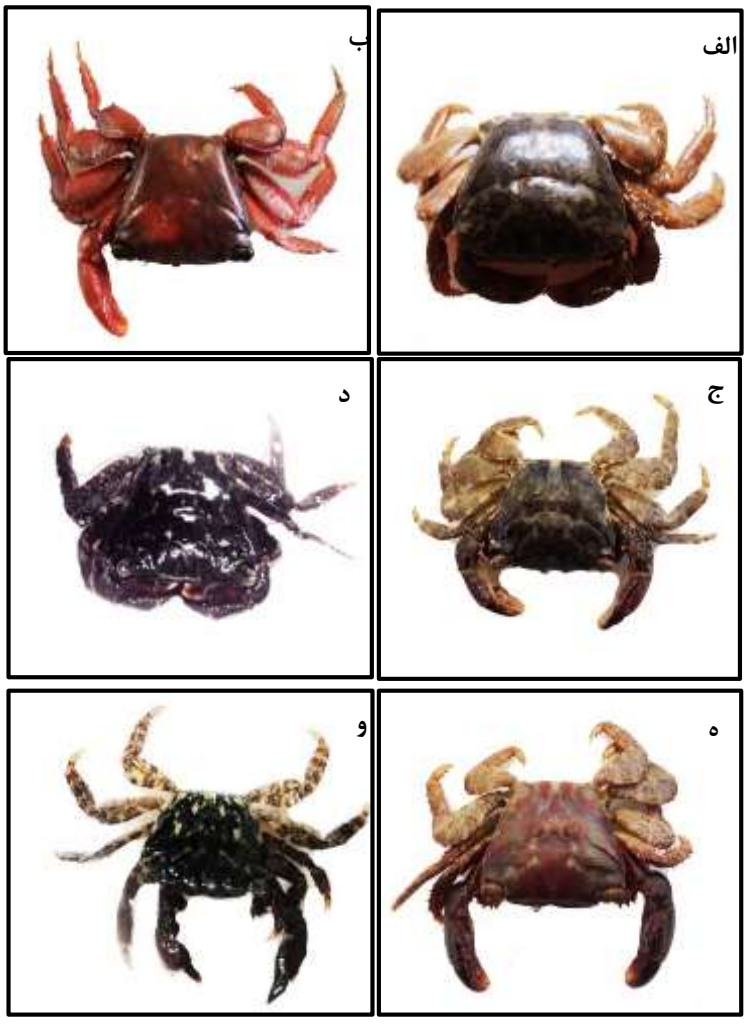
قسمت خلفی پروکسیمال، در انتهای دسته خارهای کیتینی شکل است (شکل ۳، الف).

Metopograpsus sp.PGB-۲۰۱۵: خط راسی منحنی شکل گونوپود در قسمت خلفی‌تری نسبت به سایر گونه‌ها قرار گرفته و تارهای بلند مو شکل مانند دیگر گونه‌ها بر روی خط راسی قرار نگرفته است و به قسمت راسی شکل خاصی بخشیده است (شکل ۳، ب).

