مطالعه تنوع آللی جایگاه‌ژنی GLU-B1 در برخی از گندم‌های دوروم ایران با استفاده از نشانگر STS

Study of Allelic Variation of GLU-B1 Locus in some Iranian Durum Wheat Using STS Marker

الهام صبوری‌رباط[۱*]، محمود سلوکی[۲] و مسیح فروتن[۳]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۹/۲۰

چکیده

ارزیابی تنوع ژنتیکی یک ابزار مفید و کارآمد جهت استفاده مفید از ژرم‌پلاسم می‌باشد که به این منظور، در این تحقیق ۳۰ ژنوتیپ مختلف گندم دوروم به‌کمک ۳ جفت آغازگر اختصاصی برای مکان ژنی (GLU-B1) مطالعه و بررسی گردید. در مجموع ۹ آلل در لوکوس GLU-B1 یافت شد. بیشترین فراوانی مربوط به آلل(BY8) b بود. میزان تنوع ژنتیکی برای هر آغازگر نشان داد که آغازگر B1.2 (۰/۸۵) قادر به شناسایی چندشکلی‌های بیشتری نسبت به سایر آغازگرها است. تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA انجام شد و در ضریب تشابه ۰/۶۲ براساس روش جاکارد ارقام به هشت گروه اصلی تفکیک شدند. نتایج نشان داد که نمونه‌های گندم دوروم منابع ارزشمندی از لحاظ زیرواحدهای سنگین گلوتنین هستند و می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی جهت بهبود کیفیت محصولات حاصل از گندم استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: گندم دوروم، تنوع ژنتیکی، گلوتنین، آغازگر اختصاصی

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان

۲. دانشیارگروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان

۳. استادیارگروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان

*: نویسنده مسوول Email: saboorielham@gmail.com

مقدمه

گندم دوروم یکی از مهم‌ترین غلات دانه ریز می‌باشد که عمدتاً مصرف انسانی دارد. این گندم بهتر از ارقام گندم نان به مناطق کم باران دارای محدودیت رطوبتی و تغییرات زیاد شرایط آب و هوایی سازگاری دارد و در بیشتر منابع از آن به‌عنوان یک گندم مقاوم به خشکی یاد می‌کنند *هاین* (Heyne, 1981). علی‌رغم مسأله کمبود آب و همچنین نیاز مبرم صنایع ماکارونی‌سازی به سمولینای گندم دوروم، متأسفانه این گندم جایگاه شناخته شده و قابل‌توجهی در زراعت کشور نداشته است. تا کنون به‌خاطر فرآیندهای اهلی‌کردن گندم دوروم و اخیراً به‌واسطه به‌کارگیری ژرم‌پلاسم یکنواخت، متأسفانه تنوع ژنتیکی این گیاه زراعی کاهش یافته است *الارد* (Allard, 1996).

