

<https://tbj.ui.ac.ir/?lang=en>

Taxonomy and Biosystematics

E-ISSN: 2322-2190

Document Type: Research Paper

Vol. 16, Issue 2, No.59, (2024), P: 1-14

Received: 06/05/2024

Accepted: 07/09/2024

Morphological and molecular identification of the small-scale grouper, *Epinephelus polylepis*, (Perciformes: Epinephelidae) from the Persian Gulf and Gulf of Oman

Masoumeh Gholipour Gilak

Ph. D. Student, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Gholipour8@gmail.com

Faezeh Yazdani Moghaddam * 

Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Yazdani@um.ac.ir

Mehdi Ghanbarifardi

Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
Mehdi.ghanbarifardi@science.usb.ac.ir

Ehsan Damadi

Ph. D. Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Ehsandamadi@gmail.com

Abstract

The small-scale grouper *Epinephelus polylepis* from the family Epinephelidae, is an important commercial species that plays a crucial role in coastal benthic ecosystems. Previous studies have failed to accurately identify this species in the northern region of the Persian Gulf and the Gulf of Oman. The aim of this study is to analyze the samples of *E. polylepis* collected in the Persian Gulf and Gulf of Oman using a combination of morphological and molecular data. The morphological data include 17 morphological characters and six counting characters. For the molecular study, sequences of the mitochondrial COI were used, which were combined with GenBank sequences. The samples were collected in the sandy areas of two stations, Tis and Qeshm. This species can be distinguished from other congeners by the presence of smaller and closer spots on the fins and spots on the back of the head and body. Analysis of the COI sequences of the mitochondrial DNA and samples sequenced in this study and samples from the vicinity of the typing site (Bahrain) revealed a monophyletic group with a high posterior probability and a low intraspecific genetic distance (0.19%). In addition, molecular analysis completely separated this species from other congeners.

Keywords: Taxonomy, morphometric, meristic characteristic, mtDNA.

Introduction

The Epinephelidae family (Groupers) includes commercially important species (Luiz et al., 2016). This family includes 16 genera and 170 species in tropical and subtropical regions, of which 4 genera and 15 species are distributed in the Persian Gulf and the Gulf of Oman (Fricke et al., 2024). The *Epinephelus* genus has 91 species, the most species diversity among its genera, and it is distributed from the Atlantic Ocean to the Indo-Pacific Ocean, including the Persian Gulf and the Gulf of Oman (Fricke et al., 2024). The small-scale grouper *Epinephelus polylepis*, widely distributed in the Western Indian Ocean, is known as one of the primary sources of valuable fish catch in the Persian Gulf and the Gulf of Oman (Fricke et al., 2024). According to the morphological similarity, *Epinephelus polylepis* with other species in the genus *Epinephelus* including *E. chlorostigma*, *E.*

*Corresponding author

Gholipour Gilak, M., Yazdani Moghaddam, F., & Ghanbarifardi, M., Damadi, E. (2024). Morphological and molecular identification of the small-scale grouper, *Epinephelus polylepis*, (Perciformes: Epinephelidae) from the Persian Gulf and Gulf of Oman. *Taxonomy and Biosystematics*, 16 (59), 1-14.

2322-2190 © The Author(s).

Published by University of Isfahan

This is an open access article under the CC BY-NC 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>).



<http://dx.doi.org/10.22108/tbj.2024.141401.1262>

bleekeri, *E. areolatus* is confused. The aim of this study is to identify the species *E. polylepis* by morphological and molecular approaches with the COI gene for the first time in the Persian Gulf and Gulf of Oman.

Materials and Methods

During a field study conducted from 1400 to 1401, we collected samples of *E. polylepis* using gill nets and hooks. These samples were then transferred to the Zoological Museum of Ferdowsi University of Mashhad (ZMFUM).

Morphological Studies

We analyzed morphological traits of the samples based on available sources, including Johnson et al. (2019). To identify the specimens, we used valid identification keys (Randall, 1995; Johnson et al., 2019). In total, we used 23 morphological traits, including 17 measuring traits and six counting traits.

Molecular Studies

For DNA extraction, we used the salt method (Bruford et al., 1992) on three samples. We amplified the gene fragment using the primers FishF1 and FishR1. The PCR conditions for the COI gene included an initial denaturation at 94 °C for 5 minutes, followed by 35 cycles at 94 °C for 45 seconds, 52 °C for 45 seconds, and 72 °C for 90 seconds, with a final extension at 72 °C for 7 minutes. We corrected the mitochondrial gene sequences using BioEdit v7.2 software (Hall, 1999) and aligned them with MEGA v10.0 software (Kumar et al., 2018). Using the Kimura Two-Parameter (K2P) model in MEGA v10.0 software (Kumar et al., 2018), we calculated the intraspecies and interspecies genetic distance, which reflects the nucleotide difference. To determine the best evolutionary replacement model for nucleotides, we used jModelTest v2.1.6 (Darriba et al., 2012), based on the Akaike Information criterion. For Bayesian analysis, we used MrBayes 3.2.7 software (Ronquist et al., 2012) with 30,000,000 repetitions.

Research findings

A total of five samples of the species *Epinephelus polylepis* were collected from two stations: Tis in the Gulf of Oman and Qeshm in the Persian Gulf.

Morphological data

Morphological features of the small-scale grouper include: 11 spines (XI) and 17-16 soft rays on the dorsal fin; 66-70 scales along the lateral line; 8 soft rays on the dorsal fin; 19 soft rays on the pectoral fin; 9-10 gill spines in the upper half of the first arch and 17-18 gill spines in the lower half of the first arch (25-28 total gill spines); caudal fin short or slightly edged; serrated gill cover; head, body, and fins covered with many small, closely spaced dark brown spots (except ventral parts of head and body); terminal edge of the caudal fin with a white line and a row of blackish brown spots; dark lines on the upper jaw.

Molecular analysis

For molecular analysis, a total of 65 sequences belonging to 57 species of the genus *Epinephelus* and an outgroup of *Cephalopholis boenak* were used. *Epinephelus polylepis* showed a very close relationship with *E. areolatus*, *E. cyanopodus*, and *E. multinotatus* as a sister group (Fig. 3). The genetic differences between *E. polylepis* samples and their sister group, *E. areolatus* (8.3 %), *E. bleekeri* (11.8 %), and *E. chlorostigma* (10.6 %), were calculated.