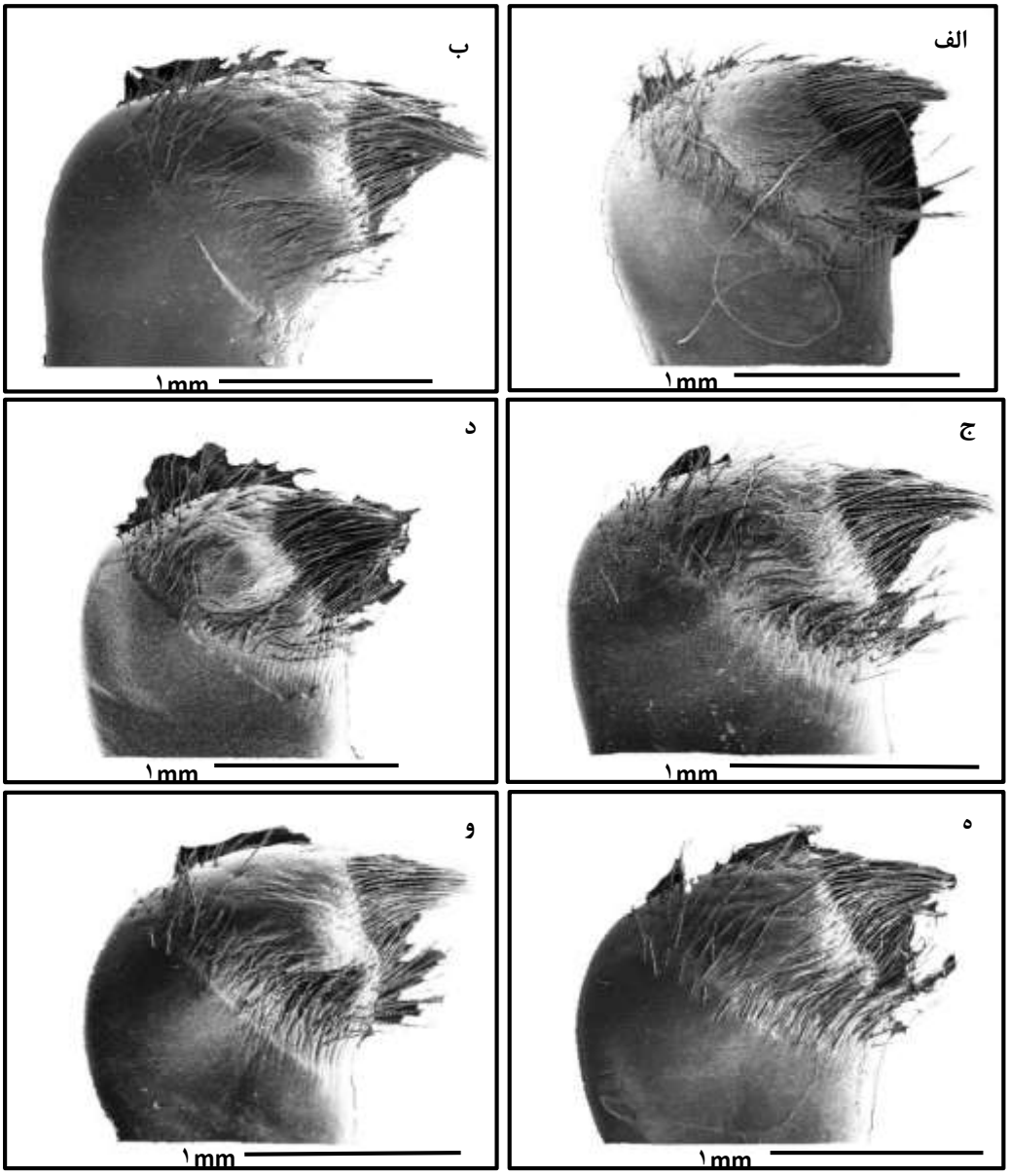
Metopograpsus sp.PGC-۲۰۱۵: تفاوت قابل ملاحظه‌گونوپود این گونه با سایر گونه‌ها این است که گونوپود در این گونه حالت تنومند و ضخیم‌تری نسبت به سایرین دارد و این ضخامت در تمام قسمت‌ها یکنواخت است. برجستگی که در انتهای خلفی دسته تارهای کیتینی در اکثرگونه‌ها دیده می‌شود دراین گونه مشاهده نمی‌شود و حالت مسطحی دارد (شکل ۳، ج).

Metopograpsus sp.PGD-۲۰۱۵: دسته خارهای کتینی راسی به سمت بالا متمایل شده است و خط منحنی در انتهای راسی به وضوح دیده نمی‌شود و تارهای پراکنده در انتهای خلفی بلندتر و به سمت بالا متمایل شده‌اند (شکل۳، د).

Metopograpsus sp.PGE-۲۰۱۵: دسته خارهای کیتینی راسی حالت کوتاه‌تر و انبوه‌تری نسبت به سایر گونه‌ها دارد و در انتهای خلفی آن حالت برجستگی مشخصی دیده می‌شود و تارهای ناحیه خلفی حالت کوتاه و پراکنده‌تری دارد (شکل۳، ه).



