

## بررسی فیلوژنتیکی گونه *Charybdis hellerii* (سخت‌پوستان، خرچنگ‌ها) در سواحل بین جزر و مدی چابهار بر اساس توالی ژنی قطعه‌ی ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز (CO1)

گیلان عطاران فریمان<sup>۱</sup>، یاسر فاطمی<sup>۲</sup>

۱. هیئت علمی گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
۲. کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** *Charybdis hellerii* گونه‌ی بسیار شناخته شده‌ای در اقیانوس هند است. بررسی‌های مولکولی فراوانی بر روی این گونه در سایر نقاط دنیا انجام شده است. در ایران مطالعات مولکولی بر روی خرچنگ‌ها نسبت به مطالعات ریخت‌شناسی سهم بسیار کمتری را به خود اختصاص داده‌اند. در تحقیق حاضر برای اولین بار در ایران به بررسی مولکولی گونه‌ی *Charybdis hellerii* جنس *Charybdis* پرداخته شده است.

**مواد و روش‌ها:** نمونه‌برداری در سال ۱۳۹۲ در سواحل ماسه‌ای چابهار و در هنگام جزر کامل صورت گرفت. سپس نمونه‌های به آزمایشگاه برای نگهداری در دمای ۲۰- منتقل شدند. برای استخراج DNA برش بافتی از آبشش نمونه‌ها جدا گردید. عمل استخراج DNA با استفاده از روش Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام شد. پس از توالی‌یابی، درخت فیلوژنی گونه‌ی مورد نظر رسم گردید.

**یافته‌ها:** با بررسی‌های مورفولوژی گونه مورد مطالعه *Charybdis hellerii* شناسایی گردید و بررسی‌های مولکولی داده‌های مورفولوژی را تأیید کردند. توالی نوکلئوتیدی به دست آمده در قطعه‌ی ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز (CO1) مورد آنالیزهای مولکولی قرار گرفت. با آنالیزهای انجام شده و ترسیم درخت فیلوژنی مشخص شد که گونه‌ی ایرانی با ۹۴ درصد بوت استرپ حمایت با گونه *C. hellerii* در یک کلاد قرار گرفته است.

**نتایج:** نتایج حاصل از آنالیز Maximum Likelihood نشان داد که گونه‌ی مورد نظر در کلاد *Eubrachyura* قرار می‌گیرد که ۹۴ درصد شبیه به *Charybdis hellerii* است و در یک گروه خواهری قرار گرفتند. آنالیزهای مولکولی نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژی را تأیید می‌کند.

**کلمات کلیدی:** *Charybdis hellerii*، قطعه‌ی ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز، فیلوژنی، چابهار، سخت‌پوستان

### مقدمه

خرچنگ‌ها از گروه‌های مهم سخت‌پوستان در ناحیه‌ی بین جزر و مدی هستند. آنها یکی از متنوع‌ترین شاخه‌های جانوری

نویسنده مسئول: گیلان عطاران فریمان

پست الکترونیکی: [Gilan.attaran@gmail.com](mailto:Gilan.attaran@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۰۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۶/۲۱

می‌باشند و حدود ۹۰۰۰ گونه‌ی زنده از آنها در حال حاضر وجود دارد. خرچنگ‌های حقیقی با داشتن حدود ۷۰۰۰ گونه‌ی زنده، ۱۲۷۱ جنس و ۹۳ خانواده، بیشترین تنوع را در بین خرچنگ‌ها دارند (۸ و ۳۵).

