

شناسایی جنس *Lydia* (Brachyuran: Oziidae) براساس مطالعات مولکولی و فراساختاری اولین گونوپود جنس نر

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

تاریخ دریافت: آذر 1395 تاریخ پذیرش: اسفند 1395

چکیده

جنس *Lydia* متعلق به زیرشاخه سخت‌پوستان و رده خرچنگ‌های حقیقی می‌باشد. تنها گونه‌ای از آن که در خلیج فارس یافت شده است *Lydia tenax* نام دارد. از آنجایی‌که در قلمرو دریایی گونه‌های شناسایی نشده به‌وفور وجود دارند روش شناسایی سنتی مبتنی بر ویژگی‌های مورفولوژیک شناسایی آن‌ها را با مشکل مواجه می‌کند. اخیراً ژن COI برای شناسایی و تعیین حد و مرز گونه‌ای کاربرد فراوانی دارد به همین منظور از نشانگر مولکولی ژن COI و همچنین فراساختار اولین گونوپود جنس نر استفاده شد برای اینکه احتمال وجود گونه‌های مخفی در میان 3 مورفوتایپ این گونه نشان داده شود. بنابراین از گونه منسوب به *Lydia tenax* از سواحل صخره‌ای استان بوشهر نمونه‌برداری انجام شد. سپس اولین گونوپوذهای جنس نر، جداسازی شده و با میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ (SEM) مورد عکس‌برداری قرار گرفتند. جهت مطالعات مولکولی DNA نمونه‌ها با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج و قطعه ژنی زیر واحد یک سیتوکروم اکسیداز میتوکندری (COI) تکثیر و توالی‌یابی شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد توالی نوکلئوتیدی این قطعه ژنی میتوکندریایی (COI) در نمونه‌های مورد بررسی یکسان نیست و از این 3 مورفوتایپ نمونه *Lydia sp.FCH* با بقیه مورفوتایپ‌ها تفاوت بیش‌تری را نشان داد و در کلاسی جداگانه قرار گرفت. مطالعه دقیق فراساختار اولین گونوپود جنس نر در 3 مورفوتایپ، نیز تفاوت‌هایی را در قسمت راسی نشان داد. بررسی حاصل نشان داد، زمانی که تشخیص گونه‌ها به‌دلیل شباهت‌های زیاد مورفولوژی مشکل است، بررسی‌های فراساختار اولین گونوپود جنس نر و شناسایی براساس ژن COI در تفکیک گونه‌ها سودمند خواهد بود. کلمات کلیدی: *Lydia tenax*، مولکولی، COI، فراساختاری، گونوپود، خلیج فارس

مقدمه

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 آن‌ها، کمک زیادی به حفظ و باسازی جمعیت آن‌ها خواهد کرد (سعیدپور، 1373). طبقه‌بندی سیستماتیک خرچنگ‌های خانواده Oziidae نیاز به مطالعات گسترده‌ای دارد و در ارتباط با مطالعات مولکولی در این خانواده بررسی‌های اندکی صورت گرفته است. آنالیز سیستماتیک مولکولی توسط Lai و همکاران (2014) در ارتباط با فیلوژنی این خانواده نشان داد خانواده Oziidae منشأ مونوفیلیتیک ندارند و

حتی منشأ گونه‌های یک جنس در این خانواده، نیز متفاوت می‌باشد. آن‌ها بیان کردند این مسأله می‌تواند نشان‌دهنده ضعف طبقه‌بندی سنتی در شناسایی موجودات باشد که صرفاً از ویژگی‌های ریختی برای شناسایی گونه‌ها استفاده می‌کند. زیرخانواده Oziinae شامل دو جنس می‌باشند که جنس *Lydia* با داشتن تنها یک گونه شناخته‌شده در خلیج فارس یکی از آن‌ها است. این جنس دارای دو گونه به‌نام *Lydia annulipes* و *Lydia tenax* در جهان می‌باشد که به‌دلیل شباهت‌های مورفولوژیک زیاد، تمایز آن‌ها از هم بسیار دشوار است. محققان رده‌بندی سنتی، تنها روش شناسایی این دو گونه را از یکدیگر تفاوت تعداد گرانول‌های ریز بر روی کلیپ‌ها و کاراپاس آن‌ها ذکر کردند و بیان داشتند تعداد این گرانول‌ها در



