



بررسی مولکولی و مورفولوژیک گونه *Cellana karachiensis* در جزیره قشم

منا ایزدیان^{۱*}، حسین ذوالقرنین^۲، سیدمحمدباقر نبوی^۲، آریا اشجع‌اردلان^۳، سیامک یوسفی‌سیاه‌کلودی^۴

^۱ گروه تنوع زیستی و ایمنی زیستی، پژوهشکده محیط‌زیست و توسعه پایدار، سازمان حفاظت محیط‌زیست

^۲ گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

^۳ گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

^۴ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین پیشوا

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

گونه‌های شکم‌پایان دریایی خلیج فارس بسیار متنوع و فراوانند و منبع غذایی مهمی را برای زنجیره بعدی مصرف‌کنندگان به وجود آورده‌اند. گونه *Cellana karachiensis* متعلق به خانواده Nacellidae از رده Gastropoda می‌باشد. این گونه دارای صدف‌هایی با ظاهری متفاوت و رنگ‌بندی و نقوش مختلف می‌باشند. در این پژوهش برای نخستین بار شناسایی مولکولی این گونه در سواحل جزیره قشم به همراه بررسی مورفولوژیک آن انجام شد. نمونه‌برداری در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۳ در سواحل صخره‌ای صورت گرفت. نمونه‌ها مورد شناسایی مورفولوژیک قرار گرفتند و سپس مراحل استخراج DNA، تکثیر قطعه ژنی زیر واحد I سیتوکروم اکسیداز COI و توالی‌یابی انجام شد. در مجموع تعداد ۴ توالی COI از این گونه به دست آمد که این توالی‌ها برای اولین بار از منطقه شمالی خلیج فارس گزارش می‌شوند. آنالیزهای فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزارهای Mega6، PAUP، BEAST و با رسم درخت‌های فیلوژنی Maximum Likelihood، Bayesian و Maximum Parsimony صورت گرفت. نتایج حاصل از شناسایی مولکولی نشان داد که با وجود تفاوت فاحش در مورفولوژی نمونه‌های مورد بررسی، همه آن‌ها گونه *C. karachiensis* هستند. هم‌چنین مشخص شد که گونه *C. karachiensis* در خلیج فارس از نظر مولکولی شباهت بیشتری با جمعیت این گونه در سواحل کشور هند دارد و مقداری تفاوت با همین گونه در سواحل کشور عمان نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی:

جزیره قشم

خلیج فارس

سیتوکروم اکسیداز I

سواحل صخره‌ای

مقدمه

گونه *Cellana karachiensis* از لیمپت‌های گوشت‌خوار دریایی متعلق به خانواده Nacellidae از کلاس Patellogastropoda می‌باشد. Nacellidae تنها خانواده در فوق خانواده Nacelloidea می‌باشد (Bouceht and Rocroi, 2005). اگرچه اطلاعات زیادی در مورد زیست‌شناسی و اکولوژی گونه‌های خانواده Nacellidae وجود دارد، اما رده‌بندی این گروه تا حدودی مغفول مانده است (Valdovinos et al., 2005). لیمپت‌ها نقش کلیدی در ساختاردهی به اکوسیستم‌های بین جزر و مدی دریایی دارند. بنابراین مطالعات زیادی بر روی آن‌ها انجام شده است. باین‌حال در مورد پراکنش و فراوانی تنوع فنوتیپی و ژنتیکی لیمپت‌ها در ارتباط با تفاوت‌های جغرافیایی اطلاع چندانی در دست نیست. گونه *C. karachiensis* به فراوانی در سواحل

