



Molecular and Morphological Comparison of Two Species of Mugilidae in Southern Coast of The Caspian Sea; Golden grey mullet (*Liza aurata*; Risso,1810) and leaping mullet (*Liza saliens*; Risso,1810)

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Kouhee S.¹ MSc,
Alavi-Yeganeh M.S.¹ PhD,
Ghasemzadeh J.² PhD

How to cite this article

Kouhee S, Alavi-Yeganeh M S, Ghasemzadeh J. Molecular and Morphological Comparison of Two Species of Mugilidae in Southern Coast of The Caspian Sea; Golden grey mullet (*Liza aurata*; Risso,1810) and leaping mullet (*Liza saliens*; Risso,1810). Journal of Fisheries Science and Technology. 2018;7(3):231-237.

¹Marine Biology Department, Marine Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Nur, Iran

²Fisheries Department, Marine Sciences Faculty, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

*Correspondence

Address: Marine Biology Department, Marine Sciences Faculty, Nour, Mazandaran, Iran. Postal Code: 461776489

Phone: +98 (11) 44559952

Fax: +98 (11) 44553499

malavi@modares.ac.ir

Article History

Received: December 31, 2017

Accepted: March 10, 2018

ePublished: September 22, 2018

ABSTRACT

Golden grey mullet (*Liza aurata*) and leaping mullet (*Liza saliens*) are two species from Mugilidae which inhabit the Caspian Sea. Despite the difference in the number of Pyloric caeca, lateral line scale, and gill rakers, diagnosis between two species regarding morphological plasticity is relatively difficult. In this experimental study, in addition to access previous morphological diagnostic characters, 31 morphometric and 10 meristic characters were surveyed. Also, *COI* gene sequence used to confirm accurate identification of these two commercial species in the Caspian Sea. In this way 25 samples were used for biometry. Samples were collected from Nur and Anzali cities beach sein fishing center in autumn and winter 2016. Among surveyed morphological characters, 3 meristic and 15 morphometric characters revealed a significant difference ($p < 0.05$), respectively. Regarding the principal component analysis (PCA) results, Pre-pectoral fin length, Pelvic fin length, Anal fin base length, Caudal peduncle width, Anal fin height and Head width, within Morphometric characters and Second dorsal fin rays, lateral line scale number, number of Gill rakers and Pyloric caeca were among meristic characters which reveals highest load factor (>0.7) in discrimination of two species specimens. Regarding genetic distances, the between-group distance estimated 40bp (6.8%) or 0.078 K2P that well agreed with morphological identification. Results revealed the application of more morphological characters in the diagnosis of two Mullet species in the Caspian sea which could be useful in completing identification keys.

Keywords Cytochrome Oxidase subunit 1 gene; Caspian Sea; Mugilidae

CITATION LINKS

[1] The Mugilidae of the ... [2] Bony fishes order mugiliformes ... [3] Fishes of the ... [4] Catalog of fishes, electronic ... [5] Systematics of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): Molecular phylogenetic evidence challenges two ... [6] The living marine resources of the Western Central Atlantic ... [7] Coastal fishes of ... [8] Freshwater fishes of ... [9] Biodiversity of fishes of the Southern basin of the Caspian ... [10] The catch composition of the beach seine fishery in Southeast of the ... [11] Culture of two mullet species from the Mazandaran sea in brackish waters of Iran ... [12] Status of Mugilidae fisheries in the Iranian coast of Caspian ... [13] Western Indian ocean, fishing area 51. Rome: Food and Agriculture Organization ... [14] Biological identifications through DNA ... [15] BOLD: The Barcode of Life Data System ... [16] Mitochondrial phylogeny of grey mullets (Acanthopterygii ... [17] Multilocus resolution of Mugilidae phylogeny ... [18] Molecular phylogeny of mullets (Teleostei: Mugilidae) in Iran based on mitochondrial ... [19] Molecular phylogeny of Mugilidae fishes ... [20] Past: Paleontological statistics software package for education and data ... [21] A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid ... [22] Mugil curema in Argentinean waters: Combined morphological and molecular ... [23] MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony ... [24] A revision of the genera of mullets, fishes of the family Mugilidae, with descriptions of three new ... [25] Phylogenetic interrelationships of the mullets (Pisces ... [26] The Pharyngobranchial organ of mugilid fishes, its structure, variability, ontogeny, possible function and ... [27] Phylogeny and systematics of Indo-Pacific mullets ... [28] Morphological comparison of Alosa shad species using morphometric ... [29] Scandinavian fishing year ... [30] Rapid color change in fish and amphibians - function, regulation, and emerging ... [31] Background matching and color-change plasticity in colonizing ... [32] Morphometric and meristic characteristics ... [33] Study of some biological features of mullets in Iranian coasts ... [34] Investigation morphometric and meristic of leaping mullet (*Liza saliens* Risso, 1810) in the coast of Bandar Anzali ... [35] Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets ... [36] Molecular phylogeny of grey mullets (Teleostei: Mugilidae) in ...

مقایسه ریختی و مولکولی دو گونه از کفال ماهیان سواحل جنوبی دریای خزر؛ کفال طلایی (*Liza aurata*; Risso, 1810) و کفال پوزه باریک (*Liza saliens*; Risso, 1810)

ساناز کوهی MSc

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

محمدصادق علوی‌یگانه PhD

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

جواد قاسم‌زاده PhD

گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

چکیده

دو گونه از کفال ماهیان با نام‌های کفال طلایی (*Liza aurata*) و کفال پوزه باریک (*Liza saliens*) در دریای خزر زیست می‌کنند. علی‌رغم تفاوت‌های تشریحی و ریختی مانند تعداد زوائد باب‌المعده‌ای، تعداد فلس روی خط جانبی و خارهای آبششی در منابع، تمایز ریختی این دو گونه با توجه به شکل‌پذیری ریختی تا حدی دشوار است. در این مطالعه تجربی ضمن بررسی مجدد اختلافات ریختی تشریح‌شده قبلی به بررسی مقایسه‌ای ۳۱ صفت اندازه‌شی و ۱۰ صفت شمارشی ریختی پرداخته شد. همچنین توالی ژن *COI* به‌منظور تایید شناسایی این دو گونه تجاری به کار رفت. تعداد ۲۵ نمونه از هر گونه از صیدگاه‌های پره واقع در شهرستان‌های نور و انزلی طی پاییز و زمستان ۱۳۹۵ جمع‌آوری و زیست‌سنجی شد. از میان صفات اندازه‌شی و شمارشی مورد بررسی به‌ترتیب ۱۵ و ۳ صفت در مقایسه دو گونه اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$). براساس نتایج آزمون تحلیل به مولفه‌های اصلی، صفات طول پیش‌باله سینه‌ای، باله شکمی، پایه باله مخرجی، عرض ساقه دم و ارتفاع باله مخرجی نسبت به طول استاندارد و همچنین عرض سر نسبت به طول سر و بین صفات شمارشی، تعداد شعاع باله پشتی دوم، فلس‌های خط جانبی، خار آبششی و زوائد باب‌المعده‌ای دارای بیشترین بار عاملی (۰/۷) در جدایی دو گونه بودند. فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای ۴۰ جفت‌باز (معادل ۶/۸٪) یا ۰/۰۷۸ (فاصله دو عامله کیمورا) محاسبه شد که به‌خوبی تاییدکننده شناسایی ریختی صورت گرفته بود. نتایج بیانگر کارایی دیگر صفات ریختی در تمایز دو گونه کفال‌ماهی دریای خزر است که می‌تواند در تکمیل کلیدهای شناسایی موجود مفید واقع شود.