پروتئین‌های ذخیره‌ای گندم از دسته پرولامین‌ها بوده که به دو دسته گلوتن و غیرگلوتن تقسیم می‌شوند و عمدتاً مسئول کیفیت خمیر و پاستا (ماکارونی) حاصل از گندم نان و دوروم می‌باشند. پروتئین‌های گلوتنی گندم به دو دسته گلیادین‌ها (تک‌زنجیره‌ای) و گلوتنین‌ها (چندزنجیره‌ای) تقسیم می‌شوند. در ادامه گلوتنین‌های گندم به‌لحاظ وزن مولکولی در دو دسته زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا (HMW-Gs) و زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین (LMW-GS) قرار گرفته‌اند *دیوید* و همکاران (D`ovidio *et al.*, 1997). گلوتنین‌های سنگین توسط ژن‌های موجود در ۳ مکان ژنی GLU-B1 GLU-A1 و GLU-D1 که به‌ترتیب بر روی بازوی بلند کروموزوم‌های 1B ,1A و 1D در گندم‌های هگزاپلوئید، و بر روی کروموزوم‌های 1A و 1B در گندم‌های دوروم قرار گرفته‌اند، کد می‌شوند. *پاین و لاورنس* (Payne and Lawrence, 1983). STSها نواحی‌ای هستند که توالی آنها مشخص شده و می‌توانند برای PCR استفاده شوند. در آزمایشاتی که *دبستوس* و همکاران (Debustus *et al.*, 2001) انجام داده بودند از نشانگرهای STS برای تکثیر توالی کدکننده گلوتنین با وزن مولکولی بالا استفاده کردند. یک‌سری نشانگرهای مولکولی AP-PCR از نواحی GLU-A1 و GLU-D1 طراحی شد این انتخاب همچنین با استفاده از نشانگر AFLP در بازیابی زمینه ژنتیکی والدهای تکراری انجام پذیرفت. در مطالعات قبلی مشخص شده که زیرواحدهای سنگین گلوتنین نقش مهمی در کیفیت خمیر گندم دارد و همچنین HMWهای گلوتنین در کروموزوم 1A نسبت به ژن‌های HMW گلوتنین در کروموزوم 1B تأثیر کمتری بر کیفیت گندم نان و دوروم دارد *رکیتی* و همکاران، *پوگنا* و همکاران (Raciti *et al.*, 2003, Pogna *et al.*, 1990). پژوهش‌هایی که در سطح پروتئین در گندم نان و خویشاوندان آن صورت گرفته است نشان می‌دهد که نمونه‌های بومی گندم ایران منبع ارزشمندی از لحاظ زیرواحدهای سنگین گلوتنین هستند *نقوی* و همکاران، *گل‌آبادی و ارزانی* (Naghavi *et al.*, 2009; Golabadi and Arzani, 2002). در پژوهشی که در ژنوتیپ‌های دوروم انجام شد ۱۱ آلل در لوکوس GLU-B1 شناسایی شد که بیشترین فراوانی مربوط به آلل‌های GLU-B1a (زیرواحد ۷) و آلل GLU-B1e (زیرواحد ۲۰) گزارش شد *نقوی* و همکاران (Naghavi *et al.*, 2009). در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای در سطح پروتئین در گندم نان و خویشاوندان آن صورت گرفته است اما تنوع طولی در ژن‌های کدکننده HMW-Gs به‌وسیله‌ی نشانگرهای اختصاصی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است و همچنین اطلاعات محدودی راجع به تنوع ژنتیکی گندم‌های دوروم بومی ایران در دسترس است. هدف اصلی این تحقیق بررسی و شناسایی تنوع آللی در ژن‌های کدکننده HMW-Gs ژنوتیپ‌های بومی و ارقام زراعی گندم دوروم با استفاده از نشانگرهای اختصاصی بوده تا اطلاعات حاصل از این بررسی بتواند در جهت استفاده از ژرم پلاسم مفید واقع شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

در این تحقیق از ۳۰ ژنوتیپ گندم دوروم (*T. turgidum, durum 2n=4x=28=AABB*) ، شامل ۱۰رقم زراعی و ۲۰ توده بومی موجود در بانک ژن مؤسسه اصلاح نهال و بذر کرج، که از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شده بودند، استفاده شد (جدول ۱). DNA ژنومی از برگ‌های تازه گندم به‌روش *دلاپورتا* تغییریافته, *دلاپورتا* و همکاران (Dellaporta *et al.*, 1983) استخراج گردید و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به‌روش فتومتری و الکتروفورز بر روی ژل‌آگارز تعیین گردید.

تهیه آغازگرها

در این آزمایش سه جفت آغازگر اختصاصی برای مکان ژنی GLU-B1 به‌کار رفته است (جدول ۲). دو جفت آغازگر GLUB1. 1 و GLUB1. 2 به‌ترتیب از تحقیق *لی* و همکاران (Lie *et al.*, 2005) و *ما* و همکاران (Ma *et al.*, 2003) انتخاب گردید و جفت آغازگر GLUB1. 3 با استفاده از توالی‌های ثبت‌شده در سایت NCBI با شماره‌ی شناسایی X13927. 3 طراحی گردیده است.