* نویسنده مسؤول، پست الکترونیک: izadian.mona@gmail.com

صخره‌ای یافت می‌شود (Misra and Kundu, 2005). Faladu و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی ترجیح زیستگاهی و اکولوژی جمعیت *C. karachiensis* و *Siphonaria siphonaria* در سواحل صخره‌ای بین جزر و مدی خلیج Kathiawar هند پرداخت. نتایج نشان داد که گونه *C. karachiensis* احتمالاً به علت توانایی که تحمل تغییرات بالای خشک شدن، شوری و دما دارد، گونه غالب در بسترهای صخره‌ای است. همچنین این گونه منطقه اسپری را ترجیح می‌دهد که در واقع در آن ناحیه تقریباً هیچ رقابتی برای فضا و غذا با سایر نرم‌تنان وجود ندارد. Joseph و همکاران در سال ۲۰۱۴ شناسایی گروهی از گونه‌های پنهان لیمپت دریایی، *C. karachiensis* در سواحل هند را با استفاده از توالی‌یابی قطعه ژنی میتوکندریایی COI انجام دادند. در این پژوهش روابط فیلوژنی بین سه گروه از لیمپت‌های دریایی دارای الگوهای رنگی متفاوتی بر روی پوسته بررسی شد. نتایج نشان داد که هر سه نوع مطالعه شده در این تحقیق ۹۹/۵۹ درصد با اولین توالی گزارش شده از گونه *C. karachiensis* در سواحل هند شباهت داشتند. کلیه بررسی‌های پیشین در ایران بر روی این گونه تنها بر اساس ویژگی‌های ریختی این جاندار بوده و در این مطالعه برای نخستین بار به شناسایی مولکولی نمونه‌هایی از گونه *C. karachiensis* پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و شناسایی مورفولوژیک

نمونه‌برداری از سواحل صخره‌ای جزیره قشم در اردیبهشت ۱۳۹۳ انجام گرفت. نمونه‌ها در الکل مطلق فیکس و به آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (آزمایشگاه دکتر رستگار) منتقل شدند. نمونه‌برداری با توجه به زمان حداکثر جزر آب و به صورت گشت در منطقه بین جزر و مدی انجام گرفت. در کل ۸ نمونه از این گونه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه جهت شناسایی مورفولوژیک بررسی شدند که در این راستا از کلیدهای شناسایی شامل: *Sea Shells of Eastern Encyclopedia of Marine Gastropods*, *Sea Shore of Kuwait Persian Gulf* (Jones, 1986), *Arabia* (Bosch *et al.*, 1995) (Robin, 2008) و اطلس نرم‌تنان خلیج فارس (Hosseinzadeh *et al.*, 2001)، استفاده شد.

مطالعات مولکولی

پس از شناسایی مورفولوژیک نمونه‌ها، استخراج DNA با استفاده از پودر Chelex انجام شد. پس از ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز و اسپکتروفوتومتر، تکثیر قطعه ژنی COI انجام گرفت. به این منظور از پرایمر جهانی Folmer (1994) جهت تکثیر قطعه ژنی COI استفاده شد. مشخصات این پرایمر در جدول ۱ قابل مشاهده است. جهت تهیه محلول PCR، یک میکرولیتر (۱۰ نانوگرم) از DNA استخراجی، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌متر)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز (۵۰/۵)، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰ X) PCR و یک میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌متر) استفاده شد که در نهایت حجم آن با آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد (McPherson and Møller, 2006). محصول PCR مورد خالص‌سازی قرار گرفت و جهت توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید و سپس به وسیله دستگاه توالی‌یاب خودکار Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzers Sequencing بر پایه پروتکل شرکت سازنده، توسط شرکت Bioneer کره جنوبی به روش سانگر یا ختم زنجیره (Dideoxy Chain Termination)، توالی‌یابی شدند.

جدول ۱. مشخصات پرایمر استفاده شده برای تکثیر قطعه ژن COI

Primer Name (F/R)	Nucleotide Sequence (5' to 3')	Reference
COI LCO1490_t1 HCO2198_t1	TGTA AACGACGGCCAGTGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer <i>et al.</i> , 1994

ثبت توالی‌ها در پایگاه داده‌ها

به این منظور ابتدا توالی‌ها در سایت NCBI، BLAST^۱ شد و با توجه به میزان فاصله ژنتیکی از توالی‌های نزدیک به آن‌ها و همچنین رسم درخت در این سایت اقدام به ثبت نمونه‌ها گردید. در ابتدا قالب خواندن^۲ توالی‌های به‌دست‌آمده، توسط نرم‌افزار CLC Sequence Viewer v6.5.4 (Knudsen *et al.*, 2012)^۳ تعیین شد. سپس از طریق سایت DDBJ توالی‌ها در پایگاه داده NCBI ثبت گردید.