کلیدواژه‌ها: ژن سیتوکروم/کسیداز زیر واحد ۱، دریای خزر، کفال ماهیان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۹

*نویسنده مسئول: malavi@modares.ac.ir

مقدمه

خانواده کفال‌ماهیان (Mugilidae) مشتمل بر حدود ۲۰ جنس و ۷۰ گونه با نام عمومی Mullet از ماهیان اقتصادی باارزش و واجد پراکنش گسترده در آب‌های جهان هستند^[1-5]. این خانواده از جنبه‌های بوم‌شناختی و فیزیولوژیک مورد توجه محققین هستند، زیرا قدرت سازگاری به محدوده وسیعی از تغییرات دما، شوری و شرایط تغذیه‌ای را دارند^[2, 6]. از مشخصات ریختی و تشریحی کفال‌ماهیان می‌توان به بدن کشیده و فشرده از طرفین، سر فشرده از بالا و پایین، ناحیه عریض و فلس‌دار بین چشمی، دهان کوچک و عموماً به شکل ۷ وارونه، دو باله پشتی کاملاً مجزا، باله سینه‌ای فوقانی، فقدان خط جانبی یا تحلیل رفته و معده عضلانی سنگدان‌مانند اشاره کرد^[1, 5, 7]. در ایران گونه‌های کفال‌ماهیان در

دریای خزر، خلیج فارس و دریای عمان یافت می‌شوند که دو گونه کفال طلایی و کفال پوزه باریک با نام‌های علمی *Liza aurata* و *Liza saliens* در دریای خزر زیست می‌کنند. این دو گونه در سال‌های ۱۹۳۰ تا ۱۹۳۴ از دریای سیاه به‌صورت موفقیت‌آمیز به این دریا معرفی شده‌اند و پراکنش طبیعی آنها در دریای مدیترانه، سیاه و شرق اقیانوس اطلس است^[8]. پراکنش و تراکم این دو گونه در سواحل جنوبی خزر متفاوت است به‌طوری که کفال پوزه باریک در تالاب گمیشان و خلیج گرگان و کفال طلایی در منطقه بابل‌سر بیشتر یافت می‌شود^[9]. علی‌رغم این که این کفال‌ماهیان بیشترین میزان صید در پره‌های ساحلی را به خود اختصاص می‌دهند (۵۲/۶٪)^[10] و از جمله ذخایر مهم شیلاتی و از ماهیان قابل تکتیر در شرایط مصنوعی و نیمه‌مصنوعی هستند^[11] اما از نظر بهره‌برداری و حفاظت در سطح گونه مورد توجه قرار نداشته و عموماً آمار مربوط به هر دو گونه بدون تفکیک در قالب کفال مستخرج می‌شود. این در حالی است که در مطالعات موردی آمار مربوط به صید کفال پوزه باریک بسیار کمتر از کفال طلایی گزارش شده است^[10, 12]. این موضوع به‌ویژه با توجه به بیماری ویروسی کفال‌ماهیان در سال‌های اخیر از اهمیت بیشتری برخوردار است. در منابع موجود صفات مورد استفاده در تمایز این دو گونه مربوط به تعداد خارهای آبششی، الگوی فلس‌داربودن ناحیه پوزه، تعداد و اندازه ضمایم است^[8, 9, 13].

استفاده از تکنیک خط‌شناسه DNA یکی از راه‌های ایجاد یک سیستم سریع، دقیق و مقرون‌به‌صرفه برای شناسایی گونه‌های مختلف جانوری است که شامل استفاده از ژن‌هایی با توالی کوتاه و استاندارد جهت ساختن یک بانک ژنی از گونه‌های شناخته شده است. به اعتقاد هبرت و همکاران^[14]، توالی ژن *COI* از میتوکندری به‌تنهایی برای تمایز تمام گونه‌های جانوران از یکدیگر کارایی داشته و می‌تواند به شکل ابزاری جهان‌شمول به‌عنوان خط‌شناسه گونه‌های جانوری به کار آید. این ژن همچنان به‌عنوان یک ابزار نیرومند تبارشناسی استفاده شده و دارای بانک اطلاعاتی مخصوص با پشتوانه مالی و علمی قوی است^[15]. مطالعات مولکولی متعددی براساس توالی‌یابی ژن میتوکندریایی *COI* جهت بازنگری و اعتباربخشیدن به درخت تبارشناسی خانواده کفال‌ماهیان نیز انجام شده است^[5, 16-19].

با توجه به این که شناسایی دقیق و علمی، نقش مهمی در به‌کارگیری راهکارهای مناسب برای حفظ و مدیریت ذخایر دارد، در این تحقیق با توجه به اهمیت شیلاتی و شباهت بالای این دو گونه، ضمن استفاده از صفات تشریحی ذکرشده در منابع قبلی تلاش شد تا با بررسی اختلافات صفات ریختی اندازه‌شی و شمارشی، به سایر تفاوت‌های متمایزکننده این دو گونه در آب‌های جنوبی دریای خزر پرداخته شود. ضمن اینکه از داده‌های مولکولی به‌دست‌آمده برای تایید و تکمیل نتایج ریختی استفاده شد. وضعیت تبارشناسی نمایندگان این دو گونه از دیگر نقاط نیز بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر تعداد ۲۵ عدد از هر یک از گونه‌های مورد بررسی پس از جمع‌آوری از سواحل شهرستان‌های نور و انزلی به آزمایشگاه منتقل و در فرمالین بافر ۴٪ تثبیت و با کدهای TAC1058F و TAC1153F در کلکسیون جانوران آبرزی دانشگاه تربیت‌مدرس ثبت شدند. قبل از تثبیت در فرمالین، از ۳ عدد ماهی

