بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های نرم تن مرکب (*Sepia pharaonis*) به روش میکروستلایت در مناطق بندرعباس و بوشهر

هدایت یاورمقدم[۱]، حسین ذوالقرنین[۱]، محمدعلی سالاری علی آبادی*[۱]، سعید کیوان شکوه[۲]، محمد مدرسی[۳]

۱. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر
۲. گروه شیلات دانشکده مهندسی منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر
۳. مرکز مطالعات و پژوهش های خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۹

چکیده

در این مطالعه به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ماهی مرکب ببری در دو منطقه بندرعباس و بوشهر با استفاده از ۶ جفت از نشانگرهای ملکولی میکروستلایت، تعداد ۵۱ نمونه از مناطق بندرعباس و بوشهر جمع آوری و مقداری از بازوی (تانتاکول) هر نمونه در الکل اتیلیک ۹۶ درصد قرارداده شد و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردید. DNA ژنومی به روش CTAB یک درصد استخراج و کمیت وکیفیت DNA استخراجی با استفاده از روش اسپکتوفتومتر و الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد تعیین گردید. واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از ۶ جفت آغازگر ریزماهواره ای انجام گرفت و محصولات PCR روی ژل اکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز و با نیترات نقره رنگ آمیزی گردید که ۴ جفت از پرایمرها پلی مورف و ۲ جفت مونومورف بودند. پس از شمارش و اندازه گیری آلل ها، پارامترهای ژنتیک جمعیت با استفاده از نرم افزارهای Arlequin و GenAlex محاسبه و رابطه فیلوژنیکی بین نمونه ها با استفاده از نرم افزار TFPGA رسم گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی بین مناطق به ترتیب ۰/۲۸۲ و ۰/۷۵۴ می‌باشد و میزان تمایز ژنتیکی پایین ۰/۰۳۱ بین مناطق مشاهده گردید.

واژگان کلیدی: ماهی مرکب ببری، *Sepia pharaonis* میکروستلایت، بوشهر، بندرعباس

*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: salari1346@yahoo.com

۱. مقدمه

سرپایان یکی از رده‌های نرم تنان است که تمام گونه‌های آن دریایی بوده و بیش از ۸۰۰۰ گونه را شامل می‌شوند (Lindgren et al., 2004) و به چهار گروه اصلی، نوتیلووس‌ها، اسکوییدها، هشت پاها و ماهیان مرکب تقسیم‌بندی می‌شوند (Hickman et al., 2003). ماهی مرکب ببری فراوانترین گونه موجود از سرپایان در خلیج فارس است و در سرتاسر آب های جنوب کشور از سیستان بلوچستان در شرق تا استان خوزستان در غرب پراکنش دارد. این گونه دارای ارزش اقتصادی و اکولوژیکی فراوانی می‌باشد که متاسفانه در سال های اخیر به دلیل صید بی رویه ذخایر این گونه کاهش چشمگیری داشته است (Khodadadi et al., 2010). با توجه به ارزش تجاری و اقتصادی بالای ماهی مرکب ببری، اطلاعات اندکی در مورد ژنتیک جمعیت این گونه وجود دارد (Anderson et al., 2007) که تنها مطالعه انجام شده محدود به Nahavandi et al., (2005) بررسی ژن 18SrRNA به روش PCR-RFLP در خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد. افزایش کاربرد نشانگرهای ریز ماهواره‌ها نشان می‌دهد که این روش می‌تواند اطلاعات جامعی را برای شناخت جمعیت سرپایان فراهم نماید (Adcock et al., 1999; Doubleday et al., 2009)

در این پژوهش از روش ملکولی ریزماهواره برای اولین بار به منظور مقایسه و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های گونه‌ی تجاری و ارزشمند ماهی مرکب ببری در مناطق بندرعباس و بوشهر استفاده گردیده است.