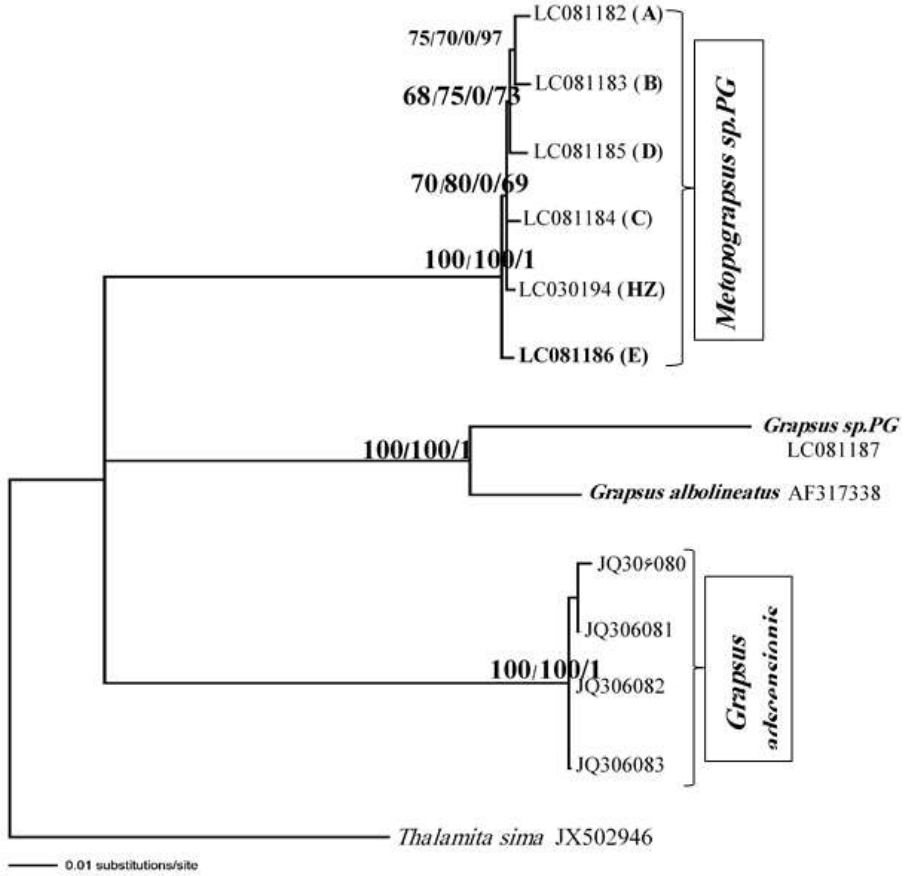
شکل۲: گونه‌های *Metopograpsus sp.PG*، الف)A، ب)B، ج)C، د)D، ه)E و)HZ



شکل۳: تصاویر فراساختار قسمت راسی گونوپود گونه‌های ۲۰۱۵- *Metopograpsus sp.PG* ، الف)A، ب)B، پ)C، ج)D، د) E و)HZ

نتایج روابط تکاملی: نتیجه محاسبات فیلوژنی و روابط تکاملی (ML, MP, BI)، ۶ توالی ژن COI از جنس *Metopograpsus* الگوی توپولوژی یکسانی را برای درختان تکاملی نشان داد. نتایج اختلافات ژنتیکی در توپولوژی درختان تکاملی منعکس شد (شکل۴). در کلاد *Metopograpsus sp.PG-۲۰۱۵*، گونه‌های LC۰۸۱۱۸۲ (A) و LC۰۸۱۱۸۳ (B) به سبب داشتن شباهت زیاد در قطعه ژنی COI کلادی مشترک را تشکیل دادند و این کلاد با ارزش‌های نسبتاً بالای بوت استراپ (MP=۷۰، ML=۷۵) و احتمال پسین بالا (PP=۰/۹۷) حمایت شد. گونه LC۰۸۱۱۸۵ (D) با ارزش بوت استراپ بالا (MP=۷۵، ML=۶۸) و احتمال پسین بالا (PP=۰/۷۳) از کلاد خواهری خود که شامل گونه A و گونه B بود، جداشد. توالی گونه LC۰۸۱۱۸۶ (E) با ارزش بوت استراپ بالا (MP=۱۰۰، ML=۱۰۰) و احتمال پسین بالا (PP=۱) در شاخه‌ای جداگانه، از دیگر گونه‌های گروه (A,B,C,D,HZ)

