

بررسی جایگاه آرایه‌شناسی گاوماهی ایرانی *Ponticola iranicus* (Teleost, Gobiidae) براساس زیر واحد ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز COI

نسرین نیک‌مهر^۱، سهیل ایگدری^{۲*}، هادی پورباقر^۲

۱. دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۳۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۶/۲۷

چکیده

در آب‌های داخلی ایران خانواده گاوماهیان شامل ۴۲ گونه در ۱۵ جنس است که جنس *Ponticola* با ۶ گونه تنوع بالایی دارد. تنوع ریختی بالای اعضای جنس *Ponticola* شناسایی گونه‌های این جنس را دشوار ساخته است. اخیراً یک گونه جدید از این جنس به نام گاوماهی ایرانی *Po. iranicus* براساس ویژگی‌های ریختی از رودخانه‌های زیرحوضه رودخانه سفیدرود یعنی رودخانه‌های بیجار، گیسوم و توتکابن توصیف شده است. از این رو تحقیق حاضر جهت اعتبارسنجی این گونه و تعیین جایگاه آرایه‌شناسی آن براساس ژن COI به اجرا درآمد. برای این منظور نمونه‌های موردنظر پس از نمونه برداری و استخراج DNA با روش فنول-کلروفرم، ژن سیتوکروم COI آن‌ها طی فرآیند PCR تکثیر و پس از خالص‌سازی توالی‌یابی شدند. نتایج نشان داد که *Po. iranicus* از نظر مارکر ژنی مورد بررسی یک گونه معتبر بوده و به‌عنوان گونه خواهری *Po. syrman* با فاصله ژنتیکی حدود ۳ درصد می‌باشد.

واژگان کلیدی: آرایه‌شناسی، تنوع ریختی، تنوع ژنتیکی، ایران.

۱. مقدمه

(Eagderi et al., 2018) به سختی امکان پذیر است. گونه گاوماهی ایرانی به واسطه رنگ خاکستری تیره باله پشتی، داشتن یک خط هاله مانند مورب و سیاه در باله پشتی و داشتن ۱۶-۱۵ و ۱۲-۱۱ شعاع منشعب در باله پشتی دوم و باله مخرجی از دیگر اعضای این جنس جدا شده است، که چنین صفاتی در برخی جمعیت‌های گونه‌های دیگر جنس *Ponticola* از جمله *Po. gorlap* و *Po. syrman* نیز مشاهده می‌شود، بنابراین به نظر می‌رسد که اعتبار این گونه با استفاده از مارکرهای مولکولی و استخوانی باید مورد بررسی قرار گیرد.

به علت محدودیت‌های کاربرد ویژگی‌های ریخت‌شناسی در آرایه‌شناسی ماهیان (Swain and Foote, 1999)، توالی ژن COI میتوکندریایی به طور گسترده در مطالعات تبارشناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد و این ژن توانایی بالایی در تشخیص اعتبار گونه‌های نزدیک را دارد (Ward et al., 2005)، بنابراین برای جلوگیری از هر گونه خطا در توصیف و رده‌بندی گونه‌ها لازم است از صفات مولکولی و استخوانی نیز به عنوان روش‌های مکمل استفاده شود. از این رو با توجه به مطالب فوق، تحقیق حاضر با هدف اعتبار سنجی گونه گاوماهی ایرانی *Po. iranicus* و بررسی جایگاه تبارزایی آن با استفاده از نشانگر مولکولی زیر واحد ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) به اجرا درآمد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۰۲. نمونه برداری

نمونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق از رودخانه سفیدرود (از محل نمونه‌های پاراتایپ گونه گاوماهی ایرانی) توسط دستگاه الکتروشوکر صید شدند (شکل ۱). تعداد ۳ نمونه جهت بررسی مولکولی در اتانول ۹۶ درصد تثبیت شدند و سپس طی دو مرحله با فاصله زمانی ۱۲ ساعت عملیات تعویض اتانول آن‌ها انجام شد. به علاوه تعداد ۳۰ نمونه جهت مطالعات ریخت‌شناسی در فرمالین فسفات بافری ۱۰ درصد تثبیت و بعد از ۴۸ ساعت محلول فرمالین تعویض و به دنبال آن نمونه‌ها پس از ۲ هفته به الکل ۷۲ درصد منتقل شدند، شناسایی گونه‌های گاوماهی ایرانی نیز براساس Vasileva و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد.

