



## شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی گونه *Thryssa whiteheadi* (Wongratana, 1983) از جنگل‌های مانگرو تیاب استان هرمزگان

محبوبه افزند<sup>۱</sup>، ایمان سوری نژاد<sup>۱\*</sup>، سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی<sup>۳\*</sup>، آرش اکبرزاده<sup>۱</sup>، لاله پارسا یگانه<sup>۳</sup>، مریم

صادقی<sup>۳</sup>، رضا آذربایجانی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان

<sup>۲</sup> گروه فناوری‌های نوین، پژوهشکده منطقه‌ای جنگل‌های حرا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

<sup>۳</sup> مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران

### چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

کلمات کلیدی:

بارکدگذاری DNA

سیتوکروم اکسیداز ۱

*Thryssa whiteheadi*

*Thryssa whiteheadi* تنها گونه بومی گزارش شده از خانواده آنچوی‌ماهیان (Engraulidae) است که به لحاظ پراکنش جغرافیایی به‌طور انحصاری در حوضه خلیج فارس و دریای عمان یافت می‌شود. در این پژوهش خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی این گونه به‌طور دقیق با استفاده از تکنیک بارکدگذاری DNA بررسی شد. به همین منظور، بعد از نمونه‌برداری، DNA استخراج و با کمک یک جفت آغازگر جهانی، ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱ تکثیر و تعیین توالی شد. پس از تجزیه و تحلیل، نتایج به دست آمده با سایر گونه‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد و نام علمی و توالی ژن COI برای نخستین بار در بانک ژن و پایگاه داده‌های بارکد، ثبت جهانی گردید. طبق بررسی انجام شده برای این گونه، مقدار فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای بر اساس مدل K2P صفر به دست آمد و فاصله ژنتیکی آن با سایر گونه‌ها به‌طور متوسط ۱۵/۳۳ درصد محاسبه شد.

### مقدمه

خانواده Engraulidae معروف به آنچوی‌ماهیان، متعلق به راسته شگ‌ماهی‌شکلان (Clupeiformes) است که به‌طور کلی شامل ۲ زیر خانواده، ۱۷ جنس و ۱۴۴ گونه است (Eschmeyer, 2013). سه جنس از این خانواده شامل *Stolephorus*، *Encrasicolina* و *Thryssa* که دارای ۱۴ گونه‌اند از آب‌های خلیج فارس و دریای عمان گزارش شده است (Delfieh *et al.*, 2011). این سه جنس منحصراً در آب‌های اقیانوس هند و آرام پراکنش دارند (Nelson, 2006) که در این میان، گونه *Thryssa whiteheadi* به‌عنوان تنها گونه بومی از این خانواده در آب‌های خلیج فارس و دریای عمان گزارش شده است (Whitehead *et al.*, 1988). در بازنگری رده‌بندی خانواده Engraulidae عنوان شده است که *Thryssa whiteheadi* جایگاه رده‌بندی مشخص و واضحی ندارد و این گونه مترادف با گونه *Thryssa mystax* می‌باشد (Delfieh *et al.*, 2011). در بازنگری و اصلاح تاکسونومی ماهیان استخوانی موزه تاریخ طبیعی ایران، این گونه به‌عنوان گونه‌ی کمیاب معرفی شد (Owfi and Rabhaniha, 2014). به نظر می‌رسد بیشتر مطالعات انجام شده بر روی این گونه منحصر به بررسی فون ماهیان خلیج فارس و دریای عمان بوده است (Whitehead *et al.*, 1988; Randall, 1995; Carpenter *et al.*, 1997). شناسایی و مطالعه نمونه‌های با ارزش بومی و به