Metopograpsus sp.PG-۲۰۱۵ جای گرفت. توپولوژی درختان برای دیگر گونه‌های جنس *Metopograpsus* شامل *Metopograpsus sp.PGC-۲۰۱۵* و *Metopograpsus sp.HZ-۲۰۱۵*، نشان داد این گونه‌ها از کلاد مورفولوژیک *Metopograpsus sp.PG-۲۰۱۵* (A,B,D) با ارزش بوت استراپ بالا (MP=۸۰، ML=۷۰) و احتمال پسین متوسط (PP=۰/۶۵) جدا شده و در کلادی مشترک قرار گرفته‌اند.



شکل۴: درخت Maximum Parsimony، Maximum Likelihood و Baysian خانواده Grapsidae. درصدهای بوت استراپ برای (ML/MP) و احتمال توزیع پسین (Posteriorprobability)، برای Baysian روی گره‌ها نشان داده شده است (ML/MP/PP).

بحث

شناسایی گونه‌های جنس *Metopograpsus* بر اساس ویژگی‌های مورفولوژی تا حد زیادی دشوار است زیرا از لحاظ مورفولوژیک شباهت‌های زیادی بین آن‌ها وجود دارد و هیچ استاندارد جهانی برای تشخیص آن‌ها از هم وجود ندارد (Macpherson و Machordom، ۲۰۰۵). مطالعات اخیر ۶ گونه از این جنس را شناسایی کرده‌اند (Ng و همکاران، ۲۰۰۸). در آب‌های سواحل ایرانی خلیج فارس براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی دو گونه از این جنس گزارش شد. گونه *Metopograpsus messor* برای اولین‌بار توسط Stephensen (۱۹۴۵) گزارش شد و سپس Naderloo (۲۰۱۱) وجود این گونه را مورد تایید قرار داد. گونه *Metopograpsus thukhur* نخستین بار توسط Naderloo (۲۰۱۱) در سواحل ایرانی خلیج فارس گزارش شد. Yamindago و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند این دو گونه از لحاظ مورفولوژی شباهت بسیار زیادی به‌هم دارند و شناسایی آن‌ها براساس تفاوت‌های جزئی ظاهری در شکل کاراپاس و اولین گونوپود انجام می‌گیرد درنتیجه براساس مورفولوژی شناخت آن‌ها بسیار گیج‌کننده است. در مطالعه حاضر به‌منظور شناسایی دقیق و تفکیک گونه‌ها از ۶ مورفوتایپ رنگی مختلف از این جنس نمونه‌برداری

