

وضعیت قرارگیری خرچنگ جنس *Charybdis* در خانواده *Portunidae* بر اساس توالی ژن

CO1 در گونه‌های *Charybdis lucifera* و *Charybdis helleri*

چکیده

خرچنگ‌های جنس *Charybdis* از جمله جنس‌های مهم خانواده *Portunidae* می‌باشند که وضعیت قرارگیری آن‌ها در این خانواده همیشه مورد بحث محققین مختلف بوده است. از این رو در مطالعه‌ی حاضر ضمن بررسی توالی قطعه‌ی یک ژن سیتوکروم اکسیداز دو گونه‌ی *Charibdis* و *Charibdis helleri* به بررسی این موضوع پرداخته شد. نمونه‌برداری در سواحل خلیج چابهار در سال ۱۳۹۳ انجام گرفت. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB صورت گرفت. با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت LCO1490 و HCO2198 توالی قطعه‌ی یک ژن سیتوکروم اکسیداز تعیین گردید. پس از انجام آنالیزهای فیلوژنتیکی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی مربوط به آن، مونوفایلیتیک بودن خانواده *Portunidae* و قرارگیری جنس *Charibdis* در زیرخانواده *Thalamininae* با درصد حمایت بالا تأیید شد.

واژگان کلیدی: *Portunidae*، *Charybdis*، چابهار، دریای عمان، ژن سیتوکروم اکسیداز، خرچنگ.

گیلان عطاران فریمان^۱

یاسر فاطمی^{۲*}

فاطمه نصری^۳

۱، ۲. گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
۳. اداره کل دامپزشکی سیستان و بلوچستان شبکه دامپزشکی، چابهار، ایران

*مسئول مکاتبات:

y.fatemi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۱۴

کد مقاله: ۱۳۹۷۰۲۰۵۱۲

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.

مقدمه

خرچنگ‌های خانواده *Portunidae* از گروه‌های مهم خرچنگ‌های حقیقی در ناحیه‌ی هند-آرام می‌باشند. اعضای این خانواده دارای سپر پشتی ۶ وجهی می‌باشند و در حاشیه‌ی جلویی جانبی خود ۵ تا ۹ دندان دارند. پاها از جوانب پهن می‌باشند و دو بند آخر پاهای آخر پارو مانند می‌باشند (Apel and Spiridonov, 1998). *Charybdis* از جنس‌های مهم خانواده *Portunidae* است که به واسطه‌ی حضور ۶ تا ۷ دندان در حاشیه‌ی جلویی جانبی خود و نیز حاشیه‌ی جلویی پهن کاسه‌ی چشم که به‌طور واضحی کوچک‌تر از پهنای سپر پشتی می‌باشد شناخته می‌شود (Wee and Ng, 1995).

Wee و Ng در سال ۱۹۹۵ تعداد ۴۷ گونه از جنس *Charybdis* را از ناحیه‌ی هند - آرام گزارش دادند. در سواحل ایرانی خلیج فارس و دریای عمان نیز تنوع خرچنگ‌ها به‌ویژه خانواده *Portunidae* بالا است. تاکنون تعداد ۱۳ گونه از خرچنگ‌های این خانواده را از دریای عمان گزارش شده است (Apel and Spiridonov, 1998; Naderloo and Türkay, 2012; Ghotbeddin et al., 2012; Naderloo et al., 2015; Naderloo, 2017). (۱۳۹۱).