سواحل دریای عمان و به ویژه سواحل چابهار زیستگاه مهمی برای خرچنگ‌ها می‌باشند. مطالعات سیستماتیک زیادی بر روی خرچنگ‌های سواحل ایران انجام شده است. با این حال بیشتر این مطالعات بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی آنها صورت گرفته است و مطالعات مولکولی سهم کمتری را به خود اختصاص داده‌اند. از اولین مطالعات جامعی که بر روی خرچنگ‌های خلیج فارس صورت گرفته می‌توان به تحقیقات Apel و Spiridonov اشاره کرد (۴). پس از آن Naderloo (۱۸ و ۱۹)، Naderloo و همکاران (۳۰-۳۲)، Naderloo و Sari (۲۵-۲۶)، Naderloo و Apel (۲۰)، Naderloo و Ng (۲۱)، Naderloo و Schubart (۲۶-۲۷) و Naderloo و Türkay (۲۸-۲۹) در طی تحقیقات خود مطالعات بسیار جامع و مفیدی را بر روی خرچنگ‌های خلیج فارس و دریای عمان انجام دادند. Apel و Spiridonov در سال ۱۹۹۸ بررسی جامعی را بر روی خرچنگ‌های Portunidae در خلیج فارس و دریای عمان پرداختند. آنها به تشریح کامل خانواده‌ی Portunidae به خصوص جنس *Charybdis* پرداختند. جنس *Charybdis* از خانواده‌ی خرچنگ‌های Portunidae دارای دو زیر جنس *Charybdis* و *Goniohellenus* می‌باشد. *Charybdis hellerii* از شناخته‌شده‌ترین گونه‌های این جنس است. این گونه دارای کاراپاس پهن و گاهی پوشیده از کرک می‌باشد، دارای ۶ دندان جلویی-جانبی تیز است که نوک همه‌ی آنها سیاه است. حاشیه‌ی جلویی *Merus* دارای ۳ خار مشخص و یک خار کوچک در قسمت انتهایی آن است.

*Carapus* پاهای حرکتی یک خار در حاشیه‌ی پشتی خود دارند. در حاشیه‌ی پشتی *propodus* یک سری خار ریز وجود دارد (۳).

امروزه روش‌های مولکولی، مانند توالی یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود (۵). DNA میتوکندریایی (mtDNA) در تشخیص گونه‌ها و ترسیم رابطه فیلوژنتیکی دارای مزایایی از جمله تعداد کمی بالاتر در هر سلول، اندازه کوچک‌تر آن، وراثت‌پذیری مادری، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی، وجود نواحی حفاظت نشده‌ای مانند ناحیه D-loop برای مطالعات تکاملی گونه‌های وابسته می‌باشد (۴). گونه‌ی *Charybdis hellerii* (A. Milne Edwards, 1867) در سواحل ایران به خصوص سواحل چابهار پراکنش بالایی دارد (۴). این گونه به لحاظ مورفولوژیکی به خوبی شناخته شده است. با این حال تاکنون مطالعات مولکولی کمی بر روی آن انجام شده است. هدف این تحقیق بررسی مورفولوژی، فیلوژنی و شناسایی مولکولی این گونه بر اساس قطعه‌ی ژنی سیتوکروم اکسیداز ۱ است.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری

در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۲ و در هنگام جزر کامل نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌برداری از سواحل صخره‌ای و قله‌سنگی خلیج چابهار از ایستگاه‌هایی با شیب کم انجام شد (شکل ۱). سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- نگهداری شدند.



شکل ۱: محل نمونه برداری. خلیج چابهار - دریای عمان

## استخراج DNA و توالی‌یابی

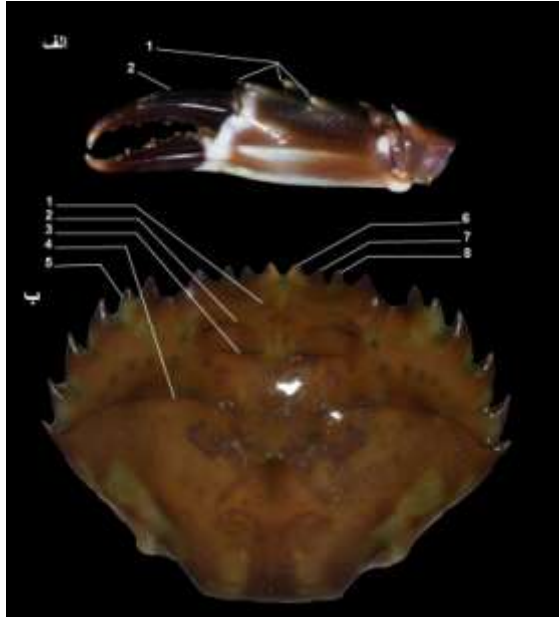
به منظور استخراج DNA برش‌های بافتی از آبشش نمونه‌ها جدا گردیده و به خوبی له کرده تا برای عمل لیز شدن بهتر آماده شوند. سپس به تیوب حاوی نمونه‌ها محلول CTAB (0.1% CTAB, 1.4M NaCl, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol, 20mM EDTA and 100mM TRIS-HCl pH8) اضافه شد. پس از اضافه نمودن پروتئیناز K و  $\beta$ -mercapthonal به DNA استخراج‌شده بسته به اندازه آن ۳۰-۵۰ میکرو لیتر محلول TE standard اضافه گردید. نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا انجام مراحل بعدی نگهداری شد. برای مشخص نمودن کیفیت DNA استخراجی، الکتروفورز انجام شد که از ژل آگارز ۱٪ و از اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی نمونه‌های DNA استفاده گردید. ژل بعد از الکتروفورز به درون دستگاه UV Transluminator منتقل شد و پس عکسبرداری، نمونه DNAهای باکیفیت خوب برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انتخاب گردیدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمر از (PCR)