Discussion of Results & Conclusion

The present study demonstrates the successful identification of the species *Epinephelus polylepis* from the Persian Gulf and Gulf of Oman, which had not been thoroughly studied previously. Both molecular and morphological data strongly support the validity of *E. polylepis* (Fig. 3). The meristic features and color patterns observed in the specimens collected in this study largely overlap with those of the type and paratype specimens (Randall & Heemstra, 1991; Heemstra & Randall, 1993). Additionally, the morphometric characteristics of our samples are consistent with the original sample, except for the slightly larger body depth and head length. Molecular analysis and morphological identification of specimens from the northern Persian Gulf and Gulf of Oman confirm their classification as *E. polylepis* (Fig. 3). The phylogenetic analysis of the COI mitochondrial sequence reveals a monophyletic group consisting of samples from the northern region of the Persian Gulf and the Gulf of Oman indicating minimal divergence between them. The genetic distance in this study further confirms the distinctiveness of *E. polylepis*, with divergences from *E. areolatus*, *E. bleekeri*, and *E. chlorostigma* exceeding the minimum determined distance (8.3%, 11.8%, and 10.6%, respectively). It is worth noting that a genetic distance of at least 2% is typically required for the separation of closely related species in marine fish based on the COI gene (Ward, 2009), further supporting the genetic validity of *E. polylepis*. Future research should focus on accurately molecularly identifying other members of the Epinephelidae to establish their relationships and diversity.

Acknowledgment

I would like to express my gratitude to all those who have cooperated with us at different stages of this research. This research was done with the financial support of Ferdowsi University of Mashhad.

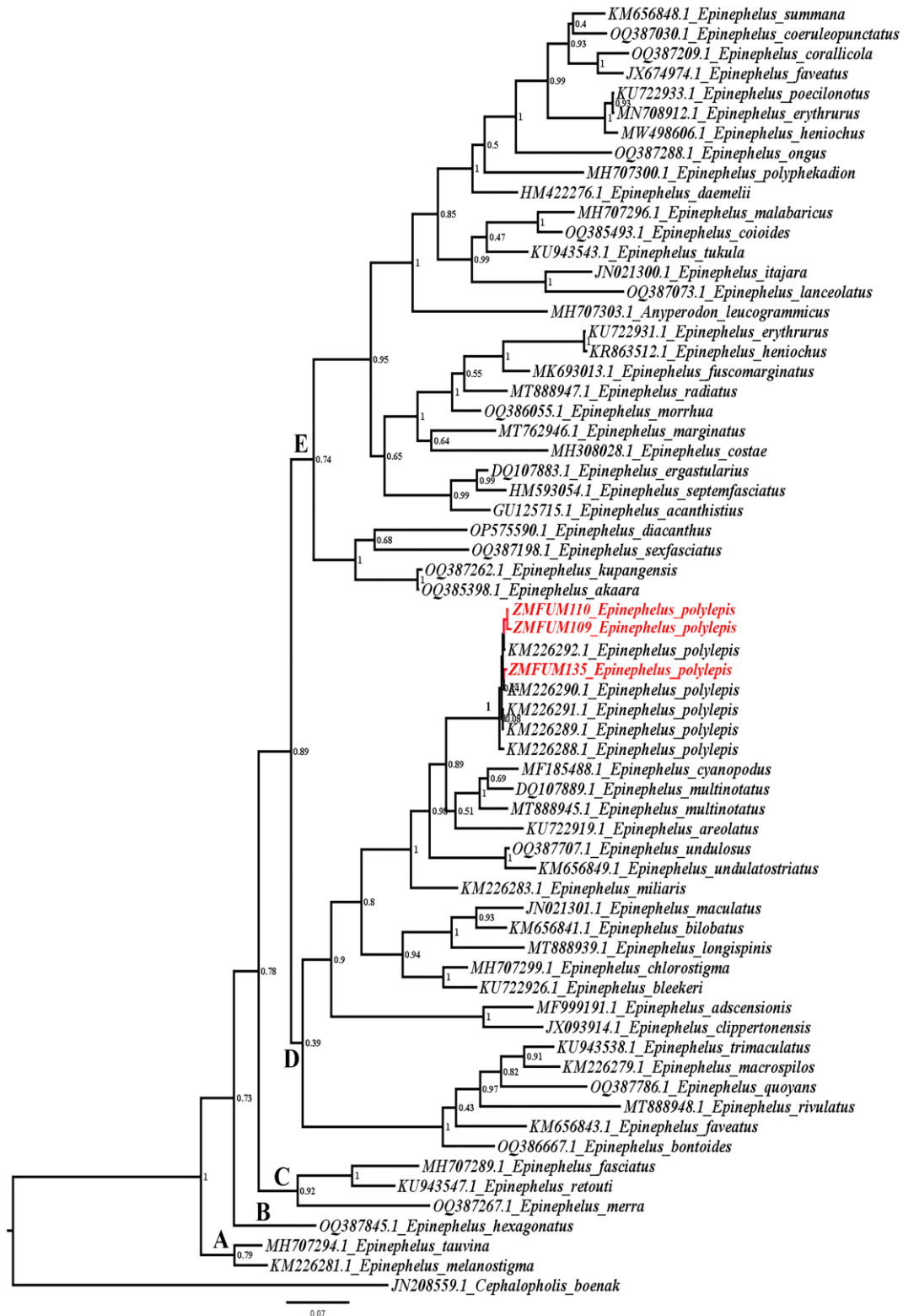



Figure 3. Bayesian Inference tree based on the mitochondrial gene of cytochrome C oxidase subunit (COI) I for *Epinephelus* species. The sequences of *Epinephelus polylepis* studied in this study are shown in red.

شناسایی ریختی و مولکولی گروپر فلس کوچک، *Epinephelus polylepis* J. E. Randall & Heemstra, 1991 (سوف ماهی شکلان: Epinephilidae) از خلیج فارس و خلیج عمان

معصومه قلی پور گیلک، دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

Gholipour8@gmail.com

فائزه یزدانی مقدم* ، استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

Yazdani@um.ac.ir

مهدی قنبری فردی، دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

Mehdi.ghanbarifardi@science.usb.ac.ir

احسان دامادی، دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

Ehsandamadi@gmail.com

چکیده

گروپر فلس کوچک، *Epinephelus polylepis* از خانواده Epinephilidae گونه تجاری مهمی است که نقش مهمی را در اکوسیستم کفزی ساحلی ایفا می کند. مطالعات قبلی موفق به شناسایی دقیق این گونه در محدوده شمالی خلیج فارس و خلیج عمان نشده است. هدف از این مطالعه، تجزیه و تحلیل نمونه های جمع آوری شده از *E. polylepis* در خلیج فارس و خلیج عمان با استفاده از ترکیبی از داده های ریخت شناسی و مولکولی است. داده های ریخت شناسی شامل ۱۷ صفت ریخت سنجی و شش صفت شمارشی است. برای مطالعه مولکولی، از توالی های ژن میتو کندریایی COI استفاده شده که با توالی های بانک ژنی (GenBank) ترکیب شدند. نمونه ها از مناطق شنی دو ایستگاه تیس و قشم جمع آوری شدند. این گونه می تواند از دیگر همجنس های خود با ویژگی های حضور لکه های کوچک تر و نزدیک روی باله ها و همچنین، لکه های پشتی سر و بدن جدا شد. تجزیه و تحلیل توالی های DNA میتو کندریایی COI و نمونه های توالی یابی شده در این مطالعه با نمونه هایی از نزدیک محل تایپ (بحرین) یک گروه تک نیا با احتمال پسین بالا و فاصله ژنتیکی درون گونه ای کم (۰٫۱۹ درصد) را نشان داد. همچنین، تحلیل مولکولی کاملاً این گونه را از دیگر هم جنس ها جدا کرد.