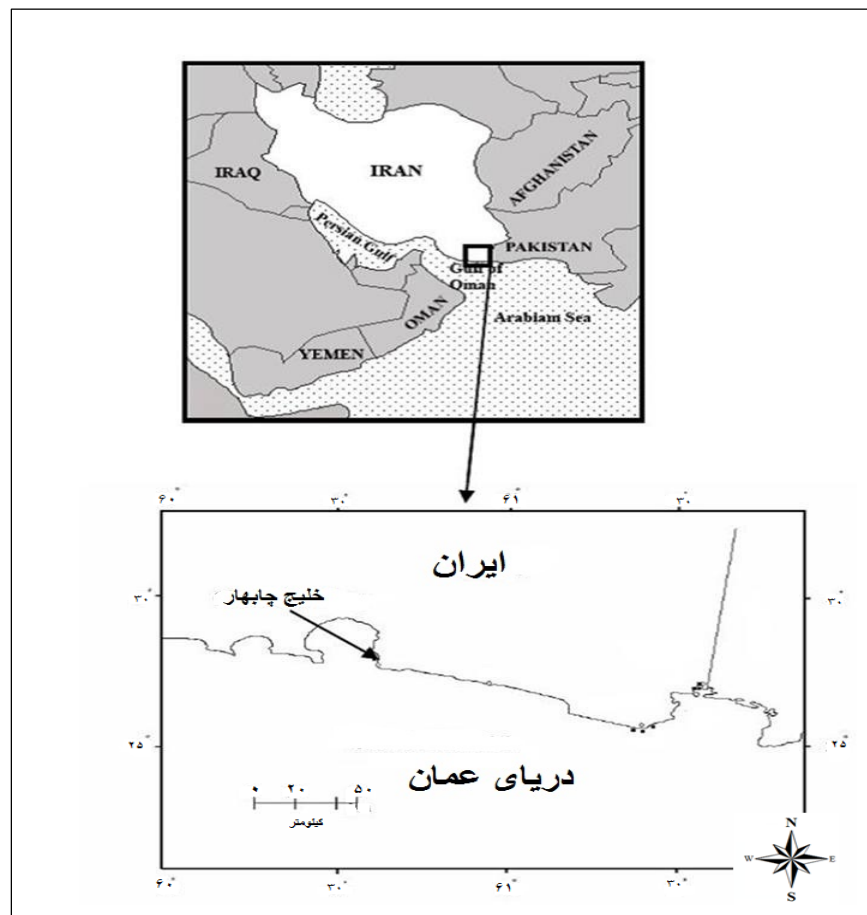
C. hellrii از گونه‌های رایج خانوادهی *Portunidae* در سواحل ایرانی خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد (Naderloo and Türkay, 2012). *C. lucifera* نیز در مطالعات مختلفی از خلیج فارس و دریای عمان گزارش گردید (Naderloo, 2017; Apel and Spiridonov, 1998).

تحقیقات مولکولی زیادی بر روی خانوادهی *Portunidae* در دست است. Jondeung و همکاران در سال ۲۰۱۲ ضمن بررسی مطالعه‌ی ژنوم کامل میتوکندریایی *Scylla serrate* مونوفایلیتیک بودن خانوادهی *Portunidae* را با درصد حمایت بالا تأیید کردند. Liu و Cui در سال ۲۰۰۹ بیان داشتند که وضعیت قرارگیری جنس *Charybdis* در زیر خانوادهی *Thalamitinae* حمایت نمی‌شود. در مطالعه‌ی آن‌ها مونوفایلیتیک بودن خانوادهی *portunidae* به شدت حمایت می‌شود. در مطالعات زیادی (Stephenson and Campbell, 1960; Wee and Ng, 1995) جنس *Charybdis* همراه با *Portunus* و *Scylla* در زیر خانوادهی *portuninae* قرار گرفت. باین حال در مطالعات Ng و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Apel و Spiridonov در سال ۱۹۹۸ جنس *Charybdis* در زیر خانوادهی *Thalamitinae* قرار گرفته است. این نظریه‌ی در مطالعه‌ی Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز حمایت شد. آن‌ها بیان داشتند که *C. japonica* رابطه‌ی نزدیکی با *C. sapidus* و *P. tritubercalatus* در مقایسه با گونه‌های جنس *Scylla* دارد. بنابراین وضعیت قرارگیری جنس *Charybdis* در زیر خانوادهی *Thalamitinae* زیر سؤال می‌رود و حمایت نمی‌شود. در این مطالعه به بررسی دو گونه از جنس *Charybdis* و وضعیت قرارگیری این جنس نسبت به زیر خانواده‌های *Portuninae* و *Thalamitinae* پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در سال ۱۳۹۳ از سواحل بین جزر و مدی خلیج چابهار در جنوب شرق ایران (در محدوده طول جغرافیایی ۲۴° ۶۰' تا ۳۷° ۶۰' شرقی و عرض جغرافیایی ۱۷° ۲۵' تا ۲۷° ۲۵' شمالی) انجام گرفت (شکل ۱). تعداد ۴ نمونه از هرگونه جمع‌آوری و جهت انجام تحقیقات به آزمایشگاه جانورشناسی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار منتقل شد. نمونه‌ها پس از عکس‌برداری در فریزر ۸۰- و اتانول ۹۶ درصد نگاه‌داری شدند. برش بافتی از پای نمونه‌ها جدا گردید و استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام گرفت (Liu and Cui, 2009; Jondeung et al., 2012). برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از دو آغازگر جهت تکثیر قطعه ژنی سیتوکروم اکسیداز واحد ۱ به طول ۷۱۰ جفت باز استفاده گردید که آغازگرها در این مطالعه LCO1490 با ترتیب نوکلئوتیدی (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') و HCO2198 با ترتیب نوکلئوتیدی (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') بودند (Folmer et al., 1994). مواد مورد استفاده در واکنش، شامل ۱۵ نانوگرم 25mM MgCl₂، 10x PCR Buffer، 10mM dNTP، 2.5U Taq DNA polymerase و دو آغازگر رفت و برگشت ذکر شده در بالا بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ۳۵ سیکل و با برنامه حرارتی زیر انجام گرفت. واسرشت سازی 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 واسرشت سازی 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.