\* نویسنده مسئول (۱)، پست الکترونیک: sourinejad@hormozgan.ac.ir

\* نویسنده مسئول (۲)، پست الکترونیک: fazeli@ibrc.ir

خصوص کمیاب از جمله گام‌های پایه در جهت حفاظت از تنوع زیستی به شمار می‌رود. تکنیک DNA بارکدگذاری یکی از نوین‌ترین روش‌های شناسایی موجودات است که از DNA میتوکندریایی، برای شناسایی دقیق و سریع گونه‌ها استفاده می‌نماید (Costa and Carvalho, 2007). Hebert و همکاران در سال ۲۰۰۳ برای اولین بار تکنیک بارکدگذاری DNA را با استفاده از DNA میتوکندریایی، بر پایه ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱ (COI) به‌عنوان یک سیستم شناسایی زیستی جهانی برای تمایز همه یا حداقل اکثریت گونه‌های جانوری پیشنهاد کردند. هدف از این تحقیق شناسایی دقیق مورفولوژی گونه *Thryssa whiteheadi* از جنگل‌های مانگرو تیاب استان هرمزگان و تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن COI با استفاده از بارکدگذاری DNA و ثبت جهانی آن در بانک ژن (NCBI) و پایگاه داده‌های بارکد (BOLD) می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه برداری و شناسایی نمونه‌ها

نمونه‌برداری از ماهیان جنگل‌های مانگرو تیاب با مختصات جغرافیایی (E ۵۰° ۰۴' - N ۲۷° ۰۴' ۱۷") در خرداد ماه ۹۴ انجام گرفت و نمونه‌ها بلافاصله در اتانول ۹۶ درصد فیکس و به آزمایشگاه ماهی شناسی دانشگاه هرمزگان منتقل شدند و سپس شناسایی آنها با توجه به کلیدهای شناسایی فائو انجام گرفت (Whitehead et al., 1988). از ویژگی‌های برجسته موجود در کلیدهای شناسایی با استفاده از لوپ استریو عکس تهیه شد و سپس به‌منظور انجام آنالیزهای مولکولی شش قطعه ماهی انتخاب شد و در آزمایشگاه بانک مولکولی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران آزمایش‌های مولکولی انجام گردید.

### استخراج DNA، تکثیر، توالی یابی

استخراج DNA از قسمت عضله ساقه دمی ماهی با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومیک خون و سلول انسانی و حیوانی تولید شده در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (cat no. MBK0021) انجام شد. بعد از الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل در اتیدیوم بروماید، با دستگاه مستندسازی ژل (Gel Document) از آن عکس گرفته شد. جهت تکثیر ژن (COI) با طول تقریباً ۶۵۲ جفت باز از جفت پرایمرهای (LCOI490 - HCO2198) معرفی شده توسط Folmer و همکاران (۱۹۹۴) استفاده گردید.

LCOI490: 5'- GGTC AACAAATCATAAAGATATTGG-3'  
HCO2198: 5'- TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

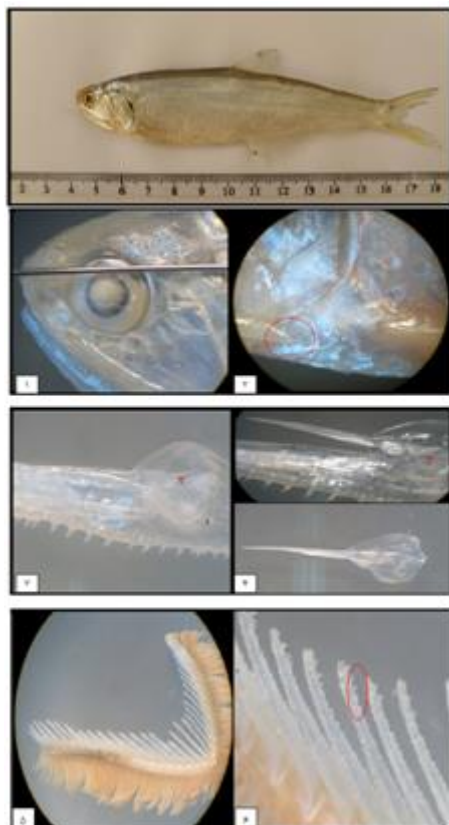
واکنش زنجیره ای پلیمرز بر اساس روش پیشنهادی Hebert و همکاران در سال ۲۰۰۳ (با کمی تغییرات) صورت پذیرفت. این واکنش در دستگاه ترموسایکلر انجام شد و تکثیر ژن با چرخه‌های حرارتی مورد استفاده برای بسط قطعه مورد نظر شامل ۳ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد بود. بعد از این مرحله، شروع ۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و بسط ناحیه‌ی مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و اتصال پرایمرها در دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و بسط ناحیه‌ی مورد نظر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام گرفت. این چرخه حرارتی با ۵ دقیقه بسط تکمیلی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد پایان پذیرفت. هر واکنش PCR با حجم ۵۰ میکرولیتر، از آنزیم تک‌پلی‌مراز ۰/۵ میکرولیتر (با غلظت ۵ واحد آنزیم بر میکرولیتر)، ۳ میکرولیتر کلرید منیزیم (با غلظت ۲۵ میلی مولار)، بافر (۱۰ X) ۲ میکرولیتر، از پرایمرها ۰/۵ میکرولیتر (با غلظت 10 پیکومول)، مخلوط ۰/۷ میکرولیتر dNTP (با غلظت ۱۰ میلی مولار)، DNA ۲-۱ میکرولیتر و H<sub>2</sub>O استفاده گردید. برای اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر، از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شد و سپس با دستگاه مستندسازی ژل از آن عکس گرفته شد. به‌منظور توالی‌یابی دو طرفه ژن مورد نظر، بعد از خالص سازی محصول PCR با کیت تخلیص PCR (cat no. MBK0071)، تولید شده در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به آمریکا ارسال شد.