واژه های کلیدی: آرایه شناختی، صفات ریخت سنجی، صفات شمارشی، ژن میتو کندریایی COI

* مسئول مکاتبات

قلی پور گیلک، معصومه، یزدانی مقدم، فائزه، قنبری فردی، مهدی، دامادی، احسان. (۱۴۰۳). شناسایی ریختی و مولکولی هامور فلس کوچک، *Epinephelus polylepis* (سوف ماهی سانان):

هامور ماهیان) از خلیج فارس و خلیج عمان. تاکسونومی و بیوسستماتیک، ۱۶ (۵۹)، ۱-۱۴.



مقدمه

خانواده Epinephelidae (راسته سوف ماهی شکلان) شامل گونه‌های تجاری مهم است (Luiz et al., 2016). این خانواده قبلاً به‌عنوان زیرخانواده Epinephelinae در خانواده Serranidae قرار داشته است که به‌تازگی از خانواده Serranidae جدا و به سطح خانواده Epinephelidae ارتقا پیدا کرده است (Ma & Craig, 2018; Frick et al., 2024; Smith & Craig, 2007). گروپر‌ها معمولاً با شکل بدن و سر، الگوهای رنگی، و همچنین اندازه عناصر باله شناسایی می‌شوند (Heemstra & Randall, 1993; Randall, 1995) که ریخت‌شناسی همگن آنها می‌تواند باعث شناسایی نادرست گونه‌های نزدیک شود (Rimmer & Glamuzina, 2019; Hassanien & Al-Rashada, 2021). این خانواده شامل ۱۶ جنس و ۱۷۰ گونه در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری است که ۴ جنس و ۱۵ گونه آن در خلیج فارس و خلیج عمان پراکنش دارند (Fricke et al., 2024). جنس *Epinephelus* با ۹۱ گونه، بیشترین تنوع گونه‌ای را بین هم جنس‌های خود دارد و از اقیانوس اطلس تا اقیانوس هند-آرام شامل خلیج فارس و خلیج عمان پراکنش دارد (Fricke et al., 2024). در گذشته مطالعه کمی در ارتباط با این جنس مهم در خلیج فارس و خلیج عمان انجام گرفته است. مطالعات برجسته در ارتباط با گونه‌های این جنس شامل چک‌لیست‌ها (Blegvad, 1994; Carpenter et al., 1997)، بررسی اتولیت شش گونه (*E. coioides*, *E. bleekeri*، *E. latifasciatus*، *E. areolatus*، *E. stoliczkae*، *E. dicanthus*) (Edalati et al., 2018; Javadzadeh et al., 2017)، چک‌لیست ماهیان خلیج فارس از جمله جنس *Epinephelus* (Eagderi et al., 2018) و بررسی مولکولی گونه *E. coioides* (Tavakoli-Kolour et al., 2022) انجام گرفته است. گونه‌های این جنس نقش بوم‌شناختی مهمی در زیستگاه‌های ساحلی و فراساحلی ایفا می‌کنند؛ زیرا این گونه‌ها معمولاً شکارچیان برتر در اکوسیستم کفی هستند (Moazzam & Osmany, 2023). گروپر‌ها معمولاً با شکل بدن و سر، الگوهای رنگی و همچنین اندازه باله شناسایی می‌شوند (Heemstra & Randall, 1993) که شباهت ریخت‌شناسی آنها می‌تواند باعث شناسایی نادرست بین گونه‌ها در میان گونه‌های خاصی از جنس *Epinephelus* از جمله گروپر فلس کوچک شود. گروپر فلس کوچک *Epinephelus polylepis* با پراکندگی گسترده در اقیانوس هند غربی یکی از منابع اولیه صید ماهی با ارزش در خلیج فارس و خلیج عمان شناخته می‌شود (Fricke et al., 2024). این گونه اولین بار از بحرین در خلیج فارس توسط Randall and Heemstra (1991) توصیف و نامگذاری شد. با توجه به شباهت ریختی، *Epinephelus polylepis* با گونه‌های دیگر در جنس *Epinephelus* از جمله *E. chlorostigma*، *E. bleekeri*، *E. lanceolatus*، *E. areolatus* اشتباه گرفته می‌شود. استفاده از داده‌های مولکولی در مطالعات رده‌بندی جانوران مختلف در سال‌های اخیر افزایش یافته است (Hebert et al., 2004). در مطالعات مولکولی توالی بخشی از زیر واحد سیتوکروم اکسیداز I (COI) برای شناسایی در سطح گونه (Damadi et al., 2020; Alavi-Yeganeh et al., 2021; Mehraban et al., Asgharian et al., 2011) و آنالیزهای ریخت‌شناسی (Damadi et al., 2021; Khayyami et al., 2015) و همچنین، ریخت‌سنجی هندسی (Ghanbarifardi et al., 2020; Sadeghi et al., 2020; Damadi Polgar et al., 2017) (et al., 2024) در خلیج فارس و خلیج عمان استفاده می‌شود. هدف این مطالعه، شناسایی گونه *E. polylepis* با رویکرد ریخت‌شناسی و مولکولی با ژن COI برای اولین بار در خلیج فارس و خلیج عمان است.

مواد و روش‌ها

طی مطالعه میدانی بین سال‌های ۱۴۰۰ تا ۱۴۰۱، نمونه‌های متعلق به *E. polylepis* با استفاده از تورهای آبششی و قلاب جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها به موزه جانورشناسی دانشگاه فردوسی مشهد (ZMFUM) منتقل شدند. نمونه‌ها از نظر شکل، رنگ و سایر صفات اندازه‌گیری و شمارشی بررسی شدند. نمونه‌ها از سمت چپ عکس برداری شدند. سپس، بخش کوچکی از بافت عضلانی از هر نمونه تازه جدا شد و در اتانول مطلق نگهداری شدند. سپس کل نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند.