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از دو پرایمر جهت تکثیر قطعه ژنی سیتوکروم اکسیداز واحد ۱ به طول ۷۱۰ جفت باز استفاده گردید که پرایمرها در این مطالعه LCO1490 با توالی (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') و HCO2198 با ترتیب نوکلئوتیدی (3'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-5') بودند (8). مواد مورد استفاده در واکنش، شامل DNA 15 ng, 10 x Taq, 2.5u Taq, PCR Buffer, MgCl<sub>2</sub> 25mM, dNTP 10mM, DNA polymerase و دو پرایمر F و R ذکر شده در بالا بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط دستگاه ترموسایکلر Eppendorf مدل 5331 در ۳۵ سیکل و با برنامه حرارتی زیر انجام گرفت. واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه صورت گرفت. یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه نیز انجام شد (۷).

## آنالیزهای فیلوژنتیکی

عقبی propodus نیز تا دارای یک سری خار تا سقف ۱۰ تا می‌باشند. سطح شکمی جنس نر و ماده دارای چندین costae متقاطعی هستند که در بخش چهارم شکم وجود دارند و حدود نیمی از این بخش را به خود اختصاص داده‌اند. سوراخ تناسلی جنس ماده به شکل سوراخ کلید می‌باشد.



شکل ۲: *Charybdis hellerii* الف: چنگک (۱) خارهای manus (۲) داکتیلوس. ب: (۱) برآمدگی‌های frontal (۲) برآمدگی‌های protogastric (۳) برآمدگی‌های mesogastric (۴) برآمدگی‌های epibranchial (۵) دندان‌های حاشیه‌ی جلویی جانبی (۶) دندان‌های میانی front (۷) دندان‌های submedian ناحیه‌ی front (۸) دندان‌های جانبی front.

نتایج آنالیزهای مولکولی و ترسیم درخت فیلوژنی به روش Maximum likelihood سه کلاد را که در این مطالعه به نام کلادهای A، B و C نشان داده شده است که گونه‌ی مورد مطالعه در کلاد A که گونه‌های متعلق به خانواده Portunidae است، قرار می‌گیرد و با ۹۴ درصد بوت استرپ (boot strap) حمایت می‌شود (شکل شماره ۳). کلادهای نشان داده شده در شکل هر سه رابطه خویشاوندی نزدیکی باهم دارند و جز کلاد Podotremata که از گروه‌های راسی خرچنگ‌های حقیقی می‌باشند هستند.

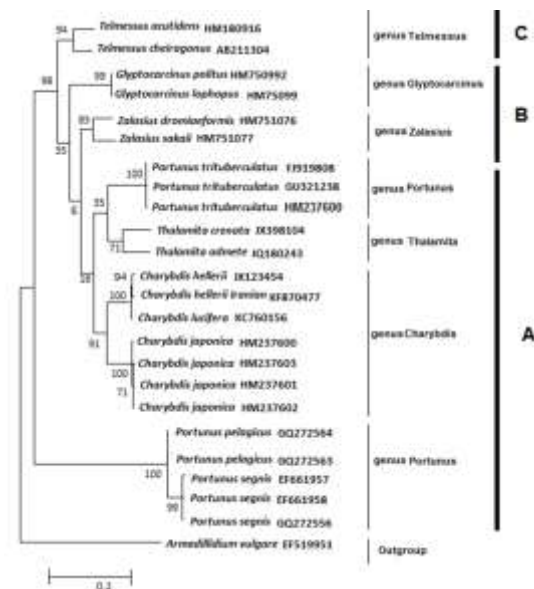
کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی نمونه‌ها و هم ردیف-گرایی آنها با استفاده از نرم‌افزارهای BioEdit (۱۰) و ClustalX7.0 (۱۱) انجام گرفت. ماتریس داده‌های حاصله به وسیله‌ی نرم‌افزار MEGA5 (12) تجزیه و تحلیل گردیدند. توالی ژنی گونه خرچنگ ایرانی با توالی ژنی ۲۱ گونه خرچنگ دیگر از بانک ژن مقایسه شد و گونه *Armadillidium vulgare* به عنوان group out در نظر گرفته شد. آنالیز فیلوژنی گونه‌ی مورد مطالعه با استفاده از روش Maximum likelihood (ML) انجام گرفت.