## آنالیز داده‌ها

کروماتوگرام‌های به دست آمده از ژن مورد نظر در ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Seq Man متعلق به DNA STAR Laser gene ردیف یابی (Align) شدند. توالی‌های به دست آمده به بانک ژن (NCBI) و پایگاه داده‌های بارکد (BOLD) ارسال شدند. به منظور مقایسه ۶ توالی به دست آمده با سایر گونه‌های هم‌جنس از توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژن استفاده شد و درخت تبارشناسی Neighbor joining, Maximum Likelihood بر اساس مدل دو پارامتری کیمورا با ۱۰۰۰ تکرار برای آن‌ها در نرم‌افزار Mega6 ترسیم گردید (Kimura, 1980; Tamura et al., 2013).

## نتایج و بحث

خصوصیات ریخت‌شناسی گونه *Thryssa whiteheadi* در شکل ۱ قابل مشاهده می‌باشد.



شکل ۱. خصوصیات ریخت‌شناسی گونه *Thryssa whiteheadi*

۱- امتداد نوک پوزه بالای سطح مرکز چشم قرار دارد؛ ۲- استخوان فک بالایی به طور واضح کمی آنسوی سرپوش آبششی قرار دارد؛ ۳- دندان‌های فک بالایی در این گونه برخلاف گونه‌های دیگر بزرگ هستند و روی استخوان فکی فقط یک استخوان پیش فکی وجود دارد؛ ۴- استخوان پیش فکی اول (۱) در این گونه وجود ندارد؛ ۵- تعداد خارهای آبششی در قسمت پایینی کمان آبششی ۲۱-۱۹ می‌باشد؛ ۶- پرزهای روی خارهای آبششی به صورت منفرد است.