جدول ۱: مشخصات ژنوتیپ‌های گندم دوروم مورد مطالعه

Table 1: The studied durum cultivars

شماره Number	کد ژنوتیپ Pop.Code	محل جمع‌آوری Location	شماره Number	رقم Cultivar	
1	KC: 524	Khuzestan	21	D-81-18	D-81-18
2	KC:525	Khuzestan	22	Yavarus	یاواروس
3	KC:3559	Khuzestan	23	Karkheh	کرخه
4	KC:3560	Khuzestan	24	Arya	آریا
5	KC:3082	Khorasan	25	Dena	دنا
6	KC:860	Mazandaran	26	Behrang	بهرنگ
7	KC:863	Mazandaran	27	Dehdasht	دهدشت
8	KC:1886	Isfahan	28	Semireh	سمیره
9	KC:227	Ardabil	29	Saji	ساجی
10	KC:1764	Khorasan	30	Shotor dandan	شتردندان
11	KC:3066	Khorasan			
12	KC:3075	Khorasan			
13	KC:3081	Khorasan			
14	KC:464	Lorestan			
15	KC:641	Lorestan			
16	KC:467	Lorestan			
17	KC:768	Azarbayejan sharghi			
18	KC:1545	Kermanshah			
19	KC:1546	Kermanshah			
20	KC:1548	Kermanshah			

جدول ۲: نام و توالی آغازگرهای به‌کار رفته شده و دمای اتصال

Table 2: The Name, sequence of used primers and Annealing temperature

آغازگر primer	توالی آغازگر (5' ⟶ 3') Sequence (5' ⟶ 3')	ژن‌ها و آلل‌ها Genes and alleles	دمای اتصال (°C) Annealing temperature (°C)
GLU-B1. 1	TTAGCGCTAAGTGCCGTCT TTGTCCTATTTGCTGCCCTT	BY8	64
GLU-B1. 2	CGCAACAGCCAGGACAATT AGAGTTCTATCACTGCCTGGT	BX6, BX7, BX17	59
GLU-B1. 3	CATCATCACCCACAACACC TGTTGCCCTTGTCCTGTTT	BX7	58

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر، که حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taqپلیمراز (1U)، ۲۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱/۲میکرولیتر از $MgCl_2$ (۱۰۰ میلی‌مولار) و ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ پیکومول) انجام شد. برنامه PCR به‌ترتیب ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه، ۳۵ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال (Tm) به‌مدت ۴۵ ثانیه (طبق جدول۲) ،۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه و دمای بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌کار گرفته شده است. محصولات حاصل از PCR به کمک الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۱۲۰ ولت و مدت زمان ۹۰ دقیقه تفکیک و ارزیابی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

شاخص تنوع ژنتیکی نی برای هر آغازگر طبق فرمول زیر محاسبه شد:

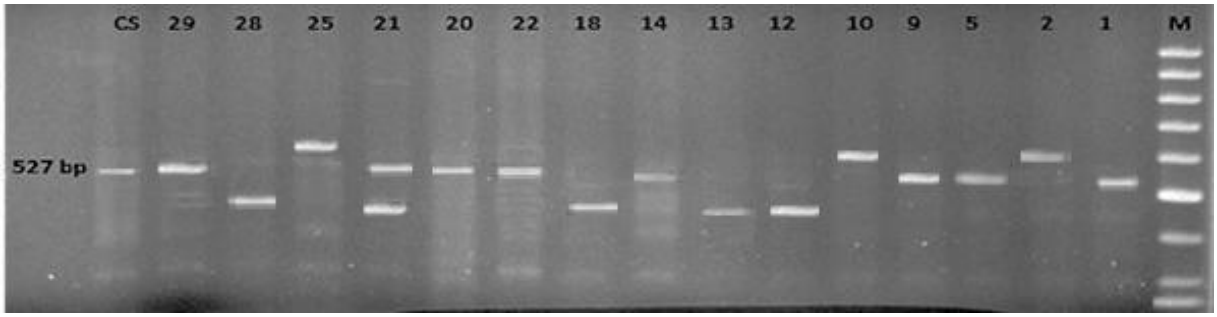
$$H = 1 - \sum \ p_i^2$$

P_i^2: فراوانی نسبی هر آلل

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار NTSYS vesion 2/11 *رهلف* (Rohlf, 1998) و دندروگرام براساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد ترسیم شد.