رسم درخت فیلوژنی

آنالیز فیلوژنی با استفاده از روش‌های Maximum Likelihood، Maximum Parsimony و Bayesian انجام شد. پیش از انجام آنالیزهای ML، MP و BI، با استفاده از برنامه MrModeltest v2.3 (Nylander, 2004) و بر اساس معیار اطلاعاتی AIC (Akaike Information Criterion) و AICc مدل‌های مناسب برای داده‌های موردنظر، انتخاب شدند (Nylander, 2004). طبق این آزمون مدل GTR+I+G (Rodriguez *et al.*, 1990) برای داده‌های این پژوهش انتخاب شد. توالی‌ها در فرمت FASTA، جهت استفاده در نرم‌افزار MEGA6^۴ (Tamura *et al.*, 2011) آماده شد. جهت هم‌ردیف کردن^۵ توالی‌ها از نرم‌افزارهای Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) استفاده شد. آنالیز ML برای توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و تکرار بوت استرپ ۱۰۰۰ انجام شد.

توالی‌ها جهت استفاده در نرم‌افزارهای فیلوژنی به فرمت Nexus در آمد. آنالیز MP برای داده‌ها به همراه توالی‌های مرجع با استفاده از نرم‌افزار PAUP^۶ نسخه 4b10 (Swofford, 2003) انجام گرفت. این نرم‌افزار که نرم‌افزار تخصصی برای رسم درخت‌های MP است، پرکاربردترین بسته نرم‌افزاری برای رسم درخت‌های تکاملی می‌باشد (Swofford, 2003). برای انجام آنالیزها از الگوریتم مبادله شاخه به شاخه روش دو نیمه‌سازی درخت و اتصال مجدد (TBR=Tree-Bisection-Reconnection) و روش جستجوی اکتشافی (heuristic search) استفاده شد که به‌صورت تصادفی ۱۰۰ توالی اضافی را نیز بررسی می‌کند. کلادهای MP با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ بررسی شدند.

از نرم‌افزار BEAST v1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012) برای تخمین زمان جدیدترین نیای مشترک (TMRCA)^۷ برای گره‌های^۸ مورد نظر در درخت‌های فیلوژنی استفاده شد. این نرم‌افزار همچنین آنالیز Bayesian MCMC را انجام می‌دهد و قادر است رسم درخت و تعیین زمان واگرایی را به‌طور هم‌زمان انجام دهد که مزیت این نرم‌افزار نسبت به نرم‌افزار MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) می‌باشد (Sotelo *et al.*, 2009). جهت تنظیم ساعت مولکولی، پس از بررسی منابع موجود، از نرخ جایگزینی^۹ ۰/۳۵ تا ۱/۲ درصد در میلیون سال در این آنالیزها استفاده شد (Donald *et al.*, 2005). آنالیز برای ۳۰ میلیون نسل اجرا و در هر ۱۰۰۰ مرحله نمونه‌گیری انجام شد.

نتایج

ویژگی‌های مورفولوژیک *Cellana karachiensis*

بزرگ‌ترین نمونه اندازه‌گیری شده در این مطالعه ۵۱ میلی‌متر طول داشت. اندازه گزارش شده برای قطر این صدف بین ۲۰ تا ۵۵ میلی‌متر می‌باشد. صدف به رنگ قهوه‌ای روشن و دارای خطوط شعاعی برجسته و محکم است. تعداد زیادی نوار شعاعی

¹ Basic Local Alignment Search Tool

² Fram

³ www.clcbio.com

⁴ Molecular Evolutionary Genetics Analysis

⁵ Alignment

⁶ Phylogenetic Analysis Using Parsimony

⁷ Time to the Most Recent Common Ancestor (TMRCA)

⁸ Nodes

⁹ Substitutional Rates

قهوه‌ای تیره در سطح خارجی آن دیده می‌شود. سطح درونی صدف نقره‌ای‌رنگ بوده و اثر ماهیچه‌ای قهوه‌ای دارد. رادولا در زیر غدد گوارشی و تناسلی قرار گرفته است. تصاویری از نمونه‌های جمع‌آوری شده در شکل ۱ آماده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود تفاوت قابل ملاحظه‌ای در الگوی رنگ و نقوش صدف در نمونه‌های مختلف وجود دارد.