توالی ژنی خرچنگ‌های ایرانی با توالی ژنی ۲۱ گونه خرچنگ دیگر از بانک ژن مقایسه شد و گونه *Armadillidium vulgare* به عنوان Out Group در نظر گرفته شد. آنالیز فیلوژنی گونه‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزارهای BioEdit، ClustalX7.0، MEGA6 و به روش Maximum likelihood (ML) انجام گرفت (Hall, 1999; Jeanmougin et al., 1998; Kumar, 2013).



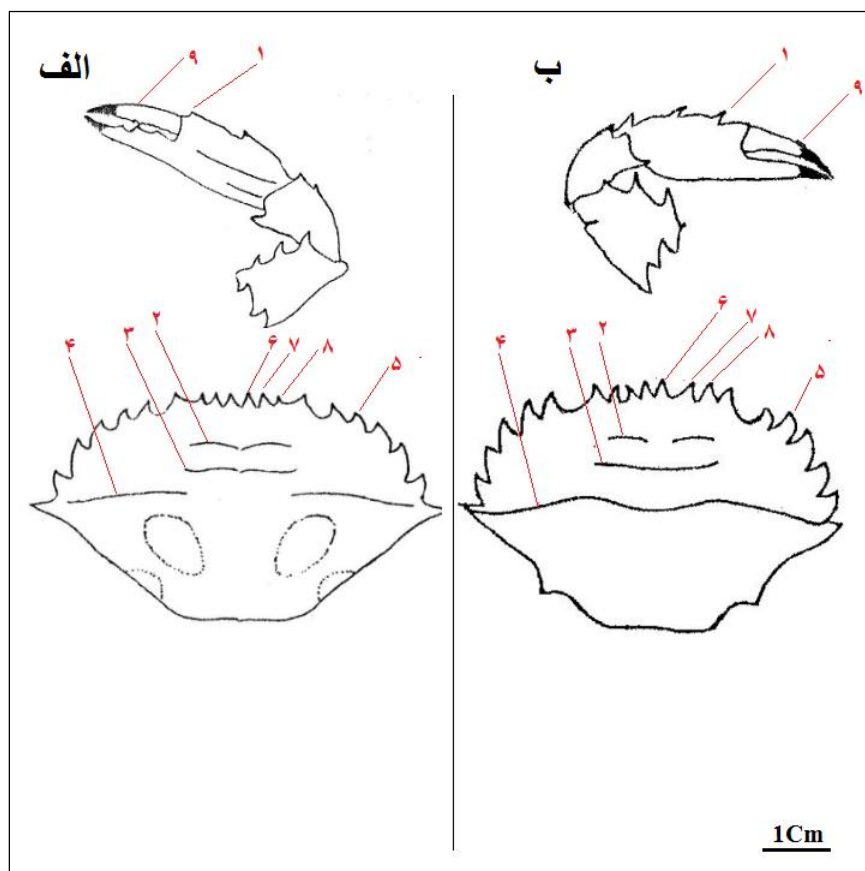
شکل ۱: موقعیت ایستگاه نمونه برداری (خلیج چابهار) در سواحل ایرانی دریای عمان.

