

ANALYSE MOLECULAIRE DES RELATIONS PHYLOGENETIQUES AU SEIN DES SIX ESPECES DE MUGILIDAE EN TUNISIE

Hager BLEL* (1), K. SAID (1) et J. D. DURAND (2)

(1) Unité de Recherche Génétique: Biodiversité et Valorisation des Bio ressources (UR:09/30) Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, 5000 Monastir-Tunisie.

(2) Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR070, IRD de Bel Air, BP 1386, CP 18524 Dakar, Sénégal.

✉ blel_hager@yahoo.fr ☎ (00216) 99 90 50 10

ملخص

تحليل العلاقات الجينية بين الأنواع الستة لعائلة "المجل" (Mugilidae) في تونس للقيام بدراسة العلاقات الجينية بين الأنواع المتوسطة السنت لعائلة "المجل" في تونس تم تحليل 589 pb وهو جزء من الحمض النووي لجين ميتوكوندري وهو (ARN 16 S). وقد تم تكثيف ثم قراءة وتحليل هذا الجين عند مختلف أنواع هاته الأسماك. هكذا قمنا بتحديد مختلف أنواع "المجل". تتفق نتيجة هذه الدراسة مع البيانات المتاحة في بنك الجينات والتي تخص هذه العائلة (Mugilidae) مما يؤكد وجود النوع *Oedalechilus labeo* في الساحل التونسي على الرغم من ندرته. إن الشجرة الجينية التي تم رسمها بالاعتماد على نتائج هذه الدراسة تؤكد الاختلاف الكبير للنوع *Mugil Cephalus* مقارنة بالأنواع الأخرى الموجودة في البحر الأبيض المتوسط. هكذا فإنه تم التحقق من صحة وجود الجنس *Oedalechilus* genre بينما شكك في صحة الجنس *Chelon* genre بسبب انتمائه إلى المجموعة التي تضم الأنواع الثلاثة من الجنس *Liza* genre. الكلمات المفتاحية: مجل، تونس، العلاقة الجينية، ARN 16S.

RESUME

- Afin d'étudier les relations phylogénétiques chez les six espèces méditerranéennes de la famille de Mugilidé en Tunisie (*Mugil cephalus*, *Chelon labrosus*, *Liza aurata*, *Liza ramada*, *Liza saliens* et *Oedalechilus labeo*), un fragment de 589pb du gène mitochondrial ARN 16S a été analysé. Ce gène a été amplifié, séquencé puis analysé chez les différentes espèces. La détermination des différentes espèces de mugilidé réalisée dans cette étude est en accord avec les données de séquences disponibles dans GenBank et confirme la présence de l'espèce *Oedalechilus labeo* dans les côtes tunisiennes malgré sa rareté. L'arbre phylogénétique établit confirme la grande divergence de *Mugil cephalus* par rapport aux autres espèces présentes en Méditerranée. Le genre *Oedalechilus* est validé alors que la validité du genre *Chelon* est remise en question du fait de sa position au sein du clade regroupant les 3 espèces du genre *Liza*.

Mots clefs : Mugilidae, Tunisie, Phylogénie, ARNr 16S

ABSTRACT

Phylogenetic relationships among the six Mugilidae species in Tunisia: In the aim to study the relationships among the mediterranean mugilidae species in Tunisia (*Mugil cephalus*, *Chelon labrosus*, *Liza aurata*, *Liza ramada*, *Liza saliens* and *Oedalechilus labeo*), 589 bp of mitochondrial gene sequence (16S rRNA) were analysed. This gene was amplified, sequenced and analysed for all species. The Mugilidae species determination was in agreement with sequences data in GenBank and confirms the presence of *Oedalechilus labeo* in the Tunisian coasts in spite of its rarity. The phylogenetic tree established in this study, confirm the high divergence of *Mugil cephalus*. The *Oedalechilus* genus was valid, whereas the validity of the genus *Chelon* was questioned in reason of its regrouping with the *Liza* species.