مطالعات مولکولی و فیلوژنی

در مجموع ۴ توالی COI خوانا و قابل تحلیل به‌دست آمد که این توالی‌ها برای نخستین بار از منطقه خلیج فارس گزارش شده است. نمونه‌ها با اسامی HoSp11, BuSp14, BuSp15 و BuSp16 برای رسم درخت فیلوژنی مشخص شدند. مراحل ثبت این توالی‌ها در بانک ژن جهانی به پایان رسیده و شماره دسترسی^{۱۰} آن‌ها در سایت www.ncbi.nih.gov در جدول ۲ قابل مشاهده است.

درخت فیلوژنی

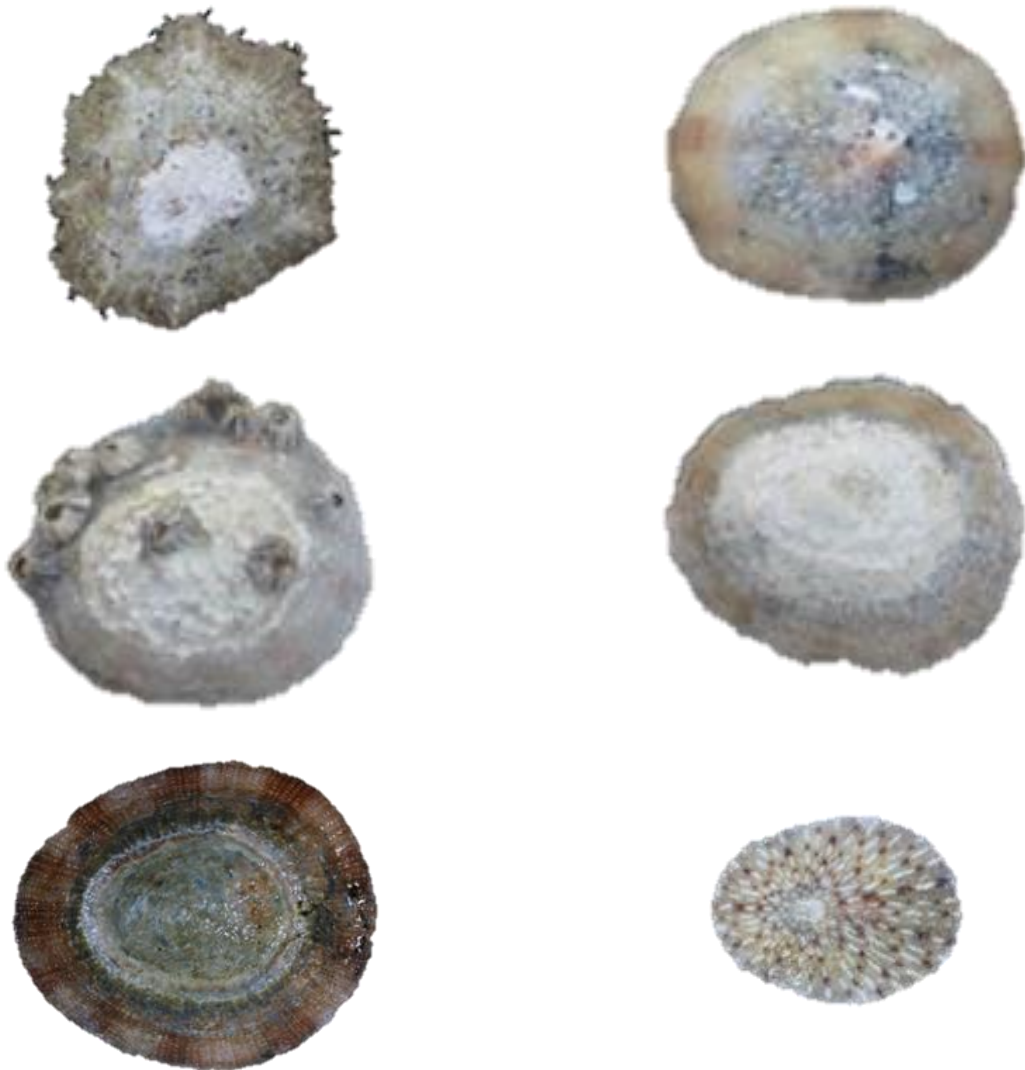
از این گونه ۴ توالی COI به‌دست آمد. نمونه‌های BuSp16, BuSp15, BuSp14 و HoSp11 با آن‌که صدف‌هایی با ظاهری متفاوت داشتند، از نظر مولکولی همگی با گونه *C. karachiensis* از هند تطابق صد در صد داشتند (ارزش بوت‌استرپ $ML=92$ ، $MP=100$ و احتمال پسین ۱) و با دو توالی دیگر از این گونه از کشور عمان، با اندکی اختلاف، در یک کلاد قرار گرفتند که می‌تواند نشانه‌ای از خاستگاه این گونه نیز باشد. درخت‌های رسم شده برای این کلاد در شکل‌های ۲، ۳ و ۴ نمایش داده شده است. با استفاده از نرم‌افزار BEAST قدمت نزدیک‌ترین نیای مشترک کلاد *Cellana* ۶/۳۱ میلیون سال پیش تخمین زده شد.