نتایج

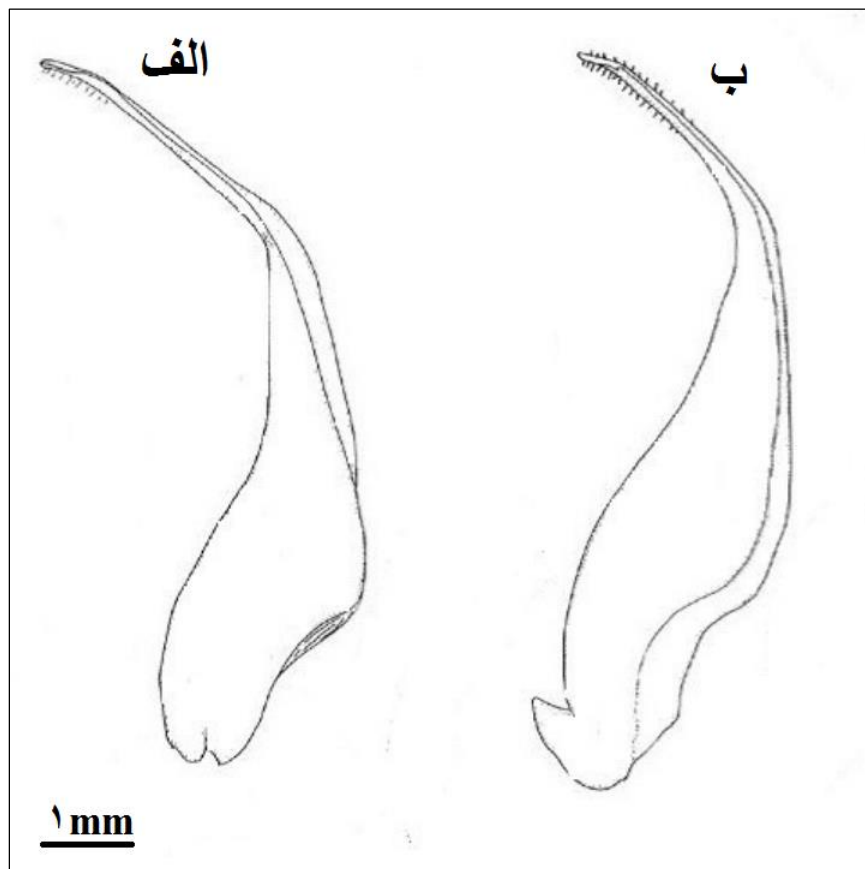
با بررسی مورفولوژیکی گونه‌های مورد مطالعه مشخص شد که گونه‌ی اول، دارای سپر پشتی پهن، بدون کرک و دارای برآمدگی‌های متقاطع در قسمت جلویی خود می‌باشد. طول سپر پشتی ۵۲ و عرض آن ۷۶ میلی‌متر می‌باشد، دارای یک جفت پروتوگاستریک، مزوگاستریک پیوسته، دوتا متاگاستریک کوتاه و یک جفت برآمدگی رو-آبششی می‌باشد. ۶ دندان تیز در قسمت جلویی سپر پشتی و ۶ دندان در قسمت جلویی - جانبی آن دیده می‌شود. بخش جلویی و پهن مروس‌ها (Merus) به ۳ تا ۴ خار چنگال مانند مجهز شده است و بخش عقبی آن‌ها بدون خار می‌باشد. نیمه‌ی انتهایی گونوپود ۱ باریک و به سمت لبه‌ها حالت منحنی به خود می‌گیرد، همچنین دارای خارهای زیادی در حاشیه‌ی کناری خود می‌باشد (شکل ۳، الف). سوراخ تناسلی جنس ماده کوچک و تخم‌مرغی شکل است (شکل ۲، ب).

