

آنالیز PCR-RFLP دو قطعه‌ی ژنی DNA میتوکندریایی در جمعیت زنبورعسل ایرانی

RFLP-PCR Analysis of Two mtDNA Gene Segments in Iranian Honey Bee Population

مریم صفدری شاهرودی^{۱*}، حسن مهربانی یگانه^۲، عباس پاکدل^۳، اردشیر نجاتی جوارمی^۳ و غلامعلی نهضتی پاقله^۲

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۳/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۰۲

چکیده

زنبورعسل (*Apis mellifera* L.) دارای زیرگونه‌های جغرافیایی زیادی است که دارای پراکنش وسیعی در اروپا، آفریقا و آسیا بوده و بسیاری از زیرگونه‌های آنها شناسایی و توصیف شده است. شناسایی زیرگونه‌های جغرافیایی برای اصلاح و حفاظت از تنوع زیستی زنبورعسل بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر از آنالیز DNA میتوکندریایی برای مطالعه‌ی میزان تنوع موجود در جمعیت زنبورعسل ایرانی استفاده شد. نمونه‌های زنبورعسل از چندین مکان در ایران جمع‌آوری شد. چندین نمونه خارجی نیز به‌عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. از آنزیم‌های برشی BglI و TaqI برای برش قطعات تکثیر شده‌ی DNA میتوکندریایی Cytb و ND5 استفاده شد. قطعات برش یافته روی آگارز سه درصد جداسازی شد. تمام نمونه‌ها دارای مکان شناسایی برای BglI بوده و برای ژن ND5 نیز الگوی هضم مشابهی برای تمام نمونه‌ها مشاهده شد. این امر نشان‌دهنده‌ی عدم تنوع در جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه در جمعیت مورد بررسی است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های برشی، ژن ND5، ژن Cytb

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۲. استادیاران گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۳. دانشیاران گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

Email: safdari_m2002@yahoo.com

*: نویسنده مسوول

مقدمه

زنبورعسل (*Apis mellifera* L.) از حشراتی است که دارای پراکندگی وسیعی در سطح جهان است. این پراکندگی وسیع می‌تواند باعث پیدایش زیرگونه‌ها و جمعیت‌های بومی شده باشد که تمایز در ساختار جمعیتی آنها حاصل فرآیندهای تکاملی و تصادفی است (Bouga et al, 2005).

جمعیت‌های زنبورعسل عضو مهمی از اکوسیستم‌های طبیعی به‌شمار می‌روند و از نقش‌های بسیار مهم آنها در طبیعت کمک به عمل گرده‌افشانی بسیاری از گونه‌های گیاهی می‌باشد (Dela Rua et al, 2009).

زنبورهای عسل مربوط به مناطق مختلف جهان دارای ویژگی‌های ریخت‌شناسی، رفتاری و زیستی متفاوتی می‌باشند. در ابتدا و قبل از دسترسی به ابزارهای ملکولی در طبقه‌بندی زنبور عسل از صفات ریخت‌شناسی که شامل چندین ویژگی ظاهری بوده است، استفاده شده است (Dela Rua et al, 2009).

نخستین مطالعه‌ی جامع بر روی تنوع جمعیت‌های زنبورعسل و تلاش برای طبقه‌بندی آنها توسط راتنر (1988) انجام گرفت. براساس ویژگی‌های ظاهری استفاده شده در این مطالعه، زیرگونه‌های زنبورعسل در چندین شاخه‌ی تکاملی قرار گرفتند که عبارت بودند از: شاخه‌ی خاور نزدیک (O)، آفریقای استوایی (A)، مدیترانه‌ی غربی (M) و شاخه‌ی مدیترانه‌ی مرکزی و جنوب اروپا (C). یک شاخه‌ی محدود نیز از اتیوپی (Y) نیز گزارش شده است (Zaitoun et al, 2008). بر همین اساس زنبورهای عسل ایرانی در شاخه‌ی شرق مدیترانه یعنی گروه O قرار داده شدند (Ruttner, 1988; Kauhausen-Keller et al. 1997).

