

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

هدایت یاورمقدم<sup>۱</sup>، حسین ذوالقرنین<sup>۱</sup>، محمدعلی سالاری علی آبادی<sup>۱\*</sup>، سعید کیوان شکوه<sup>۲</sup>، محمد مدرس<sup>۳</sup>

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 پژوهش‌های خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۵

شناسه دیجیتال (DOI): [10.22113/jmst.2016.34143](https://doi.org/10.22113/jmst.2016.34143)

### 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 (تاناکول) هر نمونه در الکل اتیلیک ۹۶ درصد قرارداد شد و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردید. DNA ژنومی به روش CTAB یک درصد استخراج و کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از روش اسپکتوفتومتر و الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد تعیین گردید. واکنش زنجیره ای پلی مرز 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 آلل‌ها، پارامترهای ژنتیک جمعیت با استفاده از نرم افزارهای Arlequin و GenAlex محاسبه و رابطه فیلوژنتیکی بین نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار TFGPA 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

## ۱. مقدمه

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) و (*Sepia esculenta*) (Wang et al., 2010) انتخاب گردید و تکثیر جایگاه‌های ژنی در

حجم ۲۵ میکرولیتر و شرایطی شامل: (۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۲ میلی مولار MgCl<sub>2</sub>، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ واحد آنزیم تک پلی مرز، 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 مرز بر روی ژل اکریل امید ۸ درصد جداسازی شدند. از نشانگر ۵۰bp برای تعیین اندازه آلی 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)، محدودده آلی (R) و همچنین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) با استفاده از نرم افزار Arlequin v. 3.5.1 محاسبه 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 TFGA v.1.3 (Miller, 1997) رسم گردید. خطای دسته‌بندی آلل‌ها و وجود آلل‌های نول با

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، نوتیلوس‌ها، اسکوییده‌ها، 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 آب‌های 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 سال‌های 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 جمعیت‌های گونه‌ی تجاری و ارزشمند ماهی مرکب ببری در مناطق بندرعباس و بوشهر استفاده گردیده است.

## ۲. مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها 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 (تاناکول) هر نمونه در الکل اتیلیک ۹۶ درصد قرارداد شده و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

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

تبادل را نشان دادند ( $P < 0/05$ ) (جدول ۲). میزان فاصله و شباهت ژنتیکی بر اساس آزمون AMOVA، بین دو مناطق ۲۸۲/۰ و ۷۵۴/۰ 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 (شکل ۱).

جدول ۱: خصوصیات و نتایج بدست آمده از جایگاه‌های ریزماهورهای

توالی آغازگر ( $5' >$ )	واحد تکرار شونده	دمای اتصال	تعداد چرخه	جایگاه ژنی
F: CAGTTATATCAGTTTTCCAAAGC R: ATTAACAGTTTTCAGCAACGA	(AAT)16	۵۱	۳۰	Sof2*
F: TCAGAAATACCAGCGTAG R: TATAACCACAAGGACCAG	(TG)6	۴۶	۳۰	Secu3*
F: ATGGCGAGCGTGAGTGAA R: CACCCGTCATCCTCATCG	(TG)6(TG)14 (TG) 5(TG)11	۵۳	۳۰	Secu44
F: TATGAAGGTAGGCGGGAGTC R: AATTCTTGATGCAAAGTGG	(GT)8	۵۸	۳۰	Secu15
F: CTGGGAGAAATGACAAAA R: CACTCTGCCACTCTACAT	(GT)14	۵۵	۳۰	Secu17
F: TCTTGGCCTTTCCACTAACT R: TGATTTCCTTCTTTCCCTCT	(AC)11	۵۳	۳۰	Secu77

\*جایگاه‌های مونومورف

جدول ۲: خصوصیات و نتایج بدست آمده از جایگاه‌های پلی مورف

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

پوشهر (۳۰)

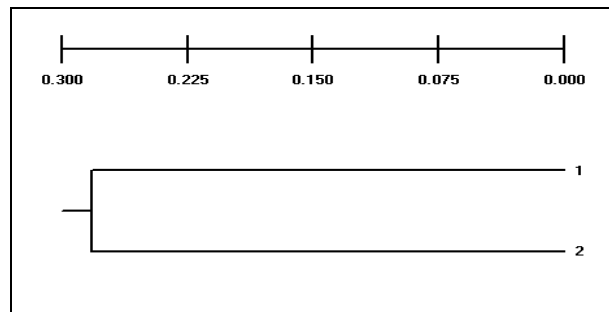
بندر عباس (۲۱)

Na تعداد آل، R محدوده آلی، Ho هتروزیگوسیتی مشاهده شده، He هتروزیگوسیتی مورد انتظار،  $P\text{-value}=0/05$  سطح احتمال

گروهی ماهیان مرکب جهت تولید مثل عنوان کرده‌اند (Garoi et al., 2004; Zheng et al., 2009).

هتروزیگوسیتی نیز به عنوان معیاری از سنجش تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، مورد توجه اکولوژیست‌ها و آبی‌پروران 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، ریزماهوره‌ها 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 گسترده‌ای در مطالعات جمعیتی سرپایان یافت

شده است (Shaw and Pérez-Losada, 2000; Garoi 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 داده‌اند (Garoi 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 آلل‌های 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، ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و ۰/۱۵ تا



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 ریزماهوره 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

ژاپن و چین با میانگین کل ۰/۰۲۰ 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 ریزماهوره ای اختصاصی گونه و دیگر روش های آنالیز ملکولی نظیر AFLP جهت تشخیص بهتر تفاوت و تایید نتایج حاصل از این تحقیق ضروری بنظر می رسد.

### منابع

Adcock, G.J., Shaw, P.W., Rodhouse, P.G., Carvalho, G.R. 1999. Microsatellite analysis of genetic diversity in the squid *Illex argentinus* 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

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

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

Hedayat Yavar Moghadam<sup>1</sup>, Hossein Zolgharnein<sup>1</sup>, Mohamad Ali Salari Aliabadi<sup>1\*1</sup>,  
Sayeed keyvanshokoh<sup>2</sup>, Mohamad Modarresi<sup>3</sup>

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 determined 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

<sup>1</sup> \*Corresponding author E-mail: salari1346@yahoo.com