مطالعات ریخت‌سنجی

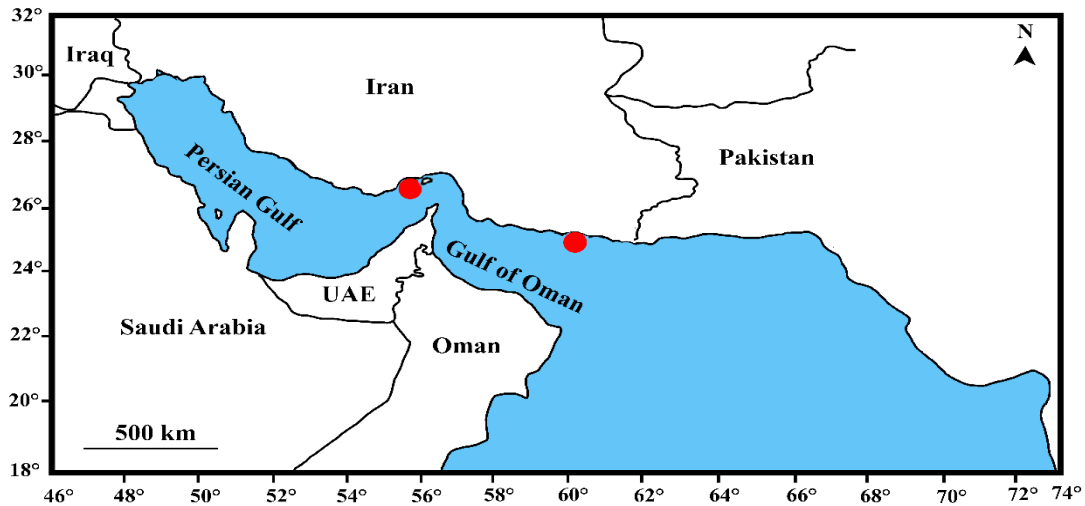
صفات ریخت‌شناسی براساس منابع موجود از جمله جانسون و همکاران (Johnson et al., 2019) استخراج و بررسی شدند. نمونه‌ها با کلیدهای شناسایی معتبر (Johnson et al., 2019; Randall, 1995) شناسایی شدند. در مجموع از ۲۳ صفت ریخت‌شناسی شامل ۱۷ صفت اندازه‌گیری و شش صفت شمارشی استفاده شد (جدول ۱). صفات اندازه‌گیری و شمارشی به ترتیب با استفاده از کولیس دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ و استرئومیکروسکوپ مدل (Olympus SZ40) بررسی شدند. برای حذف اثر اندازه از صفات ریخت‌سنجی نسبت گرفته شد.

مطالعات مولکولی

استخراج DNA از سه نمونه با استفاده از روش نمکی انجام گرفت (Bruford et al., 1992). تکثیر قطعه ژنی با پرایمرهای (5' ACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA و FishF1(5' (TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC 3' FishR1 3') صورت گرفت. برنامه دمایی برای ژن COI به صورت حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۵ دقیقه، با ۳۵ سیکل چرخه حرارتی، ۴۵ ثانیه دناتوره در دمای ۹۴ درجه، دمای اتصال ۴۵ ثانیه در ۵۲ درجه، مرحله طویل شدن ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه دنبال شد و در نهایت، به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد پایان پذیرفت. کیفیت نهایی محصول با الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۵ درصد و با رنگ آمیزی Green viewer با ولتاژ ۸۵ ولت برای حرکت DNA استفاده گردید و در انتها از دستگاه مستندساز ژل برای مشاهده باندهای DNA استفاده شد. محصولات حاصل از PCR برای تعیین توالی به شرکت میکروسنس سوئیس ارسال شد. تراب‌های این مطالعه با توالی‌های حاصل از بانک ژنی (GenBank) ترکیب شد. برون‌گروه براساس مطالعه ما و همکاران (Ma et al., 2018) انتخاب شد. ترتیب‌های ژن میتوکندریایی با نرم‌افزار (Hall, 1999) BioEdit v7.2 تصحیح و با نرم‌افزار (Kumar et al., 2018) MEGA v10.0 هم‌تراز شدند. برای بررسی کدون‌های متوقف‌کننده، توالی‌های کدکننده پروتئین به توالی‌های آمینواسیدی ترجمه شدند تا در صورت حضور آنها از مجموعه توالی‌ها حذف شوند. فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای و بین گونه‌ای که در نتیجه تفاوت نوکلئوتیدی است، با مدل Kimura Two-Parameter (K2P) و با نرم‌افزار (Kumar et al., 2018) MEGA v10.0 محاسبه شد. بهترین مدل جایگزینی تکاملی برای نوکلئوتیدها با استفاده از (Darriba et al., 2012) jModelTest v2.1.6 و با توجه به معیار Akaike Information criterion شناسایی شد. تحلیل بیژین با نرم‌افزار (Ronquist et al., 2012) MrBayes 3.2.7 و تعداد ۳۰۰۰۰۰۰۰ تکرار انجام شد. در تحلیل بیژین ۲۰ درصد درخت اولیه از تحلیل حذف شد و پارسیمونی‌ترین درخت حاصل از بیژین با نرم‌افزار (Rambaut, 2016) FigTree v1.4.4 ویرایش شد. کладаها با احتمال پسین بالای ۹۵ به‌عنوان کلادهای تأییدی در نظر گرفته شدند.

نتایج

از دو ایستگاه تیس (خلیج عمان) (سه نمونه) (25°33'99"N; 60°60'02"E) از عمق ۳۰ تا ۵۰ متری و قشم (خلیج فارس) (دو نمونه) از عمق ۲۵ تا ۳۰ متری (26°58'75"N; 55°48'34"E) (شکل ۱) در مجموع، ۵ نمونه از گونه *Epinephelus polylepis* (شکل ۲) با تور و قلاب ماهیگیری جمع آوری شد.



شکل ۱. ایستگاه‌های نمونه‌برداری گونه *Epinephelus polylepis* از خلیج فارس و خلیج عمان

Figure 1. *Epinephelus polylepis* sampling stations from the Persian Gulf and Gulf of Oman.



شکل ۲. نمونه *Epinephelus polylepis* در شرایط تازه جمع آوری شده از ایستگاه تیس، خلیج عمان

Figure 2. Freshly collected specimen of *Epinephelus polylepis* from Tis station, Gulf of Oman.

داده‌های ریخت‌شناسی

صفات ریخت‌شناسی:

ویژگی‌های ریخت‌شناسی در گروپر فلس کوچک (شکل ۲) شامل: ۱۱ خار (XI) و ۱۶-۱۷ شعاع نرم در باله پشتی؛ ۶۶-۷۰ فلس در امتداد خط جانبی؛ ۸ شعاع نرم در باله مخرجی؛ ۱۹ شعاع نرم در باله سینه‌ای؛ ۹-۱۰ خار آبششی در نیمه بالایی کمان اول و ۱۷-۱۸ خار آبششی در نیمه پایینی کمان اول (۲۵-۲۸ مجموع خارهای آبششی)؛ باله دم‌ی کوتاه یا کمی لبه‌دار؛ سرپوش آبششی دندان‌دار؛ سر، بدن و باله‌های با تعداد زیادی لکه‌های قهوه‌ای تیره کوچک و نزدیک پوشیده شده (به جز قسمت‌های شکمی سر و بدن)؛ لبه انتهایی باله دم‌ی با خط سفید و یک ردیف لکه‌های قهوه‌ای مایل به سیاه؛ خطوط تیره در فک بالا.

جدول ۱. ویژگی‌های شمارشی و ریخت‌سنجی برای پنج نمونه *Epinephelus polylepis* از خلیج فارس و خلیج عمان (همه اندازه گیری‌ها بر طول استاندارد تقسیم شد).

