مطالعه تنوع آلل‌های پروتئینی آندوسپرم برخی از ارقام گندم نان با استفاده از روش SDS-PAGE

Study of Endosperm protein banding pattern variation in some of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes by SDS-PAGE method

فرزاد مرادی[۱]، مهدی کاکایی[۲*] و هدیه شرربار[۳]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۰۳

چکیده

وجود تنوع ژنتیکی پایه و اساس اصلاح گیاهان است که گزینش گیاهان با خصوصیات مطلوب و یا انتقال صفات به گیاهان را ممکن می‌سازد. مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی بر پایه نشانگرها و از جمله نشانگرهای پروتئینی در برنامه‌های به‌نژادی و به‌ویژه انتخاب والدین نقش مهمی دارد. در تحقیق حاضر، تنوع ژنتیکی ۱۶ رقم گندم نان (سرخ‌تخم، شهریار، توس، الموت، زرین، آرام، گاسپارد، بزوستایا، پیشگام، سایسون، گاسکوژن، میهن، امید، نوید، بک کراس روشن زمستانه و زارع) به کمک روش الکتروفورز SDS-PAGE بررسی شد. غلظت پروتئین توسط روش برادفورد مشخص گردید. پس از رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید با کوماسی بلو R-250 و امتیازدهی باندها طبق روش صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند)، تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضریب تشابه جاکارد به روش UPGMA انجام گردید. بر این اساس ارقام در چهار گروه مجزا قرار گرفتند. بر این اساس ژنوتیپ سرخ‌تخم در گروه دوم، ژنوتیپ گاسپارد در گروه سوم و سایر ژنوتیپ‌ها در گروه اول خوشه‌بندی شدند. نتایج نشان داد که ژنوتیپ بک کراس روشن زمستانه با ژنوتیپ گاسپارد بیش‌ترین تفاوت فاصله‌ای را براساس آلل‌های پروتئینی مورد مطالعه، دارا هستند. بنابراین، با توجه به فواصل ژنوتیپ‌ها نسبت به هم براساس ضریب تشابه، در برنامه‌های بیومتری اصلاحی، تلاقی ژنوتیپ‌های امید، سایسون، بک‌کراس روشن زمستانه با ژنوتیپ گاسپارد قابل توجیه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، ضریب تشابه جاکارد، فاصله ژنتیکی