جدول ۲. شماره دسترسی توالی‌های ثبت شده در سایت NCBI

Accession Number	نام خانواده	اسم ثبت شده	ژن	ردیف
LC060523	Nacellidae	<i>Cellana karachiensis</i>	COI	۱
LC060524	Nacellidae	<i>Cellana karachiensis</i>	COI	۲
LC060525	Nacellidae	<i>Cellana karachiensis</i>	COI	۳
LC060526	Nacellidae	<i>Cellana karachiensis</i>	COI	۴

¹⁰ Accession number

نمای خلفی^{۱۱}



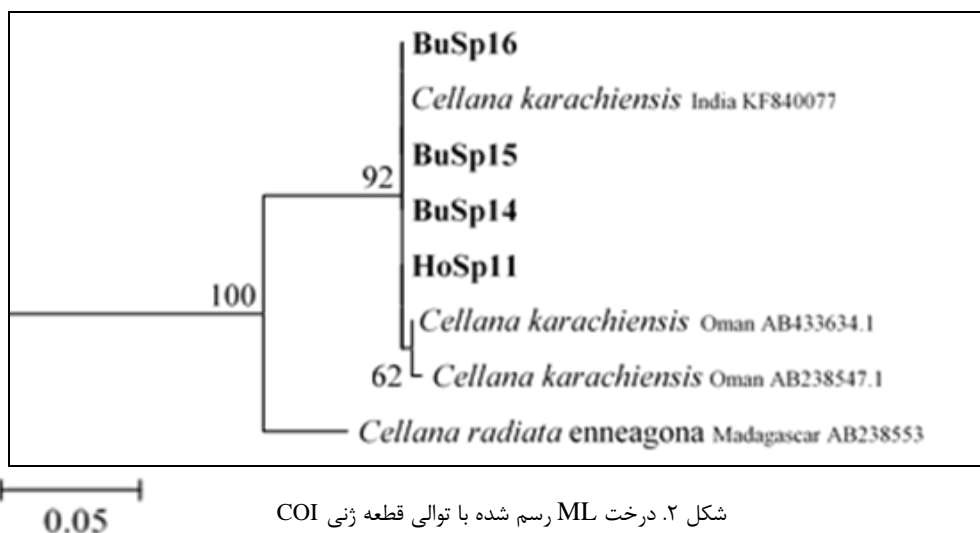
نمای شکمی^{۱۲}



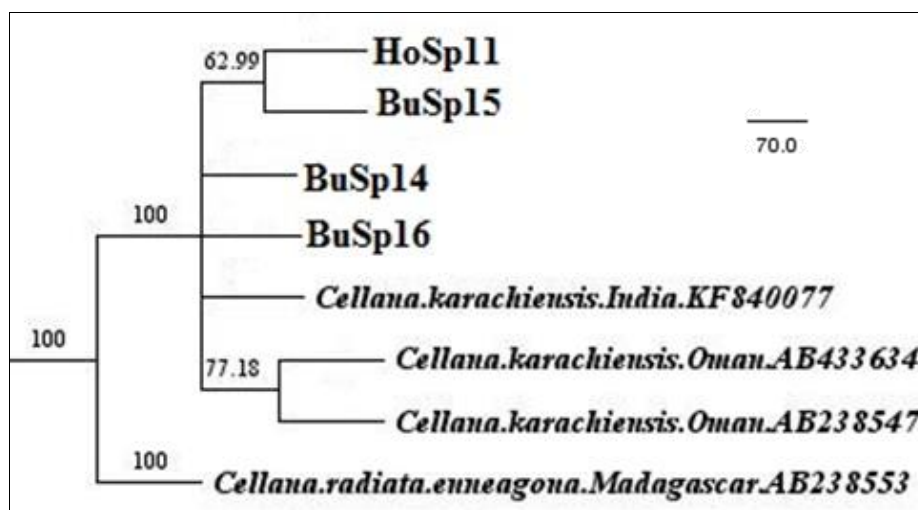
شکل ۱. تصاویری از صدف گونه *Cellana karachiensis* (Winckworth, 1930)

^{۱۱} Posterior view

^{۱۲} Ventral view



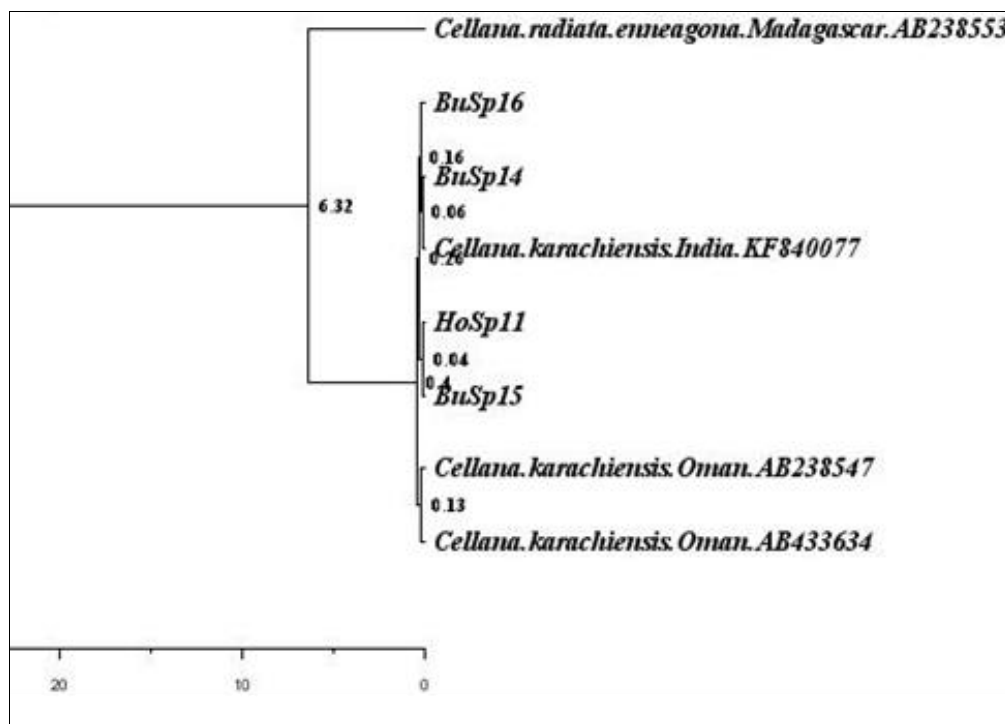
شکل ۲. درخت ML رسم شده با توالی قطعه ژنی COI