۲. مواد وروش ها

جمع آوری نمونه ها بصورت تصادفی از ماهیان مرکب صید شده از دو منطقه بندرعباس و بوشهر انجام شد. تعداد ۲۱ نمونه از بندرعباس و ۳۰ نمونه از بوشهر جمع آوری و قطعه ای از بازوی (تانتاکول) هر نمونه در الکل اتیلیک ۹۶ درصد قرارداده شد و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردید. استخراج DNA به روش CTAB یک درصد و با تغییراتی جزئی انجام گردید (Winnepenninckx et al., 1993). کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از اسپکتوفتومتر و الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد تعیین گردید.

در این تحقیق شش جفت آغازگر از دو گونه ماهی مرکب (*Sepia officinalis*) (Shaw and Pérez Losada, 2000) و (*Sepia esculenta*) (Wang et al., 2010) انتخاب گردید و تکثیر جایگاهای ژنی در حجم ۲۵ میکرولیتر و شرایطی شامل: (۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۲ میلی مولار MgCl2، ۱۰پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ واحد آنزیم تک پلی مراز، بافر 1×PCR) انجام گرفت. تنظیم درجه حرارت به صورت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه، همراه با ۳۰ چرخه حرارتی به صورت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، درجه حرارت اتصال ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه برای ۴۵ ثانیه با یک بسط نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام گردید و محصولات واکنش زنجیره ای پلی مراز بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد جداسازی شدند. از نشانگر ۵۰bp برای تعیین اندازه آللی استفاده شد و در ادامه، ژل ها با نیترات نقره رنگ آمیزی گردید (Bassam et al ., 1991). پس از تهیه تصاویر از نرم افزار LabImage برای محاسبه طول قطعات استفاده گردید. تعیین پارامترهای تنوع درون جمعیتی شامل تعداد آلل واقعی (Na) ، محدوده آللی(R) و همچنین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) با استفاده از نرم افزار Arlequin v. 3.5.1محاسبه گردید. جریان ژنی، تمایز ژنتیکی (Fst) بر اساس مدل Weir and Cockerham,1984) و مقادیر شباهت و فاصله ژنتیکی بر اساس مدل (Nei, 1972) بوسیله نرم افزار Gen Alex (Peakall and Smouse, 2009) و رابطه فیلوژنیکی بین نمونه ها با استفاده از نرم افزار TFPGA v.1.3 (Miller, 1997) رسم گردید. خطای دسته‌بندی آلل‌ها و وجود آلل های نول با

استفاده از نرم افزار Micro checker v. 2.2.1 (Oosterhout et al., 2004) بررسی شد.

۳. نتایج

در این تحقیق از شش جفت آغازگر مورد استفاده ۴ جفت پلی مورف (چندشکل) و دو جفت مونومورف (یک شکل) بودند (جدول ۱) و تمامی جایگاههای ژنی و جمعیت‌های مورد مطالعه انحراف معنی داری از تعادل را نشان دادند ($P < 0/05$) (جدول ۲). میزان فاصله و شباهت ژنتیکی بر اساس آزمون AMOVA، بین دو مناطق ۲۸۲ /۰ و ۰/۷۵۴ به ترتیب بدست آمد. F_{ST} و جریان ژنی (Nm) بین دو مناطق ۰/۰۳۱ و ۷/۷۷ به ترتیب محاسبه گردید. همچنین نمودار دندروگرام (UPGMA) حاصل از فاصله ژنتیکی دو منطقه مورد مطالعه بر اساس (Nei, 1972) با نرم افزار TFPGA ۰/۲۸۲ بدست آمد (شکل۱).