گونه به ترتیب در جدول های ۳ و ۴ نمایش داده شده است. بر این اساس دو گونه در صفات اندازه‌شناسی نسبی شامل ارتفاع بدن از منشا باله دوم پشتی، طول پیش‌باله پشتی اول، پیش‌باله پشتی دوم، پیش‌باله مخرجی، باله شکمی، پایه باله پشتی اول، پایه باله پشتی دوم، پایه باله مخرجی، عرض ساقه دم، ارتفاع ساقه دم، فاصله باله سینه‌ای تا باله شکمی، ارتفاع باله مخرجی، قطر چشم، فاصله بین دو چشم و عرض سر دارای اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) بودند. همچنین در صفات شمارشی نیز تعداد فلس خط جانبی و خار آیشی به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) متفاوت بودند.



شکل ۱) نمونه ماهی و زوائد باب‌المعدی کفال طلایی (بالا) و کفال پوزه باریک (پایین) صیدشده از سواحل جنوبی دریای خزر

جدول ۳) میانگین آماری زیست‌سنجی ۳۱ صفت شمارشی در دو گونه کفال طلایی و کفال پوزه‌باریک در سواحل جنوبی دریای خزر

صفت	کفال طلایی	کفال پوزه‌باریک
نسبت به طول استاندارد (SL)		
طول کل	۱/۲۳±۰/۰۴	۱/۲۲±۰/۰۲
طول چنگالی	۱/۱۱±۰/۰۲	۱/۱۲±۰/۰۲
ارتفاع بدن از منشا باله اول پشتی	۰/۲۱±۰/۰۱	۰/۲۱±۰/۰۱
ارتفاع بدن از منشا باله دوم پشتی*	۰/۱۸±۰/۰۱	۰/۱۷±۰/۰۱
طول پیش‌باله پشتی اول*	۰/۴۹±۰/۰۲	۰/۵۰±۰/۰۲
طول پیش‌باله پشتی دوم*	۰/۷۲±۰/۰۲	۰/۷۳±۰/۰۱
طول پیش‌باله سینه‌ای	۰/۲۵±۰/۰۱	۰/۲۶±۰/۰۲
طول پیش‌باله شکمی	۰/۳۶±۰/۰۱	۰/۳۸±۰/۰۲
طول پیش‌باله مخرجی*	۰/۶۸±۰/۰۱	۰/۷۳±۰/۰۲
طول باله سینه‌ای	۰/۱۹±۰/۰۱	۰/۲۰±۰/۰۱
طول باله شکمی*	۰/۱۶±۰/۰۱	۰/۱۴±۰/۰۱
طول پایه باله پشتی اول*	۰/۰۷±۰/۰۱	۰/۰۸±۰/۰۱
طول پایه باله پشتی دوم*	۰/۱۰±۰/۰۱	۰/۰۹±۰/۰۱
طول پایه باله مخرجی*	۰/۱۳±۰/۰۱	۰/۰۹±۰/۰۱
عرض ساقه دم*	۰/۰۵	۰/۰۴±۰/۰۱
ارتفاع ساقه دم*	۰/۰۹	۰/۱۰
فاصله باله سینه‌ای تا باله شکمی*	۰/۱۶±۰/۰۲	۰/۱۸±۰/۰۱
فاصله باله شکمی تا باله مخرجی	۰/۳۵±۰/۰۳	۰/۳۶±۰/۰۲
فاصله باله پشتی اول و دوم	۰/۲۳±۰/۰۱	۰/۲۳±۰/۰۲
ارتفاع باله پشتی اول	۰/۱۴±۰/۰۱	۰/۱۳±۰/۰۱
ارتفاع باله پشتی دوم	۰/۱۴±۰/۰۱	۰/۱۴±۰/۰۱
طول ساقه دم	۰/۱۹±۰/۰۱	۰/۱۹±۰/۰۱
ارتفاع باله مخرجی*	۰/۱۷±۰/۰۱	۰/۱۴±۰/۰۲
طول سر	۰/۲۴±۰/۰۱	۰/۲۴±۰/۰۱
نسبت به طول سر (HL)		
ارتفاع سر	۰/۶۸±۰/۰۳	۰/۶۹±۰/۰۳
طول پوزه	۰/۲۳±۰/۰۱	۰/۲۴±۰/۰۲
قطر چشم*	۰/۲۲±۰/۰۱	۰/۲۴±۰/۰۲
فاصله بین دو چشم*	۰/۳۴±۰/۰۱	۰/۳۶±۰/۰۳
طول پس‌چشمی	۰/۵۲±۰/۰۲	۰/۵۳±۰/۰۳
عرض سر*	۰/۵۹±۰/۰۳	۰/۵۶±۰/۰۲

علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$)

از هر گونه، باله‌های سینه‌ای جدا و به‌منظور انجام مطالعات مولکولی در اتانول ۹۶٪ تثبیت شدند. شناسایی و تفکیک گونه‌ها با استفاده از صفات تشریحی انجام شد [8]. ده نمونه بالغ از هر گونه برای بررسی ۳۱ صفت اندازه‌شناسی و ۱۰ صفت شمارشی انتخاب شد. صفات اندازه‌شناسی با استفاده از ریزسنگ عقریه‌ای با دقت ۰/۰۲ میلی‌متر و صفات شمارشی با کمک استریومیکروسکوپ مدل HP-smp-180 (ایالات متحده) بررسی شد.

به‌منظور بررسی اختلاف معنی‌دار بین صفات ریختی، پس از انجام آزمون توزیع نرمال، از آزمون غیرجفتی در نرم‌افزار SPSS 16 و برای بررسی مهم‌ترین صفات موثر بر اختلاف دو گونه از آزمون تحلیل به مولفه‌های اصلی (PCA) برای صفات واجد اختلاف معنی‌دار، در نرم‌افزار PAST 3.14 استفاده شد [20]. تشخیص تناسب داده‌ها برای انجام تحلیل عاملی با استفاده از آماره KMO انجام شد (بالتر از ۰/۵).

استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم انجام شد [21]. از پرایمرهای Fish-F1، Fish-F2 و Fish-R2 طبق شرایط دمایی بهینه برگرفته از شرایط تحقیق هراس و همکاران برای تکثیر ژن COI استفاده شد [22] (جدول ۱ و ۲).