علی‌رغم استفاده‌ی گسترده از این نوع آنالیز، این عقیده وجود دارد که این ویژگی‌ها برای مطالعات تکاملی چندان مناسب نیستند. علت این امر آنست که این ویژگی‌ها نسبت به فشارهای انتخابی محیطی حساس می‌باشند، از طرفی انجام مطالعه نیاز به زمان و تجربه‌ی بالایی داشته و گاهی نیز برای شناسایی برخی از هیبریدها نامناسب می‌باشند (Zaitoun et al. 2008).

با در دسترس قرار گرفتن ابزارهای ملکولی، در مطالعات مربوط به تنوع اکولوژیکی در حشرات استفاده از این نوع تکنیک‌ها مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از نشانگرهایی مانند نشانگرهای DNA میتوکندریایی (mtDNA)، ریزماهورها، RAPD، EST و AFLP به میزان چشم‌گیری

باعث افزایش دانش در زمینه‌ی تنوع ژنتیکی موجودات شده است.

از نشانگرهایی که تاکنون در این نوع مطالعات روی زنبورعسل به‌میزان زیادی مورد استفاده قرار گرفته است، نشانگرهای مربوط به DNA میتوکندریایی بوده است. ملکول حلقوی دو رشته‌ای DNA میتوکندریایی در حیوانات، به طور کلی ملکولی کوچک (با اندازه‌ی متوسط ۱۶ کیلو باز) با سرعت تکاملی بالا و ترتیب ژنی حفاظت شده است (Rokas et al, 2003). برش mtDNA با استفاده از آنزیم‌های برشی خاص، نشانگرهای خوبی را برای تمایز گونه‌ها، زیرگونه‌ها و جمعیت‌های درون جنس *Apis* فراهم می‌کند (Ferreira et al, 2009).

تمام زنبوران کارگر و نر یک کلنی، mtDNAی ملکه را به ارث می‌برند بنابراین با استفاده از آنالیز mtDNA فقط یک زنبور کارگر اطلاعاتی در مورد اجداد مادری یک کلنی فراهم خواهد شد (Dela Rua et al, 2009). از تنوع موجود در mtDNA در مطالعات مربوط به تعیین خطوط تکاملی زنبورعسل استفاده شده است و چندین خط اصلی تکاملی به تایید رسیده است. البته در چنین نوع مطالعاتی همواره باید ملکه‌های وارداتی را در نظر داشت چرا که این امر می‌تواند توزیع انواع mtDNAی مشاهده شده در خزانه‌ی ژنتیکی زنبوران بومی را تغییر دهد (Bouga et al, 2005).

اطلاعات مربوط به mtDNA حضور سه شاخه‌ی تکاملی را در آفریقا، غرب اروپا و جنوب‌شرق آسیا به تأیید رسانده است. حضور چهارمین انشعاب میتوکندریایی در خاورمیانه نیز به تأیید رسیده است (Zaitoun et al, 2008).

برای مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی جمعیت‌های زنبورعسل از چندین ژن میتوکندریایی استفاده شده است. برخی از ژن‌ها قابلیت تمایز در زیرگونه‌های خاص را دارند و برخی از ژن‌ها دارای عمومیت بیشتری هستند. هرچند تا کنون توافق کلی و اطلاعات جامع از نتیجه‌ی استفاده از این قطعات و الگوهای حاصل از برش آنها با آنزیم‌های برشی که تمام جمعیت‌ها را در بر بگیرد در دست نیست. البته از میان این ژن‌ها منطقه‌ی بین ژنی سیتوکروم اکسیداز یک و دو و ژن سیتوکروم b بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات متعددی بر روی جمعیت زنبورعسل ایرانی با استفاده از منطقه‌ی بین ژنی سیتوکروم اکسیداز یک و دو انجام شده است که البته قادر به تمایز بین جمعیت ایرانی و سایر جمعیت‌های زنبورعسل متعلق به این خط تکاملی نبوده است