## نتایج

با انجام بررسی‌های مورفولوژیکی مشخص شد که، میانگین طول نمونه‌ها برای جنس نر بین ۷۰ تا ۱۰۰ میلی‌متر و برای جنس ماده بین ۵۰ تا ۷۰ میلی‌متر به دست آمد. کاراپاس پهن بوده پوشیده از کرک و یا فاقد آن است. در قسمت جلویی کاراپاس برآمدگی‌های متقاطع و منظمی دیده می‌شود. دارای یک جفت frontal کوتاه است، mesogastric به شکل منحنی به هم پیوسته‌ای است. metagastric به هم پیوسته است و یا در قسمت میانی دارای شکاف باریکی است. قسمت epibranchial دارای یک خمیدگی خفیفی است. فرانت (بجز در قسمت مدار بیرونی) کمی کوتاه‌تر از حاشیه‌ی خلفی است. دندان‌های میانی گرد بوده و تا حدودی نسبت به دندان‌های submedian تیزترند. دندان‌های submedian گرد و مثلثی می‌باشند. دندان‌های کناری به وسیله‌ی یک شکاف عمیق از دیگر دندان‌ها جدا می‌شوند. حاشیه‌ی جلویی - جانبی پهن و دارای شش دندان است که همه‌ی آنها تیز و دارای نوک سیاه می‌باشند. بخش پایه‌ای آنتن‌ها دارای برآمدگی برجسته و دندان‌دار می‌باشند. چنگک‌ها نسبتاً قطور، حاشیه‌ی جلویی merus پهن و دارای ۳ تا خار تیز است و در قسمت انتهایی خود نیز دارای یک خارچه می‌باشند. سطح خارجی manus دارای ۳ تا costae است. سطح داخلی آن دارای یک costae متوسط (گاهی ریز) است، هم‌چنین ممکن است یک costae ریز در حاشیه‌ی پایینی سطح داخلی دیده شود. حاشیه‌ی

حرکت استفاده می‌شوند، چشم‌ها در کنار آنتن‌ها قرار می‌گیرند، ماده‌ها فاقد پلوپود ۲ تا ۵ هستند، لاروها دارای کاراپاس کروی که در قسمت شکمی خود یک خار تیز و مستقیم را حمل می‌کنند. این در حالی است که خرچنگ‌های کاذب، سطح شکمی فاقد تقارن مارپیچی یا متقارن است، جفت پنجم پروپودها اغلب تحلیل رفته و نقش حرکتی ندارد و جاندار از آن برای پاک‌کردن آبشش‌ها استفاده می‌کند، پلوپودها تحلیل رفته و یا وجود ندارند، چشم‌ها بین آنتن‌ها قرار دارند، لارو ناپلیوس آنها طویل و خار تیز و مستقیم در قسمت جلویی دیده می‌شود (۳۴). خرچنگ‌های حقیقی خود در دو گروه اصلی Eubrachyura و Podotremata قرار می‌گیرند، وضعیت قرارگیری این دو گروه نسبت به هم همیشه مورد بحث قرار دارد. کلاد Podotremata به واسطه‌ی قرارگیری gonopore بر روی کوکسای پروپودها شناخته می‌شوند (۱). در تحقیقات مختلف Podotremata نسبت به Eubrachyura در وضعیت پارافایلی، مونوفایلی و پلی فایلی قرار می‌گیرند. به عنوان مثال این دو گروه در مطالعات Gouinot و همکاران (۹) و Mclay (۱۷) مونوفایلی، در مطالعات Martin و Davis (۱۶)، Ahyong و Omeally (۲) و Brossing و همکاران (۶) پارافایلی و در تحقیق Spears و همکاران (۳۶) در حالت پلی فابلیتیک قرار می‌گیرند، در این مطالعه تمام گونه‌های خرچنگ در کلاد Eubrachyura قرار گرفتند.