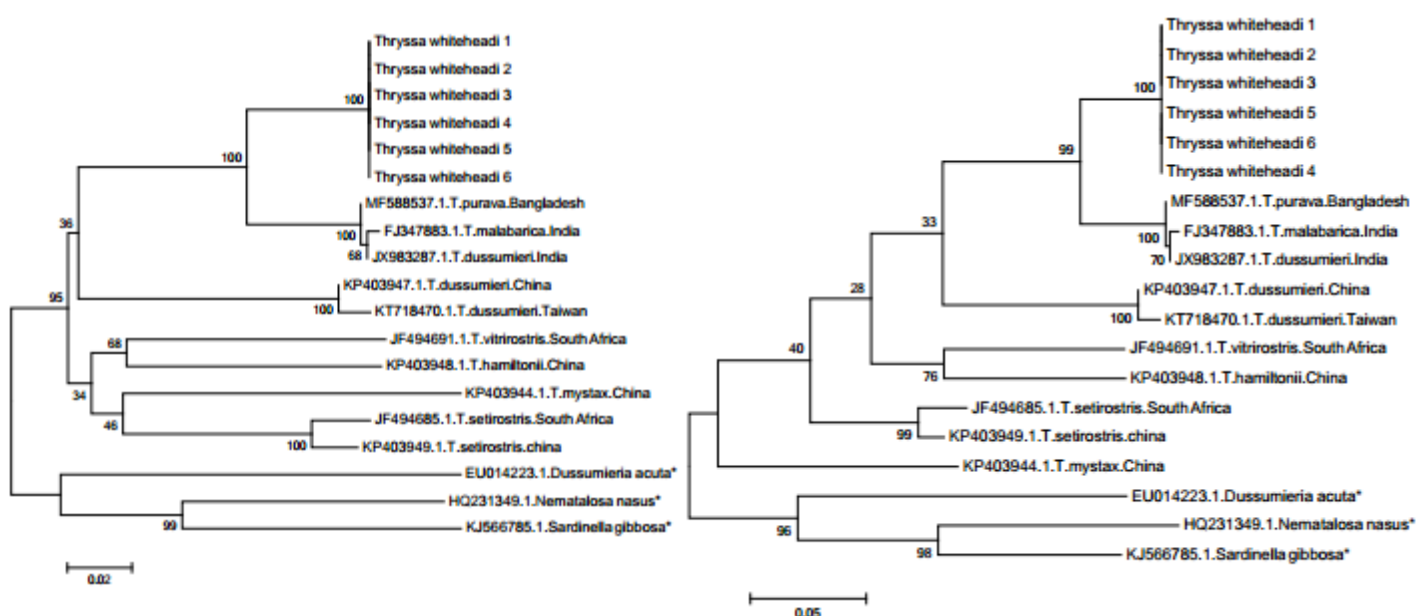
علاوه بر ویژگی‌های عکس گرفته‌شده تعداد شعاع‌های باله پشتی (۳ شعاع غیر منشعب و ۱۱-۱۰ شعاع منشعب)، شعاع باله مخرجی (۲۰-۱۹)، تعداد کیل قبل از باله شکمی (۱۶-۱۵) و بعد از باله شکمی (۱۰-۹)، شمارش و همچنین، طول استاندارد (۱۰/۵-۱۴) و طول کل (۱۶/۵-۱۲/۵) اندازه‌گیری شد.

با ارسال توالی گونه *Thryssa whiteheadi* به مرکز BOLD هیچ شباهتی با توالی‌های ثبت‌شده در این مرکز نشان داده نشد اما با ارسال آن به بانک ژن (NCBI)، بیشترین شباهت را با گونه *Thryssa dussumieri* (۹۴ درصد) نشان داد. نتایج هم‌ردیفی نوکلئوتیدی قطعه توالی یابی شده با سایر توالی‌های نوکلئوتیدی هم‌جنس ثبت‌شده در بانک ژن در شکل ۲ نشان داده شده است.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Thryssa whiteheadi</i> voucher ThWh-IBRC cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1205	1205	100%	0.0	100%	KX947384.1
<input type="checkbox"/> <i>Thryssa dussumieri</i> voucher NF763 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial	972	972	99%	0.0	94%	JX983288.1
<input type="checkbox"/> <i>Thryssa dussumieri</i> voucher NF564 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial	966	966	99%	0.0	94%	JX983287.1
<input type="checkbox"/> <i>Thryssa malabarica</i> voucher NBFGR-THM92 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	944	944	99%	0.0	93%	FJ347882.1
<input type="checkbox"/> <i>Thryssa malabarica</i> voucher NBFGR-THM96 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	939	939	99%	0.0	93%	FJ347943.1
<input type="checkbox"/> <i>Thryssa dussumieri</i> voucher NF52 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial	885	885	91%	0.0	93%	JX983289.1
<input type="checkbox"/> <i>Thryssa purava</i> voucher FBGN-SAU-Dhaka F1511sb-50 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	800	800	83%	0.0	93%	MF588537.1
<input type="checkbox"/> <i>Thryssa purava</i> isolate F1511sb-50 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	795	795	83%	0.0	93%	MF601477.1
<input type="checkbox"/> <i>Thryssa purava</i> voucher FBGN-SAU-Dhaka F1511sb-49 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	791	791	83%	0.0	93%	MF595070.1