همچنین برای گونه‌ی دوم مشخص شد که سپر پشتی پهن بوده پوشیده از کرک و یا فاقد آن‌هاست. طول آن ۶۰ و عرض آن ۹۰ میلی‌متر می‌باشد. در قسمت جلویی سپر پشتی برآمدگی‌های متقاطع و منظمی دیده می‌شود. ۶ دندان تیز در قسمت جلویی سپر پشتی و ۶ دندان در قسمت جلویی - جانبی آن دیده می‌شود. دارای یک جفت frontal کوتاه است، مزوگاستریک به شکل منحنی به هم پیوسته‌ای است. متاگاستریک به هم پیوسته است و یا در قسمت میانی دارای شکاف باریکی است. قسمت رو-آبششی دارای خمیدگی خفیفی است. قسمت پیشانی (به جز 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. سطح خارجی منوس (manus) دارای ۳ تا خار ریز است. سطح داخلی آن دارای یک خار متوسط (گاهی ریز) است، همچنین ممکن است یک خار ریز در حاشیه‌ی پایینی سطح داخلی دیده شود. حاشیه‌ی عقبی propodus نیز تا دارای یک سری خار تا سقف ۱۰ تا می‌باشند. سوراخ تناسلی جنس ماده به شکل سوراخ کلید می‌باشد (شکل ۲، الف). نیمه انتهایی گونوپود ۱ به سمت داخل خمیده شده است و در حاشیه بالایی و پایینی قسمت نوک آن تعداد زیادی زوائد مومماند دیده می‌شود (شکل ۳، ب). بنابراین با توجه به ویژگی‌های ذکر شده در بالا گونه‌ی اول با *C. hellrii* و گونه‌ی دوم با *C. lucifera* مطابقت دارد که آنالیزهای فیلوژنتیکی نیز این ادعا را ثابت می‌کند.