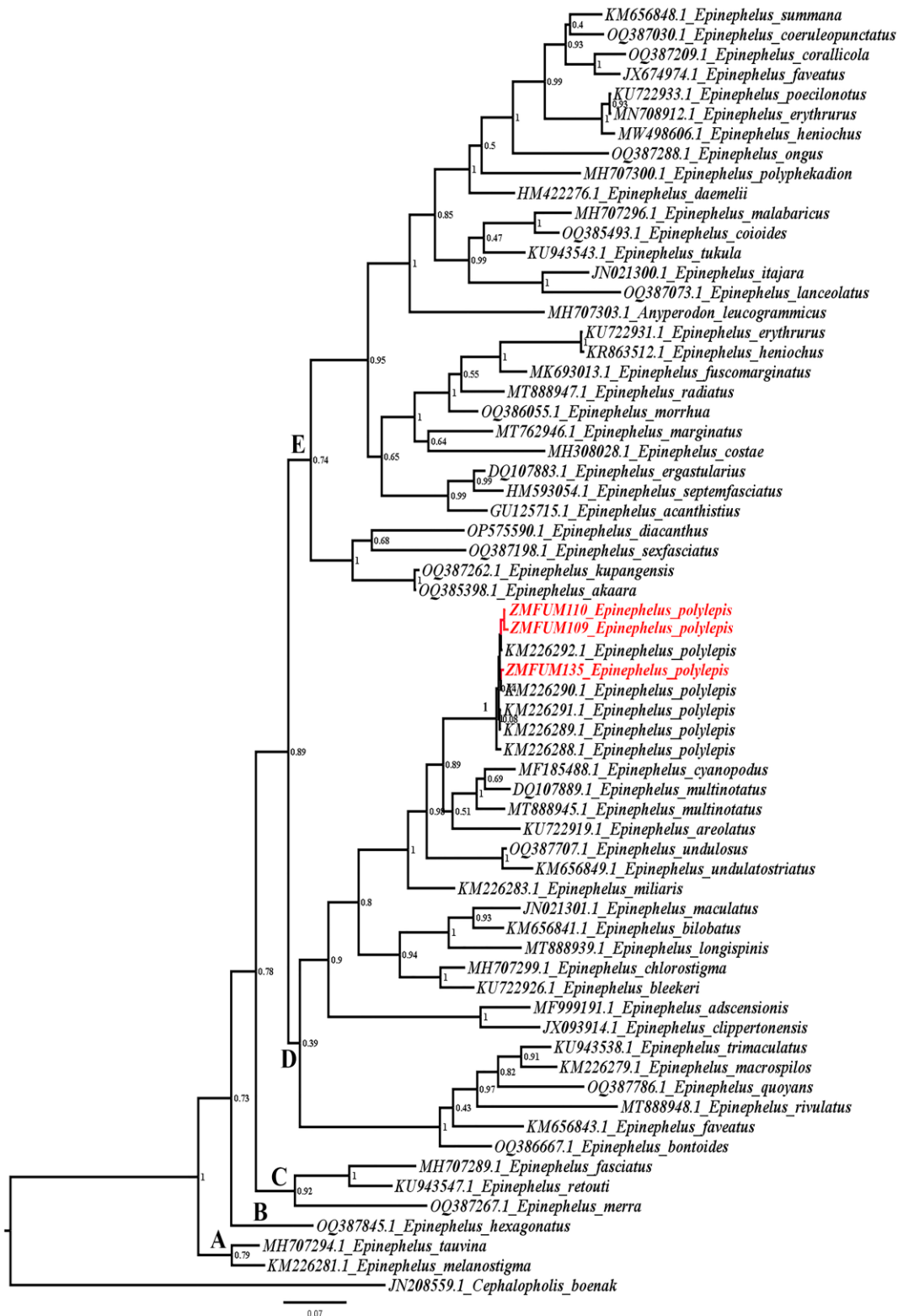
Table 1. Meristic and morphometric characteristics for five specimens of *Epinephelus polylepis* from the Persian Gulf and Gulf of Oman (all measurements as a percentage of standard length).

حد اقل - حداکثر ایستگاه قشم (خلیج فارس)	حد اقل - حداکثر ایستگاه تبس (خلیج عمان)	صفات
صفات شمارشی		
XI-۱۶	(XI-۱۷-۱۶)	تعداد خارها و شعاع نرم باله پشتی
III-۸	III-۸	تعداد خارها و شعاع نرم باله مخرجی
۱۹	۱۹	تعداد شعاع نرم باله سینه‌ای
۷	۷	تعداد شعاع نرم باله شکمی
۶۸-۶۶	۷۰-۶۷	تعداد فلس‌های خط جانبی
(۹) (۱۸-۱۷)	(۱۰-۹) (۱۸-۱۷)	تعداد خارهای آبششی نیمه بالایی - پایینی
صفات ریخت‌سنجی		
۳/۲۶۸-۳/۲۶۲	۸/۲۷۸-۲/۲۶۰	طول استاندارد
۹/۳۲-۲/۳۱	۴/۳۶-۶/۳۰	عمق بدن
۱/۴۰-۸/۳۹	۸/۴۱-۶/۳۹	طول سر
۲/۴۰-۸/۳۹	۸/۴۱-۶/۳۹	طول پوزه
۷-۵-۵/۵	۸/۵-۴/۵	قطر چشم
۱/۱۳-۴/۱۲	۱/۱۴-۳/۱۲	طول فک بالا
۹/۱۰-۴/۱۰	۳/۱۱-۷/۹	عمق ساقه دم
۴/۱۸-۶/۱۷	۴/۱۹-۱/۱۵	طول ساقه دم
۴/۷۵-۳/۷۲	۱/۸۴-۵/۶۸	طول پیش باله مخرجی
۱/۴۰-۵/۳۸	۴۱-۲/۳۷	طول پیش باله شکمی
۶/۵۴-۴/۵۲	۵/۵۶-۹/۴۹	طول باله پشتی
۲/۱۶-۹/۱۵	۹/۱۷-۴/۱۵	طول باله شکمی
۹/۱۱-۶/۱۱	۴/۱۳-۳/۱۰	طول باله مخرجی
۹/۲۰-۶/۱۸	۲۱-۱/۱۶	طول باله دم
۴/۲۰-۴/۱۹	۳/۲۱-۷/۱۸	طول باله سینه‌ای
۶/۱۲-۴/۱۲	۹/۱۲-۴/۱۲	طول بلندترین خار باله پشتی
۵/۱۰-۲/۹	۷/۱۱-۲/۸	طول بلندترین خار باله مخرجی

آنالیز مولکولی

در مجموع، ۶۵ توالی متعلق به ۵۷ گونه از جنس *Epinephelus* و یک برون گروه *Cephalopholis boenak* مربوط به ژن میتوکندریایی سیتوکروم C اکسیداز زیر واحد I (COI) برای تحلیل‌های مولکولی استفاده شدند. پس از هم‌ترازی توالی‌های نهایی گونه‌های این جنس تعداد ۶۵۴ نوکلئوتید برای تحلیل‌های استفاده شد که شامل ۱۸۰ نوکلئوتید پلی مورف، ۲۸۲ نوکلئوتید محافظت‌شده و ۱۶۷ نوکلئوتید پارسیمونی بود. مدل GTR+I+G به‌عنوان بهترین مدل انتخاب شد. جنس *Epinephelus* با توجه به حضور گونه *Anyperodon leucogrammicus* پارافیلی بود و در تجزیه و تحلیل بیژین جنس *Epinephelus* به پنج کلاذ مجزا با حمایت متوسط تا بالا تقسیم شده است (A-E) (شکل ۳).