Keywords : Mugilidae; Tunisia; Phylogeny; 16S rRNA

INTRODUCTION

L'élevage du mullet est une activité ancienne, répandue à travers le monde du fait de caractéristiques biologiques de ces poissons à savoir leur grande capacité d'adaptation aux variations de salinité et de température, leur régime alimentaire (herbivore/détritivore) et leur croissance rapide (Liao,

1981). L'élevage extensif du mullet est un élevage traditionnel qui se réalise à partir d'alevinage naturel ou artificiel, sous la forme de polyculture que ce soit en eau douce ou en eau saumâtre (Sarig, 1981).

Le caractère très euryhalin des mullets permet de les élever dans des milieux variés, qui vont de l'eau salée jusqu'à l'eau douce. En effet, le mullet a été introduit dans des grands lacs en Tunisie (Rais & Turki, 1989)

avec d'excellents résultats. L'abondance des alevins et leur facilité de transport (Sarig, 1981) ont grandement contribué au développement de ces empoissonnements. Le développement d'une aquaculture sur la base d'une capture d'alevins dans le milieu naturel est réalisé depuis des années en Tunisie (Vidy & Franc, 1993). Durant ces dernières années, de nombreuses améliorations successives ont permis d'augmenter les rendements des élevages de mullets en Tunisie basés sur le grossissement dans les retenues d'eaux douces (barrages) des alevins capturés dans le milieu naturel. Parmi toutes les espèces collectées en mer pour l'empoissonnement des barrages, les mullets (aussi bien *Mugil cephalus* que *Liza ramada*) sont parmi les espèces les plus importantes du point de vue halieutique puisqu'elles constituent 33% de la production totale des barrages (DGPA, 2006). De tels progrès poussent les aquaculteurs à améliorer ces élevages en envisageant la reproduction artificielle de *Mugil cephalus* et de *Liza ramada*.

La famille des Mugilidés est représentée en Tunisie par six espèces dont cinq sont très fréquentes (*Mugil cephalus*, *Chelon labrosus*, *Liza aurata*, *Liza ramada* et *Liza saliens*). La sixième espèce, *Oedalechilus labeo*, est considérée comme rare le long du littoral Tunisien (Vidy & Franc, 1993). En effet, cette dernière est l'espèce la moins signalée par les auteurs ayant travaillé sur la famille des Mugilidés en Tunisie (Tortonese, 1972 ; Farrugio & Quignard, 1973 ; Vidy & Franc, 1993 ; Blel *et al.*, 2008). Elle reste mal connue, son habitat particulier (eaux côtières sans entrer en estuaires), la difficulté de sa capture, son intérêt limité pour la pêche et l'aquaculture, en sont les causes principales. Sa présence en Tunisie a été signalée par Quignard & Raibaut, 1972, Ben Hassine, 1983 et Vidy & Franc, 1989).

Bien que les Mugilidés soient d'un grand intérêt économique, leurs études en Tunisie demeurent limitées (Heldt, 1948, Farrugio, 1975, 1977, Bruslé & Bruslé, 1977). Récemment, l'analyse de dix systèmes enzymatiques a permis d'étudier les relations phylogénétiques au sein des 5 espèces de mugilidés les plus fréquentes en Tunisie (Blel *et al.*, 2008).

Afin de différencier les espèces de Mugilidae, plusieurs clés d'identification peuvent être utilisées (Farrugio, 1975 ; Thomson, 1997 ; Fiches FAO). Certains critères morphologiques externes sont utilisés tels que la longueur des nageoires pectorales et anales, la forme de la membrane adipeuse sur l'œil, de la lèvre supérieure et des maxillaires, la largeur de l'espace jugulaire, la couverture écailleuse, la coloration et la pigmentation de la tête (Farrugio, 1977 ; Minos *et al.*, 2002). D'autres critères internes sont aussi utilisés mais qui nécessitent le sacrifice des poissons tels que la forme et le nombre des coeca

pyloriques (Cambrony, 1983) ainsi que la forme des otolites (Akyol & Kinacigil, 2001).