به بررسی آن‌ها در زیر میکروسکوپ‌های تشریحی و لوپ محدود بود و در مطالعات اندکی تنها از میکروسکوپ الکترونی (SEM) برای مشاهده جزئیات ساختاری آن‌ها استفاده شده است (Chen و همکاران 2007؛ Rorandelli و همکاران، 2008). در این مطالعه برای اولین بار سه مورفوتایپ گونه *Lydia tenax* با تفاوت‌های اندکی در کاراپاس برای بررسی وجود گونه‌های مخفی با توجه به فراساختار مورفولوژی اولین گونوپود جنس نر و با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز COI مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورفوتایپ متفاوت از گونه *Lydia tenax* با توجه به اختلاف اندک در شکل کاراپاس در آبان ماه 1393 از مناطق جزر و مدی سواحل صخره‌ای استان بوشهر در ایستگاه بندر دیر (اولی جنوبی، "50°19'27"، "15°56'51") شناسایی و جمع‌آوری شدند (شکل‌های 1 و 2). در محل از نمونه‌ها جهت شناسایی مورفولوژیک عکس تهیه شد و سپس با کنار زدن قسمت اپرکولوم شکمی، اولین گونوپودهای خرچنگ‌های نر، به وسیله پنس جدا شدند و در فرمالین 10% برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی قرار گرفتند. 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 هات پلیت به مدت نیم ساعت دهیدراته و خشک گردیدند و سپس با پوششی از فلز طلا رنگ‌آمیزی شد. از میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ (SEM) مدل VEGATS5136 ساخت کشور آلمان، برای عکس‌برداری از نمونه‌ها استفاده شد.



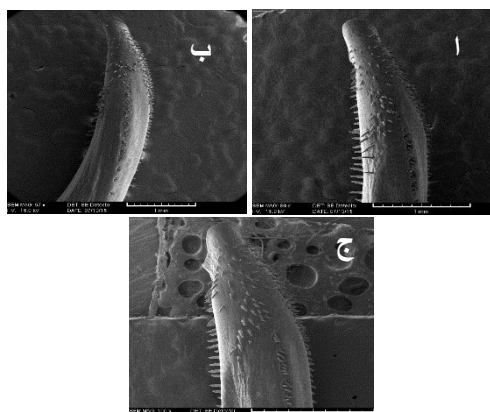
Lydia tenax نسبت به گونه *Lydia annulipes* بیش‌تر است. گونه *Lydia tenax* اولین بار در مناطق ایرانی سواحل صخره‌ای خلیج فارس توسط Stephensen (1946) شناسایی شد و سپس Naderloo و همکارانش (2012) وجود این گونه را از این مناطق تایید کرده و بیان داشتند محدوده پراکنش این جنس قسمت‌های غربی اقیانوس هند می‌باشد. گونه‌های مخفی و شناسایی نشده در قلمرو دریایی به فراوانی دیده می‌شوند که شناسایی بر پایه ویژگی‌های مورفولوژیک تشخیص آن‌ها را با مشکل مواجه می‌کند (Knowlton، 1993). گونه‌های مرموز یا مخفی به گونه‌هایی اطلاق می‌شود که از لحاظ مورفولوژی بسیار شبیه بوده اما از لحاظ ژنتیکی متفاوتند. برای غلبه بر چنین مسایلی، در حال حاضر روشی استاندارد مبتنی بر توالی‌یابی ژن COI میتوکندری که در حدود 650bp می‌باشد، به عنوان ابزاری سودمند برای شناسایی موجودات و تعیین مرز میان گونه‌ها به کار می‌رود. در دسترس بودن پرایمر جهانی، نرخ بالای تکامل مولکولی و فقدان جهش‌های حذف و اضافه نسبت به ژن‌های دیگر آن را به عنوان یک روش بارکدینگ جهانی تبدیل کرده است (Hebert و همکاران، 2003). از طرفی دیگر مورفولوژی تزیینات راسی گونوپود (اندامی تغییر شکل یافته از پاهای شنا است، که برای انتقال اسپرم در حین جفت‌گیری به کار می‌رود) به عنوان ویژگی مهم در مطالعات سیستماتیک در خرچنگ‌ها مطرح می‌باشد و اشکال مختلف گونوپود، مدرکی در تکامل این زائده در خرچنگ‌های حقیقی است بنابراین در این مطالعه به موازات مطالعات مولکولی ساختار اولین گونوپود (اندامی تغییر شکل یافته از پاهای شنا است، که برای انتقال اسپرم در حین جفت‌گیری به کار می‌رود) جنس نر نیز توسط میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت. توصیف اولیه گونوپود خرچنگ‌های حقیقی