گونه *Epinephelus polylepis* ارتباط بسیار نزدیکی با *E. areolatus*، *E. cyanopodus* و *E. multinotatus* به‌عنوان گروه خواهری را نشان داد (شکل ۳). همچنین، در آنالیزهای تبارزادی، نمونه‌های توالی‌یابی شده در این مطالعه با نمونه‌هایی از نزدیک محل تایپ (بحرین) یک گروه تک نیا با احتمال پسین بالا را شکل دادند (شکل ۳). تفاوت ژنتیکی بین نمونه‌های *E. polylepis* و گروه خواهری آنها به ترتیب *E. areolatus* (۸/۳ درصد)، *E. bleekeri* (۱۱/۸ درصد) و *E. chlorostigma* (۱۰/۶ درصد) بود؛ در حالی که میانگین فاصله ژنتیکی درون گونه‌های آنها ۰٫۱۹ درصد است.



شکل ۳. درخت حاصل از بیژن براساس ژن میتو کندریایی سیتوکروم C اکسیداز زیرواحد I (COI) برای گونه‌های *Epinephelus* توالی‌های گونه *Epinephelus polylepis* مطالعه شده در این پژوهش با رنگ قرمز نشان داده شده‌اند.

Figure 3. Bayesian Inference tree based on the mitochondrial gene of cytochrome C oxidase subunit (COI) I for *Epinephelus* species. The sequences of *Epinephelus polylepis* studied in this study are shown in red.

بحث

مطالعه حاضر شناسایی گونه *Epinephelus polylepis* با رویکرد یگانگی از خلیج فارس و خلیج عمان را نشان می‌دهد که قبلاً مطالعه جامعی صورت نگرفته بود. بسیاری از گونه‌های دریایی از جمله گونه‌های گروپر به دلیل شباهت زیادی که دارند، سبب شناسایی نادرست یا گزارش‌های گمراه‌کننده از گونه‌ها می‌شوند (Heemstra & Randall, 1993). چنین مواردی می‌تواند منجر به عدم دقت داده‌ها برای شیلات و همچنین، ارزیابی اشتباه در ارتباط با تنوع گونه‌ای مدنظر شود؛ بنابراین، مشکل شناسایی گونه‌های مختلف Epinephilidae می‌تواند در تمام مناطق ساحلی اقیانوس هند رخ دهد (Craig et al., 2001; Tavakoli-Kolour et al., 2022). تنوع بسیار بالا در سطح گونه، نبود تفاوت‌های ریخت‌شناسی مشخص و تخصص ناکافی در رده‌بندی گونه‌های گروپر سه عاملی هستند که احتمال شناسایی نادرست گونه و در نتیجه، برداشت بیش از حد احتمالی گونه‌های ناخواسته را افزایش می‌دهند (Tavakoli-Kolour et al., 2022; Craig et al., 2001). روابط تبارزادی بین اعضای جنس *Epinephelus* مدت‌هاست که به‌خوبی درک نشده و با نمونه‌های محدود مطالعه شده است

(Ma & Craig, 2018; Craig & Hastings, 2007). در این مطالعه، روابط تبارزادی بیش از ۶۰ درصد گونه‌های جنس *Epinephelus* (۵۷ گونه از ۸۹ گونه) به‌عنوان ابزاری برای ایجاد یک فرضیه تبارزادی با استفاده از تحلیل بیژن و بیشینه درست‌نمایی بررسی شد؛ در حالی که نتایج ریخت‌شناسی، تک‌نیایی دو جنس *Anyperodon* و *Epinephelus* را در گذشته تأیید کرده است (Johnson, 1983; Leis, 1986)؛ با این حال نتایج مولکولی ما همراه با مطالعات قبلی (Ma et al., 2018)، جنس *Anyperodon* Günther 1859 شامل گونه تایپ *Anyperodon leucogrammicus* را در جنس *Epinephelus* Bloch 1793 قرار می‌دهد و احتمالاً باید به‌عنوان مترادف *Epinephelus* در نظر گرفته شود. علاوه بر این، کلادهای حاصله در جنس *Epinephelus* از نظر الگوی رنگی و بوم‌شناختی باهم تفاوت دارند (Ma et al., 2018). هر دو داده مولکولی و ریخت‌شناسی اعتبار *E. polylepis* را با حمایت بالا پشتیبانی می‌کنند (شکل ۳، جدول ۱). این گونه از غرب سواحل هند تا یمن گزارش شده است و در گذشته به اشتباه به‌عنوان *E. chlorostigma* که یک گونه پیچیده (species complex) شناخته شده است (Heemstra & Randall, 1993). همه ویژگی‌های شمارشی و الگوی رنگی نمونه‌های جمع‌آوری شده این مطالعه تا حد زیادی با نمونه‌های تایپ و پاراتایپ هم‌پوشانی دارند (Heemstra & Randall, 1993; Randall & Heemstra, 1991). مقایسه این نمونه‌ها درباره ویژگی‌های ریخت‌سنجی نیز با نمونه اصلی سازگار بود، به‌جز دو صفت عمق بدن و طول سر که در نمونه‌های ما تا حدی بزرگ‌تر است. این تغییرات می‌تواند به دلیل نحوه اندازه‌گیری متفاوت توسط نویسندگان در این دو مطالعه انجام گرفته باشد. همچنین، ویژگی‌های توصیفی نمونه‌های گزارش شده از عمان (Randall, 1995)، پاکستان (Moazzam & Osmany, 2023; Psomadakis et al., 2015) و شمال غرب اقیانوس هند (Heemstra et al., 2022) نمونه‌های بررسی شده در این مطالعه را تأیید می‌کنند. گونه *E. polylepis* از نظر ریخت‌شناسی و مولکولی بیشترین شباهت را با گونه‌های *E. areolatus*، *E. bleekeri* و *E. chlorostigma* در خلیج فارس و خلیج عمان نشان می‌دهد (شکل ۳). گونه *E. chlorostigma* اکثراً به اشتباه با *E. polylepis* شناسایی می‌شود. این دو گونه به‌وسیله تعداد فلس‌های روی خط جانبی (۶۶-۷۰ در *E. polylepis* در مقابل ۵۳-۴۸ در *E. chlorostigma*) و باله مخرجی پهن‌تر در *E. polylepis* در حالی که در *E. chlorostigma* باله مخرجی نوک تیزتر است (Randall, 1995). گونه *E. polylepis* از *E. areolatus* و *E. bleekeri* به‌وسیله تعداد خارهای آبششی (۱۷-۱۸ خار آبششی در نیمه پایینی در مقابل ۱۶-۱۴ خار آبششی در *E. areolatus*) و الگوی رنگی (لکه‌های قهوه‌ای تیره کوچک و نزدیک در سطح بدن در مقابل لکه‌های قهوه‌ای تیره بزرگ و با فاصله زیاد در *E.*