کیفیت محصول PCR، تک‌باندبودن و وزن مولکولی قطعه تکثیرشده با استفاده از الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با رنگ سایبرگرین ارزیابی شد.

به‌منظور شناسایی مولکولی، توالی‌های به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر به کمک ابزار اینترنتی بلاست با توالی‌های موجود در بانک ژنی همردیف (Align) و سپس به‌منظور تحلیل جایگاه تبارشناسی از دیگر توالی‌های این دو گونه که در بانک ژنی موجود است برای مقایسه منطقه‌ای استفاده شد. درخت تبارشناسی با روش حداکثر تشابه (MT) و با استفاده از مدل جایگزینی HKY+G و پشتوانه تکرار ۱۰۰۰، به کمک نرم‌افزار Mega 6 ترسیم شد [23]. توالی‌های ثبت‌شده برای هر دو گونه مورد بررسی و همچنین گونه‌های مربوط به جنس‌های Chelon، Ellochelon، Liza و Planiliza از بانک ژن استخراج شد و برای تعیین جایگاه تبارشناسی هاپلوتایپ‌های شناسایی‌شده مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱) توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر بخشی از ژن COI در خانواده کفال‌ماهیان

نام آغازگر	توالی آغازگر
Fish F1	5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'
Fish F2	5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3'
Fish R2	5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'

جدول ۲) شرایط دمایی برای واکنش PCR [22]

مرحله	زمان (ثانیه)	دما (°C)
واشرشته‌سازی اولیه	۱۸۰	۹۴
واشرشته‌سازی	۴۵	۹۴
هم‌سرشته‌سازی	۴۵ و ۵۲	۵۷
بسط	۶۰	۷۲
بسط نهایی	۳۰۰	۷۲

مجموع تعداد چرخه برای مراحل واشرشته‌سازی، هم‌سرشته‌سازی و بست ۳۵ سیکل بود.

یافته‌ها

ریخت‌شناسی: در مجموع تعداد ۲۵ کفال پوزه باریک و ۲۵ کفال طلایی از ایستگاه‌های نور و بندر انزلی جمع‌آوری شد (شکل ۱). مقادیر میانگین صفات اندازه‌شناسی و شمارشی برای ۲۰ نمونه از هر دو

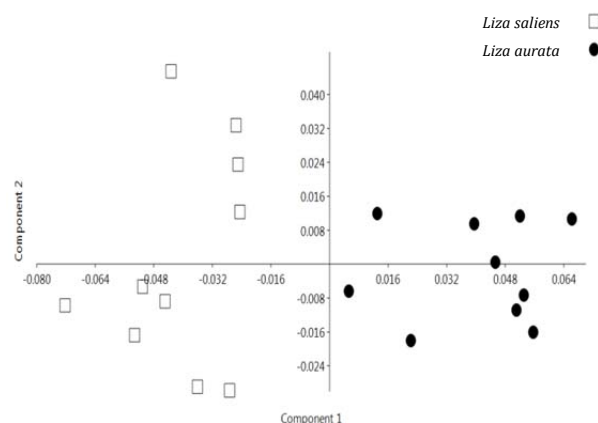
جدول ۴) نتایج زیست‌سنجی ۱۰ صفت شمارشی در دو گونه کفال طلایی و کفال پوزه باریک از سواحل جنوبی دریای خزر

صفت	کفال پوزه باریک	کفال طلایی
میانگین (دامنه تغییرات)	میانگین (دامنه تغییرات)	میانگین (دامنه تغییرات)
خار باله پشتی اول	۴	۴
شعاع باله پشتی دوم*	I+۷	I+۸
خار باله مخرجی	۳	۳
شعاع باله مخرجی	۹	۹
شعاع باله سینه‌ای	۱۵	۱۵
شعاع باله شکمی	I+۵	I+۵
تعداد فلس خط جانبی*	۴۴ (۴۴-۴۶)	۴۰ (۳۸-۴۰)
تعداد فلس اریب پشتی	۷	۷
خار آبششی*	۶۵ (۶۳-۷۰)	۱۱۲ (۹۹-۱۱۵)
زوائد باب‌المعدی*	۳s+۴b	۶s

علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$): s: زوائد کوچک؛ b: زوائد باب‌المعدی بزرگ

نتایج بیانگر مقادیر معنی‌دار بیشتر ($p < 0.05$) در صفت‌های ارتفاع بدن در منشا باله پشتی دوم، طول باله لگنی، طول پایه باله پشتی دوم، طول پایه باله مخرجی، پهنای ساقه دم و ارتفاع باله مخرجی نسبت به طول استاندارد و عرض سر نسبت به طول سر در گونه کفال طلایی نسبت به گونه کفال پوزه باریک بود. همچنین به شکل معنی‌داری ($p < 0.05$) طول پیش‌باله پشتی اول، طول پیش‌باله پشتی دوم، طول پیش‌باله مخرجی، طول پایه باله پشتی اول، ارتفاع ساقه دم و فاصله باله سینه‌ای تا باله شکمی نسبت به طول استاندارد و قطر چشم و فاصله بین دو چشم نسبت به طول سر در گونه کفال پوزه باریک بیشتر از گونه کفال طلایی بود. دامنه تغییرات در تعداد فلس خط جانبی در کفال طلایی بین ۳۸-۴۰ عدد و در کفال پوزه باریک بین ۴۴-۴۶ عدد متغیر بود. همچنین تعداد خار آبششی در کفال طلایی ۹۹-۱۱۵ و در کفال پوزه باریک ۶۳-۷۰ عدد مشاهده شد.

براساس نتایج آزمون تحلیل به مولفه‌های اصلی (PCA) (جدول ۵، نمودار ۱)، صفات اندازه‌گیری همچون طول پیش باله سینه‌ای، باله شکمی، پایه باله مخرجی، عرض ساقه دم و ارتفاع باله مخرجی نسبت به طول استاندارد و همچنین عرض سر نسبت به طول سر بیشترین سهم (بار عاملی بیشتر از ۰/۷) را در تمایز دو گونه داشتند. در صفات شمارشی نیز تعداد شعاع باله پشتی دوم، فلس خط جانبی، خار آبششی و زوائد بیشترین تاثیر (بار عاملی بیشتر از ۰/۷) را در جدایی دو گونه نشان دادند.