دو گروه از ماهیان خانواده گاوماهیان (Gobiidae) به ترتیب در مناطق آتلانتیک-مدیترانه و منطقه پونتوکاسپین (PontoCaspian) یافت می‌شوند که از نظر تبارزایی دارای جد مشترک بوده و به دلیل جدایی جغرافیایی از یکدیگر مسیر تکاملی مجزایی را سپری کرده‌اند (Miller, 1986; Smirnov, 1986). منطقه پونتوکاسپین شامل حوضه‌های دریای سیاه، آزوف، خزر و آرال است (Berg, 1949) و در بین این مناطق حوضه جنوبی خزر براساس Esmaeili و همکاران (۲۰۱۴، ۲۰۱۸) شامل ۱۱۹ گونه ماهی است که اعضای گاوماهیان با ۳۷ گونه (۳۱/۰۹ درصد) بعد از کپورماهیان دارای بیشترین تنوع می‌باشند. اعضای این خانواده معمولاً ارزش تجاری کمی دارند، از این رو اطلاعات درباره تنوع زیستی آن‌ها اندک می‌باشد (Miller, 2003, 2004; Bogutskaa et al., 2013).

در حوضه جنوبی خزر در مجموع ۳۷ گونه در ۸ جنس از گاوماهیان یافت می‌شود که در بین آن‌ها جنس *Ponticola* با ۶ گونه بیشترین تنوع را دارد. جنس *Ponticola* به وسیله چند صفت ریخت‌شناسی شامل: داشتن پوسته قدامی باله لگنی توسعه یافته، لوب‌های جانبی تیز، استخوان دندانی (Dentary) با دندان‌های بزرگ مخروطی در قسمت انتهایی و فک پهن‌تر در بخش پشتی از دیگر جنس‌ها متمایز می‌شوند (Vasileva et al., 1993; Miller and Vasileva, 2003). گاوماهیان رودخانه‌های منتهی به تالاب انزلی، استان گیلان و نواحی شمالی ایران قبلاً تحت عنوان *Ponticola cyrius* بیان شده بودند (Ahnelt and Holčík, 1996)، ولی براساس Vasileva و همکاران (۲۰۱۵) اعضای گاوماهیان این جنس در ناحیه‌ی شرق حوضه جنوبی دریای خزر دارای تنوع بالایی می‌باشند و در نتیجه آن‌ها گونه گاوماهی ایرانی *Po. iranicus* را براساس صفات ریختی توصیف کردند.

با توجه به وجود تنوع ریختی بالای اعضای جنس *Ponticola* در زیستگاه‌های مختلف حوضه جنوبی دریای خزر، شناسایی تنوع گونه‌ای آن‌ها در رودخانه‌های مختلف علی‌رغم کلیدهای شناسایی آرایه شده



شکل ۱- نمای جانبی گونه گاوماهی ایرانی، *Ponticola iranica* از رودخانه سفیدرود.

۲.۲. استخراج DNA

استخراج DNA براساس روش بهینه‌شده فنل-کلروفورم صورت گرفت. در این روش قطعاتی از باله سینه‌ای سمت راست در بافر استاندارد STE به همراه پروتئیناز K به مدت ۲۴ ساعت هضم و سپس خالص‌سازی با استفاده از فنل و کلروفورم انجام شد. پس از رسوب و شستشوی DNA با الکل، در آب مقطر حل شد. تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۱٪ و کمیت آن توسط دستگاه نانودراپ مورد سنجش قرار گرفت. به‌منظور تکثیر ژن COI از یک جفت پرایمر رفت و برگشت (FishF1: 5'TCAACCAACCACAAAGACATTGG CAC3' و FishR1: 5'TAGACTTCTGGG TGGCCAAAGAATCA3' Ward et al., 2005) استفاده شد.

۳.۲. واکنش PCR

برای انجام واکنش PCR بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده پرایمرها (Thermo Scientific) از ۵۰ μL محلول PCR شامل ۲۵ μL محلول Taq 2X Mastermix red، مقدار ۱ μL از هر پرایمر، مقدار ۵ μL از DNA الگو و ۱۸ μL آب مقطر یونیزه شده درون میکروتیوپ ۲۰۰ μL استفاده شد. شرایط دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک چرخه ده دقیقه‌ای واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C و ۳۰ چرخه یک دقیقه‌ای با دماهای ۹۴، ۵۸/۵ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای واسرشته‌سازی، اتصال پرایمر و تکثیر و در نهایت یک چرخه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۲°C به‌منظور بست نهایی انجام شد. به‌منظور اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر ۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگاروز یک درصد بارگذاری (الکتروفورز) شدند.