کلاد B را خانواده‌ی Xanthidae تشکیل می‌دهد. خانواده‌ی Xanthidae دارای چنگکی با نوک قاشق مانند است، بخش‌های سوم تا پنجم شکمی جنس ماده غیر متحرک، این بخش‌ها کاملاً به هم چسبیده‌اند ولی ممکن است شکاف‌هایی نیز در بین آنها قابل مشاهده باشد. در این خانواده Gonopod اول در جنس نر بسیار کشیده شده است و به شکل S است و نوک ساده‌ای دارد. Chia و Ng در سال ۱۹۹۴ جنس Glyptocarcinus را از زیر خانواده‌ی Eumedonidae جدا کرده و آن را در زیر خانواده‌ی جدید Antrocarcininae قرار دادند (۳۳). جنس Glyptocarcinus دارای کاراپاس ۶ وجهی بوده که در حاشیه جلویی کناری خود دارای ۳ دندانه است. در



شکل ۳: درخت فیلوژنی شامل ۲۲ گونه خرچنگ بر اساس توالی ژنی قسمتی از ژن CO1 با استفاده از آنالیز Maximum Likelihood. اعداد boot strap با 1000 replication را نشان می‌دهد. گونه‌ی Armadillidium vulgare به عنوان group out در نظر گرفته شده است.

## بحث

درخت حاضر بر اساس توالی نوکلئوتیدی قطعه‌ی ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز ۲۲ گونه از خرچنگ‌های حقیقی ترسیم گشته است. گونه‌ی Armadillidium vulgare از رده‌ی جور پایان و خانواده‌ی Armadillidiidae به عنوان group out در نظر گرفته شد. خرچنگ‌ها در دو کلاد اصلی خرچنگ‌های حقیقی و خرچنگ‌های کاذب قرار می‌گیرند (۳۴). خرچنگ‌های حقیقی با داشتن ۴ جفت پای حرکتی که به راحتی قابل مشاهده هستند، مشخص می‌شوند. این در حالی است که خرچنگ‌های کاذب ۳ جفت پای حرکتی واضح دارند و جفت چهارم در سطح زیرین بدن قرار دارد و به حالت چسبیده قرار گرفته است که به سختی قابل مشاهده است (۳۴). تحقیقات زیادی در دست است که نشان‌دهنده پارافایلیتیک بودن خرچنگ‌های کاذب و خرچنگ‌های حقیقی است (۲، ۶، ۹، ۱۶، ۱۷، ۳۶). در خرچنگ‌های حقیقی سطح شکمی متقارن بوده و به شدت تحلیل رفته است، یوروپودها غالباً دیده نمی‌شوند، پروپودهای ۲ تا ۵ ساده و به منظور

قرار می‌گیرد (۱۴). جنس *Charybdis* دارای کاراپاس شش وجهی می‌باشد، *front* به ۶ لوب تقسیم شده است، دارای ۶ دندانه در حاشیه‌ی جلویی کناری خود می‌باشد، چنگک‌ها نابرابر، *merus* دارای خار، *carpus* دارای یک خار بزرگ در گوشه‌ی سطح داخلی و سه خار در سطح بیرونی خود می‌باشد، *manus* دارای خارهایی در سطح خارجی خود می‌باشد، اولین *Gonopod* کشیده و طویل می‌باشد و دارای موهایی در حاشیه‌های داخلی و خارجی خود می‌باشد (۳۸، ۴). گونه‌های *Charybdis hellerii* و *Charybdis lucifera* از لحاظ مورفولوژیکی بسیار به هم نزدیک‌اند. *Charybdis hellerii* دارای کاراپاس پهنی بوده که پوشیده از کرک و یا بدون کرک می‌باشد. دارای یک جفت *frontal* کوتاه می‌باشد، *mesogastric* به شکل منحنی به هم پیوسته‌ای است. *metagastric* به هم پیوسته است و یا در قسمت میانی دارای شکاف باریکی می‌باشد. قسمت *epibranchials* دارای خمیدگی خفیفی می‌باشد. *front* (به جز در قسمت مدار بیرونی) کمی کوتاه‌تر از حاشیه‌ی خلفی است. حاشیه‌ی جلویی- جانبی پهن و دارای شش دندانه می‌باشد که همه‌ی آنها تیز و دارای نوک سیاه می‌باشند. حاشیه‌ی جلویی *merus* پهن و دارای ۳ تا خار تیز می‌باشد و در قسمت انتهایی خود نیز دارای یک خارچه می‌باشند. سوراخ تناسلی جنس ماده شبیه به سوراخ کلید می‌باشد (۳۸، ۳). *Charybdis lucifera* دارای کاراپاس پهن بدون کرک، دوتا *metagastric* کوتاه و یک جفت برآمدگی *epibranchials* می‌باشد. *front* به جز در قسمت لوب مداری داخلی، عریض‌تر از حاشیه‌ی پهن عقبی می‌باشد. حاشیه‌ی جلویی - کناری دارای ۶ دندانه می‌باشد که از دندانه ۱ تا دندانه ۵ به طور ضعیفی اندازه‌ی آنها بزرگ‌تر می‌شود و دندانه آخری کوچک‌تر از بقیه بوده و حالت خارچه دارد. بخش جلویی و پهن *merus* به ۳ تا خار چنگال مانند مجهز شده است و بخش عقبی آنها بدون خار می‌باشد. سوراخ تناسلی جنس ماده کوچک و تخم‌مرغی شکل است (۳۸، ۳).