Les relations phylogénétiques de cette famille restent confuses malgré l'abondance de travaux phylogénétiques (Autem & Bonhomme, 1980; Caldara *et al.*, 1996; Papatotiroopoulos *et al.*, 2001 ;2002 ;2007; Rossi *et al.*, 2004; Turan *et al.*, 2005; Imsiridou *et al.*, 2007 ; Blel *et al.*, 2008), par ailleurs du fait d'une faible diversité morphométrique il est extrêmement difficile de distinguer les espèces en particulier à des stades juvéniles ou les séries développementales ne sont pas toutes identifiées (Trewavas & Ingham, 1972; Thomson, 1981; Caldara *et al.*, 1996). Cependant, la détermination des mugilidés a non seulement une grande importance écologique, mais aussi pratique car elle trouve des possibilités d'application en zootechnie comme dans le domaine halieutique. Il est en effet très utile d'identifier les espèces en particulier pour l'étude du recrutement, qui est une phase clé pour la dynamique des populations. Cela permettrait ainsi d'identifier la saison et les habitats les plus favorable pour la pêche des juvéniles des espèces les plus intéressantes pour l'empoissonnement des barrages (Morović, 1953).

Dans le but de clarifier au mieux les relations phylogénétiques au sein de la famille des mugilidae, plusieurs études cytogénétiques (Cataudella *et al.*, 1974; Crosetti *et al.*, 1993; Gornung *et al.*, 2001; 2004; Delgado *et al.*, 1992; Rossi *et al.*, 1998), biochimiques (Autem & Bonhomme, 1980; Papatotiroopoulos *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2004; Turan *et al.*, 2005; Blel *et al.*, 2008) et moléculaires (Caldara *et al.*, 1996; Papatotiroopoulos *et al.*, 2002; 2007; Rossi *et al.*, 2004; Imsiridou *et al.*, 2007) ont été réalisées sur les mullets méditerranéens.

Dans le cadre de cette étude nous proposons de réaliser une analyse moléculaire basée sur le séquençage d'un marqueur mitochondrial (16S RNA) afin d'identifier génétiquement les différentes espèces de Mugilidae présentes en Tunisie et de souligner leurs relations phylogénétiques.

MATERIELS ET METHODES

Parmi les six espèces, cinq (*Mugil cephalus*, *Chelon labrosus*, *Liza ramada*, *Liza aurata* et *Liza saliens*) ont été échantillonnées dans la lagune de Hergla (Tunisie), ces même échantillons ont fait l'objet d'une analyse allozymique (Blel *et al.*, 2008). *Oedalechilus labeo* qui est une espèce strictement marine et bien qu'elle soit rare en Tunisie a pu être collecté sur les côtes du Cap Bon et plus précisément à Hammam el Ghzez.

Les poissons ont été collectés à l'aide d'une technique artisanale, la pêche à l'épervier, et après la détermination des espèces à l'aide des clés d'identification de Farrugio (1975), un morceau de muscle a été prélevé et stocké dans de l'éthanol

absolu. Deux individus de chaque espèce ont été séquencés dans cette étude.

L'extraction de l'ADN s'est faite selon la méthode standard au phénol-chloroforme (Sambrook & Russel, 2001). Les fragments d'ADNmt analysés ont été amplifiés par PCR. La réaction PCR est réalisée dans un volume final de 50µl contenant 1µl d'ADN dilué, 1µM de chaque amorce, 1,2mM de MgCl₂, 74µM de chaque dNTP et 0,13 µl Taq polymérase. Pour chaque réaction d'amplification, une paire d'amorce est utilisée. Afin d'amplifier le 16s rRNA, les amorces utilisées sont celles décrites par Palumbi *et al.* (1991) (16SARL-SBRH.) Les conditions d'amplification consistent en une phase de dénaturation initiale à 92°C pendant 5 min suivie de 35 cycles de dénaturation à 92°C pendant 45s, d'hybridation à 50°C pendant 1 min et de polymérisation à 72°C pendant 90s. Le programme d'amplification s'achève par une phase d'élongation de 5 minutes à 72°C. Le produit PCR est par la suite purifié à l'exosap. La réaction de séquençage a été réalisée dans le sens 3' et 5' à l'aide du Kit de séquençage BigDye (Promega) et des amorces utilisées en PCR.