صورت گرفت. به‌منظور شناسایی از روش DNA بارکدینگ (COI) و فراساختار اولین گونوپود جنس نر استفاده شد. نتایج ترسیم درخت فیلوژنی و انطباق نتایج آن بر فراساختار اولین گونوپود جنس نر نشان از وجود گونه‌های مخفی دارد که این مورفوتایپ‌ها را از هم جدا کرد. گونه *Metopograpsus sp.PGE* با داشتن دو نوکلئوتید بیش‌تر و دو جایگاه حذف تفاوت بیش‌تری نسبت به سایر مورفوتایپ‌ها داشت و در کلادی جداگانه نسبت به سایر گونه‌ها قرار گرفت. پس از آن مورفوتایپ‌های A و B به سبب داشتن شباهت زیاد در قطعه ژنی COI کلادی مشترک را تشکیل دادند و از بقیه گونه‌ها جدا شدند. در قلمرو دریایی گونه‌های مخفی و شناسایی نشده به‌وفور وجود دارند که روش شناسایی سنتی توسط ویژگی‌های مورفولوژیکی شناسایی آن‌ها را با مشکل مواجه می‌کند (Knowlton، ۱۹۹۳). Klaus و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند ترکیبی از داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی، قطعاً اطلاعات بیش‌تری در بازسازی و ترسیم درخت تکاملی در ده‌پایان خواهد داد. بسیاری از موجودات دریایی دارای تنوع رنگی فراوانی می‌باشند و میان پراکنش مورف‌های رنگی و الگوهای ساختاری ژنتیکی آن‌ها پیچیدگی زیادی وجود دارد. در بعضی موارد الگوهای رنگی مختلف از لحاظ ژنتیکی جدا هستند و ممکن است حتی معرف گونه‌های جداگانه‌ای باشند (Palma و Steneck، ۲۰۰۱). تحقیقات Palma و همکاران (۲۰۰۳)، نشان داد پلی‌مورفیسم رنگی و الگوهای رنگی مختلف در بسیاری از خرچنگ‌های حقیقی وجود دارد و این تغییر رنگ‌ها به‌منظور استتار به‌کار می‌رود. با این حال اهمیت به‌کارگیری الگوی‌های رنگی برای شناسایی گونه‌های مخفی و هم نیا در ده‌پایان هنوز مورد بحث است (Costa و همکاران، ۲۰۰۷) . نتایج مطالعه حاضر نشان داد ۶ مورفوتایپ متعلق به یک گونه نیستند و در میان آن‌ها گونه‌های ناشناخته وجود دارد و شناسایی براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی برای شناسایی مرز گونه‌ها ناکافی است.کاراپاس در همه نمونه‌ها بسیار شبیه بود و در این تحقیق به موازات مطالعات مولکولی به بررسی مورفولوژی اولین گونوپود جنس نر پرداخته شد تا تفاوت‌های احتمالی در انطباق با جدایی مولکولی بررسی گردد. بررسی اولین گونوپود جنس نر در میان ۶ مورفوتایپ در بررسی‌های اولیه با استریومیکروسکوپ فقط توانست سبب جدایی گونه *Metopograpsus* sp.HZ شود. گونه‌ای که در مطالعات Naderloo به‌نام گونه *Metopograpsus thukhur* معرفی شده بود. تفاوت بارز گونوپود این گونه حالت کشیده تر آن نسبت به سایر گونوپودها بود. بررسی فراساختار با میکروسکوپ الکترونی (SEM) سبب ظاهر شدن تفاوت‌های بارز میان گونوپودهای این گونه‌ها از هم 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 مشابهی روی خرچنگ جنس *Esanthelphusa* توسط Ponchunchoovang (۲۰۰۶) نشان داد 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 راسی اولین گونوپود جنس نر دارای تغییرات واضحی در گونه‌های مختلف می‌باشد و به‌خصوص این ویژگی در خرچنگ‌های حقیقی ارزش تاکسونومیکی دارد. این اندام تا حد زیادی پایدار و ثابت بوده و از تغییرات محیطی تاثیر نمی‌پذیرد. مطالعه حاضر نشان داد شناسایی بر مبنای مورفولوژی برای شناخت مرز گونه‌ها مناسب نیست و باید از روش‌های مبتنی بر نشانگرهای ژنتیکی برای قرار دادن صحیح گونه‌ها در جایگاه اصلی خود استفاده کرد. بنابراین پیشنهاد می‌شود زمانی‌که ویژگی‌های مورفولوژیک برای تشخیص مرز بین گونه‌ها ناکافی است، آنالیزهای مولکولی براساس اولین گونوپود جنس نر برای روشن شدن وضعیت گونه‌های خرچنگ حقیقی کارآمد خواهد بود.

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. **Bedini, R., ۲۰۰۲.** Colour change and mimicry from juvenile to adult: *Xantho poressa* (Olivi, ۱۷۹۲) (Brachyura, Xanthidae) and *Carcinus maenas* (Linnaeus, ۱۷۵۸) (Brachyura, Portunidae). Crustaceana. Vol. ۷۵, pp: ۷۰۳-۷۱۰.

۳. **Costa, F.O.; deWaard, J.R.; Boutillier, J.; Ratnasingham, S. and Dooh, R.T., ۲۰۰۷.** Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. Can J Fish Aquat Sci .Vol. ۶۴, pp: ۲۷۲-۲۹۵.

۴. **Knowlton, N., ۱۹۹۳.** Sibling species in the sea. Annu Rev Ecol Syst. Vol. ۲۴, pp: ۱۸۹-۲۱۶.