جدول۱: خصوصیات و نتایج بدست آمده از جایگاه‌های ریزماهواره‌ای

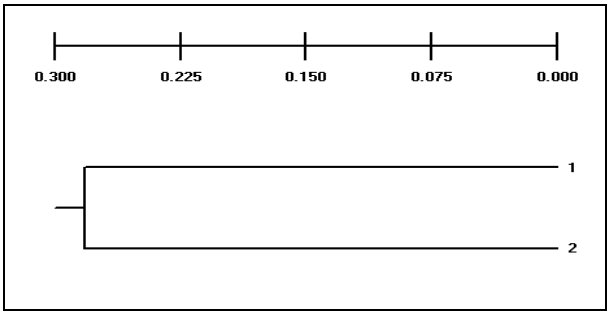
جایگاه ژنی	تعدادچرخه	دمای‌اتصال	واحدتکرارشونده	توالی آغازگر(´۳<´۵)
Sof2*	۳۰	۵۱	(AAT)16	F:CAGTTATATCAGTTTTCCAAAGC R:ATTAACAGTTTTCAGCAACGA
Secu3*	۳۰	۴۶	(TG)6	F: TCAGAAATACCAGCGTAG R:TATAACCACAAGGACCAG
Secu44	۳۰	۵۳	(TG)6(TG)14 (TG) 5(TG)11	F: ATGGCGAGCGTGAGTGAA R:CACCCGTCATCCTCATCG
Secu15	۳۰	۵۸	(GT)8	F:TATGAAGGTAGGCGGGAGTC R:AATTCTTGATGCAAAGTGG
Secu17	۳۰	۵۵	(GT)14	F:CTGGGAGAAATGACAAAA R:CACTCTGCCACTCTACAT
Secu77	۳۰	۵۳	(AC)11	F: TCTTGGCCTTTCCACTAACT R:TGATTTCCTTCTTTCCCTCT

*جایگاه‌های مونومورف

جدول۲: خصوصیات و نتایج بدست آمده از جایگاهای پلی مورف

نام جمعیت و تعداد نمونه		جایگاههای ژنی مورد مطالعه				
		Secu15	*Secu17*	*Secu 44*	*Secu77*	میانگین و انحراف معیار
بوشهر(۳۰)	*Na*	۷	۸	۸	۷	۷/۵±۰/۵۷
	R	۶	۷	۷	۷	۶/۷۵±۰/۵۰
	Ho	۰/۴۳۳	۰/۴۶۷	۰/۸۳۳	۰/۴۰۰	۰/۵۳۳±۰/۲۰
	He	۰/۸۳۷	۰/۸۱۶	۰/۸۸۰	۰/۸۴۴	۰/۸۰۱±۰/۰۷
	P	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	
بندرعباس(۳۱)	*Na*	۷	۸	۸	۷	۷/۵±۰/۵۷
	R	۷	۷	۹	۶	۷/۲۵±۱/۲۵
	Ho	۰/۶۱۹	۰/۵۷۱	۰/۶۱۹	۰/۷۱۴	۰/۶۳۰±۰/۵۹
	He	۰/۸۳۷	۰/۸۱۶	۰/۸۸۰	۰/۸۴۴	۰/۸۴۴±۰/۰۲
	P	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	

Na تعداد آلل، R محدوده آللی، Ho هتروزیگوسیتی مشاهده شده، He هتروزیگوسیتی مورد انتظار، *P-value*=0/05 سطح احتمال



شکل ۱: نمودار دندروگرام (UPGMA) حاصل از فاصله ژنتیکی دو منطقه مورد مطالعه بر اساس (Nei, 1972) با استفاده از نرم افزار TFPGA