Les séquences obtenues ont été alignées à l'aide de ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) dans le logiciel MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Les relations phylogénétiques ont été estimées par la méthode du plus proche voisin Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) qui consiste à regrouper les séquences qui sont les plus similaires entre elles. Cette méthode de reconstruction est basée sur les distances calculées à l'aide de la méthode dite « Kimura à 2 paramètres » (Kimura, 1980), qui tient compte en plus de la fréquence relative des transitions et des transversions. La robustesse des nœuds des arbres phylogénétiques construits a été testée par la méthode dite du bootstrap (Felsenstein, 2004). Mille rééchantillonnages ont été réalisés pour les phylogénies reconstruites par la méthode NJ à l'aide du logiciel MEGA (Kumar *et al.*, 2004).

RESULTATS

589 pb du gène ARN 16S des six espèces de Mugilidae en Tunisie ont été analysées et alignées avec celles disponibles dans GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) (voir Fig. 1).

L'arbre phylogénétique reconstruit par la méthode de NJ (Fig. 1) indique que *Mugil cephalus* est l'espèce la plus divergente au sein des 6 espèces échantillonnées. *Oedalechilus labeo* se regroupe avec les autres espèces bien que très divergente. Enfin, les trois espèces du genre *Liza* sont regroupées et sont phylogénétiquement très proches de *Chelon labrosus* puisque regroupées dans un même clade fortement soutenue. Les séquences extraites de Genbank ne présentent pas de différences avec celles issues de

cette étude et confirme ainsi la détermination des espèces étudiées.

Discussion

L'identification des différentes espèces de Mugilidae se fait généralement selon certains critères morphologiques externes tels que la longueur des nageoires pectorales et anales, la forme de la membrane adipeuse sur l'œil, de la lèvre supérieure et des maxillaires, la largeur de l'espace jugulaire, la couverture écailleuse, la coloration et la pigmentation de la tête (Farrugio, 1975, Quéro & Vayne, 1997, Minos *et al.*, 2002). D'autres critères internes sont aussi utilisés mais qui nécessitent le sacrifice des poissons tels que la forme et le nombre des coeca pyloriques (Cambrony, 1983) ainsi que la forme des otolites (Akyol & Kinacigil, 2001). Dans cette étude, l'identification s'est basée sur les caractères externes pour discriminer les 6 espèces de Tunisie (*Mugil cephalus*, *Chelon labrosus*, *Liza ramada*, *Liza aurata*, *Liza saliens* et *Oedalechilus labeo*). Bien que l'espèce *O. labeo* est considérée comme rare en Tunisie (Tortonese, 1972 ; Farrugio & Quignard, 1973 ; Vidy & Franc, 1993 ; Blel *et al.*, 2008), quelques spécimens ont pu être collectés au cours de l'échantillonnage le long des côtes du Cap Bon. L'utilisation des séquences de l'ARN 16S confirme la détermination issue des caractères morphométriques et confirme la présence de cette espèce en Tunisie. *O. labeo* a toujours été l'espèce la moins décrite par les auteurs ayant travaillé sur la famille des Mugilidés en Tunisie. Les séquences de ce même marqueur moléculaire (ARN 16S) peuvent être utilisées pour étudier les relations phylogénétiques au sein de la famille des Mugilidae. L'arbre phylogénétique obtenu confirme les relations phylogénétiques obtenues par Rossi *et al.* (2004) et Papisotiropoulos *et al.* (2007) pour les mêmes espèces de mugilidés présentes respectivement en Italie et en Grèce. Ce résultat n'est pas surprenant puisque le même marqueur et les mêmes espèces ont été analysés dans cette étude. L'intérêt de cette étude est de valider la présence d'*O. labeo* dans les eaux tunisiennes, de confirmer les relations phylogénétiques et de présenter des données de diversité interspécifique. Cependant, aucune différence entre les séquences des espèces échantillonnées en Tunisie et en Italie n'a été observée. Cet apparent manque de diversité génétique est probablement lié au marqueur utilisé dans cette étude, l'ARN 16S, qui est un gène peu variable utilisé généralement pour la reconstruction des phylogénies des procaryotes pour ses nombreuses caractéristiques dont la plus importante est qu'il n'a probablement pas subi d'évènements de transferts horizontaux entre espèces au cours de l'évolution (Woese, 1987).