شکل ۲. نتایج هم‌ردیفی نوکلئوتیدی قطعه توالی یابی شده با سایر توالی‌های نوکلئوتیدی هم‌جنس ثبت‌شده در بانک ژن

با توالی‌های هم‌ردیف شده به‌وسیله برنامه ClustalW، درخت تبارشناسی گونه *T. whiteheadi* و گونه‌های هم‌جنس آن، گرفته‌شده از بانک ژن بر اساس مدل K2P با روش Neighbor joining، Maximum Likelihood و با ۱۰۰۰ تکرار برای مقایسه توالی‌های COI گونه از جنس *Thryssa* ترسیم گردید. براین اساس گونه‌ی مورد مطالعه *T. whiteheadi* در یک کلاد جداگانه قرار گرفت اما با گونه‌های بارکد شده از هند به ترتیب (*T.purava*, *T.dussumieri*, *T.malabarica*) رابطه خیلی نزدیک و خواهری نشان داد (شکل ۳) که این موضوع در محاسبه مقدار فاصله ژنتیکی بین آن‌ها بر اساس مدل K2P مشهود است. بر اساس این مدل، مقدار فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای برای این گونه، صفر و فاصله ژنتیکی با سایر گونه‌ها به‌طور متوسط ۱۵/۳۳ درصد محاسبه شد. گونه *T. whiteheadi* کمترین فاصله ژنتیکی را با (*T.purava*, *T.dussumieri*, *T.malabarica*) ۰/۰۷ و بیشترین فاصله را با گونه *T. mystax.China* نشان داد بیشترین فاصله ژنتیکی در این مطالعه بین *T. mystax.China* و *T. malabarica.India* ۰/۲۲۱ و کمترین مقدار بین گونه‌های *T. purava.Bangladesh* و *T. setirostris. china* ۰/۰۰۲ مشاهده شد. مقدار فاصله دو به دو نوکلئوتیدی بر اساس مدل K2P بین گونه‌های *Thryssa*، در جدول ۳ قابل مشاهده می‌باشد.



شکل ۳. درخت تبارشناسی گونه‌های، جنس *Thryssa* بر اساس مدل K2P با روش Neighbor joining (شکل ۱) و Maximum

Likelihood (شکل ۲) با ۱۰۰۰ تکرار، نام‌های علمی ستاره دار (گونه‌های برون گروه)

در تحقیق حاضر، با ارسال توالی *T. whiteheadi* به بانک ژن (NCBI)، بیشترین شباهت با گونه *T. dussumieri* (۹۴ درصد) به دست آمد (شکل ۲). طبق مطالعات Hebert و همکاران (۲۰۰۴) و همچنین Steinke و همکاران (۲۰۰۹)، فاصله ژنتیکی بیش از ۳ درصد، معمولاً نمی‌تواند مربوط به تنوع داخل گونه‌ای و بین جمعیتی باشد و بیش از این مقدار، به‌عنوان گونه‌ی جدا شناخته خواهد شد. با توجه به شواهد به دست آمده از بومی بودن گونه *T. whiteheadi* و نتایج مولکولی به دست آمده از ارسال آن به مراکز مذکور ثبت ژن، تاکنون هیچ ثبت ژنی از این گونه انجام نشده بود و توالی‌های مربوط به ژن COI این گونه‌ی بومی و کمیاب برای اولین بار در مراکز جهانی ثبت ژن (NCBI و BOLD) ثبت گردید. Delfieh و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه خود بر روی بازنگری رده‌بندی خانواده Engraulidae عنوان کردند که گونه‌ی *T. whiteheadi*، جایگاه رده بندی مشخص و واضحی ندارند و با بررسی کتاب (Carpenter *et al.*, 1997) به این نتیجه رسیدند که این گونه مترادف با گونه

*T. mystax* می‌باشد. ارسال توالی‌های مربوط به گونه‌ی *T. whiteheadi* به مراکز مذکور ثبت ژن، به‌منظور تعیین هویت آن‌ها هیچ درصد شباهتی مبنی بر اینکه گونه‌ی مورد مطالعه همان گونه *T. mystax* باشد، نشان داده نشد. درواقع نتایج به دست آمده از این تحقیق در مورد این گونه با نظریه Delfieh و همکاران (۲۰۱۱) مبنی بر مترادف بودن این دو گونه مطابقت ندارد.