نمودار ۱) نمودار تحلیل به مولفه‌های اصلی (PCA) برای صفات اندازه‌گیری در دو گونه کفال طلایی و کفال پوزه باریک

جدول ۵) مقادیر بار عاملی صفات اندازه‌گیری و شمارشی در دو مولفه اول از آزمون تحلیل به مولفه‌های اصلی (PCA) مربوط به دو گونه کفال طلایی و کفال پوزه باریک

انواع صفات	مولفه اول	مولفه دوم
صفات اندازه‌گیری		
ارتفاع بدن از منشا باله دوم پشتی	۰/۶۹۵	۰/۴۴۲
طول پیش باله پشتی اول	۰/۴۹۷	۰/۳۴۱
طول پیش باله پشتی دوم	۰/۵۲۷	۰/۳۱۵
طول پیش باله سینه‌ای	۰/۸۸۲	۰/۲۵۳
طول باله شکمی	۰/۷۵۵	۰/۲۶۱
طول پایه باله پشتی اول	۰/۴۴۰	۰/۴۹۲
طول پایه باله پشتی دوم	۰/۵۸۴	۰/۱۴۶
طول پایه باله مخرجی	۰/۹۴۱	۰/۱۲۳
عرض ساقه دم	۰/۷۸۳	۰/۰۰۳
ارتفاع ساقه دم	۰/۵۱۰	۰/۵۰۱
فاصله باله سینه‌ای تا باله شکمی	۰/۵۴۶	۰/۰۶۵
ارتفاع باله مخرجی	۰/۷۸۴	۰/۲۰۹
عرض سر	۰/۸۵۴	۰/۳۴۵
عرض بین دو چشم	۰/۵۹۰	۰/۱۲۹
قطر چشم	۰/۵۸۷	۰/۷۰۰
واریانس	۵۷/۹۱	۱۱/۰۴
صفات شمارشی		
خار باله پشتی اول	۰	۰
شعاع باله پشتی دوم*	۰/۹۹۸۱	۰/۰۰۰۶
خار باله مخرجی	۰	۰
شعاع باله مخرجی	۰	۰
شعاع باله سینه‌ای	۰	۰
شعاع باله شکمی	۰	۰
فلس‌های خط جانبی*	۰/۹۴۱۲	۰/۳۳۷۶
فلس‌های اریب پشتی	۰	۰
خار آبششی*	۰/۹۹۹۹	۰/۰۰۶
زوائد باب‌المعدی*	۰/۹۹۸۱	۰/۰۰۰۶
واریانس	۹۹/۷۸	۰/۲۱

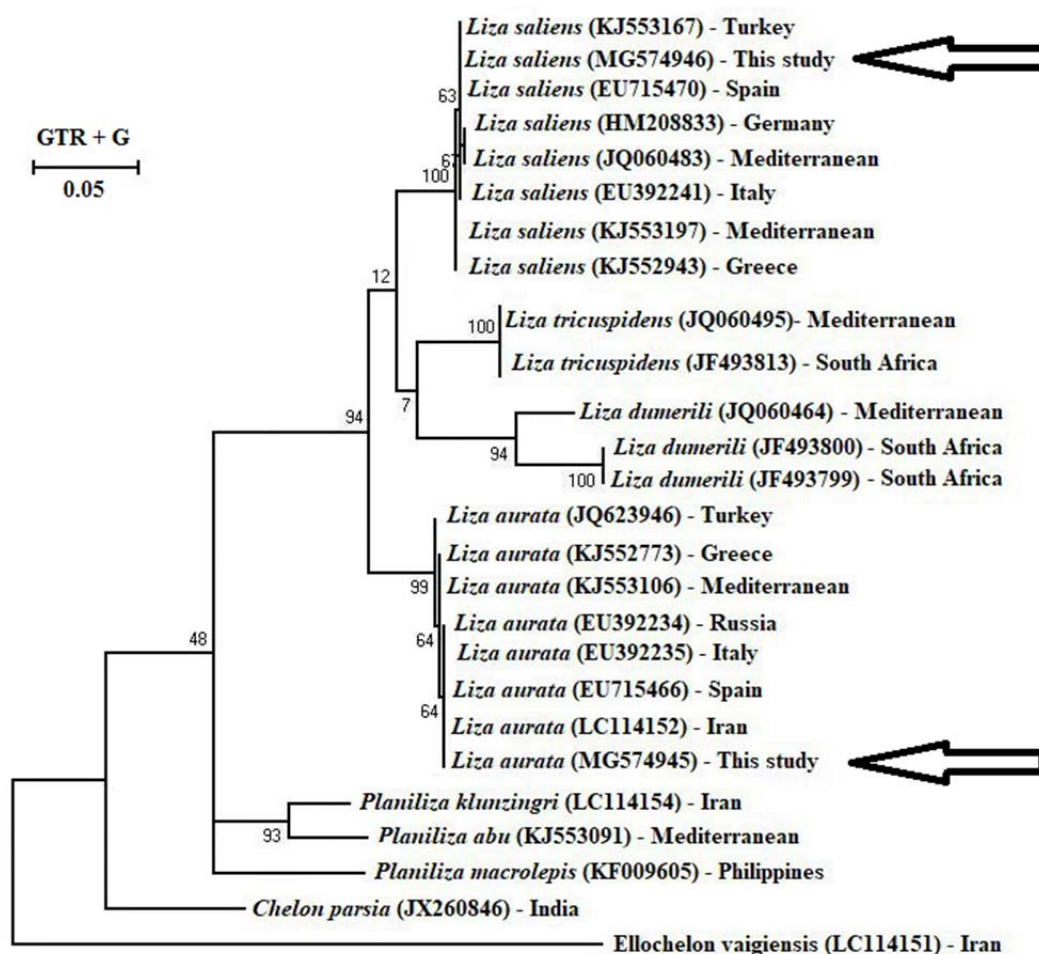
مقادیر بار عاملی بیش از ۰/۷ به صورت برجسته نمایش داده شده است

در صفات شمارشی علاوه بر دو صفت تعداد فلس خط جانبی و تعداد خار آبششی که در آزمون مقایسه میانگین اختلاف معنی‌داری داشتند، دو صفت شعاع باله پشتی دوم و زوائد باب‌المعدی نیز دارای بار عاملی بیشتر از ۰/۷ بودند که در گونه کفال طلایی تعداد شعاع باله پشتی دوم ۹ و در کفال پوزه باریک ۸ عدد، تعداد زوائد باب‌المعدی در کفال طلایی ۶ زائده هم‌اندازه و در گونه کفال پوزه باریک ۷ زائده غیرهم‌اندازه (۳ کوچک و ۴ بزرگ) بودند (شکل ۱).