۴.۲. توالی‌یابی

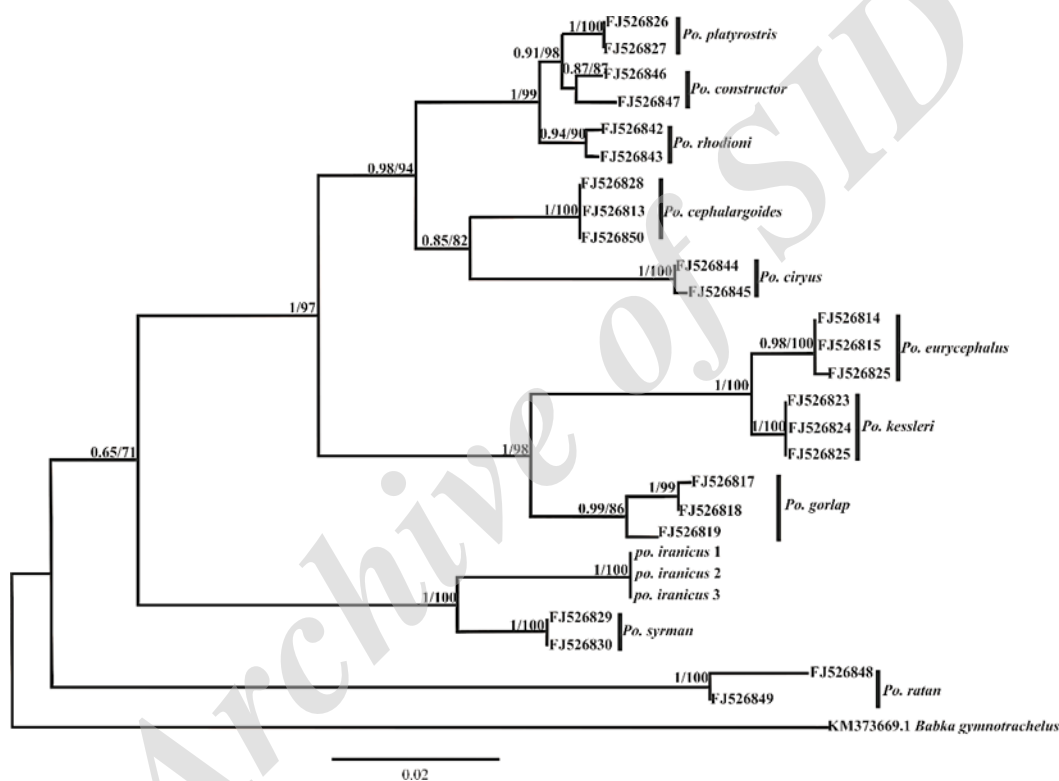
به‌منظور توالی‌یابی قطعه مورد نظر ابتدا محصول PCR توسط کیت خالص‌سازی بایونیر (Bioneer, Inc, Daejeon, Korea) خالص شد و سپس جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen, Inc, Daejeon, Korea) ارسال شد. قطعات تکثیر شده از دو جهت مستقیم و معکوس توالی‌یابی شدند.

۵.۲. آنالیز داده‌ها

توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Bioedit V 7.1.3 ویرایش شدند (Hall, 1999). عملیات انطباق توالی‌های ژن COI با استفاده از نرم‌افزار ClustalX (1.83) انجام شد. به‌منظور یافتن توالی‌های مشابه برای استفاده در بررسی شجره‌شناسی، توالی‌های به-دست آمده با استفاده از جستجوی Blast در بانک ژن NCBI با سایر توالی‌های موجود مقایسه و این توالی‌های استخراج شدند (جدول ۱). مدل تکاملی با استفاده از نرم‌افزار jModeltest انتخاب گردید (Darriba et al., 2012). برای بررسی شجره‌شناسی به روش Bayesian inference از نرم‌افزار MrBayes v3.1.2 و تکرار ۱/۵ میلیون نسل (Ronquist et al., 2012) و برای Maximum likelihood از نرم‌افزار RaxML V 7.2.5 و ۱۰۰۰ تکرار استفاده گردید (Stamatakis, 2014). برای تعیین فاصله نوکلئوتیدی از روش K2P در نرم‌افزار MEGA6 استفاده شد (Kumar et al., 2008). این فاصله بین گاوماهی ایرانی و گونه‌های *Po. syrman* و *Po. gorlap*، *Po. cyrius* تعیین گردید. همچنین برای نمایش دارنگاره‌های ایجاد شده

جدول ۱- نام تاکسون و شماره دسترسی آن‌ها در بانک ژن.