زنبور عسل بوده است. تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌تواند در مطالعات بهبود نژادهای زنبور عسل که به لحاظ اقتصادی دارای ارزش بیشتری بوده و مقاوم به بیماری هستند، مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های زنبور بالغ از مناطق مختلف ایران شامل کرج (۴۰ نمونه)، چالوس (۲۰ نمونه)، گلستان (۲۰ نمونه)، اصفهان (۴۰ نمونه) و قسمت جنوب استان سیستان و بلوچستان (۴۰ نمونه) جمع‌آوری شد. همچنین نمونه‌هایی از کلنی‌های غیربومی در دسترس نیز جمع‌آوری شد. این کلنی‌ها متعلق به کانادا (۱۰ نمونه)، ترکیه (۱۰ نمونه) و آلمان (۵ نمونه) بودند. در این جمعیت‌ها ملکه از کشورهای مذکور خریداری شده بودند. از هر کلنی یک زنبور کارگر گرفته شد. نمونه‌های زنبور در الکل ۹۶ درصد و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج DNA

کل DNA هر فرد (یک زنبور کارگر به ازای هر کلنی) بر اساس روش /سدی (2009) استخراج شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و هضم آنزیمی

تنوع موجود در mtDNA با استفاده از آنالیز RFLP که بر روی محصولات PCR تکثیر یافته، مورد بررسی قرار گرفت. دو سری پرایمر برای تکثیر قطعات ژنی Cytb و ND5 استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده به‌همراه مرجع آنها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعات ژنی

Table 1: Primers sequences used for amplifying gene segments

منبع Refernce	توالی پرایمر Primer seyuemce	منطقه‌ی ژنی Cone Place
Bouga et al. 2005	F: 5'-TCGAAATGAATAGGATACAG R: 5'-GGTTGAGATGGTTTATAGGATT	ND5
Zaitoun et al. 2008	F: 5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC R: 5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT	Cytb

میکرولیت‌ر DNA بود. مواد مصرفی برای واکنش PCR از شرکت سیناژن تهیه شد.

برنامه‌ی پایه‌ای PCR برای هر کدام از ژن‌ها به‌صورت ذیل

بود:

(Pish Jang et al, 2011; Jabbari Farhoud and Kence 2005; Ozdil et al, 2009).

به‌دنبال آفریقایی شدن کلنی‌های زنبور عسل اروپایی و بروز صفات تهاجمی بسیار نامطلوب، محققان به دنبال یافتن نشانگرهایی که قادر به ایجاد تمایز بین این دو جمعیت باشند، بودند. حاصل آن استفاده از ژن سیتوکروم b (Cytb) به عنوان مارکری برای اختصاص منشأ مادری کلنی‌های *A. mellifera* به اروپا یا آفریقا با استفاده از وجود یا عدم‌وجود مکان شناسایی آنزیم BgII بود (Crozier et al, 1991).

به‌نظر می‌رسد که ژن Cytb ابزاری با ارزش برای تشخیص وقایع تکاملی ژنوم میتوکندریایی *A. mellifera* به‌ویژه آنهایی که مرتبط با تفرق زیر گونه‌ای درون شاخه‌ی C است، می‌باشد (Zaitoun et al, 2008).

بر اساس مطالعه‌ی بوگا و همکاران (2005) آنزیم Taq I دارای مکان برش برای ژن ND5 است اگرچه مطالعه‌ای در این زمینه تکرار نشده است و برای بررسی آن در دیگر جمعیت‌ها باید مطالعاتی صورت گیرد.

نظر به اینکه هر فعالیتی در جهت حفاظت از جمعیت زنبور عسل باید موقعیت کنونی جمعیت‌های مدیریت شده در منطقه‌ی مورد بررسی را در نظر داشته باشد لذا اطلاعات زنبورداری با جزئیات آن از هر کشوری باید قبل از طراحی برنامه‌های حفاظتی آینده جمع‌آوری شود.