۵. **Macpherson, E. and Machordom, A., ۲۰۰۵.** Use of morphological and molecular data to identify three New sibling species of the genus *Munida* Leach, ۱۸۲۰ (Crustacea, Decapoda, Galatheidae) from New Caledonia. Journal of Natural History. Vol. ۳۹, pp: ۸۱۹-۸۳۴.

۶. **Moyano, M.P.S.; Gavio, M.A. and Cuartas, E.I., ۲۰۱۱.** Copulatory system of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea: Brachyura: Majoidea). J Mar Biol Ass UK. Vol. ۹۱, pp: ۱۶۱۷-۱۶۲۵.

۷. **Ng, P.K.L.; Guinot, D. and Davie, P.J.F., ۲۰۰۸.** Systema brachyurorum: part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. The Raffles. Bulletin of Zoology. Vol. ۱۷, pp: ۱-۲۸۶.

۸. **Naderloo, R., ۲۰۱۱.** Grapsoid crabs (Decapoda: Brachyura: Thoracotremata) of the Persian Gulf and the Gulf of Oman. Zootaxa. Vol. ۳۰۴۸, PP: ۱-۴۳.

۹. **Palma, A.T.; Orrego, C. and Arriagada, M., ۲۰۰۳.** Crypsis in early benthic phases of brachyuran Decapod crustaceans in central Chile. Rev. Chil. Hist. Nat. Vol. ۷۶, pp: ۱۴۹-۱۵۶.

۱۰. **Palma, A.T. and Steneck, R.S., ۲۰۰۱.** Does variable coloration in juvenile marine crabs reduce risk of visual predation? Ecology. Vol. ۸۲, pp: ۲۹۶۱-۲۹۶۷.

۱۱. **Paulay, G., ۲۰۰۷.** *Metopograpsus oceanicus* (Crustacea: Brachyura) in Hawai‘i and Guam: Another Recent Invasive? Pacific Science. Vol. ۶۱, pp: ۲۹۵-۳۰۰.

۱۲. **Pessani, D. and Tirelli, T., ۲۰۰۶.** Chromatic patterns of the hermit crab *Calcinus tubularis* related to the occupied shell. Hydrobiologia. Vol. ۵۵۷, pp: ۱۰۷-۱۱۲.

۱۳. **Ponchunchoovong, S., ۲۰۰۶.** Species identification of Thai rice- field crab in the lower northea sren region of Thailand. Suranaree J. Sci. Technol. Vol. ۱۳, pp: ۲۴۵-۲۴۹.

۱۴. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., ۲۰۰۳.** MrBayes ۳: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. Vol.۱۹, pp: ۱۵۷۲-۱۵۷۴.

۱۵. **Sebastian, K.; Christoph, D.S. and Brandis, D., ۲۰۰۶.** Phylogeny, biogeography and a new taxonomy for the Gecarcinucoidea Rathbun, ۱۹۰۴ (Decapoda: Brachyura. Org diver evol. Vol. ۶, pp: ۱۹۹-۲۱۷.

۱۶. **Schubart, C.D.; Cannicci, S.; Vannini, M. and Fratini, S., ۲۰۰۶.** Molecular phylogeny of grapsoid crabs (Decapoda, Brachyura) and allies based on two mitochondrial genes and a proposal for refraining from current superfamily classification. Blackwell Verlag, Berlin. JZS. Vol. ۴۴, pp: ۱۹۳-۱۹۹.

۱۷. **Swofford, D., ۲۰۰۲.** PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version ۴,۰ b۱۰. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

۱۸. **Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A. and Kumar, S.,** ۲۰۱۳. MEGA۶: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version ۶,۰.

۱۹. **Yamindago, A.; Senanan, W. and Tangkrock-Olan, N., ۲۰۱۳.** Verification on Morphological Identification of Grapsid Crabs Genus *Metopograpsus* H. Milne Edwards, ۱۸۵۳ from Chon Buri Province Using Partial Sequences of Mitochondrial ۱۶S rRNA, ۱۲S rRNA and Cytochrome c Oxidase Subunit I (COI) Genes. Burapha Sci. J. Vol.۱, pp: ۱۸۱-۱۹۳