Concernant la structure de l'arbre inféré à partir des mutations de l'ARN 16S et comme indiqué dans les études réalisées en Italie (Rossi *et al.*, 2004) et en Grèce (Papasotiropoulos *et al.*, 2007), *Mugil cephalus*

est l'espèce la plus divergente au sein des mugilidés présents en Méditerranée. Ce résultat est en accord à la fois avec les données allozymiques

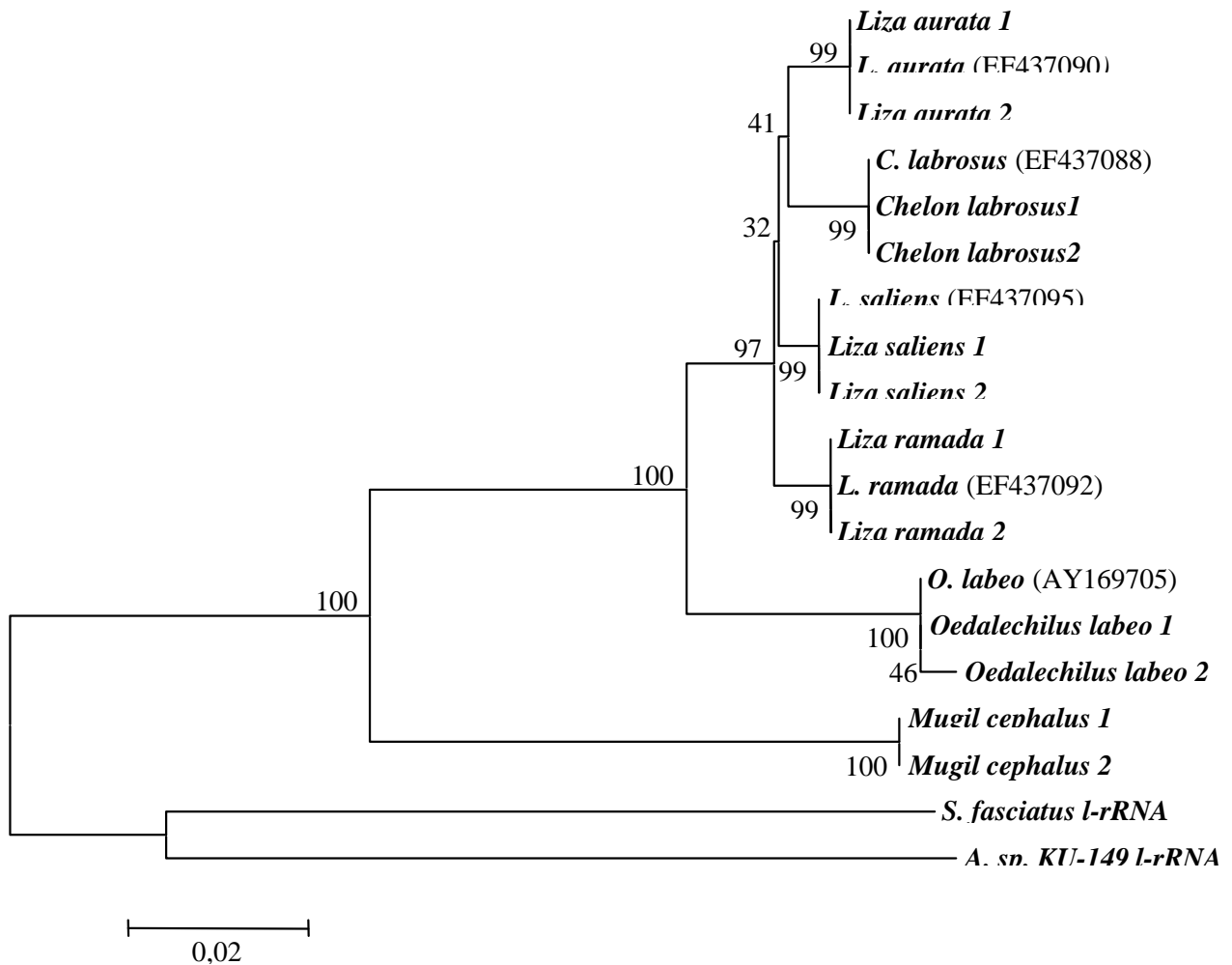


Fig. 1 : Arbre phylogénétique issu de l'analyse de 589 pb de la séquence du ARN 16S reconstruit à l'aide de la méthode Neighbor-joining (NJ) (Saitou & Nei 1987) et des distances estimées par la méthode Kimura 2-paramètre distance (Kimura, 1980). Les valeurs numériques aux nœuds indiquent les scores de bootstrap.