به این منظور، شناسایی و طبقه‌بندی زنبوران عسل برای اصلاح و بهبود زنبوران عسل در ایران ضروری است. هدف از این مطالعه آنالیز مکان‌های برشی و چندشکلی طولی mtDNA جمعیت زنبور عسل در ایران به‌منظور بررسی سطح تنوع موجود در این جایگاه‌ها است. زنبورداری مهاجرتی و وارد کردن ملکه‌ها دو عامل اصلی در افزایش هموزیگوتی در سطح وسیع و از دست‌دادن تنوع خاص جمعیت‌های محلی

هر واکنش PCR (۲۳ میکرولیتر) متشکل از بافر PCR 10X، دو میکرولیتر $MgCl_2$ ، دو میکرولیتر dNTP، یک میکرولیتر از هر پرایمر، ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم تک‌پلیمرز (5 U/μl) و دو

در خصوص قطعه‌ی ژنی ND5: ۳۵ چرخه شامل مرحله‌ی واسرشت‌سازی ۹۴ درجه برای یک دقیقه، دمای اتصال ۴۸ درجه برای یک دقیقه و دمای بسط ۷۲ درجه برای دو دقیقه. در خصوص قطعه‌ی ژنی Cytb: ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه برای ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۶ درجه برای ۱۵ ثانیه و ۷۲ درجه برای یک دقیقه.

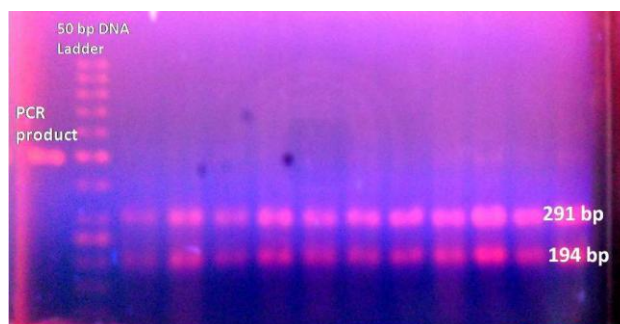
به‌منظور اطمینان از تکثیر موفقیت‌آمیز توالی‌های موردنظر، این محصولات بر روی ژل آگارز یک‌ونیم درصد برده شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید تحت نور UV مورد بررسی قرار گرفت.

در مرحله‌ی بعد، هر محصول PCR با استفاده از آنزیم برشی مربوطه مورد هضم قرار گرفت. با استفاده از هفت میکرولیتر محصول PCR، دو میکرولیتر از بافر آنزیم و یک تا دو میکرولیتر آنزیم برشی، حجم نهایی واکنش با اضافه نمودن آب دو بار استریل شده به ۲۱ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط واکنش در دمای مناسب هر آنزیم (۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برای آنزیم Bg/II و ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای TaqI) به مدت شش ساعت قرار داده شد. قطعات حاصل از واکنش هضم بر روی ژل آگارز سه درصد برده شد. ژل‌ها با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس تحت نور UV مشاهده و عکس

برداری شد. از آنجایی که در مورد قطعه‌ی ND5 اطلاعاتی از قطعات حاصل از هضم در جمعیت مورد بررسی وجود نداشت، برای اطمینان بیشتر از نتایج و دقت بیشتر محصولات حاصل از هضم بر روی ژل اکریل‌آمید ۱۲ درصد نیز برده شد و پس از رنگ‌آمیزی با روش استفاده از محلول نیترات نقره مشاهده شد.

نتایج و بحث

تنوع ژنتیکی کلنی‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران با استفاده از دو آنزیم برشی مورد بررسی قرار گرفت. شکل-های یک و دو الگوی چند شکلی DNA هضم شده با آنزیم-های مربوطه را نشان می‌دهد. تمام نمونه‌ها دارای مکان برش برای هر دو آنزیم بودند. محصولات ۴۸۵ جفت بازی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از منطقه‌ی Cytb با استفاده از آنزیم Bg/II هضم شدند. این آنزیم در تمام نمونه‌ها (شامل نمونه-های ایرانی و خارجی) دارای یک مکان برش بود و آن را به دو قطعه‌ی ۲۹۱ و ۱۹۴ جفت بازی تقسیم نمود. برای ارزیابی دقیق‌تر قطعات حاصل از هضم آنزیمی از مارکر استاندارد استفاده شد. در شکل یک نشان داده شده است که جایگاه برشی در تمامی نمونه‌های بررسی شده وجود دارد.