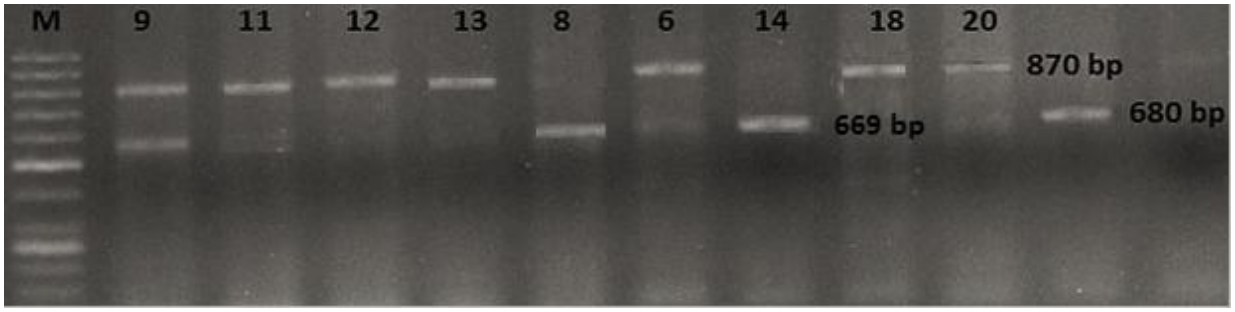
نتایج و بحث

آغازگر GLU-B1.1 در گندم Chinese spring یک قطعه ۵۲۷ جفت باز مربوط به آلل (BY8) b را تکثیر می‌کند که از این ژنوتیپ به‌عنوان کنترل این آغازگر استفاده گردید. بر این اساس قطعات تکثیر شده‌ای که دارای طول ۵۲۷ جفت‌بازی بوده احتمالاً می‌توانند به‌عنوان یک آلل شناخته شوند *لی* و همکاران (2005). با بررسی دقیق قطعات تکثیرشده به‌وسیله این آغازگر در هر ژنوتیپ پی به تفاوت در طول قطعات تکثیرشده برده می‌شود، همچنین در این آغازگر علاوه‌بر آلل موردنظر ۲ آلل (a, c) با طول تقریبی بین ۴۰۰ تا ۵۵۰ شناسایی شد (شکل ۱)، که آلل b با فراوانی ۰/۵۶ بیشترین و آلل a با فراوانی ۰/۱۶ کمترین فراوانی را به‌خود اختصاص داده است (جدول ۳). استفاده از آغازگر B1.1 امکان شناسایی آلل-های BY8 و *BY9 و ترکیب آللی (BX7+ BY) که تشخیص آنها با روش SDS-PAGE مشکل است و معمولاً با روش SDS-PAGE به‌عنوان یک آلل شناسایی می‌شوند را فراهم می‌کند *لی* و همکاران (2005). به کمک آغازگر B1. 2 سه آلل (d, e, f) شناسایی شد (شکل ۲)، که آلل d با فراوانی ۰/۲۶ و آلل e با فراوانی ۰/۱۶ به‌ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را به‌خود اختصاص دادند. آغازگر GLU-B1. 2 سه آلل مختلف e(BX6) با طول ۶۸۰ جفت‌باز، f (BX7) با طول ۶۶۹ جفت‌باز و d (BX17) با طول ۸۷۰ جفت باز را تکثیر می‌کنند (Ma *et al.*, 2003). این آغازگر در اکثر ارقام دو باند با اختلاف اندازه تقریبی۲۰۰ جفت‌باز را نشان داد (شکل ۲). به‌کمک آغازگر B1. 3 سه آلل (g, h, i) با طول تقریبی بین ۴۵۰ تا ۷۰۰ جفت‌باز شناسایی شد (شکل ۳)، که آلل h با فراوانی ۰/۵۳ و آلل g با فراوانی ۰/۱۰ به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین فراوانی را به‌خود اختصاص دادند.



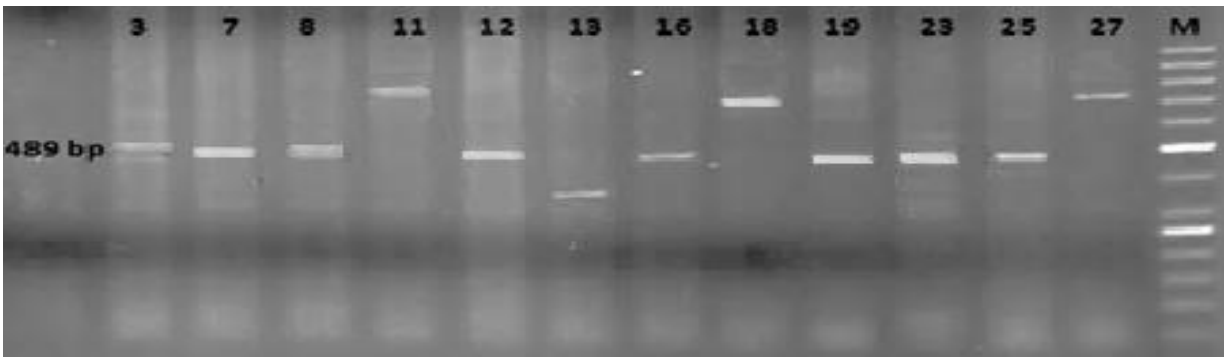
شکل ۱: تنوع طولی ژن‌های کنترل‌کننده HMW-GS که به‌وسیله‌ی آغازگر GLU-B1. 1 شناسایی شده‌اند. شماره‌گذاری طبق (جدول ۱) می‌باشد. Cs: گندم چینی بهاره