areolatus) جدا می‌شود. تجزیه و تحلیل مولکولی، شناسایی ریخت‌شناسی نمونه‌های محدوده شمالی خلیج فارس و خلیج عمان به‌عنوان *E. polylepis* را تأیید کرد (شکل ۳). در آنالیز تبارزادی توالی میتوکندری COI یک گروه تک‌نیا شامل نمونه‌های محدوده شمالی خلیج فارس و خلیج عمان و نمونه‌های بحرین (مکان تایپ) را ثابت کرد که واگرایی کمی بین آنها وجود دارد. تجزیه و تحلیل ژنتیکی نیز واگرایی بالایی بین *E. polylepis* و گونه‌های نزدیک از جمله *E. chlorostigma* و *E. areolatus* نشان داد. اگرچه روابط تبارزادی این گونه‌ها را نمی‌توان تنها با ژن COI به‌خوبی حل کرد، هر یک از گونه‌ها یک کلاذ تک‌نیا را با پشتیبانی بالا تشکیل دادند که از اعتبار آنها حمایت می‌کند (شکل ۳). نتایج فاصله ژنتیکی مطالعه حاضر نیز جدایی بین *E. polylepis* و سه گونه نزدیک *E. areolatus*، *E. bleekeri* و *E. chlorostigma* را بیش از حداقل فاصله تعیین شده شناسایی کرد (۸/۳، ۱۱/۸ و ۱۰/۶ درصد به ترتیب). این فاصله ژنتیکی در ماهیان دریایی براساس ژن COI برای جدایی گونه‌های نزدیک یا آرایه‌های خواهری حداقل ۲ درصد تعیین شده است (Ward, 2009) که اعتبار این گونه را از نظر ژنتیکی تأیید می‌کند. همچنین، براساس داده‌های بانک ژن *E. polylepis* با شباهت ۹۹ تا ۱۰۰ درصد درباره توالی‌های COI با موفقیت به‌عنوان *E. polylepis* شناسایی شد. اگرچه توالی‌هایی از بانک ژن مشاهده می‌شود که گونه‌های *E. areolatus*، *E. chlorostigma* و *E. bleekeri* را به اشتباه به‌عنوان *E. polylepis* شناسایی کردند (از آنالیز حذف کردیم)، به نظر می‌رسد شناسایی نادرست گروپر *Epinephelus* به‌طور فراگیر و بین گونه‌ای رخ می‌دهد. در مطالعات آینده شناسایی دقیق مولکولی دیگر اعضای خانواده Epinephelidae می‌تواند روابط و تنوع گونه‌ای آنها را به‌خوبی به اثبات برساند.

سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی کسانی که در مراحل مختلف این تحقیق با ما همکاری داشته‌اند، اعلام می‌نمایم. این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است.

References

- Alavi-Yeganeh, M. S., Khajavi, M., & Kimura, S. (2021). A new ponyfish, *Deveximentum mekranensis* (Teleostei: Leiognathidae), from the Gulf of Oman. *Ichthyological Research*, 68, 437-444. <https://doi.org/10.2478/cjf-2019-0021>
- Asgharian, H., Sahafi, H. H., Ardalani, A. A., Shekarriz, S., & Elahi, E. (2011). Cytochrome c oxidase subunit 1 barcode data of fish of the Nayband National Park in the Persian Gulf and analysis using meta-data flag several cryptic species. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 461-472. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02989.x>
- Blegvad, H. (1944). *Fishes of the Iranian Gulf*. Danish Scientific Expedition in Iran (1935-1938) Part 3, 247.
- Craig, M. T., Pondella II, D. J., Franck, J. P., & Hafner, J. C. (2001). On the status of the serranid fish genus *Epinephelus*: evidence for paraphyly based upon 16S rDNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(1), 121-130. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0913>
- Bruford, M. W., Hanotte, O., Brookfield, J. F. Y., & Burke, T. (1992). Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach* (pp. 225-269.). IRL Press. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19931698234>
- Carpenter, K.E., Krupp, F., Jones, D.A., Zajonz, U. (1997). *FAO species identification field guide for fishery purposes. The living marine resources of Kuwait, Eastern Saudi Arabia, Bahrain, Qatar, and the United Arab Emirates*. FAO. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19970106805>
- Craig, M. T., & Hastings, P. A. (2007). A molecular phylogeny of the groupers of the subfamily Epinephelinae (Serranidae) with a revised classification of the Epinephelini. *Ichthyological Research*, 54, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s10228-006-0367-x>