مولکولی: قطعه‌ای به طول ۵۸۵ جفت‌باز از ژن *COI* برای هر یک از دو گونه توالی‌یابی شد. در حالی که هر سه نمونه توالی‌یابی‌شده از هر گونه بیانگر یک هاپلوتایپ یکسان بودند و فاصله درون‌گونه‌ای معادل صفر محاسبه شد، فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای ۴۰ جفت‌باز (معادل ۶/۸٪) یا ۰/۰۷۸ (فاصله دو عامله کیمورا) در مقایسه بین دو گونه مشاهده شد. توالی مربوط به هر یک از هاپلوتایپ‌ها با شماره دسترسی MG574945 و MG574946 در بانک ژن (NCBI) ثبت شد. همچنین از توالی‌های گونه‌های کفال طلایی و پوزه باریک موجود در بانک ژنی به منظور مقایسه با توالی هاپلوتایپ‌های شناسایی‌شده در درخت تبارشناسی استفاده شد. از روش حداکثر تشابه، با استفاده از مدل GTR+G و پشتیبان تکرار ۱۰۰۰ برای ترسیم درخت استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده بیانگر

مقایسه ریختی و مولکولی دو گونه از کفال ماهیان سواحل جنوبی دریای خزر؛ کفال طلایی... ۲۳۵
(LC114151) از خانواده کفال ماهیان با توجه به فاصله ژنتیکی زیاد با سایر جنس‌های این خانواده، به عنوان برون‌گروه استفاده شد. در درخت تبارشناسی، دو گونه با پشتوانه تکرار ۹۴٪ به دو شاخه مجزای هم‌تبار تقسیم شدند.

قرارگیری هاپلوتایپ‌های شناسایی‌شده از این تحقیق و هاپلوتایپ‌های قبلی گزارش‌شده از هر گونه در کنار هم و در قالب دو شاخه هم‌تبار مجزا بود (شکل ۲). از توالی گونه *Ellochelon* *vigiensis* موسوم به Squaretail Mullet گزارش‌شده از ایران



شکل ۲) درخت تبارشناسی به منظور تعیین جایگاه تبارشناسی هاپلوتایپ‌های شناسایی‌شده از دو گونه کفال طلایی و کفال پوزه باریک در کنار هاپلوتایپ‌های سایر گونه‌های خویشاوند از خانواده کفال ماهیان به روش حداکثر تشابه

از سوراخ‌های بینی عبور می‌کند و پلک چربی ناقص دیده می‌شود، [2, 8, 9, 13, 26]. تمام صفات مورد اشاره تشریحی بوده و به صفات شمارشی و اندازشی ظاهری در تمایز این دو گونه اشاره نشده است. از دیگر صفاتی که در منابع به عنوان ویژگی ظاهری متمایزکننده دو گونه بیان شده، می‌توان به وجود لکه طلایی رنگ روی سرپوش آبششی گونه کفال طلایی اشاره نمود. چنانچه نام عمومی کفال طلایی بر همین مبنا انتخاب شده است [29]. اما در تحقیق حاضر این لکه طلایی رنگ در تمامی نمونه‌های هر دو گونه تاحدی مشاهده شد. بنابراین به نظر می‌رسد صفت فوق فاقد ارزش آرایه‌شناسی باشد. رنگ بدن در منابع برای هر دو گونه آبی-خاکستری در ناحیه پشتی بدن و نقره‌ای در ناحیه شکم گزارش شده بود [8] اما در این بررسی رنگ بدن کفال پوزه باریک در ناحیه پشت بدن زیتونی-خاکستری و در پهلوها خاکستری روشن مشاهده شد. هر دو گونه دارای ۴ الی ۵ خط طولی‌اند که در گونه کفال طلایی این خطوط واضح‌تر بود. البته صفات مربوط به رنگ در آرایه‌شناسی از ارزش زیادی برخوردار نبوده و تحت تاثیر شرایط

بحث

مطالعه ویژگی‌های ریخت‌شناسی برای توصیف و شناسایی گونه‌های کفال ماهیان از پیشینه‌ای طولانی برخوردار بوده [1, 24-27] و شناسایی مولکولی نیز در گونه‌های با شباهت ریختی بالا از ابزارهای مکمل در بازنگری تبارشناسی و شناسایی دقیق گونه‌های این خانواده محسوب می‌شوند [19, 28]. از صفات مهم در شناسایی و تمایز دو گونه کفال طلایی و پوزه باریک در کلیدهای شناسایی می‌توان به تعداد شکاف روی فلس‌های جانبی، تعداد و اندازه زوائد، الگوی فلس روی پوزه و شکل استخوان پیش‌چشمی اشاره کرد. کفال طلایی با داشتن یک شکاف روی فلس‌های جانبی، ۶ زائده هم‌اندازه باب‌المعده‌ای، وجود یک ردیف فلس روی پوزه که به سوراخ‌های بینی نمی‌رسد، پلک چربی تحلیل‌رفته، قرارگیری امتداد گوشه دهان در جلوی بینی و برجسته‌بودن لبه عقبی استخوان پیش‌چشمی از کفال پوزه باریک شناخته می‌شود. در حالی که در گونه پوزه باریک دو شکاف روی فلس جانبی، ۷ زائده با اندازه متفاوت (۳ کوچک و ۴ بزرگ)، چند ردیف فلس روی پوزه که

زیستگاه است [30, 31]. همچنین بریدگی باله دمی در کفال طلایی V شکل و در کفال پوزه باریک کمائی مشاهده شد.

در مقایسه صفات شمارشی، مقادیر میانگین در صفات تعداد خار آبششی، فلس خط جانبی، زوائد و شعاع منشعب باله پشتی دوم در دو گونه واجد اختلاف معنی‌دار بودند که این امر به‌جز صفت تعداد شعاع باله پشتی دوم در سایر موارد هم‌راستا با گزارشات قبلی موجود بود [32-34]. در دیگر صفات هیچ‌گونه اختلافی مشاهده نشد. اختلاف در صفت تعداد شعاع منشعب باله پشتی دوم احتمالا با توجه به تعداد محدود نمونه‌ها مشاهده شده است.

علی‌رغم مطالعات انجام‌شده در ارتباط با دوریختی جنسی با استفاده از صفات اندازه‌شی در هر دو گونه کفال طلایی و پوزه باریک، تاکنون مقایسه ریختی این دو گونه با استفاده از این دسته از صفات صورت نگرفته است [32-34]. پیش از این اختلاف ریختی دو گونه در صفات اندازه‌شی مرتبط با ساقه دمی و عرض سر توسط *ابدولی و نادری* [9] مورد توجه قرار گرفته بود. چنانچه در این تحقیق نیز به‌طور معنی‌داری عرض ساقه دمی و عرض سر در کفال پوزه باریک کمتر از کفال طلایی بود. وجود اختلاف معنی‌دار در ۱۳ صفت اندازه‌شی دیگر برای نخستین‌بار در این تحقیق مشاهده شد که برخی از این صفات همچون طول پیش‌باله مخرجی و پایه باله مخرجی با توجه به اختلاف چشمگیر می‌توانند از کارایی لازم برای تمایز دو گونه برخوردار باشند.