Fig. 1: Product size for HMW glutenin genes using of GLU-B1. 1 primer. Numbered according to Table 1. Cs: Chinese spring



شکل ۲: تنوع طولی ژن‌های کنترل‌کننده HMW-GS که به‌وسیله‌ی آغازگر GLU-B1. 2 شناسایی شده‌اند. شماره‌گذاری طبق (جدول ۱) می‌باشد

Fig. 2: Product size for HMW glutenin genes using of GLU-B1. 2 primer. Numbered according to Table 1



شکل ۳: تنوع طولی ژن‌های کنترل‌کننده HMW-GS که به‌وسیله‌ی آغازگر GLU-B1. 3 شناسایی شده‌اند. شماره‌گذاری طبق (جدول ۱) می‌باشد

Fig. 3: Product size for HMW glutenin genes using of GLU-B1. 3 primer. Numbered according to Table 1

در این تحقیق آغازگر B1.3 با استفاده از توالی‌های ثبت‌شده در سایت NCBI با شماره شناسایی X13927.3 طراحی گردیده است و به‌عنوان یک نشانگر اختصاصی جدید برای زیرواحد BX7 معرفی می‌شود که می‌توان از این نشانگر برای شناسایی آلل BX7 در ژنوتیپ‌های دیگر گندم استفاده نمود همچنین ساختار آن در مطالعات بعدی بررسی کرد لازم به‌ذکر است که آلل BX7 همراه با زیرواحدهای BY8 یا BY9 در افزایش خاصیت کشسانی خمیر حاصل از گندم مؤثر است. میزان تنوع ژنتیکی محاسبه‌شده برای هر آغازگر (H) نشان داد که آغازگر B1. 2 بالاترین میزان تنوع ژنتیکی را دارا است (H= 0.85) لذا این آغازگر می‌تواند اطلاعات مفیدی را در خصوص تنوع ژن-های کدکننده زیرواحد سنگین گلوتنین فراهم کند (جدول ۳).

جدول ۳: آلل‌های شناسایی شده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در مکان ژنی GLU-B1