۴. بحث و نتیجه گیری

از جمله تکنیک‌های ملکولی رایج در تعیین تفاوت نوکلئوتیدی، تشخیص جمعیت‌ها و چندشکلی در جمعیت‌ها استفاده از نشانگرهای ریزماهواره است. با وجود اهمیت بالای ماهی مرکب ببری، دارا بودن ارزش اقتصادی و همچنین اکولوژیکی بالا، اطلاعات در مورد وضعیت فیلوژنی و ژنتیک جمعیت این گونه اندک می‌باشد (Anderson et al., 2007). این گونه دارای دوره زندگی کوتاهی در حدود یک تا دو سال می‌باشند و بعد از فصل تخم ریزی می‌میرند (Boal et al., 2010). چرخه زندگی Semelparous با دوره جوانی غیرقابل پیش بینی منجر به کاهش شدید اندازه جمعیت در بسیاری از گونه‌ها می‌شود (Boyle and Boletzky, 1996). بنابراین ضروری است تا تصویر دقیقی از ساختار جمعیتی، جهت مدیریت صید و بهره‌برداری از این منابع دریایی ایجاد شود (Shaw, 2003). مهاجرت‌های گروهی سرپایان جهت تخم ریزی (تولید مثل) توسط (Carvalho et al., 1992) و بیان شده است. بر اساس نتایج حاصل تمامی جایگاههای ژنی و جمعیت‌های مورد مطالعه انحراف معنی داری از تعادل را نشان دادند. عوامل متعددی می‌تواند در انحراف از تعادل هاردی واینبرگ دخالت بنماید. در مطالعات مشابه انجام شده در دیگر مناطق بر روی گونه‌های نزدیک علل انحراف از تعادل را آلل‌های نول و فاکتورهای دیگری از قبیل مهاجرت گروهی ماهیان مرکب جهت تولید مثل عنوان کرده‌اند (Garoia et al., 2004; Zheng et al., 2009).

هترزیگوسیتی نیز به عنوان معیاری از سنجش تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، مورد توجه اکولوژیست‌ها و آبزی پروران است (Xu et al., 2001). در مطالعه حاضر در هر دو منطقه نمونه برداری و در تمامی جایگاههای ژنی هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی قابل انتظار پایین‌تر بود. کاهش در هتروزیگوسیتی مشاهده شده می‌تواند نتیجه فاکتورهایی از قبیل وجود آلل‌های نول یا فاکتورهای بیولوژیکی از قبیل درون آمیزی، اثر وهلاند یا انتخاب طبیعی باشد (Zheng et al., 2009). جدا از دلایل بیولوژیک معمول در ایجاد کسری هتروزیگوسیتی، ریزماهواره‌ها به طور خاص مستعد این پدیده هستند (Diz and Presa, 2009). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر و مطالعات انجام شده بر روی سرپایان نشان می‌دهد کاهش هتروزیگوسیتی به طور گسترده ای در مطالعات جمعیتی سرپایان یافت شده است (Shaw and Pérez-Losada, 2000; Garoia et al., 2004; Cabranes et al., 2008). در مطالعات انجام شده بر روی سرپایان، دلایل اصلی کاهش هتروزیگوسیتی را وجود آلل‌های نول (Pérez-Losada et al., 2002; Wolfram et al., 2006) و همچنین مهاجرت گروهی سرپایان جهت تولید مثل نسبت داده اند (Garoia et al., 2004; Zheng et al., 2009). نتایج به دست آمده از نرم افزار Micro-cheker علایمی از وجود خطای دسته‌بندی آلل‌ها هیچ یک از جایگاه‌های ژنی نشان نداد ولی در هر دو جمعیت افزایش هموزیگوسیتی را نشان داد که ممکن است در جایگاههای ژنی یاد شده آلل‌های نول وجود داشته باشد. مهاجرت گروهی و آلل های نول می‌تواند یکی از علل کاهش هتروزیگوسیتی و انحراف از تعادل در یافته‌های حاضر همانند سایر مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های مشابه باشد. بر اساس معیار Wright (1978) میزان F_{ST} بین صفر تا ۰/۰۵ نشان دهنده تمایز پایین، ۰/۰۵تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و ۰/۱۵ تا