شکل 1: موقعیت جغرافیایی منطقه نمونه‌برداری

1/5U آنزیم Polymerase Tag DNA و 20-30 نانوگرم DNA الگو صورت گرفت. برنامه حرارتی برای واکنش موردنظر شامل: مرحله واسرشته‌سازی اولیه: 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه و مرحله واسرشته‌سازی: 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه، مرحله الحاق: 45 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، مرحله بسط: 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 90 دقیقه و نهایتاً مرحله بسط نهایی: 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 دقیقه و تعداد 35 چرخه در نظر گرفته شد. محصولات تکثیر شده به همراه سایز مارکر 100bp بر روی ژل آگارز 1/5 درصد الکتروفورز و توسط safe stain رنگ‌آمیزی شدند. محصولات

به‌منظور شناسایی مولکولی استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفرم انجام شد (Hillis و همکاران، 1996). کیفیت و کمیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز 1% تعیین گردید. سپس با استفاده از آغازگر جهانی (Folmer و همکاران، 1994) (LCO1490 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA) (TTG G-3', HCO2198 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز جهت تکثیر قطعه ژنی سیتوکروم اکسیداز I (COI) انجام شد. واکنش PCR در حجم 25 میکرولیتری شامل بافر (1x)، 1 میلی مولار Mgcl2، 0/2 میلی مولار dNTP، 5 پیکومول از هر آغازگر رفت و برگشت،



شکل 3: فراساختار قسمت راسی گونوپود نمونه‌های
الف) *Lydia* sp. MS، ب) *Lydia* sp. MB،
ج) *Lydia* sp. FCH

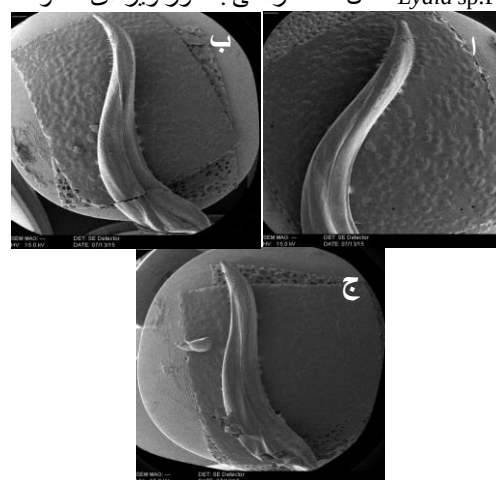
نتایج مولکولی: توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار CLC sequencer viewer به توالی‌های اسید آمینه ترجمه شدند. سپس در بانک داده جهانی NCBI به‌عنوان نمونه‌هایی با نام‌های فعلی *Lydia* sp. FCH (LC034193)، *Lydia* sp. MB-2015 (LC081231)، *Lydia* sp. MS (LC091344)، برای اولین بار از منطقه خلیج فارس ثبت گردیدند. درخت فیلوژنی تجزیه و تحلیل ماتریس داده‌ها بر اساس روش‌های ماکزیم پارسیمونی (Maximum Parsimony) با استفاده از نرم‌افزار PAUP (Swofford, 2002)، ماکزیم احتمال (Maximum Likelihood) با استفاده از نرم‌افزار Mega6 (Tamura و همکاران، 2012) انجام گردید. درخت فیلوژنی با استفاده از توالی‌های به‌دست آمده و چندین توالی از گونه‌های دیگر زیرخانواده Oziinae بر پایه گونه *Portunus pelagicus* ترسیم شد.

نتیجه محاسبات فیلوژنی و روابط تکاملی (ML, MP) برای 10 توالی ژن COI از خانواده Oziinae الگوی توپولوژی یکسانی را برای درختان تکاملی نشان دادند. نتایج اختلافات ژنتیکی در توپولوژی درختان تکاملی منعکس شد (شکل 4). توپولوژی درختان تکاملی نشان داد کلاص مربوط به سه نمونه *Lydia* مطالعه حاضر با گونه *Lydia annulipes* رابطه خواری دارد و این روابط مونوفیلتیک با ارزش بوت استرپ بالا (MP=70، ML=65) حمایت شده‌اند. نمونه *Lydia* sp. FCH با ارزش بوت استرپ بالا (MP=100، ML=86) از دو مورفوتایپ‌های خواری خود جدا شد و در کلاص جداگانه قرار گرفت. نمونه‌های *Lydia* sp. MB و *Lydia* sp. MS نیز خوشه‌ای جداگانه را با ارزش بوت استرپ متوسط (MP=64، ML=58) تشکیل دادند.