شکل ۳. درخت MP رسم شده با توالی قطعه ژنی COI

بحث و نتیجه‌گیری

شناسایی لیمپت‌ها غالباً به علت ویژگی‌های مورفولوژیک متغیر درون‌گونه‌ای صدف و رنگ و طرح آن‌ها بازمانده است (Nakano and Sasaki, 2011). از زمان قبل از لینه تاکنون رده‌بندی‌های پیچیده و گیج‌کننده و الگوهای پراکنش غیرقطعی برای لیمپت‌ها ارائه شده است که گاهی موجب ایجاد فهرست‌های طولی از مترادف‌ها و نمونه‌های شناسایی نشده گشته است (Gofas 2016). از زمان ظهور تکنیک‌های مولکولی رده‌بندی‌های سنتی تحت بازنگری قابل توجهی قرار گرفته‌اند (Willassen et al., 2016). در این پژوهش برای نخستین بار شناسایی مولکولی گونه *C. karachiensis* در سواحل قشم انجام شد؛ تمامی مطالعات گذشته برای رده‌بندی و شناسایی تنها با توجه به ویژگی‌های ریختی این گونه صورت گرفته بود. از این رو هیچ توالی گزارش شده‌ای از آب‌های ایران برای مقایسه و مطالعه بیشتر در دسترس نبود. به همین علت حداکثر تلاش انجام گرفت تا با یافتن توالی‌هایی از این گونه از نزدیک‌ترین آب‌ها به این ناحیه جغرافیایی، شبیه‌ترین توالی‌ها استخراج شود و برای رسم درخت و مقایسه به کار رود.



شکل ۴. درخت BI رسم شده با توالی قطعه ژنی COI

مطالعه مولکولی نمونه‌های BuSp16، BuSp15، BuSp14 و HoSp11 علاوه بر این که تطابق آن‌ها را با گونه *C. karachiensis* نشان داد، مشخص کرد که گونه *C. karachiensis* از خلیج فارس با توالی این گونه از کشور هند تطابق داشته و با دو توالی دیگر از این گونه از عمان تفاوت‌هایی نشان می‌دهد که این مطلب می‌تواند نشان‌دهنده ورود این گونه از جمعیت آن در سواحل شرقی اقیانوس هند باشد. اضافه شدن توالی‌های بیشتر از گونه مذکور از نقاط دیگر سواحل حاشیه‌ای اقیانوس هند در آینده، می‌تواند امکان بررسی‌های بیشتر و ارائه نتایج قطعی‌تر را میسر سازد.

Joseph و همکاران نیز که در سال ۲۰۱۴ شناسایی گروهی از گونه‌های پنهان لیمپت دریایی، *C. karachiensis* در سواحل هند را با استفاده از توالی‌یابی قطعه ژنی میتوکوندریایی COI انجام دادند، اعلام داشتند که روابط فیلوژنی بین سه گروه از لیمپت‌های دریایی که دارای الگوهای رنگی متفاوتی بر روی پوسته خود بودند ۹۹/۵۹ درصد با اولین توالی گزارش شده از گونه *C. karachiensis* در سواحل هند شباهت داشتند که با نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش مطابقت دارد. با وجود اختلافات مورفولوژیک، آنالیزهای فیلوژنی نشان داد که تنها در حدود یک درصد تفاوت نوکلئوتیدی بین این سه نوع وجود دارد (Joseph et al., 2016). آن‌ها بیان داشتند که این تفاوت یک درصدی مشاهده شده در توالی COI احتمالاً بسیار کمتر از آن است که بتوان این انواع را سه گونه مجزا دانست. استخراج جایگاه‌های آمینواسید نشان داد که این انواع می‌توانند مجموعه‌ای از ۳ گونه پنهان *C. karachiensis* باشند.

به نظر می‌رسد جمعیت‌های هند و عمان گونه *C. karachiensis* به‌وسیله پدیده گونه‌زایی آلپاتریک و به‌واسطه جدایی جغرافیایی اشتقاق یافته‌اند. اشتراک زیستگاه بین این گروه از گونه‌های پنهان احتمالاً نشان‌دهنده وقوع گونه‌زایی سیمپاتریک باشد. در این نوع گونه‌زایی اشتقاق گونه‌ها تنها تحت تأثیر عوامل درونی و ژنتیکی است و این شکاف و جدایی بین جمعیت‌های یک گونه می‌تواند در ویژگی‌های چند ژنی نیز رخ دهد. گونه‌زایی سیمپاتریک در واقع یک واگرایی ژنتیکی است که از یک گونه والد منفرد، جمعیت‌های گوناگون حاصل می‌آیند درحالی‌که این جمعیت‌ها در منطقه جغرافیایی یکسانی زیستگاه دارند. به نظر می‌رسد خلیج فارس منبع غنی از گونه‌های ناشناخته باشد که بررسی‌های مولکولی می‌تواند در شناسایی هرچه بیشتر این جانداران مفید واقع گردد.