۰/۲۵ نشان دهنده تمایز ژنتیکی بالا میان جمعیت‌هاست. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان از تمایز ژنتیکی پایین (۰/۰۳۱) در میان جمعیت‌های تحت مطالعه را دارد که ناشی از جریان ژنی بالا بین جمعیت‌هاست. نتایج به دست آمده از دامنه و میزان تمایز ژنتیکی در پژوهش حاضر با نتایج حاصل از دیگر مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های هم جنس ماهی مرکب در دیگر مناطق از قبیل: در دریای مانش و خلیج بیسکی با میانگین کل ۰/۰۱۸ (Wolfram et al., 2004)، در دریای آتلانتیک (۰/۰۱۸تا ۰/۰۲۲) (Garoia et al., 2004) و در اطراف ژاپن و چین با میانگین کل۰/۰۲۰ همخوانی دارد (Zheng et al., 2009).

عدم وجود یک مانع قابل توجه برای جلوگیری از پراکنش ماهیان مرکب در محیط دریایی باعث شد F_{ST} پایین در این مطالعه مشاهده گردد. البته باید اشاره نمود بدلیل غیر اختصاصی بودن جایگاههای ژنی، طراحی و استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ای اختصاصی گونه و دیگر روش های آنالیز ملکولی نظیر AFLPجهت تشخیص بهتر تفاوت و تایید نتایج حاصل از این تحقیق ضروری بنظر می‌رسد.

منابع

Adcock, G.J., Shaw, P.W., Rodhouse, P.G., Carvalho, G.R. 1999. Microsatellite analysis of genetic diversity in the squid *Illexargentinus* during a period of intensive fishing.Marine Ecology Progress Series. 187: 171-178.

Anderson, F.E., Valinassab, T., Ho, C.W., Mohamed, K.S., Asokan, P.K., Rao, G.S., Nootmorn, P., Chotiyaputta, C., Dunning, M., Lu, C.C. 2007.Phylogeography of the pharaoh cuttle *Sepia pharaonis* based on partial mitochondrial 16S sequence data. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 17: 345-352.

Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, G. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical biochemistry 84: 680-683.

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F. 2004. GENETIX 4.05, Population genetics software for Windows TM. Université de Montpellier II. Montpellier.

Boal, J.G., Prosser, K.N., Holm, J.B., Simmons, T.L., Haas, R.E., Nagle, G.T. 2010. Sexually mature cuttlefish are attracted to the eggs of conspecifics. Journal of chemical ecology. 36: 834-836.

Boyle, P., Boletzky, S. 1996. Cephalopod populations: definition and dynamics. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. 351: 985-1002.

Carpenter, K., Krupp, F., Jones, D., 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.

Diz, A.P., Presa, P. 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus galloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). Aquaculture. 287: 278-285.

Doubleday, Z.A., Semmens, J.M., Smolenski, A.J., Shaw, P.W. 2009. Microsatellite DNA markers and morphometrics reveal a complex population structure in a merobenthic octopus species (*Octopus maorum*) in south-east Australia and New Zealand. Marine biology. 156: 1183-1192.

Garoia, F., Guarniero, I., Ramšak, A., Ungaro, N., Landi, M., Piccinetti, C., Mannini, P., Tinti, F. 2004. Microsatellite DNA variation reveals high gene flow and panmictic populations in the Adriatic shared stocks of the European squid and cuttlefish (Cephalopoda). Heredity. 93: 166-174.

Hickman, C. P., Roberts, L. S and Larson, A. 2003. Animal Biodiversity. 464p

Khodadadi R., Yahyavi, M., Ghorbani, R., Shabani, M.J. 2010. Spawning season and fecundity of *Sepia pharaonis* In Bushehr coastal waters (Persian Gulf). Iranian Scientific Fisheries Journal.19:31-38.

Lindgren, A.R., Giribet, G., Nishiguchi, M. 2004.A combined approach to the phylogeny of Cephalopoda (Mollusca).Cladistics. 20: 454-486.

Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.4, 157.

Nahavandi, R .Rezvani, S. Vousoghi, Gh.