همان‌طور که در شکل ۳ نیز مشاهده می‌شود داده‌های مولکولی نیز نزدیکی این دو گونه را به هم تأیید می‌کند. در این مطالعه *Charybdis hellerii* و *Charybdis lucifera* با ۱۰۰ درصد

تحقیق *Lai* و همکاران در سال ۲۰۱۱ گونه‌های جنس *Glyptocarcinus* در یک کلاد خواهری قرار گرفتند (۱۳) که بر اساس نتایج این تحقیق (شکل ۳) هم دو گونه در یک کلاد قرار گرفته و با ۱۰۰ درصد بوت استرپ حمایت می‌شود. هم-چنین گونه‌های زیر خانواده‌ی *Zalasiinae* (*Zalasius sakaii* و *Zalasius dromiaiformis*) در یک کلاد خواهری و مونوفایلیتیک قرار گرفتند که همان‌طور که در شکل ۳ نیز دیده می‌شود در درخت حاضر نیز به صورت مونوفایلیتیک قرار گرفتند.

در کلاد C خانواده‌ی *Cheiragonidae* قرار می‌گیرند، که شامل جنس *Telmessus* و گونه‌های *T. cheiragonus* و *T. acutidens* است. این دو گونه با ۹۴ درصد بوت استرپ حمایت می‌شوند. در مطالعات *Marti* و *Davis* خانواده‌ی *Cheiragonidae* با ۸۹ درصد بوت استرپ در یک کلاد قرار گرفتند (۱۶).

خانواده‌ی *Portunidae* دارای کاراپاس ۶ وجهی بوده و دارای ۵ تا ۹ دندانه در حاشیه‌ی کناری جلویی خود می‌باشند. *endopodit* مگزیلاپد دوم دارای لوب توسعه یافته‌ای در سطح داخلی خود می‌باشد. دو بخش انتهایی پاهای آخری پارو مانند هستند. بخش‌های شکمی سوم تا پنجم در جنس ماده کاملاً به هم جوش خورده و غیر متحرک‌اند (۳۷). در مطالعه‌ی حاضر *Portunus pelagicus* و *P. segnis* در یک کلاد پارافایلی و با ۱۰۰ درصد حمایت قرار می‌گیرند. *P. trituberculatus* بیشترین واگرایی را در بین اعضای این جنس دارد و در یک کلاد جدا قرار می‌گیرد؛ بنابراین مونوفایلیتیک بودن جنس *Portunus* حمایت نمی‌شود. جنس *Portunus* با داشتن ۹ دندانه در حاشیه‌ی جلویی جانبی کاراپاس شناخته می‌شود. عرض کاراپاس بیشتر از طول آن بوده و دندانه‌ی ۹ طولی‌ترین دندانه است. در تحقیقی که *Mantelatto* در سال ۲۰۰۷ بر روی جنس *Portunus* در خلیج مکزیک و انجام دادند مونوفایلیتیک بودن این جنس را رد کردند (۱۵). *Portunus pelagicus* و *P. segnis* در تحقیق *Lai* و همکاران (۲۰۱۰) در یک کلاد پارافایلیتیک نسبت به هم قرار گرفتند. *P. trituberculatus* نسبت به این دو گونه در حالت پلی فایلیتیک

## سپاسگزاری

در پایان از تمامی عوامل دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار به خصوص مهندس حسن زادعباس شاه‌آبادی که ما را در تمام مراحل این تحقیق همیاری کردند، کمال تشکر و قدردانی را داریم. هم‌چنین از دکتر رضا ندرلو به‌خاطر راهنمایی‌های ارزشمندشان در تمامی مراحل انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌کنیم.

حمایت در کلاد خواهری قرار می‌گیرند. گونه‌ی ایرانی نیز با ۱۰۰ درصد حمایت در کلاد خواهری *Charybdis hellerii* و *Charybdis lucifera* قرار می‌گیرد. با توجه به مشخصات ظاهری مشخص شد که گونه‌ی ایرانی *Charybdis hellerii* می‌باشد. اطلاعات بدست آمده در درخت فیلوژنی نیز مؤید این امر می‌باشد. به لحاظ نزدیکی و شباهت زیاد گونه‌های جنس *Charybdis* بهم، مطالعات مولکولی بیشتر، می‌تواند وضعیت قرارگیری گونه‌های این جنس را بهتر مشخص کند.

## منابع

- (1) Ah Yong ST, Ng PKI, Lai JCY, Sharkey D, Colgan D J. Phylogenetics of the brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda): The status of Podotremata based on small subunit nuclear ribosomal RNA. *Mol. Phylogenet Evol.* 2007; 45: 576–586.
- (2) Ah Yong ST, O’Meally D. Phylogeny of the Decapoda Reptantia: resolution using three molecular loci and morphology. *Raff Bull Zool.* 2004; 52 (2): 673–693.
- (۳) Apel M, Spiridonov VA. Taxonomy and zoogeography of the portunid crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae) of the Arabian Gulf and adjacent waters. *Fauna of Arabia.* 1998; 17: 159–331.
- (۴) Bellagamba F, Moretti VM, Comincini S, Valfare F. Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 3775–3781.
- (۵) Bruford M, Bradley D, Luikart G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat Rev Genet.* 2003; 3: 900–910.
- (۶) Brosing A, Richter S, Scholtz G. Phylogenetic analysis of the Brachyura (Crustacea, Decapoda) based on characters of the foregut with establishment of a new taxon. *J Zool Syst Evol Res.* 2006; 45 (1): 20–32.
- (7) Chu KH, Tong J, Chan TY. Mitochondrial cytochrome oxidase I sequence divergence in some Chinese species of *Charybdis* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Biochem Syst Ecol.* 1999; 27 : 461–468.
- (8) Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994; 3: 294–299.
- (9) Guinot D, Jamieson BGM, Richer de Forges, B. Relationship of Homolidae and Dromiidae: evidence from spermatozoal ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Acta Zool.* 1994; 75 (3): 255–267.
- (10) Hall TA. BIOEDIT: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis for Windows 95/98/NT. *Nucleic Symp Ser.* 1999; 41: 95–98.
- (11) Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends . Biochem. Sci.* 1998, 23: 403–405.
- (12) Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.* 1994; 10 (2): 189–91.
- (13) Lai J CY, Mendoza JCE, Ng PKI, Guinot D, Clark FP. Xanthidae MacLeay, 1838 (Decapoda: Brachyura: Xanthoidea) systematics: A multi-gene approach with support from adult and zoeal morphology. *Zool Anz.* 2011; 250: 407–448
- (14) Lai JCY, Ng PKL, Davie PJF. A revision of the portunus pelagicus (linnaeus, 1758) species complex (crustacea: brachyura: portunidae), with the recognition of four species. *Raff Bull Zool.* 2010; 58(2): 199–237
- (15) Mantelatto FL, Robles R, Felder DL. Molecular phylogeny of the western Atlantic species of the genus *Portunus* (Crustacea, Brachyura, Portunidae). *Zool J Linn. Soc.* 2007; 150: 211–220.
- (16) Martin JW, Davis GE. An Updated Classification of the Recent Crustacea. *Nat Hist Mus L.A. County Sci Ser.* 2001; 39: 1–124.
- (17) McLay CL. Crustacea Decapoda: revision of the family Dynomenidae. In: Crosnier, A. (Ed.), *Re’sultats des campagnes Musorstom. Me’m Mus nat Hist nat Paris*, pp. 1999; 180: 427–569.
- (18) Naderloo R. Invasive Hepu mitten crab, *Eriocheir hepuensis* (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Varunidae) from the Iranian marshland in the northern Persian Gulf estuarine system. *Marine Biodiversity Records.* 2014; 7: 1–3.
- (19) Naderloo R. Grapsoid crabs (Decapoda: Brachyura: Thoracotremata) of the Persian Gulf and the Gulf of Oman. *Zootaxa.* 2011; 3048: 1–43.