No	Accession no	Species	No	Accession no	Species
1	Po. cephalargoides	FJ526773	23	Po. gorlap	FJ526764
2	Po. cephalargoides	FJ526758	24	Po. kessleri	FJ526768
3	Po. cephalargoides	FJ526794	25	Po. kessleri	FJ526769
4	Po. ciryus	FJ526788	26	Po. kessleri	FJ526770
5	Po. ciryus	FJ526789	27	Po. platyrostris	FJ526771
6	Po. constructor	FJ526790	28	Po. platyrostris	FJ526772
7	Po. constructor	FJ526791	29	Po. ratan	FJ526792
8	Po. eurycephalus	FJ526759	30	Po. ratan	FJ526793
9	Po. eurycephalus	FJ526760	31	Po. rhodioni	FJ526786
10	Po. eurycephalus	FJ526761	32	Po. rhodioni	FJ526787
11	Po. gorlap	FJ526762	33	Po. syrman	FJ526774
12	Po. gorlap	FJ526763	34	Po. syrman	FJ526775



شکل ۲ - دارنگاره ترسیم شده به روش BI و ML. شماره دسترسی نمونه‌های بانک ژن در جلوی آنها نوشته شده است. اعداد بالای گره‌ها عدد Bootstrap بدست آمده است. برای ML حدود ۱۰۰۰ تکرار و برای BI ۱۰ میلیون نسل محاسبه گردید.

بر اساس نتایج، نرم‌افزار jModeltest مدل HKY+G پیشنهاد نمود. هر دو دارنگاره ترسیم شده با استفاده از روش‌های Maximum likelihood و Bayesian inference دارای شکل مشابهی بودند به همین دلیل تنها از دارنگاره Bayesian استفاده گردید و اعداد بوت استرپ حاصله از هر دو آزمون بر روی گره‌ها درج گردید (شکل ۲). بر اساس دارنگاره ترسیم شده اعضای جنس *Ponticola* دریافت شده از بانک ژن به همراه توالی‌های گاوماهی ایرانی، اعضای این جنس به ۱۱

نیز از نرم‌افزار FigTree v1.4.2 استفاده شد (Rambaut, 2015). تعیین برون گروه بر اساس مطالعات پیشین صورت گرفت (Neilson and Stepien, 2009).

۳. نتایج

در این مطالعه توالی زیر واحد ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) برای ۳ نمونه مورد مطالعه متعلق به جنس *Ponticola* به طول ۶۳۷ جفت باز به دست آمد.

جدول ۲- میانگین فاصله ژنتیکی K2P در بین گونه‌های مورد مطالعه بر اساس درصد تمایز توالی ژن COI.

ردیف	گونه	۱	۲	۳
۱	<i>Po. syrman</i>			
۲	<i>Po. iranicus</i>	۳		
۳	<i>Po. ciryus</i>	۹/۷	۱۰/۵	
۴	<i>Po. gorlap</i>	۸/۱	۹/۵	۷

این خطاها استفاده می‌شود.

Vasileva و همکاران (۲۰۱۵) بیان داشتند که اعضای گاوماهیان جنس *Ponticola* در ناحیه شرق حوضه جنوبی دریای خزر دارای تنوع گونه‌ای بالایی می‌باشند و گونه جدیدی از این جنس از غرب حوضه جنوبی دریای خزر با نام گاوماهی ایرانی *Po. iranicus* براساس ویژگی‌های ریختی توصیف نمودند. براساس نتایج تحقیق حاضر اعتبار گونه‌ای *Po. iranicus* به لحاظ مارکر مولکولی یعنی COI قابل تایید می‌باشد. زیرا در درخت تبارشناسی ترسیم شده این گونه در خوشه‌ای مجزا با اعداد Bootstrap بالا قرار گرفته و همچنین با نزدیک ترین گونه‌ی این جنس یعنی *Po. syrman* تقریباً ۳ درصد فاصله ژنتیکی دارد. براساس Ward و همکاران (۲۰۰۵) و Hubert و همکاران (۲۰۰۸)، تنوع ژنی درون گونه‌ای حدود ۰/۳۹ درصد برای ماهیان دریایی و ۰/۲۷ درصد برای ماهیان آب شیرین گزارش شده است که فاصله گونه مورد بررسی در این مطالعه بیشتر از این مقدار پیشنهاد شده است.