شکل ۱: محصولات هضم شده‌ی قطعه‌ی ژنی Cytb به‌وسیله‌ی آنزیم BgII

Fig. 1: PCR products of Cytb digested by Bg/II enzyme

دهد (Ferreira et al, 2009). در مطالعه‌ی حاضر و با استناد به نمونه‌های مورد بررسی می‌توان گفت که از جمعیت‌های آفریقایی به مناطق کشور ایران مهاجرتی صورت نگرفته است. کندمیر و همکاران (2006) نیز با بررسی نمونه‌هایی از زنبوران ایرانی و ترکیه مشاهده نمودند که در تمام نمونه‌ها، مکان برش آنزیم BgII وجود داشت (Kandemir et al, 2006)

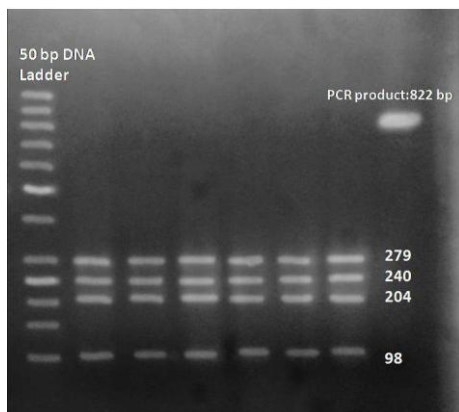
محصولات ۸۲۲ جفت بازی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از منطقه‌ی ND5 با استفاده از آنزیم TaqI هضم شدند. مانند قبل برای ارزیابی دقیق‌تر قطعات حاصل از هضم

همان‌طور که پیش از این نیز گفته شد، از ژن سیتوکروم b به-عنوان مارکری برای اختصاص کلنی‌های زنبورعسل به شاخه-های مادری اروپایی یا آفریقایی با استفاده از وجود یا عدم-وجود مکان هضمی آنزیم محدودکننده‌ی BgII استفاده می-شود. جمعیت‌های زیر گونه‌ی C دارای مکان برش برای این آنزیم می‌باشند و نمونه‌های آفریقایی این مکان را ندارند (Ferreira et al, 2009).

مطالعه‌ی این جایگاه فرضیه‌ی اختلاط زنبورهای با منشأ آفریقایی در نمونه‌های مورد بررسی را مورد آزمون قرار می

بازی. این الگوی هضمی برای تمام نمونه‌ها به صورت یکسان وجود داشت. نمونه‌های غیربومی نیز دارای الگوی باندهی مشابه بودند.

آنزیمی از مارکر استاندارد استفاده شد. در نتیجه‌ی استفاده از این آنزیم بر روی قطعات تکثیرشده‌ی این ژن چهار مکان برش وجود داشت. طول قطعات حاصل براساس ترتیب حاصل از توالی به ترتیب عبارت بود از ۲۷۹، ۲۴۰، ۲۰۴ و ۹۸ جفت



شکل ۲: نتیجه‌ی هضم ژن ND5 با آنزیم TaqI
Fig. 2: PCR products of ND5 digested by *TaqI* enzyme

زنبورهای کشور مذکور با برخی از کشورهای اروپایی تفاوتی مشاهده نشود. در واقع از لحاظ مقیاس تکاملی زمان جداسازی این جمعیت‌ها ممکن است به اندازه نبوده باشد که باعث ایجاد تمایز قابل تشخیص بین جمعیت‌ها شده باشد.

براساس مطالعه‌ی حاضر در این دو جایگاه تفاوتی بین جمعیت‌های مورد مطالعه (نمونه‌های ایرانی در مقایسه با نمونه‌های خارجی) مشاهده نشد. البته باید به این نکته توجه نمود که در مطالعات راتنر (۱۹۸۸) طبقه‌بندی زیرگونه‌ها بر اساس ویژگی‌های ظاهری انجام شده است و ممکن است نتایج این دو نوع مطالعه با هم یکی نباشد. برای نمونه گفته شده است که تنوع میتوکندریایی به‌ویژه در انشعابات میتوکندریایی C و O قابلیت تمایز بالایی در بین زیرگونه‌ها ندارد. محققان به دنبال یافتن نشانگرهایی می‌باشند که بتوانند به آسانی جمعیت‌های متمایز را از هم تشخیص دهند. برای مثال مطالعه‌ی بوگا و همکاران (۲۰۰۵) با هدف پیدا کردن آنزیم‌های برشی که قادر دارای مکان‌های برش و احتمالاً چندشکلی در جمعیت‌های زنبورعسل باشند، بوده است. نتایج هر کدام از آنزیم‌های مذکور باید بر روی دیگر جمعیت‌ها نیز آزمون شود تا سودمندی آن در دیگر جمعیت‌ها مورد قضاوت قرار گیرد. در مطالعه‌ی حاضر محققان از آنزیم TaqI بر روی قطعه‌ی ND5 استفاده نمودند که نتیجه‌ی مطالعات نشان‌دهنده‌ی وجود تفاوت‌هایی بین برخی جمعیت‌ها (جمعیت‌های مورد مطالعه حاضر با جمعیت مورد مطالعه‌ی بوگا و همکاران