- Damadi, E., Moghaddam, F. Y., Ghassemzadeh, F., & Ghanbarifardi, M. (2020). *Plectorhinchus makranensis* (Teleostei, Haemulidae), a new species of sweetlips from the Persian Gulf and the Gulf of Oman. *ZooKeys*, 980, 141. <https://doi.org/10.3897/zookeys.980.50934>
- Damadi, E., Moghaddam, F. Y., Ghassemzadeh, F., & Ghanbarifardi, M. (2021). Aspects of morphometry, distribution, and key identification of the genus *Pomadasys* (Perciformes: Haemulidae) from the Persian Gulf and Gulf of Oman with descriptions of new records. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*, 37, 671-682. <https://doi.org/10.1007/s41208-021-00308-1>
- Damadi, E., Moghaddam, F. Y., & Ghanbarifardi, M. (2023). Species delimitation, molecular phylogeny and historical biogeography of the sweetlips fish (Perciformes, Haemulidae). *Zoosystematics and Evolution*, 99(1), 135-147. <https://doi.org/10.3897/zse.99.96386>
- Damadi, E., Moghaddam, F. Y., & Ghanbarifardi, M. (2024). Taxonomic Validation of Sweetlips Fish (Haemulidae: Plectorhinchinae) From the Persian Gulf and Gulf of Oman Based On Traditional and Geometric Morphometrics with Notes On Their Distribution. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*, 40, 795-808. <https://doi.org/10.1007/s41208-024-00663-9>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. *Nature methods*, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Edalati, F., Askari Hesni, M., Teimori, A., & Lashkari, M. (2018). Sagittal morphology of *Epinephelus* Bloch 1793 (Teleostei: Serranidae) in Persian Gulf and Oman Sea. *Journal of Applied Ichthyological Research*, 6(1), 21-34. <https://jair.gonbad.ac.ir/article-1-437-en.html> [In Persian].
- Eagderi, S., Fricke, R., Esmaeili, H. R., & Jalili, P. (2019). Annotated checklist of the fishes of the Persian Gulf: Diversity and conservation status. *Iranian Journal of Ichthyology*, 6, 1-171. <https://doi.org/10.22034/iji.v6i0.454>
- Fricke R, Eschmeyer W. N, van der Laan R. (2024). *Catalog of fishes: genera, species, references*. <https://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> [Version 05/2024].
- Ghanbarifardi, M., Gut, C., Gholami, Z., Esmaeili, H. R., Gierl, C., & Reichenbacher, B. (2020). Possible link between the structure of otoliths and amphibious mode of life of three mudskipper species (Teleostei: Gobioidi) from the Persian Gulf. *Zoology in the Middle East*, 66(4), 311-320. <https://doi.org/10.1080/09397140.2020.1805140>
- Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, (41), 95-98. <https://B2n.ir/q11535>
- Hassanien, H. A., & Al-Rashada, Y. (2021). Assessment of genetic diversity and phylogenetic relationship among grouper species *Epinephelus* spp. from the Saudi waters of the Arabian Gulf. *Saudi journal of biological sciences*, 28(3), 1779-1786. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.020>
- Heemstra, P. C, Randall J. E. (1993). *Groupers of the World (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae); an annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date*. FAO Species Catalog 16.
- Heemstra, P. C., E. Heemstra, D. A. Ebert, W. Holleman and J. E. Randall (eds.) 2022 (29 Sept.). [ref. 39652] See ref. online *Coastal fishes of the western Indian Ocean*. Volume 3. South African Institute for Aquatic Biodiversity, Makhanda, South Africa: i-ii, 1-469. <https://saiab.ac.za/publications/coastal-fishes-of-the-western-indian/>
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology*, 2(10), e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Javadzadeh, N., Mabudi, H., & Azhir, M. T. (2017). Study of morphometric characteristics of sagitta otolith in four species of Serranidae in coral reefs of Persian Gulf and Oman Sea. *Journal of Marine Fishes*, 1(2), 1-9. https://mfj.areeo.ac.ir/article_115395_en.html?lang=en [In Persian].
- Johnson, G.D. (1983). *Nippon spinosus*: a primitive epinepheline serranid, with comments on the monophyly and intrarelationships of the Serranidae. *Copeia*, 1983(3), 777-787. <https://www.jstor.org/stable/1444346>
- Johnson, J. W., & Worthington Wilmer, J. (2019). *Epinephelus fuscomarginatus* (Perciformes: Epinephelidae), a new species of grouper from off the Great Barrier Reef, Australia. *Zootaxa*, 4674(3), 329-348. <https://B2n.ir/m37894>

- Khayyami, H., Zolgharnein, H., Salamat, N., & Movahedinia, A. (2015). Morphological variability of *Liza klunzingeri* (Day, 1888) from Bandar Abbas Port and Qeshm Island in northeastern Persian Gulf. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 10(3), 191. <https://B2n.ir/f85988>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Leis, J.M. (1986). Larval development in four species of Indo-Pacific coral trout *Plectropomus* (Pisces, Serranidae: Epinephelinae) with an analysis of relationships of the genus. *Bulletin of Marine Science*, 38(3), 525–552. <https://B2n.ir/f25618>
- Luiz, O. J., Woods, R. M., Madin, E. M. P., & Madin, J. S. (2016). Predicting IUCN extinction risk categories for the world's data deficient groupers (Teleostei: Epinephelidae). *Conservation letter*, 9(5), 342–350. <https://doi.org/10.1111/conl.12230>
- Ma, K. Y., & Craig, M. T. (2018). An inconvenient monophyly: an update on the taxonomy of the groupers (Epinephelidae). *Copeia*, 106(3), 443-456. <https://doi.org/10.1643/CI-18-055>
- Ma, K. Y., Van Herwerden, L., Newman, S. J., Berumen, M. L., Choat, J. H., Chu, K. H., & Sadovy de Mitcheson, Y. (2018). Contrasting population genetic structure in three aggregating groupers (Percoidae: Epinephelidae) in the Indo-West Pacific: the importance of reproductive mode. *BMC Evolutionary Biology*, 18, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1284-0>
- Mehraban, H., Zarei, F., & Esmaili, H. R. (2021). A prelude to the molecular systematics and diversity of combtooth blennies (Teleostei: Blenniidae) in the Persian Gulf and Oman Sea. *Systematics and Biodiversity*, 19(5), 438-452. <https://doi.org/10.1080/14772000.2021.1895900>
- Moazzam, M., & Osmany, H. B. (2023). Groupers of Family Epinephelidae (Order: Perciformis) from Pakistan-I. Taxonomic enumeration. *International Journal of Biology and Biotechnology*, 20(4), 659-695. <https://B2n.ir/y48190>
- Polgar, G., Ghanbarifardi, M., Milli, S., Agorreta, A., Aliabadian, M., Esmaili, H. R., & Khang, T. F. (2017). Ecomorphological adaptation in three mudskippers (Teleostei: Gobioidae: Gobiidae) from the Persian Gulf and the Gulf of Oman. *Hydrobiologia*, 795, 91-111. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3120-8>
- Psomadakis, P., Thein H, Russell, B. C., & Tun, M.T. (2015). *Field identification guide to the living marine resources of Myanmar*. FAO species identification guide for fishery purposes. <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/CA7180EN>
- Randall, J. E., & Heemstra, P. C. (1991). Revision of Indo-Pacific groupers (Perciformes: Serranidae: Epinephelinae), with descriptions of five new species. *Indo-Pacific Fishes*, 20, 332. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571980074150545792>
- Randall J. E. (1995). *Coastal fishes of Oman*. Crawford House Publishing Pty Ltd Bathurst.
- Rambaut, A. (2008). *FigTree v1. 4.4*. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Rimmer, M. A., & Glamuzina, B. (2019). A review of grouper (Family Serranidae: Subfamily Epinephelinae) aquaculture from a sustainability science perspective. *Reviews in Aquaculture*, 11(1), 58-87. <https://doi.org/10.1111/raq.12226>
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Sadeghi, R., Esmaili, H. R., Zarei, F., & Reichenbacher, B. (2020). Population structure of the ornate goby, *Istigobius ornatus* (Teleostei: Gobiidae), in the Persian Gulf and Oman Sea as determined by otolith shape variation using ShapeR. *Environmental Biology of Fishes*, 103, 1217-1230. <https://doi.org/10.1007/s10641-020-01015-1>
- Smith, W. L., & Craig, M. T. (2007). Casting the percomorph net widely: the importance of broad taxonomic sampling in the search for the placement of serranid and percid fishes. *Copeia*, 2007(1), 35-55. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2007\)7\[35:CTPNWT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2007)7[35:CTPNWT]2.0.CO;2)
- Tavakoli-Kolour, P., Farhadi, A., Ajdari, A., Bagheri, D., Hazraty-Kari, S., Ghasemi, A., & Vazirzadeh, A. (2022). Genetic species identification and population structure of grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822) collected from fish markets along the Persian Gulf and the Oman Sea. *PeerJ*, 10, e14179. <https://doi.org/10.7717/peerj.14179>
- Ward, R. D. (2009). DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular ecology resources*, 9(4), 1077-1085. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02541>