گونه *Po. syrman* از جمله گونه‌های منطقه پونتوکاسپین می‌باشد که در آب‌های لب‌شور و شیرین یافت می‌شود (Freyhof and Kottelat, 2008) و گونه *Po. iranicus* به‌عنوان یک گروه خاوه‌ری گونه *Po. syrman* در حوضه جنوبی دریای خزر سیر تکاملی مجزایی را سپری کرده است، بنابراین به‌نظر می‌رسد که در حوضه دریای خزر این گونه باید جایگزین *Po. syrman* در نظر گرفته شود. برای درک بیشتر این موضوع یک مطالعه جامع مولکولی بین جمعیت‌های مختلف *Po. syrman* گزارش شده در حوضه جنوبی دریای خزر می‌بایست صورت پذیرد.

۵. قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران انجام شده است.

شاخه اصلی تقسیم شد که با اعداد بوت استرپ بالا قابل تأیید بودند. براساس نتایج گاوماهی ایرانی در یک شاخه مجزا و به عنوان گونه خاوه‌ری *Po. syrman* قرار گرفت.

به‌علاوه براساس نتایج میانگین فاصله ژنتیکی K2P بین گونه‌ای آرایه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیشترین میزان فاصله ژنتیکی به میزان ۱۰ درصد بین گونه‌های *Po. iranicus* و *Po. cyrius* و کمترین میزان فاصله ژنتیکی به میزان ۳ درصد بین گونه‌های *Po. iranicus* و *Po. syrman* به‌دست آمد (جدول ۲).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

ویژگی‌های ریختی نظیر صفت‌های اندازه‌ی و شمارشی به‌طور معمول در شناسایی و رده‌بندی گونه‌های ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. اعضای خانواده گاوماهیان به لحاظ ریختی بسیار شبیه یکدیگر هستند و این امر باعث گردیده که شناسایی گونه‌های این خانواده با دشواری صورت پذیرد. از طرفی دیگر ویژگی‌های ریخت‌شناسی که به‌عنوان کلید شناسایی برای تفکیک اعضای این خانواده استفاده می‌شود (ایگدری و همکاران، ۱۳۹۷)، به دلیل همپوشانی بالا فاقد توان تفکیکی لازم برای شناسایی گونه‌ها می‌باشد. این عوامل باعث شده تا همواره شناسایی و رده بندی اعضای خانواده گاوماهیان با مشکل مواجه باشد. به دلیل محدودیت‌ها در استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی در آرایه‌شناسی گاوماهیان، به‌ویژه در سطح درون و بین گونه‌ای، امروزه صرفاً از ویژگی‌های ریختی استفاده نمی‌گردد زیرا با تغییرات محیطی، فوتیپ ماهیان تنوع ریختی بسیار زیادی پیدا می‌کند که این تغییرات شامل تغییر در رفتار و فیزیولوژی آن‌ها نیز می‌گردد (Swain and Foote, 1999). بنابراین امروزه برای جلوگیری از این نقیصه از روش‌های مولکولی نیز به‌عنوان روشی مکمل در جهت پوشاندن