(Autem & Bonhomme, 1980; Papasotiropoulos *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2004; Blel *et al.*, 2008), et celles obtenues à l'aide d'autres gènes mitochondriaux (cytochrome b, COI) et nucléaire (ARN 5S) (Caldara *et al.*, 1996; Papasotiropoulos *et al.*, 2002; 2007; Rossi *et al.*, 2004; Imsiridou *et al.*, 2007). La position divergente de *M. cephalus* est conforme aux inférences de Thomson (1997) qui sur la base des caractères morphométriques, fait du genre *Mugil* un genre plus ancien que *Liza*, *Chelon* et *Oedalechilus*. Ceci est également en accord avec les données cytologiques puisque seul *M. cephalus* présente un caryotype dont tous les chromosomes (48) sont acrocentriques, caractéristique considérée comme primitive au sein de cette famille (Gornung *et al.*, 2001 ; 2004).

La position d'*Oedalechilus laqueo* dans l'arbre phylogénétique montre que cette espèce a divergé après la divergence de *M. cephalus* ce qui est en accord avec les autres données génétiques disponibles (Rossi, 2004, Gornung *et al.*, 2007, Fraga *et al.*, 2007) et les données cytogénétiques (Gornung *et al.*, 2001 ; 2004). En revanche, ce résultat conteste l'hypothèse de Thomson (1997) qui suggérait une proximité génétique entre les genres *Chelon* et *Oedalechilus*.

Enfin, comme précédemment discuté dans de nombreuses études (Autem & Bonhomme, 1980; Papasotiropoulos *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2004; Blel *et al.*, 2008), *Chelon labrosus* apparaît regroupé avec les espèces du genre *Liza* (*Liza aurata*, *Liza ramada* et *Liza saliens*). Le genre *Chelon*

constitué de deux espèces (Thomson, 1997) ne semble pas valide et pourrait être un synonyme du genre *Liza*. Cependant, en l'absence de données sur la position phylogénétique de *Chelon bispinosus*, l'autre espèce supposée appartenir au genre *Chelon*, aucune conclusion définitive ne peut être faite.