جدول ۱. مقدار فاصله دو به دو نوکلئوتیدی بر اساس مدل K2P بین گونه‌های *Thryssa*

نام علمی گونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱ <i>Thryssa whiteheadi</i>										
۲ <i>T. vitrirostris</i> . South_Africa	۰/۱۸۷									
۳ <i>T. hamiltonii</i> . China	۰/۱۸۳	۰/۱۵۹								
۴ <i>T. setirostris</i> . South Africa	۰/۱۹۰	۰/۱۷۷	۰/۱۸۹							
۵ <i>T. setirostris</i> . China	۰/۱۸۷	۰/۱۶۲	۰/۱۷۳	۰/۰۳۲						
۶ <i>T. dussumieri</i> . India	۰/۰۷۵	۰/۱۹۵	۰/۱۹۹	۰/۱۷۲	۰/۱۸۵					
۷ <i>T. dussumieri</i> . China	۰/۱۷۰	۰/۱۹۷	۰/۱۸۳	۰/۱۷۴	۰/۱۷۱	۰/۱۷۷				
۸ <i>T. dussumieri</i> . Taiwan	۰/۱۷۹	۰/۲۰۹	۰/۱۹۵	۰/۱۸۶	۰/۱۸۲	۰/۱۸۸	۰/۰۰۹			
۹ <i>T. malabarica</i> . India	۰/۰۷۹	۰/۱۹۰	۰/۱۹۴	۰/۱۷۲	۰/۰۰۴	۰/۱۸۵	۰/۱۷۱	۰/۱۸۲		
۱۰ <i>T. mystax</i> . China	۰/۲۱۷	۰/۲۰۵	۰/۲۰۲	۰/۱۸۴	۰/۲۲۱	۰/۱۷۴	۰/۱۹۱	۰/۲۰۳	۰/۲۲۱	
۱۱ <i>T. purava</i> . Bangladesh	۰/۰۷۳	۰/۱۹۳	۰/۱۹۶	۰/۱۷۰	۰/۰۰۲	۰/۱۸۲	۰/۱۶۸	۰/۱۸۰	۰/۰۰۶	۰/۲۱۸