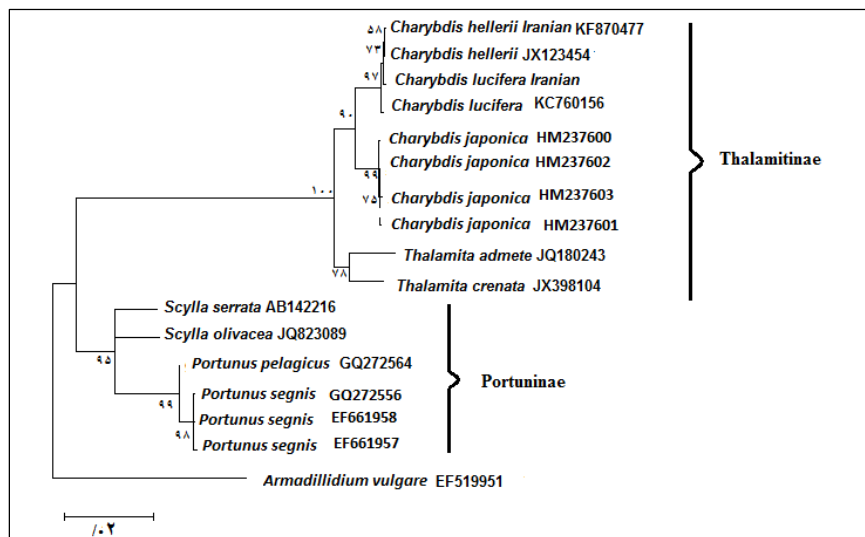


شکل ۲: الگوی طراحی شده از نمای سپر پشتی و چنگک، ویژگی‌های اصلی برای تشخیص گونه‌های جنس *Charybdis*. الف *C. hellrii* و ب *C. lucifera*. (۱): خارهای منوس (۲) برآمدگی‌های پروتوگاستریک (۳) برآمدگی‌های مزوگاستریک (۴) برآمدگی‌های اپی برانشیال (۵) دندان‌های حاشیه‌ی جلویی جانبی (۶) دندان‌های میانی ناحیه پیشانی (۷) دندان‌های ساب‌مدین (۸) دندان‌های جانبی ناحیه‌ی پیشانی (۹) داکتیلوس.



شکل ۳: نمای طراحی شده گونوپود ۱. الف *C. hellerii* و ب *C. lucifera*.

درخت حاضر مشتمل بر ۱۶ گونه از خانواده *Portunidae* و نیز گونه *Armadiliidium vulgare* به‌عنوان Outgroup می‌باشد. گونه‌های خانواده *Portunidae* در دو کلاد اصلی *Thalamitinae* و *Portuninae* قرار می‌گیرند. هر دو کلاد مونوفایلیتیک بوده و گونه‌های ایرانی به ترتیب در کلاد خواهری *Charybdis hellerii* و *Charybdis lucifera* قرار گرفتند. جنس *Charybdis* در زیر خانواده *Thalamitinae* و با درصد حمایت بالا قرار می‌گیرد و مونوفایلیتیک بودن خانواده *Portunidae* تأیید می‌شود (شکل ۴).



شکل ۴: درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس اطلاعات ژنی ۱۶ گونه از خانوادهی *Portunidae*

گونهی *armadillidium vulgare* به عنوان Out Group در نظر گرفته شده است.

بحث و نتیجه گیری

تحقیقات زیادی بر روی خرچنگ‌های خانوادهی *Portunidae* انجام گرفته است. در این میان *Charybdis* از جنس‌هایی می‌باشد که وضعیت قرارگیری آن همیشه مورد بحث می‌باشد. Campbell و Stephenson در سال ۱۹۶۰ بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی جنس *Charybdis* را در زیر خانوادهی *Portuninae* قرار دادند. پس از آن Wee و Ng در سال ۱۹۹۵ با بررسی جنس‌های *Charybdis* و *Thalamita* در تایوان، جنس *Charybdis* را در زیر خانوادهی *Portuninae* قرار دادند. همچنین Apel و Spiridonov (۱۹۹۸) با بررسی جامعی که بروی خرچنگ‌های خانوادهی *Portunidae* در خلیج فارس انجام دادند برای اولین بار جنس *Charybdis* را در زیر خانوادهی *Thalamitinae* قرار دادند.

Charybdis hellerii در خلیج فارس، دریای عمان و دریای سرخ به سه شکل، بزرگ با سپرپشتی بدون مو، کوچک با سپرپشتی بدون مو و بزرگ همراه با سپرپشتی که توسط موهای ریزی پوشیده شده است دیده می‌شود (Naderloo, 2005; Tirmizi and Kazmi, 1996). در تحقیق حاضر شکل بزرگ با کاراپاس بدون سپرپشتی مشاهده شد. *Charybdis lucifera* تاکنون از خلیج فارس گزارش نشده است (Naderloo, 2017).

تحقیق حاضر بر اساس اطلاعات ژنی به دست آمده از تکثیر قطعه‌ی یک ژن سیتوکروم اکسیداز گونه‌های *C. hellerii* و *C. lucifera* به بررسی وضعیت قرارگیری جنس *Charybdis* در خانوادهی *Portunidae* پرداخته است. همان‌طور که در شکل ۴ نیز دیده می‌شود، آنالیزهای مولکولی قرارگیری جنس *Charybdis* را در زیر خانوادهی *Thalamitinae* تأیید می‌کند. در این تحقیق مونوفایلیتیک بودن خانوادهی *Portunidae* را همچون بعضی از مطالعات (Liu and Cui, 2009; Jondeung et al., 2012) حمایت می‌کند.