BIBLIOGRAPHIE

- Akyol O. & T. Kinacigil, 2001. - Comparative body otolith morphometrics of Mugilidae in Homa Lagoon (Izmir Bay, Aegean Sea). *Acta Adriatica* 42 (2) : 3-13.
- Autem M. & F. Bonhomme, 1980. - Eléments de systématique biochimique chez les mugilidés de Méditerranée. » *Biochemical Systematic and Ecology* 8 : 305-308.
- Ben Hassine O.K., 1974. - Contribution à l'étude des copépodes parasites des muges de Tunisie. Thèse, Faculté des sciences de Tunis.
- Blel H., N. Chatti, R. Besbes, S. Farjallah, A. Elouaer, H. Guerbej & K. Said, 2008. - Phylogenetic relationships in grey mullets (Mugilidae) in a Tunisian lagoon. *Aquaculture Research*, (39): 268-275.
- Brown, W.M., George, M. Jr., & Wilson, A.C., 1979. - Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 76 : 1967-1971.
- Bruslé S. & Bruslé J., 1977. - Les muges de Tunisie : pêche lagunaire et biologie de la reproduction de trois espèces (*Mugil capito*, *Mugil cephalus* et *Mugil chelo*) des lacs d'Ichkeul et de Tunis. *Rapp. Comm. Int. Explor. Mer Médit.*, 24: 5.
- Caldara F., L. Bargelloni, L. Ostellari, E. Penzo, L. Colombo & T. Patarnello, 1996. -Molecular phylogeny of Grey Mulletts based on mitochondrial DNA sequence analysis: Evidence of a differential rate of evolution at the intrafamily level. *Molecular phylogenetic and evolution* 6 (3) : 416-424.
- Cambrony M., 1984. - Identification et périodicité du recrutement des juvéniles de mugilidae dans les étangs littoraux du Languedoc-Rosillon. *Vie Milieu* 34: 221-227.
- Cataudella S., M.V. Civitelli & E. Capanna, 1974. - Chromosome complement of the Mediterranean mullets (Pisces, perciformes). *Caryologia* 45: 93.
- Crosetti D., W. S. Nelson & J.C. Avise, 1994. - Pronounced genetic structure of mitochondrial DNA among populations of the circum-globally distributed grey mullet (*Mugil cephalus* Linnaeus). *Journal of Fish Biology*, 44: 47-58.
- Delgado J.V., A. Molina, J. Lobillo, A. Alonso & M.E. Camacho, 1992. -Morphometrical study on the chromosomes of three species of mullet (Teleostei: *Mugilidae*). *Caryologia* 45 : 263.
- DGPA, 2006. - Direction Générale de Pêche et d'Aquaculture.
- Farrugio H. & J. P. Quignard (1973). - Biologie de *Mugil (Liza) ramada*. Risso, 1826 (Poissons, Téléostéens, Mugilidés) du lac de Tunis. *Bull. Inst. Océanogr. Pêche Salammbô*. 2 : 565-579.
- Farrugio H., 1975. - Les muges (Poissons téléostéens) de Tunisie. Répartition et pêche. Contribution à leur étude systématique et biologique. Thèse 3ème cycle, 201 p. Univ. Montpellier II.
- Farrugio H., 1977. - Clés commentées pour la détermination des adultes et des alevins de Mugilidae de Tunisie. *Cybiurn* 3ème série. 2 : 57-73.
- FAO. - Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit FISH-STAT Plus: Universal software for fishery statistical time series. Version 2.3. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1996-2000 (2006).
- Felsenstein J., 2004. - *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts : 664.
- Fraga By E., Schneider H., Nirchio M., Santa-Brigida E., Rodrigues-Filho L. F. & Sampaio I., 2007. - Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *J. Appl. Ichthyol.* 23 : 598-604.
- Gornung E., E. Mannarelli, A.R. Rossi & L. Sola, 2004. - Chromosomal evolution in Mugilidae (Pisces, Mugiliformes) : FISH mapping of the (TTAGGG)_n telomeric repeat in the six Mediterranean mullets. *Hereditas* 140: 158-159.
- Gornung E., P. Colangelo & F. Annesi, 2007. - 5S ribosomal genes in six species of Mediterranean grey mullets: genomic organization and phylogenetic inference." *Genome* 50: 787-795.
- Heldt H., 1948. - Contribution à l'étude de la biologie des muges des lacs tunisiens. *Bull. Stat. Océanogr. Salammbô*, 41: 1-35.
- Imsiridou A., G. Minos, V. Katsares, N. Karaiskou & A. Tsiora, 2007. - Genetic identification and phylogenetic inferences in different Mugilidae species using 5S rDNA markers. *Aquaculture Research*, 2007: 1-10.
- Kimura M., 1980. - A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