References

- Ahnelt, H., Holčík, J., 1996. Distribution of two species of the genus *Neogobius* (Pisces: Gobiidae) in the catchment area of the southern Caspian Sea. *Acta Universitatis Carolinae Biologica* 40(1/2), 99-114.
- Berg, L.S., 1949. Freshwater Fishes of the USSR and Adjacent Countries. Izdatel'vesto Akademii Nauk SSSR, Moscow. Bleeker, P., 1853. Vierde bijdrage tot de kennis der ichthyologische fauna van Amboina. *Natuurkundig tijdschrift voor Nederlandsch Indi* 5, 317-352.
- Bogutskaa, N.G., Kiáško, P.V., Naseka, A.M., Orlova, M.I., 2013. Opredelitel' ryb i bespozvonočnyh Kaspijskogo morâ. T. 1. Ryby i mollûski [Identification keys for fish and invertebrates of the Caspian Sea. V. 1. Fishes and mollusks.] Tovarišestvo naučnyh izdanij KMK, Sankt-Peterburg–Moskva. 543 p. (In Russian with English summary)
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 772.
- Eagderi, S., Nasri, M., Jouladeh-Roudbar, A., Abbasi, K., 1397. Fishes of Iran (Gobiidae). Avai Viana Publication. Tehran, 74 p.
- Esmaeili, H.R., Coad, B.W., Mehraban, H.R., Masoudi, M., Khaefi, R., Abbasi, K., Mostafavi, H., Vatandoust, S., 2014. An updated checklist of fishes of the Caspian Sea basin of Iran with a note on their zoogeography. *Iranian Journal of Ichthyology* 1(3), 152-184.
- Esmaeili, H.R., Sayyadzadeh, G., Eagderi, S., Abbasi, K., 2018. Checklist of freshwater fishes of Iran. *FishTaxa* 3(3), 1-95.
- Freyhof, J., Kottelat, M., 2008. *Ponticola syrman*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1.
- Hall, T.a., 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series No. 41*, 95-98.
- Il'in, B.S., 1927. Opredelitel' byčkov (Fam. Gobiidae) Azovskogo i Černogo morej. (Predvaritel'noe soobšenie). [Key for gobies (Fam. Gobiidae) from the Sea of Azov and Black Sea. (Preliminary announcement).] *Trudy Azovsko-Černomorskoj Naučno-Promyslovoj Èkspedicii* 2, 128-143.
- Kumar, S.A., Lo, P.H., Chen, S.H.M., 2008. Electrochemical selective determination of ascorbic acid at redox active polymer modified electrode derived from direct blue 71. *Elsevier* 41, 518-523.
- Miller, P.J., 1986. Gobiidae. In: Whitehead P.J.P., Bauchot M.-L., Hureau J.-C., Nielsen J., Tortonese E. (eds.) Fishes of the North-eastern Atlantic and Mediterranean. UNESCO, Paris. Vol. 3. 1019-1085
- Miller, P.J., 2003. The freshwater fishes of Europe. V. 8/I. Mugilidae, Atherinidae, Atherinopsidae, Blenniidae, Odontobutidae, Gobiidae 1. AULA-Verlag, Wiebelsheim, Germany. pp: 253-264
- Ward, D., Zemlak, S., Innes, H., Last, R. and Hebert, D., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Biological Sciences* 360(1462), 1847-57.
- Gobiidae 1. AULA-Verlag, Wiebelsheim, Germany.
- Miller, P.J., 2004. The freshwater fishes of Europe. V. 8/II. Gobiidae 2. AULA-Verlag, Wiebelsheim, Germany. 404 p.
- Miller, P.J., Vasil'eva, E.D., 2003. *Neogobius Iljin*, 1927. In: P.J. Miller (Ed.). The freshwater fishes of Europe. V. 8/I. Mugilidae, Atherinidae, Atherinopsidae, Blenniidae, Odontobutidae, Gobiidae 1. AULA-Verlag, Wiebelsheim, Germany. pp: 163-171.
- Na-Nakorn, U., Sukmanomon, S., Nakajima, M., Taniguchi, N., Kamonrat, W., Poompuang, S., Nguyen, T.T.T., 2006. MtDNA diversity of the critically endangered Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas* Chevey, 1913) and closely related species: implications for conservation. *Animal Conservation* 9, 483-494.
- Rambaut, A., 2015. FigTree version 1.4. 0. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Bioinformatics* 61, 539-542.
- Smirnov, A.I., 1986. Okuneobraznye (bichkovidnye), skorpenoobraznye, kambaloobraznye, undilyishikoobraznye.
- Smirnov, A.I., 1986. Okuneobraznye (bichkovidnye), skorpenoobraznye, kambaloobraznye, udilyishikoobraznye (Perciformes (Gobioidei), Scorpaeniformes, Pleuronectiformes, Lophiiformes). *Fauna Ukraini* 8, 7-183.
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312-1313.
- Swain, P., Foote, J., 1999. Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research*. 43(1): 113-28.
- Vasil'eva, E.D., Vasil'ev, V.P., Pinchuk, V.I., 1993. Craniological analysis of the goby subgenus *Ponticola Iljin*, 1927. III. Comparative morphological study of *Neogobius kessleri*, *N. ratan*, and additional findings on *N. syrman* relevant to the diagnosis and content of the subgenus. *Voprosy Ikhtiologii* 33, 609-617.
- Vasil'eva, E., Vasil'ev, V.P., 2003. *Neogobius gorlap Iljin* in Berg, 1949. In: P.J. Miller (Ed.). The freshwater fishes of Europe. V. 8/I. Mugilidae, Atherinidae, Atherinopsidae, Blenniidae, Odontobutidae, Gobiidae 1. AULA-Verlag, Wiebelsheim, Germany. pp: 253-264