طبق درخت تبارشناسی ترسیم شده و فاصله‌های ژنتیکی به دست آمده، گونه‌ی مورد مطالعه در یک کلاد جداگانه قرار گرفت اما با گونه‌های بارکد شده از هند (*T. purava*, *T. dussumieri*, *T. malabarica*) به ترتیب رابطه خیلی نزدیک و خاوه‌ری نشان داد (شکل ۳ و جدول ۱). طبق Whitehead و همکاران (۱۹۸۸) گونه *T. Purava*, *T. whiteheadi* از نظر ریخت‌شناسی بسیار شبیه به هم هستند با این تفاوت که، *T. purava* دارای دندان‌های بزرگ فقط در فک پایین و همچنین دارای اولین استخوان پیش‌فکی است و می‌توان چنین بیان کرد که دلیل نزدیک قرارگرفتن آن‌ها و نشان دادن تنوع ژنتیکی بسیار پایین بین گونه‌ای، شباهت زیاد مورفولوژیکی است. همچنین وجود تنوع درون گونه‌ای بسیار پایین، بین گونه‌های این جنس در مطالعه Ma و همکاران (۲۰۱۵) هم گزارش شده است. در نتایج به دست آمده از بررسی توانایی ژن COI، ۶ گونه از جنس *Thryssa*، دو گونه *T. mystax* و *T. vitrirostris* در یک زیرکلاد مشترک قرار گرفته و فاصله‌ی K2P بین آن‌ها، ۰/۰۰۳ بود در صورتی که حداقل فاصله‌ی K2P بین گونه‌ای پیشنهاد شده توسط Hebert و همکاران (۲۰۰۳)، ۰/۰۲ بود. آن‌ها چنین بیان نمودند که این دو، مترادف یکدیگر هستند. اما نتایج نشان دهنده متناقض با نتایج شناسایی مورفولوژیکی آن‌ها به‌عنوان دو گونه‌ی متفاوت، است. Steinke و همکاران (۲۰۰۹) و Ward و همکاران (۲۰۰۵) پیشنهاد کردند که هیبریداسیون می‌تواند دلیل تنوع ژنتیکی پایین بین گونه‌هایی که از نظر ریختی از یکدیگر متمایزند باشد، بنابراین، تنوع درون گونه‌ای بسیار پایین گونه *T. vitrirostris* و *T. mystax* از منطقه‌ای در چین و همچنین گونه‌های گرفته شده از بانک ژن *T. purava* Bangladesh و *T. setirostris*. china (جدول ۱) ممکن است به دلیل هیبریداسیون این گونه‌ها باشد. به نظر می‌رسد که حل و فصل چنین مواردی نیاز به آنالیزهای مورفولوژیکی دقیق قبل از هرگونه نظر قطعی در این زمینه دارد. این مطالعه برای اولین بار روی گونه‌ی *Thryssa whiteheadi*، تنها گونه بومی گزارش شده از خانواده آنچوی ماهیان انجام شد و در نتیجه ژن COI این گونه بارز در بانک ژن (شماره الحاق ژنی: KX947384.1) و پایگاه داده بارکد به ثبت جهانی رسید. بارکدگذاری DNA به همراه شناسایی مورفولوژیکی درک درستی از حفاظت این گونه، در دسترس ما قرار می‌دهد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه نویسنده اول است که با حمایت مالی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران انجام شده است.

## منابع

- Carpenter, K.E. 1997. Living marine resources of Kuwait, Eastern Saudi Arabia, Bahrain, Qatar, and the United Arab Emirates. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 293 p.
- Costa, F.O., Carvalho, G.R. 2007. The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA Barcoding of fish". Life Sciences Society and Policy. 3(2): 29.
- Delfieh, P., Zohrehbakhsh, E., Owfi, F., Kazemian, M., Delfieh, P. 2011. The overview study of Engraulididae and Pristigasteridae, two families of clupeiforms in the Persian Gulf and Oman Sea. Journal of Marine Biology. Islamic Azad University. Ahvaz Branch. 3(1): 41-52.
- Eschmeyer, W.N. 2013. Catalog of Fishes-electronic version (25 March 2013). <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog/fishcatmain>.
- 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: 294-299.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 270(1512): 313-321.
- Hebert, P.D., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biology. 2(10): e312.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution. 16(2): 111-120.
- Ma, C.Y., Ma, H.Y., Ni, Y., Wang, W., Ma, L.B. 2015. Molecular identification of the genus *Thryssa* based on DNA Barcoding. Genetics and molecular research GMR. 14(4): 18580.
- Nelson, J.S. 2006. Fishes of the World. 4<sup>th</sup> edition. John Wiley and Sons. 624 p.
- Owfi, F., Rabbaniha, M. 2014. Taxonomic review of marine bony fishes of Iranian National Museum of Natural History MMTT (Persian Gulf, Oman Sea, Caspian Sea). Second Iranian Fisheries National Conference. (7).
- Randall, J.E. 1995. Coastal fishes of Oman. University of Hawaii Press. 439 p.
- Steinke, D., Zemplak, T.S., Hebert, P.D. 2009. Barcoding Nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. PLoS one. 4(7): p.e6300.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 197 p.
- Ward, R.D., Zemplak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B: Biological Sciences. 360(1462): 1847-1857.
- Whitehead, P.J.P., Nelson, G.J. Wongratana, T. 1988. Part 2-Engraulidae: FAO species catalogue. Vol 7. Clupeoid fishes of the world (Engraulidae). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, anchovies and wolfherrings. FAO Fish Synopsis. 127 p.