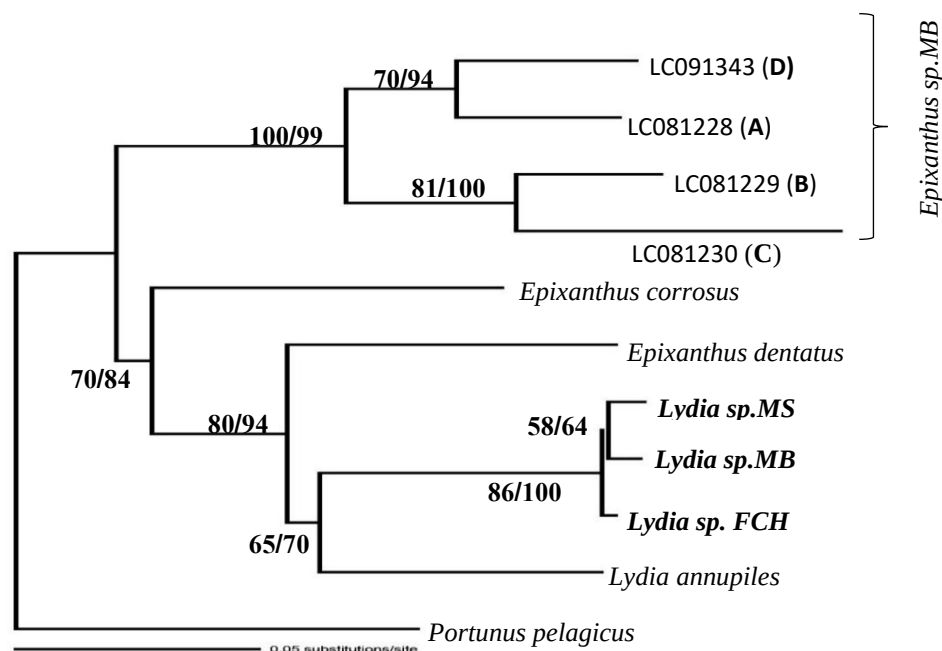
PCR مناسب، جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردیدند.

نتایج

شناسایی مورفولوژی گونوپود: نتایج بررسی فراساختار گونوپود، نشان داد به‌طور کلی گونوپود در این گونه دارای ساختاری تنومند و تا حدودی سینوسی شکل است که خارهای انبوهی در قسمت یک چهارم بخش دیستال آن قابل مشاهده است. تفاوت در شکل راسی گونوپود تا حدودی می‌تواند بیانگر جدایی سه نمونه از یکدیگر باشد. قسمت راسی گونوپود نمونه *Lydia* sp. MB، حالت کشیده‌تری نسبت به دو نمونه دیگر دارد. این قسمت در نمونه *Lydia* sp. MS کوتاه‌تر و عریض‌تر و در نمونه *Lydia* sp. FCH شکل دهانه راسی به‌طور ویژه‌ای متفاوت می‌باشد.



شکل 2: تصاویر کلی فراساختار گونوپود مورفوتایپ‌های
الف) *Lydia* sp. MS، ب) *Lydia* sp. MB، ج) *Lydia* sp. FCH



شکل 5: درخت Maximum likelihood و Maximum parsimony خانواده Oziidae. درصد های بوت استرپ از 1000 درخت روی گره ها نشان داده شده است (ML/MP)