Smith و همکاران در تحقیقی که بر روی ۹ گونه از جنس *Charybdis* انجام دادند، مونوفایلیتیک بودن این جنس را تأیید کردند (Smith *et al.*, 2010). مونوفایلیتیک بودن خانواده Portunoidea و جنس *Charybdis* در تحقیقات Ma و همکاران در سال ۲۰۱۵ و همچنین تحقیق حاضر تأیید شد. برخلاف این مطالعه و همچنین نتایج حاصل از مطالعات Schubart و Reuschel (۲۰۰۹)، مونوفایلیتیک بودن خانواده Portunoidea در مطالعه spiridonov و همکاران (۲۰۱۴) که بر اساس مطالعات مولکولی و نیز صفات ظاهری صورت گرفت، حمایت نشد. همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود دو کلاد اصلی *Portuninae* و *Thalamitinae* در این تحقیق به‌دست‌آمده است. هر دو کلاد مونوفایلیتیک بوده و با درصد بالا حمایت می‌شوند. گونه‌های ایرانی نیز در کلاد خواهری به ترتیب با گونه‌های *Charybdis hellerii* و *Charybdis lucifera* قرار گرفتند. آنالیزهای مورفولوژیکی نیز داده‌های حاصل از اطلاعات مولکولی را تأیید می‌کنند. در مطالعه‌ی حاضر جنس *Charybdis* با ۱۰۰ درصد بوت‌استرپ حمایت در کلاد *Thalamitinae* که معرف همین زیر خانواده می‌باشد قرار می‌گیرد. Ng و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی جنس *Charybdis* را در زیر خانواده‌ی *Thalamitinae* قرار دادند. در بعضی از مطالعات مولکولی نیز وضعیت قرارگیری جنس *Charybdis* در زیر خانواده‌ی *Thalamitinae* حمایت نمی‌شود. از طرفی همچون مطالعه‌ی حاضر، در بعضی مطالعات (Zhang *et al.*, 2008) قرارگیری جنس *Charybdis* در زیر خانواده‌ی *Thalamitinae* حمایت می‌شود. Cui و Liu در تحقیق خود در سال ۲۰۰۹ که بر روی ژنوم کامل میتوکندریایی *Charybdis japonica* انجام شد بیان داشتند به علت رابطه‌ی نزدیک تر *C. japonica* با گونه‌های *C. sapidus* و *P. trituberculatus* وضعیت قرارگیری جنس *Charybdis* در زیر خانواده‌ی *Thalamitinae* زیر سؤال می‌رود. تحقیق حاضر ضمن تأیید مونوفایلیتیک بودن خانواده‌ی *Portunidae*، قرارگیری جنس *Charybdis* در زیر خانواده‌ی *Thalamitinae* را با درصد حمایت بالا تأیید می‌کند. مطالعات گسترده‌تر در این زمینه توأم با مطالعات مورفولوژیکی دقیق می‌تواند گره از این مشکل بردارد.

سپاسگزاری

در پایان از تمامی دوستان عزیز که ما را در طول این تحقیق همراهی کردند بخصوص مهندس حسن زاد عباس شاه‌آبادی و عصمت بهروزی کمال تشکر را داریم.

منابع

- قطب‌الدین، ن.، فاطمی، ر. و ولی‌نسب، ت.، ۱۳۹۱. شناسایی خرچنگ‌های خانواده Portunidae مناطق زیر جزر و مدی سواحل ایرانی دریای عمان با معرفی ۵ گونه جدید. مجله اقیانوس‌شناسی، ۳ (۱۱): صفحات ۱۲-۱.
- Apel, M. and Spiridonov, V., 1998. Taxonomic and zoogeography of the Portunid crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae) of the Persian Gulf and adjacent waters. Fauna of Arabia, 17: 159-331.
- 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.
- Ghotbeddin, N., Fatemi, S.M.R. and Valinassab, T., 2012. Intertidal crabs of Chabahar Bay (Northeast of Oman Sea): New collection and biogeographic considerations. Iranian journal of fisheries science, 12(3):440-451.
- Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95-98.

- Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. and Gibson, T. J., 1998.** Multiple sequence alignment with ClustalX. Trends. Biochemistry Science, 23: 403–405.
- Jondeung, A. L., Karinthanyakit, W. and Kaewkhumsan, J., 2012.** The complete mitochondrial genome of the black mud crab, *Scylla serrata* (Crustacea: Brachyura: Portunidae) and its phylogenetic position among (pan) crustaceans. Molecular Biology Reports, 39: 10921–10937.
- Kumar, S., 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725–2729.
- Liu, Y. and Cui, Z., 2009.** Complete mitochondrial genome of the Asian paddle crab *Charybdis japonica* (Crustacea: Decapoda: Portunidae): gene rearrangement of the marine brachyurans and phylogenetic consideration of the decapods. Molecular Biology Reports, 37: 2559–2569.
- Ma, H., Ma, M. and Li, C., 2015.** First mitochondrial genome for the red crab (*Charybdis feriata*) with nimplication of phylogenomics and population genetics. Scientific Reports, 15: 1–14.
- Naderloo, R. and Turkay, M., 2012.** Decapod crustaceans of the littoral and shallow sublittoral Iranian coast of the Persian Gulf. Faunistics, Biodiversity and Zoogeography, 3374: 1–67.
- Naderloo, R., 2005.** Taxonomic study of the subtidal crabs of the Persian Gulf, Iran. Unpublished M.Sc. thesis, University of Tehran, Iran: 131 pp.
- Naderloo, R., 2017.** Atlas of Crabs of the Persian Gulf. Springer International Publishing, Switzerland. 290 pp.
- Naderloo, R., Ebrahimnezhad, S. and Sari, A., 2015.** Annotated checklist of the decapod crustaceans of the Gulf of Oman, northwestern Indian Ocean. Zootaxa, 4028: 397–412.
- Ng, P. K. L., Guinot, D. and Davie, P. J. F., 2008.** SystemaBrachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. Raffles Bulletin of Zoology, 17: 1–286.
- Schubart, C.D. and Reuschel, S., 2009.** A proposal for a new classification of Porlunoidea and Cancroidea (Brachyura: Heterotremata) based on two independent molecular phylogenies. In: Martin, J.W., Crandall, K.A., Felder, D.L. (Eds.), DecapodCrustacean Phylogenetic, vol. 18, Crustacean Issues. Taylor and Francis/ CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 533–550.
- Smith, P. J., Webber, W. R., McVeagh, S. M., Inglis, G. J. and Gust, N., 2010.** DNA and morphological identification of an invasive swimming crab, *Charybdis japonica*, in New Zealand waters. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 37: 753–762.
- Spiridonova, V.A., Neretina, T.V. and Schepetov, D., 2014.** Morphological characterization and molecular phylogeny of Portunoidea Rafinesque, 1815 (Crustacea Brachyura): Implications founder standing evolution of swimming capacity and revision of the family-level classification. Zoologischer Anzeiger, 253: 404–429.
- Stephenson, W. and Campbell, B., 1960.** The Australian portends (Crustacea: Portunidae) IV: remaining genera. Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 11: 73–122.
- Tirmizi, N. M. and Kazmi, Q. B., 1986.** Marine fauna of Pakistan. 4. Crustacea: Brachyura (Dromiacea, Archaebrachyura, Oxystomata, Oxyrhyncha). Center of Excellence, University of Karachi.
- Wee, D. P. and Ng, P. K. L., 1995.** Swimming crabs of the genera *Charybdis* De Haan, 1833 and *Thalamita* Latreille, 1829 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae) from peninsular Malaysia and Singapore. Raffles Bulletin of Zoology, 1: 1–128.
- Zhang, S., Li, X. L., Cui, Z. X., Wang, H. X., Wang, C. L. and Liu, X. L., 2008.** The Applications of mitochondrial DNA in phylogeny reconstruction and species identification of Portunid crab. Mark Science, 32: 9–18.