Kazemi, B. 2005. Gene 18S rRNA variation of cuttle fish of population (*Sepia pharaonis*) in Persian Gulf and Oman sea using PCR-RFLP method. Iranian Scientific Fisheries Journal.14:157-168.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations.American naturalist. 283-292.

Oosterhout, C. V., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. and Shipley, P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes. 4: 535-538.

Peakall, R., Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.Molecular Ecology Notes. 6: 288-295.

Shaw, P. 2003. Polymorphic microsatellite DNA markers for the assessment of genetic diversity and paternity testing in the giant cuttlefish, *Sepia apama* (Cephalopoda). Conservation Genetics. 4: 533-535.

Shaw, P., Pérez Losada, M. 2000.Polymorphic microsatellites in the common cuttlefish *Sepia officinalis* (Cephalopoda).Molecular Ecology. 9: 237-238.

Wang, H., Lin, L., Liu, S.F., Jiang, Z.Q. 2010. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in golden cuttlefish (*Sepia esculenta*). Molecular Ecology Resources, 1-9.

Weir, B.S., Cockerham C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38:1358–1370.

Winnepenninckx, B., Backeljau, T., Dewachter, R. 1993. Extraction of high-molecular-weight DNA from mollusks.TRENDS in Genetics.9, 407.

Wolfram, K., Mark, F.C., John, U., Lucassen, M., Pörtner, H.O. 2006. Microsatellite DNA variation indicates low levels of genetic differentiation among cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) populations in the English Channel and the Bay of Biscay. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics. 1: 375-383.

Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations.Variability within and among natural populations.Vol. 4. University of Chicago press, Chicago, IL, USA.

Zheng, X., Ikeda, M., Kong, L., Lin, X., Li, Q., Taniguchi, N. 2009. Genetic diversity and population structure of the golden cuttlefish, *Sepia esculenta* (Cephalopoda: Sepiidae) indicated by microsatellite DNA variations. Marine Ecology. 30: 448-454.

Assay of Genetic diversity of cuttlefish (*Sepia pharaonis*; Ehrenberg, 1831) populations using microsatellite markers in Bandarabass and Bushehr regions

Yavar Moghadam, Hedayat [1]. Zolgharnein, Hossein [1]. Salari Aliabadi, Mohamad Ali[*1]. Keyvanshokoh, Sayeed [2]. Modarresi, Mohamad [3]

1. College of Marine Science, Department of Marine Biology, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Khouzestan, Iran
2. College of Marine Science, Department of Fisheries, Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Khouzestan, Iran
3. Persian Gulf Research and Studies Center, Persian Gulf University, Boushehr, Iran

Abstract

In this present study genetic diversity of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) populations were investigated using microsatellite markers. Total 51 samples were collected from Bandarabass and Bushehr regions. Tissue sample of arm tips (tentacle) were preserved in 96% ethanol alcohol until using in biotechnology laboratory of Khorramshahr University of Marine Science and Technology. Genomic DNA was extracted with CTAB method. The quality and quantity of extracted DNA was assessed by 1% agarose gel electrophoresis and spectrophotometry, respectively. Polymerase chain reaction conducted with 6 pairs of microsatellite primers. PCR products were electrophoresed on 8% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate. These primers were shown 4 pairs of polymorph and 2 pairs of monomorp. Allele Sizes were measured in populations then genetic parameter were calculated using Arlequin and Gen Alex Programs and phylogenetic relationship was determinated and drawn using TFPGA Program. Result obtained showed genetic distance and resemblance distance is 0.282 and 0.754, respectively and Weak but significant genetic differentiation was present 0.031 between of populations.

Keywords: Microsatellite, genetic diversity, *Sepia pharaonis*, cuttlefish, Bandarabass, Bushehr

Table 1. Characteristics and result obtained from microsatellite loci
Table 2. Characteristics and result obtained from Polymorphic loci
Figure1. UPGMA dendrogram relationships between of populations based on Genetic distance (Nei, 1972) using TFPGA software

[1] *Corresponding author E-mail: salari1346@yahoo.com