بحث

از آنجایی که وجود گونه های مخفی و پنهان در میان سخت-پوستان دریایی بسیار رایج است، به همین منظور از نشانگر مولکولی ژن COI با تاکید بر فراساختار اولین گونوپود جنس نر استفاده شد برای این که احتمال وجود گونه های مخفی در میان 3 مورفوتایپ این گونه نشان داده شود. DNA بارکدینگ روشی مفید برای شناسایی و تخمین گونه های مخفی می باشد (Will و همکاران، 2005). سه مورفوتایپ مطالعه حاضر که از نظر مورفولوژی سنتی تحت نام *Lydia tenax* شناسایی شده بودند، برای بررسی های دقیق در ابتدا بر اساس تفاوت های بسیار کم و نامحسوس در شکل کاراپاس از هم تفکیک شدند (شکل 2) و سپس، توسط نشانگر COI توالی های آن ها مورد مطالعه قرار گرفت. به دلیل عدم وجود توالی از گونه *Lydia tenax* در بانک ژن، امکان بررسی صحت مطالعات مورفولوژیک که 3 مورفوتایپ حاضر را به عنوان این گونه معرفی کرده بودند فراهم نشد. تنها توالی موجود برای این جنس در ژن بانک گونه *Lydia annulipes* بود که در ترسیم درخت فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفت و طبیعتاً بدون تطابق کامل با توالی ثبت شده از کشور تایوان، بیشترین تطابق را با این نمونه ها نشان داد. نمونه های *Lydia sp. MB* و *Lydia sp. MS* تطابق زیادی را با هم نشان دادند و در درخت فیلوژنی (ML,MP) با هم در کلاسی مشترک قرار گرفتند که با ارزش بوت استرپ و احتمال پسین بالا حمایت شدند (شکل 4). نمونه *Lydia sp. FCH* با مقداری اختلاف در کلاسی جداگانه قرار گرفت و در نهایت هر سه نمونه با گونه *Lydia annulipes* منشا مونوفیلیتیک نشان دادند. نتایج مطالعات مولکولی نشان داد 3 مورفوتایپ می توانند متعلق به گونه های جداگانه باشند. کاراپاس در همه نمونه ها بسیار شبیه بود

و بنابراین به موازات مطالعات مولکولی به بررسی فراساختار مورفولوژی اولین گونوپود جنس نر پرداخته شد برای این که بتوان تفاوت های احتمالی را در انطباق با جدایی ژنتیکی بررسی کرد زیرا گونوپود اندامی است که به میزان اندکی تحت تاثیر تغییرات محیطی قرار می گیرد (Chambers و همکاران، 1980) و قسمت راسی آن دارای اشکال و ساختارهای ظریفی می باشد، که این ساختارها و تغییرات خاص در آن ها ارزش تاکسونومیک دارند (Moyano و همکاران، 2011). در مطالعه حاضر بررسی فراساختار گونوپود نمونه ها با میکروسکوپ الکترونی توانست تا حدودی تفاوت های واضحی را در میان آن ها آشکار سازد. در دهانه راسی نمونه *Lydia sp. FCH* تفاوت قابل ملاحظه ای مشهود بود (شکل 3) که سبب جدایی آن از دو مورفوتایپ دیگر شد. در مطالعه ای که Gillikin (2004) در ارتباط با سیستماتیک جنس *Perisesarma* انجام داده بود نیز بیان کرد تنها خمیدگی بیش تر در قسمت راسی گونوپود یک مورفوتایپ می تواند معرف شناسایی گونه ای جدید باشد. بر این اساس احتمال دارد بر خلاف تصور که این مورفوتایپ ها را یک گونه معرفی کرده بودند، می توانند به عنوان گونه های جداگانه مطرح باشند. محققان بیان داشتند یکی کردن گونه ها براساس نشانگر DNA میتوکندری به تنهایی و صرف نظر از مطالعات جدایی تولیدمثلی و یا سایر تمایزات مورفولوژیک همیشه برای اثبات جدایی گونه ها کافی نیست (Lee، 2004؛ Cicero و Moritz، 2004) و برای شناسایی دقیق گونه ها آنالیزهای بیش تر با استفاده از ویژگی های مورفومتریک و ریخت شناسی نیز ضروری می باشد (Hanley و Harrison، 2005). Hiller و همکاران (2006) بیان داشتند ترکیبی از داده های مورفولوژی و مولکولی قطعاً اطلاعات بیش تری در بازسازی و