Table 3:The allelic detected in studied durum cultivars in GLU-B1 luci

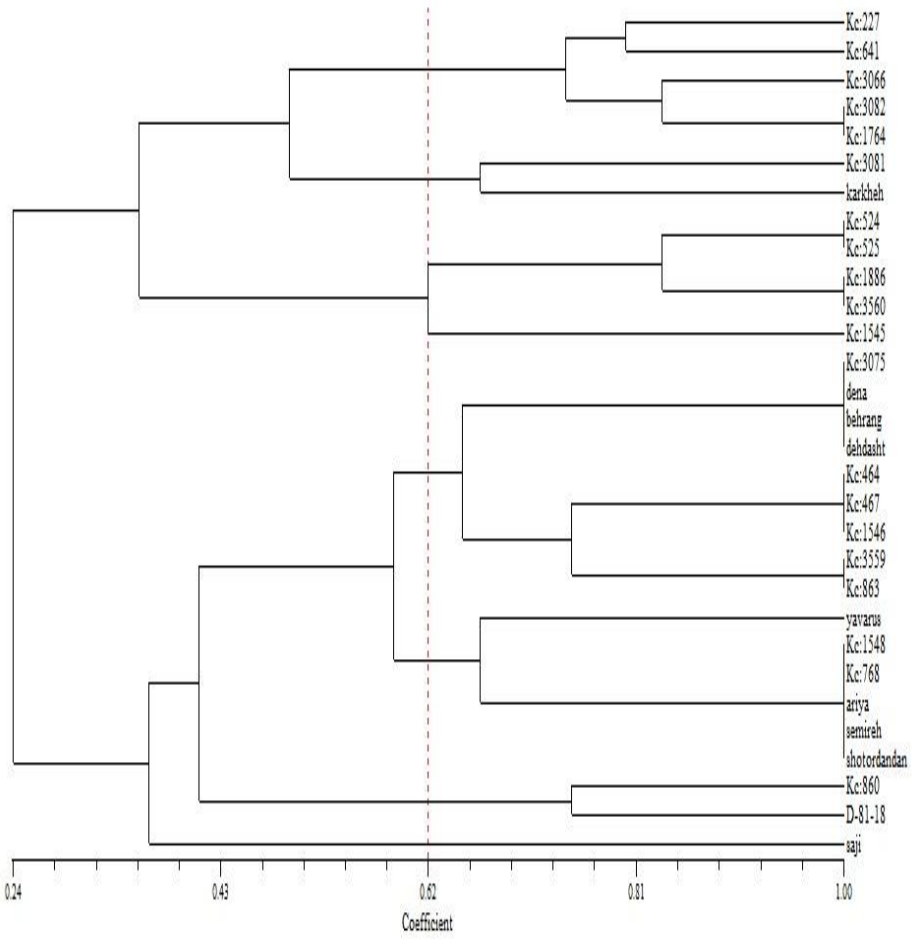
مکان ژنی Locus	آغازگر Primer	آلل Allele	فراوانی نسبی Frequency	میزان تنوع برای هر آغازگر The range for each primer
GLU-B1	B1.1	a	0.16	0.59
		b	0.56	
		c	0.26	
	B1.2	d	0.26	0.85
		e	0.16	
		f	0.23	
	B1.3	g	0.10	0.60
		h	0.53	
		i	0.33	
		a	0.16	

جهت انجام تجزیه خوشه‌ای و رسم نمودار درختی، ضریب کوفنتیک و تست مانتل برای روش‌های جاکارد و دایس محاسبه شد، در نهایت مشخص شد ضریب جاکارد با مقدار ۰/۹ نسبت به‌ضریب روش دایس با مقدار ۰/۸۶ دارای بالاترین میزان ضریب کوفنتیک بود، لذا بقیه مراحل تجزیه و تحلیل با روش جاکارد انجام شد.

براساس دندروگرام، در ضریب تشابه ۰/۶۲ می‌توان ژنوتیپ-ها را به ۸ دسته تقسیم‌بندی کرد (شکل ۴). برای تعیین محل برش نمودار خوشه‌ای از تابع تشخیص محل برش استفاده شد. طبق نتایج به‌دست آمده از این ژنوتیپ‌ها و خاستگاه‌های ژنتیکی آنها، مشاهده می‌شود که توده‌های بومی دارای خاستگاه‌های ژنتیکی یکسان، دارای فاصله ژنتیکی کوتاه‌تری نسبت به بقیه می‌باشند. البته در برخی موارد استثناء هم وجود دارد، به‌عنوان مثال توده بومی منطقه اردبیل (kc: 227) همراه با توده‌های خراسان (kc: 3066, kc: 3082) در یک زیردسته قرار گرفته است. همچنین برخی از توده‌های بومی از لحاظ

جغرافیایی به‌هم نزدیک بوده ولی در نمودار خوشه‌ای دور از هم قرار گرفته‌اند. مانند توده بومی منطقه اردبیل (kc: 227) و مازنداران (kc: 860) که در نمودار خوشه‌ای بیش‌ترین فاصله را از هم دارند. علت این می‌تواند جابه‌جایی این ژنوتیپ‌ها (مثلاً از طریق مهاجرت ژنی) باشد. در عین‌حال این نکته حائز اهمیت است که این گروه از ژنوتیپ‌ها به‌عنوان پایه تلاقی برای ایجاد حداکثر تفرق ژنی قابل استفاده است که برای برنامه‌های به‌نژادی می‌تواند موردتوجه قرار گیرد.