قرارگرفتن هاپلوتایپ‌های شناسایی‌شده از گونه‌های کفال طلایی و کفال پوزه باریک از سایر اکوسیستم‌های دریایی شامل دریای سیاه و مدیترانه در کنار هاپلوتایپ‌های شناسایی‌شده از همین گونه‌ها از دریای خزر، در شاخه‌های هم‌تبار مجزا به‌خوبی بیانگر صحت شناسایی صورت‌گرفته بر مبنای ریخت‌شناسی بود. فواصل درون‌گونه‌ای اندک در کفال‌ماهیان پیش از این توسط *پاپاسوتیروپولوس و همکاران* [35] مورد اشاره قرار گرفته بود به‌طوری که این فاصله برای دو گونه کفال پوزه باریک و طلایی بر حسب فاصله دو عامله کیمورا در خلیج مسولونگی از سواحل یونان را به‌ترتیب صفر و ۰/۱۸ گزارش شده بود. در این تحقیق نیز این فاصله برای هر دو گونه معادل صفر محاسبه شد. در مطالعات مختلف با توجه به تخم‌ریزی پلاژیک و پراکنش گسترده در گونه‌های کفال‌ماهیان فاصله ژنتیکی اندک درون‌گونه‌ای در جمعیت‌های محلی گزارش شده است. برای مثال این فواصل برای هر دو گونه *Mugil curema* و *Mugil liza* در سواحل برزیل در اقیانوس اطلس به‌ترتیب معادل ۰/۲٪ جفت‌باز محاسبه شد.

در ارتباط با فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای در خانواده کفال‌ماهیان، *پاپاسوتیروپولوس و همکاران* [36] این فاصله را برای ژن‌های *12S rRNA*، *16S rRNA* و *COI* به‌ترتیب ۱۵/۳، ۱۳/۳ و ۲۴/۹٪ برحسب دو عامله کیمورا (درصد) گزارش نمودند. این فاصله در مقایسه گونه کفال طلایی و کفال پوزه باریک در دریای مدیترانه برای ژن‌های *12S rRNA*، *16S rRNA* و *COI* به‌طور میانگین به‌ترتیب ۲/۲، ۱/۲ و ۵/۸٪ محاسبه شد. با توجه به قرارگرفتن این دو گونه در یک جنس، این اختلاف طبیعی است. در این تحقیق نیز فاصله هاپلوتایپ‌های شناسایی‌شده از دو گونه کفال طلایی و کفال پوزه باریک در دریای خزر به‌ترتیب بر مبنای فاصله ژنتیکی درصد دو عامله کیمورا و درصد جفت‌باز به‌ترتیب ۷/۸ و ۶/۸٪ محاسبه شد. نتایج این تحقیق هم‌راستا با فواصل مشاهده‌شده در دریای مدیترانه است. فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای در جنس *Liza* به‌طور میانگین ۴/۹٪ گزارش شده است [36]. در جنس *Liza* با توجه به نتایج *دوران* و همکاران [5] دو گونه کفال پوزه باریک و طلایی از نظر

تبارشناسی در دو زیرشاخه مجزا از این جنس قرار می‌گیرند، بنابراین محاسبه فاصله بیشتر ژنتیکی از مقادیر میانگین فواصل بین‌گونه‌ای در جنس *Liza*، منطقی به نظر می‌رسد. از طرفی قرابت بیشتر هر دو گونه با سایر گونه‌ها از جنس *Liza* بیانگر صحت موقعیت تبارشناسی دو گونه فوق در این جنس بود.

با توجه به این که تاکنون توالی‌یابی ژن *COI* برای گونه کفال پوزه باریک از دریای خزر صورت نگرفته بود، شناخت هاپلوتایپ‌های فوق می‌تواند در ارتباط با شناسایی و مدیریت ذخایر این دو گونه تجاری و باارزش دریای خزر مفید واقع شود. همچنین تایید شناسایی صورت‌گرفته بر مبنای صفات ریختی با استفاده از ژن مذکور کارایی برخی از صفات اندازه‌شی جدید را اثبات نمود که این امر می‌تواند در شناسایی بهتر و ساده‌تر دو گونه کفال‌ماهی ساکن دریای خزر مفید باشد.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم دسترسی به نمونه‌های شمال دریای خزر به‌منظور تخمین بهتر فاصله ژنتیکی درون‌گونه‌ای اشاره کرد.

پیشنهاد می‌شود از صفات ریختی فلس و سنگریزه شنوایی نیز برای مقایسه ریختی استفاده شود.

نتیجه‌گیری

به‌جز صفات اشاره‌شده در منابع، با استفاده از صفات اندازه‌شی همچون طول پیش‌باله سینه‌ای، پیش‌باله مخرجی، باله شکمی، پایه باله مخرجی، عرض ساقه دمی و ارتفاع باله مخرجی نسبت به طول استاندارد و همچنین طول پس‌چشمی نسبت به طول سر و صفات شمارشی مانند تعداد شعاع باله پشتی دوم، فلس‌های خط جانبی، خار آبششی و زوائد باب‌المعده به شناسایی و تفکیک این دو گونه از کفال‌ماهیان دریای خزر پرداخت. همچنین توالی ژن *COI* به‌خوبی تمایز این دو گونه را از یکدیگر نشان داد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از سرکار خانم عاطفه رضایی بابت همکاری در مراحل انجام این پژوهش ابراز می‌نمایند.

تاییدیه اخلاقی: موردی جهت اشاره به تاییدیه اخلاقی وجود نداشت.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: ساناز کوهی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۵٪)؛ محمدصادق علوی‌یگانه (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۵٪)؛ جواد قاسم‌زاده (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر از طرف دانشگاه تربیت مدرس حمایت مالی شده است.

منابع

- 1- Thomson JM. The Mugilidae of the world. Mem Qld Mus. 1997;41(3):457-562.
- 2- Harrison IJ, Senou H. Bony fishes order mugiliformes: Mugilidae. In: Carpenter KE, Niem VH, editors. The Living marine resources of the Western Central Pacific: Bony fishes part 2 (Mugilidae to Carangidae). 4th Volume. Rome: FAO; 1999. pp. 2069-108.
- 3- Nelson JS. Fishes of the world. 4th Edition. Hoboken: Wiley; 2006.

simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J Fish Biol.* 1992;40(6):963-5.