15. **Lai, J.L.; Thoma, B.P.; Clark, P.F.; Felder, D.L. and Ng, P.K., 2014.** Phylogeny of eriphioid crabs (Brachyura, Eriphioidea) inferred from molecular and morphological studies. *Zool Scripta*. Vol. 43, pp: 52-64.
16. **Lee, M.S.Y., 2004.** The molecularisation of taxonomy. *Inverse system*. Vol. 18, pp:1-6.
17. **Moritz, C. and Cicero, C., 2004.** DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biology*. Vol. 2, pp: 1529-1531
18. **Moyano, M.P.; Gavio, M.A. and Cuartas, E.I., 2011.** Copulatory system of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea: Brachyura: Majidae). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* Vol. 91, pp: 1617-1625.
19. **Naderloo, R., 2011.** Grapsoid crabs (Decapoda: Brachyura: Thoracotremata) of the Persian Gulf and the Gulf of Oman. *Zootaxa*. Vol. 3048, pp:1-43.
20. **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. *J. Morphol.* Vol. 269, pp: 259-271.
21. **Radulovici, A.; Archambault, P. and Dufresne, F., 2010.** DNA Barcodes for marine Biodiversity: Moving Fast Forward. *Journal Diversity*. Vol. 2, pp: 450-472.
22. **Stephensen, K., 1946.** The Brachyura of the Iranian Gulf. *Danish Scientific Investigations in Iran, Part IV. E. Munksgaard, Copenhagen*. Vol. 2, pp: 57-237.
23. **Swofford, D., 2002.** PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10. *Sunderland, MA: Sinauer Associates*.
24. **Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A. and Kumar, S., 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.
25. **Will, K.W.; Mishler, B.D. and Wheeler, Q.D., 2005.** The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst Biol*. Vol. 54, pp: 844-851.

ترسیم درختان تکاملی در دهپایان خواهد داد. 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 گونپود جنس نر و هم-چنین نشانگرهای ژنتیکی برای قرار دادن صحیح گونه‌ها در جایگاه اصلی خود، مفید خواهد بود. بنابراین تلفیقی از روش‌های مورفولوژی دقیق بر اساس میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM)، سیستماتیک مولکولی و دیگر مشخصات ظاهری نشان داد احتمال گونامایی در این گونه وجود دارد که بیان نظر قطعی مستلزم بررسی با نشانگرهای بیش‌تر و تعداد نمونه‌های بیش‌تر می‌باشد.

منابع

1. **سعیدپور، ب.، 1373.** شناسایی خرچنگ‌های منطقه جزر و مدی خلیج چابهار و سواحل اطراف آن. پایان‌نامه کارشناسی-ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. 121 صفحه.
2. **Abele, L.G., 1971.** Scanning electron photomicro-graphs of brachyuran gonopods. *Crustaceana*. Vol. 21, pp: 217-219.
3. **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*. Vol. 38, pp: 169-177.
4. **Chen, W.; Cheng, J.; Chen, T. and Hsu, M.J., 2007.** A comparison of the micromorphology of the G1 of freshwater crabs of the genus *Geothelphusa* (Brachyura, Potamidae) from Taiwan. *Crustaceana*. Vol. 80, pp: 861-889.
5. **Claridge, M.F.; Dawah, H.A.; and Wilson, M.R., (Eds.) 1997.** Species: The Units of Biodiversity. *Chapman & Hall, London*.
6. **Dayrat, B., 2005.** Towards integrative taxonomy. *Biol J Linnean Soc*. Vol. 85, pp: 407-415.
7. **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. *Mol Mar Biol Biotechnol*. Vol. 3, pp: 294-299.
8. **Gaston, K.J. and O'Neill, M.A., 2004.** Automated species identification: Why not? *"Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Vol. 359, pp: 655-667.
9. **Gibbs, J., 2009.** Integrative taxonomy identifies new (and old) species in the *Lasioglossum (Dialictus) tegulare* (Robertson) species group (Hymenoptera, Halictidae). *Zootaxa*. Vol. 2032, pp: 1-38.
10. **Harrison, J.S. and Hanley, P.W., 2005.** *Austinxia aidae* Righi, 1967 and *A. hardyi* Heard and Manning, 1997 (Decapoda: Brachyura: Pinnotheridae) synonymized, with comments on molecular and morphometric methods in crustacean taxonomy. *J Nat His*. Vol. 39, pp: 3649-3662.
11. **Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. and deWaard, J.R., 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond [Biol]*. Vol. 270, pp: 313-321.
12. **Hennig, W., 1966.** *Phylogenetic Systematics*, University of Illinois Press, Urbana. 280 p.
13. **Gillikin, A.P. and Schubart, C.D., 2004.** Ecology and systematics of mangrove crabs of the genus *Perisesarma* (Crustacea: Brachyura: Sesamidae) from East Africa. *Zool J Linnean Soc*. Vol. 141, pp: 435-445.
14. **Knowlton, N., 1993.** Sibling species in the sea. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. Vol. 24, pp: 189-216.