تقوی و همکاران (2009) نمونه‌های بومی گندم دوروم مناطق مختلف ایران را برای تنوع زیرواحدهای سنگین گلوتنین با استفاده از روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار دادند، که سه آلل در لوکوس GLU-A1 و ۱۱ آلل در لوکوس GLU-B1 یافت شد نتایج نشان داد که نمونه‌های بومی گندم دوروم منابع ارزشمندی از لحاظ زیرواحدهای گلوتنین هستند، همچنین استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای مکان ژنی GLU-B1 در گندم‌های دوروم ایران حضور آلل‌های شناسایی شده در این مکان ژنی را که در مطالعات قبلی با روش SDS-PAGE بررسی شده بودند را تأیید می‌کند *تقوی* و همکاران، *گل‌آبادی و ارزانی* (Naghavi *et al.*, 2009; Golabadi and Arzani, 2002). با استفاده از نشانگرهای اختصاصی امکان شناسایی آلل‌هایی که در سطح DNA وجود دارند ولی در سطح پروتئین بیان نمی‌شوند و همچنین آلل‌هایی که به‌دلیل همپوشانی با سایر پروتئین‌ها ناشناخته مانده‌اند فراهم می‌شود. همچنین نشانگرهای اختصاصی توانایی شناسایی آلل‌ها بر مبنای اختلافات خیلی جزیی حتی به اندازه یک نوکلئوتید را دارند *زانگ* و همکاران (Zhang *et al.*, 2003) پس می‌توان آلل‌های شناسایی شده را متعاقباً توالی‌یابی نموده و تغییرات در طول آنها را از لحاظ تعداد اسیدهای‌آمینه موردبررسی قرار داد و در نهایت اطلاع از توالی کدکننده کامل امکان تشخیص آلل-های غیرفعال را می‌دهد و این اطلاعات می‌تواند در برنامه‌های انتقال ژن برای گندم‌های تراریخته موردنظر استفاده شود.



شکل ۴: نمودار خوشه‌ای ژنوتیپ‌های بررسی شده براساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد
Fig. 4: The UPGMA-based dendrogram of genotypes and Jaccard's similarity coeficient

واضح است که اطلاعات در سطح پروتئین و DNA برای اصلاح‌گرانی مفید خواهد بود که مایل به انجام تلاقی‌هایی جهت اصلاح صفات مفید زراعی، با انتخاب ژنوتیپ‌هایی با تنوع مناسب و مفید هستند و همچنین آنالیز HMW-GSها با روش SDS-PAGE به استفاده از مواد دانه محدود می‌شود بنابراین انتخاب لاین‌های اصلاحی در مزرعه نمی‌تواند قبل از برداشت انجام شود از این رو PCR می‌تواند به‌عنوان یک روش پربازده و قابل‌اطمینان برای تعیین ترکیبات آللی HMW-GSها استفاده شود و می‌توان با شناسایی آلل‌هایی که با کیفیت نهایی خمیر گندم مرتبط هستند ژنوتیپ‌هایی با کیفیت بالا را در مراحل اولیه رشد گیاه انتخاب نمود.

نتیجه‌گیری کلی

تنوع آللی قابل ملاحظه‌ای در ژنوتیپ‌های گندم دوروم مشاهده گردید و میزان تنوع در ژنوتیپ‌های بومی بیشتر از ارقام دوروم به‌دست آمده است که می‌تواند در جهت تولید ارقام با کیفیت خمیر بالا مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به اینکه مکان ژنی GLU-B1 تأثیر بیشتری بر کیفیت خمیر دارد می‌توان آلل‌های شناسایی‌شده را متعاقباً توالی‌یابی نمود و ساختار آنها را در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار داد. آغازگر B1. 2 بالاترین میزان تنوع ژنتیکی را دارا است (H= 0.85) لذا این آغازگر می‌تواند اطلاعات مفیدی را در خصوص تنوع ژن‌های کدکننده زیرواحد سنگین گلوتنین فراهم کند و آن را به‌عنوان منبع باارزش تنوع آللی در برنامه‌های اصلاحی با هدف بهبود کیفیت محصولات حاصل از گندم به‌کار گرفت.

تشکر و قدردانی

از گروه اصلاح و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل به‌خاطر تأمین هزینه و همچنین از سازمان تحقیقات کشاورزی و بخش غلات مؤسسه اصلاح نهال و بذر کرج به‌خاطر در اختیار گذاشتن بذر موردنیاز قدردانی می‌گردد.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۶-۷ متن انگلیسی مراجعه شود.