بوگا و همکاران (۲۰۰۵) با جمع‌آوری نمونه از مناطقی از قبرس و یونان نیز این جایگاه ژنی را با استفاده از روش PCR-RFLP مورد مطالعه قرار دادند در نتیجه‌ی این مطالعه طول برآورد شده از قطعات برابر ۳۷۵، ۲۵۸ و ۱۸۹ بود که با نتایج حاصل از این تحقیق تفاوت دارد.

تا زمان انجام مطالعه‌ی حاضر، هیچ اطلاعات دیگری به جز مقاله‌ی مذکور در مورد این جایگاه ژنی در جمعیت‌های مختلف زنبورعسل در دسترس نبود. این میزان تفاوت در الگوهای مطالعه‌ی حاضر و جمعیت‌های یونان و قبرس می‌تواند در ارتباط با تفاوت‌های شرایط محیطی بین این مناطق باشد که از این طریق بر عملکرد بهینه‌ی ژن و در نتیجه توالی آن در بین این جمعیت‌ها تا این اندازه متفاوت نشان داده شود. از طرف دیگر این امر می‌تواند نتیجه‌ی جدا بودن این جمعیت‌ها از هم و تکامل جداگانه و تثبیت برخی از جهش‌ها در هر کدام از جمعیت‌ها باشد. هرچند برای نتیجه‌گیری مطمئن نیاز به مطالعه‌ی دیگر جمعیت‌ها است. در صورت تأیید این نتایج ممکن است این جایگاه برای تمایز بین برخی از جمعیت‌های محلی زنبورعسل مفید باشد. نتیجه‌ی مطالعه‌ی حاضر نشان‌دهنده‌ی الگوی مشابه بین نمونه‌های مربوط به ایران و نمونه‌های غیربومی شامل ترکیه، آلمان و کانادا بود. باید به این نکته توجه کرد که زنبورهای عسل منطقه‌ای مانند کشور کانادا عمدتاً زنبورهای هستند که از کشورهای اروپایی به آن منطقه وارد شده‌اند و جای تعجبی ندارد اگر بین

سپاسگزاری

از آقای مهندس سبحانی، کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم‌دانی به‌علت راهنمایی‌ها و شکیبایی‌شان در طول انجام آزمایشات و نیز از آقای دکتر آرش جوانمرد به خاطر راهنمایی‌های ارزنده‌شان تشکر می‌کنیم.

(۲۰۰۵) بود. اگرچه در این جایگاه تفاوتی بین جمعیت ایرانی با جمعیت‌های مورد بررسی اروپایی مشاهده نشد و این جایگاه قادر به ایجاد تمایز بین جمعیت‌های ایرانی با برخی از جمعیت‌های غیربومی نمی‌باشد.

از آنجایی که بشر می‌تواند به‌میزان گسترده‌ای ساختار ژنتیکی جمعیت‌های زنبورعسل را تغییر دهد و خزانه‌ی ژنتیکی محلی را مورد تهدید قرار دهد، باید با مطالعه بیشتر از جمله مطالعه‌ی جایگاه‌های ژنی دیگر و نیز استفاده از مارکرهای هسته‌ای جمعیت را مورد بررسی بیشتر قرار داد و سپس اقدام به ارائه‌ی برنامه‌های حفاظتی مناسبی برای حفظ جمعیت‌های محلی نمود.

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۵-۶ متن انگلیسی مراجعه شود.