- (20) Naderloo R, Apel M. Leucosiid crabs of the genus *Hiplyra* Galil, 2009 (Crustacea; Brachyura; Leucosiidae) from the Persian Gulf and the Gulf of Oman with describing a new species. *Zool Stud.* 2012; 52 (2): 248–258.
- (21) Naderloo R, Ng PKL. Rediscovery of the rare pilumnid crab, *Actumnus simplex* Rathbun, 1911 (Decapoda, Brachyura) and a new record for the Persian Gulf. *Crustaceana*, 2011; 84 (12–13): 593–604.
- (22) Naderloo R, & Sari A. Iranian subtidal leucosiid crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) of the Persian Gulf. *Taxonomy and zoogeography. IJAB.* 2005a; 1: 31–46.
- (23) Naderloo R, Sari A. New record of a trapeziid crab, *Quadrella reticulata* Alcock, 1898 (Brachyura: Trapeziidae) from the Persian Gulf. *IJAB.* 2005b; 1: 67–73.
- (24) Naderloo, R. & Sari, A. New record of *Hyastenus inermis* (Rathbun, 1911) (Brachyura, Majidae) From the Persian Gulf, Iran. *Crustaceana.* 2007a; 80 (10): 1261–1264.
- (25) Naderloo R, Sari A. Subtidal crabs of the Iranian coast of the Persian Gulf. New collections and biogeographic considerations. *Aquat Ecosyst Health.* 2007b; 10 (3): 341–349.
- (26) Naderloo R, Schubart CD. Redescription and mitochondrial identification of *Chiromantes boulengeri* (Calman, 1920) (Decapoda: Brachyura: Sesarmidae) based on fresh material from the Persian Gulf, Iran. *Zootaxa.* 2009; 2128: 61–68.
- (27) Naderloo R, Schubart CD. Description of a new species of *Parasesarma* (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Sesarmidae) from the Persian Gulf, based on morphological and genetic characteristics. *Zool Anz.* 2010; 249: 33–43.
- (28) Naderloo R, Türkay M. A new species of the genus *Nanosesarma* (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Sesarmidae), and redescription of *Nanosesarma jousseaumei* (Nobili, 1906), including new records from the Persian Gulf. *J Nat Hist.* 2009; 43: 2911–2923.
- (29) Naderloo R, Türkay M. A new species of the *Macrophthalmus boscii*-group (Decapoda: Brachyura: Macrophthalmidae) from the Persian Gulf with designation a neotype for *M. boscii* Audouin (1826). *Mar Biodivers.* 2011; 41: 503–515.
- (30) Naderloo R, Moradmand M, Sari A, Türkay M. An annotated check list of hermit crabs (Crustacea: Decapoda: Anomura) of the Persian Gulf and the Gulf of Oman with five new records and an identification key to the North Indian Ocean genera. *Zoosyst Evol.* 2012, 80 (1): 63–70.
- (31) Naderloo R, Türkay M, Chen HL. Taxonomic revision of the wide-front fiddler crabs of the *Uca lactea* group (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Ocypodidae) in the Indo-West Pacific. *Zootaxa.* 2010; 2500: 1–38.
- (32) Naderloo R, Türkay M, Apel M. Brachyuran crabs of the family Macrophthalmidae Dana, 1851 (Decapoda: Brachyura: Macrophthalmidae) of the Persian Gulf. *Zootaxa.* 2011; 2911: 1–42.
- (33) Ng PKL, Chia DGB. The genus *glyptocarcinus takeda*, with descriptions of a new subfamily, two new genera and two new species from new caledonia (crustacea: decapoda: brachyura: xanthidae). *Raff Bull Zool.* 1994; 42(3): 701–731.
- (34) Ng PKL.; FAO species identification guide for fishery purposes the living marine resources of the western central pacific Volume 2. Crabs, 1998; 1045-1155.
- (35) Ng PKL, Guinot D, Davie PJ. *Systema Brachyrorum: Part I. An Annotated Checklist of Extant Brachyuran Crabs of the World.* *Raff Bull Zool.* 2008; 17: 1–286.
- (36) Spears T, Abele LG, Kim W. The monophyly of brachyuran crabs: a phylogenetic study based on 18S rRNA. *Syst. Biol.* 1992; 41 (4): 446–461.
- (37) Vannini M, innocent G. Research on the coast of Somalia. Portunidae (Crustacea Brachyura). *Trop Zool.* 2000; 13: 251-298.
- (38) Wee DVC, Ng PKL. Swimming crabs of the genera *charybdis* de haan, 1833, and *thalamita latreille*, 1829 (crustacea: decapoda: brachyura: portunidae) from peninsular malaysia and Singapore. *Raff Bull Zool.* 1995; 1: 128 pp.