منابع

- Bosch, D., Dance, S.P., Moolenbeek, R., Oliver, P.G. 1995. *Seashells of Eastern Arabia* Motivate Publishing. pp. 24-186.
- Bouchet, P., Rocroi, J.P., Frýda, J., Hausdorf, B., Ponder, W., Valdés, Á. Warén, A. 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. *International Journal of Malacology*. 47(1-2): 1-397.
- Donald, K.M., Kennedy, M., Spencer, G.S. 2005. Cladogenesis as the result of long-distance rafting events in South Pacific Topshells (Gastropoda, Trochidae). *Evolution*. 59(8): 1701-1711.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*. 29: 1969-1973.
- Faladu, J., Vakani, B., Poriya, P., Kundu, R. 2014. Habitat Preference and Population Ecology of Limpets *Cellana karachiensis* (Winckworth) and *Siphonaria siphonaria*, (Sowerby) at Veraval Coast of Kathiawar Peninsula, India. *Journal of Ecosystems*. 2014(1): 1-6.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5): 294-299.
- Gofas, S. 2016. *Patellogastropoda* in MolluscaBase. Available from <http://www.molluscabase.org>. Accessed 17th November 2017.
- Hosseinzadeh, H., Daghoghi, B., Rameshi, H. 2001. Atlas of the Persian Gulf molluscs. Iranian Fisheries Research Organization, Tehran (Iran Islamic Republic). 248 p (in Persian).
- Jones, D.A. 1986. A field guide to the sea shores of Kuwait and the Persian Gulf. University of Kuwait Blandford Press. Poole, Kuwait. 192 p.
- Joseph, S., Poriya, P., Vakani, B., Singh, S. P., Kundu, R. 2016. Identification of a group of cryptic marine limpet species, *Cellana karachiensis* (Mollusca: Patellogastropoda) off Veraval coast, India, using mtDNA COI sequencing. *Journal Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping Sequencing and Analysis*. 27(2): 1328-31.
- Knudsen, B., Knudsen, T., Flensburg, M., Sandmann, H., Heltzen, M., Andersen, A., Dickenson, M. 2012. CLC Sequence Viewer, 6.7.1. CLC bio.
- McPherson, M.J., Møller, S.G. 2006. PCR Second Edition. Taylor & Francis Group. Second edition. 292 p.
- Misra, S., Kundu, R. 2005. Seasonal variations in population dynamics of key intertidal molluscs at two contrasting locations. *Aquatic Ecology*. 39(3): 315-324.
- Nakano, T., Sasaki, T. 2011. Recent advances in molecular phylogeny, systematics and evolution of Patellogastropod limpets. *Journal of Molluscan Studies*. 77(3): 203-217.
- Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. *Bioinformatics*. 24(1): 581-583.
- Robin, A. 2008. *Encyclopedia of Marine Gastropods*, Ed. IKAN Unterwasser-Archive, ConchBooks. 480 p.
- Rodríguez, F., Oliver, J.F., Marín, A., Medina, J.R. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*. 142(4): 485-501.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MRBAYES3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19(12): 1572-1574.
- Sotelo, G., Morán, P., Posada, D. 2009. Molecular phylogeny and biogeographic history of the European Maja spider crabs (Decapoda, Majidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 53(1): 314-9.
- Swofford, D.L. 2003. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts. USA: Sinauer Associates.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28(10): 2731-2739.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22(22): 4673-4680.

- Valdovinos, C., Ruth, M. 2005. Nacellidae limpets of the southern end of South America: taxonomy and distribution. *Revista Chilena de Historia Natural*. 78(3): 497-517.
- Willassen, E., Bamikole Williams, A., Roger Oskars, T. 2016. New observations of the enigmatic West African *Cellana* limpet (Mollusca: Gastropoda: acellidae), *Marine Biodiversity Records*. 9(60): 1-8.