22- Heras S, Castro MG, Roldán MI. Mugil curema in Argentinean waters: Combined morphological and molecular approach. *Aquaculture.* 2006;261(2):473-8.

23- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28(10):2731-9.

24- Schultz LP. A revision of the genera of mullets, fishes of the family Mugilidae, with descriptions of three new genera. *Proc U S Natl Mus.* 1946;96(3204):377-95.

25- Senou H. Phylogenetic interrelationships of the mullets (Pisces: Mugilidae) [Dissertation]. Tokyo: Tokyo University; 1988. [Japanese]

26- Harrison IJ, Howes GJ. The Pharyngobranchial organ of mugilid fishes, its structure, variability, ontogeny, possible function and taxonomic utility. In: British Museum (Natural History). *Bulletin of the British Museum (Natural History): Zoology series.* 57th Volume. London: The Museum; 1990. pp. 111-32.

27- Ghasemzadeh J. Phylogeny and systematics of Indo-Pacific mullets (Teleostei: Mugilidae) with special reference to the mullets of Australia [Dissertation]. Sydney: Macquarie University; 1998.

28- Ghotbi Jokandan SR, Alavi Yeganeh MS, Jamshidi Sh. Morphological comparison of Alosa shad species using morphometric and meristic characteristics in the Southern coast of Caspian sea. *Taxon Biosyst.* 2015;7(23):27-38. [Persian]

29- Muus BJ, Nielsen JG. *Scandinavian fishing year book.* Hedeusene, Denmark; 1999.

30- Nilsson Sköld H, Aspöngren S, Wallin M. Rapid color change in fish and amphibians - function, regulation, and emerging applications. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26(1):29-38.

31- Whiteley AR, Gende SM, Gharrett AJ, Tallmon DA. Background matching and color-change plasticity in colonizing freshwater sculpin populations following rapid deglaciation. *Evolution.* 2009;63(6):1519-29.

32- Ghaninejad D, Parafkandeh Haghighi F, Abdolmaleki Sh, Nahrour R, Khedmati K, Rastin R, et al. Morphometric and meristic characteristics of Liza aurata Risso 1810 in the South of Caspian sea. *J Fish.* 2012;6(2):31-42. [Persian]

33- Porfaraj V, Karami M, Nezami SA, Rafiee GR, Khara H, Hamidoghli A. Study of some biological features of mullets in Iranian coasts of the Caspian sea. *J Util Cultiv Aquat.* 2013;2(1):97-110. [Persian]

34- Nematpasand E, Abdollahpour Biriya H, Abbasi Ranjbar K, Ahmadi SM. Investigation morphometric and meristic of leaping mullet (Liza saliens Risso, 1810) in the coast of Bandar Anzali. *J Appl Ichthyol Res.* 2014;2(3):101-11. [Persian]

35- Papasotiropoulos V, Klossa-Kilia E, Kiliass G, Alahiotis S. Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleostei: Mugilidae) based on PCR-RFLP analysis of mtDNA segments. *Biochem Genet.* 2002;40(3-4):71-86.

36- Papasotiropoulos V, Klossa-Kilia E, Alahiotis SN, Kiliass G. Molecular phylogeny of grey mullets (Teleostei: Mugilidae) in Greece: evidence from sequence analysis of mtDNA segments. *Biochem Genet.* 2007;45(7-8):623-36.

4- Fricke R, Eschmeyer WN. Eschmeyer's catalog of Fishes: Genera, species, references. [Internet]. California: California Academy of Sciences; 2015 [cited 2017 Dec 01]. Available from: <https://www.calacademy.org/scientists/projects/eschmeyers-catalog-of-fishes>

5- Durand JD, Shen KN, Chen WJ, Jamandre BW, Blel H, Diop K, et al. Systematics of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): Molecular phylogenetic evidence challenges two centuries of morphology-based taxonomy. *Mol Phylogenet Evol.* 2012;64(1):73-92.

6- Harrison IJ. Mugilidae. In: Carpenter KE, editor. *The living marine resources of the Western Central Atlantic: Bony fishes part 1 (Acipenseridae to Grammatidae).* 2nd Volume. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2002. pp. 1071-85.

7- Randall JE. *Coastal fishes of Oman.* Honolulu: University of Hawaii Press; 1995.

8- Coad BW. Freshwater fishes of Iran. *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae Brno.* 1995;29:1-64.

9- Abdoli A, Naderi M. Biodiversity of fishes of the Southern basin of the Caspian sea. Tehran: Abzian; 2009. [Persian]

10- Paighambari SY, Daliri M, Kia Alvandi S. The catch composition of the beach seine fishery in Southeast of the Caspian sea (Case study: Golestan province). *J Aquat Ecol.* 2013;2(4):18-28. [Persian]

11- Azari Takami G, Amini F, Ranjbar T, Khodaei SA. Culture of two mullet species from the Mazandaran sea in brackish waters of Iran desert area. *J Vet Res.* 1997;1:59-69. [Persian]

12- Abdolmaleki S. Status of Mugilidae fisheries in the Iranian coast of Caspian sea. *Iran Sci Fish J.* 2000;9:39-52. [Persian]

13- Fischer W, Bianchi G. Western Indian ocean, fishing area 51. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1984.

14- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, De Waard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci.* 2003;270(1512):313-21.

15- Ratnasingham S, Hebert PDN. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol Ecol Notes.* 2007;7(3):355-64.

16- Durand JD, Borsa P. Mitochondrial phylogeny of grey mullets (Acanthopterygii: Mugilidae) suggests high proportion of cryptic species. *C R Biol.* 2015;338(4):266-77.

17- Xia R, Durand JD, Fu C. Multilocus resolution of Mugilidae phylogeny (Teleostei: Mugiliformes): Implications for the family's taxonomy. *Mol Phylogenet Evol.* 2016;96:161-77.

18- Nematzadeh M, Gillkolaei SR, Khalesi MK, Laloei F. Molecular phylogeny of mullets (Teleostei: Mugilidae) in Iran based on mitochondrial DNA. *Biochem Genet.* 2013;51(3-4):334-40.

19- Heras S, Roldán MI, Castro MG. Molecular phylogeny of Mugilidae fishes revised. *Rev Fish Biol Fish.* 2009;19(2):217-31.

20- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica.* 2001;4(1):art. 4.

21- Taggart JB, Hynes RA, Prodöuhl PA, Ferguson A. A