- Kumar S., Tamura K. & Nei M., 2004. - MEGA3.1: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- Liao, 1981. "Aquaculture of grey mullets. - Cambridge University Press, Cambridge: 361-389.
- Ludwig, A., 2006. - A sturgeon view on conservation genetics. *Eur. J. Wildl. Res.* 52: 3-8.
- Minos G., G. Katselis, I. Ondrias & I. J. Harisson, 2002. - Use of melanophore patterns on the ventral side of the head to identify fry of grey mullets (Teleostei: Mugilidae). *Bamidegh*, 54: 12-26.
- Morovie D., 1953. - Sur la détermination des muges adriatiques d'après la forme de l'otolithe sagitta. Institut za oceanografiju i ribarstvo - Split FNR Jugoslavija. Biljeske - notes, N°9.
- Murgia R., Tola G., Archer S.N., Vallegra S. & Hirano J., 2001. - Genetic identification of grey mullet species (mugilidae) by analysis of mitochondrial DNA sequence: application to identify the origin of processed ovary products (Bottarga). *Marine Biotechnology* 21: 119-126.
- Nelson J.S., 1994. - Fishes of the world. Widely and Sons Inc., New York.
- Palumbi, A S., Martin, S. Romano, w. O. McMillan, L. Stice and G. Grabowski, 1991. -The simple Fools Guide to PCR." version II, University of Hawaii, Honolulu.
- Papasotiropoulos V., E. Klossa-Kilia, G. Kiliias & S. Alahiotis, 2001. - Genetic Divergence and Phylogenetic Relationships in Grey Mulletts (Teleostei: Mugilidae) Using Allozyme Data. *Biochemical Genetics* 39: 155-168.
- Papasotiropoulos V., E. Klossa-Kilia, G. Kiliias & S. Alahiotis, 2002. - Genetic Divergence and Phylogenetic Relationships in Grey Mulletts (Teleostei: Mugilidae) based on PCR-RFLP analysis of mtDNA segments. *Biochemical Genetics* 40: 71-86.
- Papasotiropoulos V., E. Klossa-Kilia, S. Alahiotis & G. Kiliias, 2007. - Molecular Phylogeny of Grey Mulletts (Teleostei: Mugilidae) in Greece: Evidence from Sequence Analysis of mtDNA Segments." *Biochemical Genetics*.
- Pillay T.V.R., 1990. - Aquaculture : Principles and practices. Fishing New Books, Oxford: 575.
- Quignard J.P. & A. Raibaut, 1971. - Présence de *Mugil (Oedalechilus labeo)* Cuvier, 1829 dans les eaux tunisiennes. *Bull. Inst. Océanogr. Pêche, Salammbô*, 2 (2) : 163-168.
- Rais C., I. Turki, 1989. - Empoisonnement de la retenue du barrage de Bir M'Chergua qApar des mulets. » Bull. Inst. Natl. Sci. Tech. Oceanogr. Pêche, Salammbô, 16 : 43-53.
- Rossi A.R., Capula M., Crosetti D., Campton D.E., & Sola L., 1998. - Genetic divergence and phylogenetic inferences in five species of Mugilidae (Pisces: Perciformes). *Marine Biology* 131: 213-218.
- Rossi A.R., A. Ungaro, S. De Innocentiis, D. Crosetti & L. Sola, 2004. - Phylogenetic analysis of Mediterranean mugilids by allozymes and 16S mt-rRNA genes investigation: Are the Mediterranean species of *Liza* monophyletic?" *Biochemical Genetics* 42: 301-315.
- Saitou N, Nei M., 1987. - The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Sambrook J.; D. W. Russel, 2001. - Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sarig S., 1981. - The Mugilidae in polyculture in fresh and brackish water fishponds. In: Oren O.H. (ed.) Aquaculture of grey mullets. Cambridge University Press, Cambridge: 391-409.
- Schultz, L. P., 1946. - A revision of the genera of mullets, fishes of the family Mugilidae with description of three new genera. *Proc US Nat Mus* 96: 377-395
- Thomson J.M., 1981. - The taxonomy of the grey mullets. In "Aquaculture of Grey mullets" (O. H. Oren, Ed.), Cambridge University Press : 1-15.
- Thomson J.M., 1997. - The Mugilidae of the world. *Memoire Queensland Museum* 41 (3): 457-562.
- Thompson J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson 1994. - CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.* 22: 4673-4680.
- Tortonese E., 1972. - I Mugilidi del bacino mediterraneo. *Natura, Soc. It. Sc.nat.* (63) 1 : 21-36.
- Trewavas E. & S. E. Ingham, 1972. - A key to the species of Mugilidae (Pisces) in the northeastern Atlantic and Mediterranean, with explanatory notes. *Journal Zoology* 167: 15-29.
- Turan C., M. Caliskan & H. Kucuktas, 2005. - Phylogenetic relationships of nine mullet species (Mugilidae) in the Mediterranean sea. *Hydrobiologia* 532 : 45-51.

Vidy G. & J. Franc, 1989. - Contribution à la connaissance de *Oedalechilus labeo* (Cuvier, 1829) (Poisson, Mugilides) Alevins de Tunisie. *Bulletin de la société zoologique de France*. 114 (4).

Vidy G. & J. Franc, 1993. - Saisons de présence à la côte des alevins de muges (Mugilidae) en Tunisie. *Cybium* 16 (1) : 53-71.

Woese C. R., 1987. - Bacterial evolution, *Microbiol Rev* 1987,51: 221-271.