۱. مربی بخش کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵

۲. استادیار بخش کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵

۳. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

*: نویسنده مسؤول Email: Mehdikakaei37@gmail.com

مقدمه

گندم مهم‌ترین غله و منبع غذایی در جهان می‌باشد (آقایی سربرزه و همکاران، ۱۳۸۸). وجود تنوع ژنتیکی جهت انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاح‌نباتات دارای اهمیت زیادی می‌باشد. از جمله روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی، می‌توان به روش‌های مورفولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی اشاره نمود، اطلاع درباره تنوع ژنتیکی و ارتباط ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها کمک بزرگی در تعیین راهبردهای توسعه محصولات به شمار می‌رود کاکایی و همکاران، ۱۳۸۸؛ *فرشادفر و فرشادفر* (Farshadfar and Farshadfar, 2008). نشانگرهای بیوشیمیایی شامل نشانگرهای پروتئینی مانند پروتئین‌های ذخیره‌ای و آیزوزیم‌ها هستند *هامیز و رایکوود* (Hames and Rikwood, 1990). به علت چندشکلی بیش از اندازه در گلیادین‌ها، همچنین به‌دلیل ترکیب ساده، سهولت استخراج، پایداری و ظهور تقریباً ثابت آن‌ها در شرایط محیطی گوناگون، برای تعیین یکنواختی ارقام، شناسایی واریته و شناسایی شجره‌ها به طور وسیع از الگوهای گلیادینی استفاده می‌شود *میتاکواسکی و برانلارد* (Metakovsky and Branlard, 1997). پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی به چهار منظور بررسی می‌شوند: ۱. تجزیه فاصله ژنتیکی درون و برون گونه‌ای، ۲. اهلی کردن گیاهان، اصلاح و حفاظت از منابع ژنتیکی، ۳. قرابت ژنتیکی و ۴. به‌عنوان ابزاری جهت توسعه محصولات کاکایی، ۱۳۸۹؛ *غفور و احمد* (Ghafoor and Ahmad, 2005). الکتروفورز ژل اکریل‌آمید با حضور سدیم دو دسیل سولفات از جمله تکنیک‌های کاربردی است که در جداسازی و تشخیص پروتئین کارآیی بالایی دارد *لاملی* (Laemmli, 1970). پایه اصلی در سیستم الکتروفورز بر این اصل استوار است که سرعت حرکت یک پروتئین (یا هر مولکول دیگر) در یک میدان الکتریکی، به قدرت الکتریکی میدان، بار الکتریکی خالص پروتئین و ضریب اصطکاک بستگی دارد. نیروی الکتریکی رانش، مولکول باردار را برخلاف جهت نیرویی که از اصطکاک بین مولکول در حالت حرکت و محیط حرکت آن بوجود می‌آید به سمت الکترود مخالف آن می‌راند. تقریباً کلیه عملیات تجزیه الکتروفورزی پروتئین‌ها روی ژل پلی‌اکریل‌آمید انجام می‌شود زیرا ژل پلی‌اکریل‌آمید شرایط لازم را برای پراکندگی پروتئین‌ها به زیر واحدهای پلی‌پپتیدی آن را فراهم می‌نماید و مانند یک غربال مولکولی، باعث جداسازی مولکول‌ها می‌شود (ریاست و نصیرزاده، ۱۳۸۵). SDS-PAGE به‌طور گسترده‌ای برای شناسایی آلل‌های HMW-GS مورد استفاده قرار گرفته‌اند و اثرات آن‌ها بر روی کیفیت نانوایی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند سینگ و همکاران (Sing *et al*., 1991). رجبی‌هشجین و همکاران (۱۳۹۲) به کمک تکنیک SDS-PAGE تنوع الگوی پروتئینی ژنوتیپ‌های گندم دوروم و نان را مطالعه نمودند و آن‌ها را در دو گروه دسته‌بندی نمودند. رهبری و همکاران (۱۳۸۹) در مطالعه‌ی الگوی الکتروفورزی جوانه برخی از ارقام گندم با استفاده از SDS-PAGE، تنوع الگوی پروتئینی را گزارش نمودند. کاکایی و همکاران ۱۳۸۸، در مطالعه‌ی با عنوان مقایسه فاصله ژنتیکی و مورفوفیزیولوژیکی برخی از ژنوتیپ‌های کلزا براساس نشانگر SDS-PAGE، ژنوتیپ‌های مطلوب را با توجه به فاصله ژنتیکی مشخص نمودند و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را براساس الگوی باند پروتئینی به دو کلاس مشخص گروه‌بندی نمودند. بهی و همکاران (۱۳۹۲) به‌منظور بررسی ارتباط بین نشانگرهای پروتئینی با مقاومت به یخزدگی در جو، پروتئین‌های گلیادین بذر با استفاده از تکنیک A-PAGE بررسی کردند. مهم‌ترین مزایای نشانگرهای مولکولی، پیوستگی مستقیم نشانگرها با ژن‌های کنترل‌کننده صفات بررسی شده، محدود نبودن در تعداد، تحت تأثیر محیط نبودن نشانگرها، شناسایی آن‌ها در هر مرحله از رشد گیاه و تعیین تنوع ژنتیکی بدون متأثر شدن از فنوتیپ است *ماهان* و همکاران (Mahan *et al*., 1996). مطالعه و آگاهی از تنوع الگوی پروتئینی و تشخیص فاصله ژنتیکی بین ارقام گندم نان جهت برنامه‌های به‌نژادی اهداف این تحقیق را تشکیل دادند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این آزمایش ۱۶ رقم گندم نان به شرح جدول شماره ۱، از مرکز تحقیقات کشاورزی همدان (بخش تحقیقات گندم) تهیه گردید.

جدول ۱: اسامی ارقام گندم نان مورد مطالعه در این آزمایش
Table 1: Name of cultivars used in the experiment

شماره رقم Number	ارقام Cultivars	شماره رقم Number	ارقام Cultivars	شماره رقم Number	ارقام Cultivars
1	سرخ تخم Scorch Tokhm	7	گاسپارد Gaspard	13	امید Omid
2	شهریار Shahriar	8	بزوستایا Bezostaya	14	نوید Navid
3	توس Toos	9	پیشگام Pishgam	15	بک کراس روشن زمستانه Back crass roshan zemestane
4	الموت Elemoat	10	سایسون Sayson	16	زارع Zare
5	زرین Zarin	11	گاسکوژن Gascogen		
6	آرام Aram	12	میهن Maihan		

استخراج پروتئین آندوسپرم بذور ارقام گندم نان مورد مطالعه

ابتدا آندوسپرم و جنین از بذر ارقام مورد مطالعه تفکیک شدند سپس نمونه ۲۵۰ میلی‌گرمی از بذر ارقام در داخل هاون چینی کوبیده و پودر شدند. پروتئین آندوسپرم پودر شده درون میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری قرار داده شدند و از بافر استخراج پروتئین به‌روش *یانگ* و همکاران (Yang *et al.*, 2006) با اندکی تغییرات پر شد. و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۳۵۰۰g سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی در دو میکروتیوب توزیع گردید و با محلول TCA-Aceton میکروتیوب پر شد و به‌مدت یک ساعت در فریزر باقی ماند و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۳۵۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید پس از ته‌نشین شدن پروتئین، محلول رویی دور ریخته شد و با استون سه بار شستشو گردید و نهایتاً با بافر لیزکننده به میزان ۱۵۰ میکرولیتر مخلوط گردید، به‌مدت یک ساعت شیک گردید و با روش *برادفورد* (Bradford, 1976)، در ۵۹۵ نانومتر جذب نمونه‌ها قرائت گردید.

الکتروفورز پروتئین آندوسپرم استخراجی

در این مطالعه برای الکتروفورز پروتئین از روش SDS-PAGE استفاده گردید. SDS-PAGE در ژل جداکننده ۱۲/۵ درصد و ژل متراکم‌کننده ۵ درصد، به‌روش لاملی با برخی تغییرات انجام پذیرفت. ابتدا مقدار پروتئین نمونه‌ها به‌روش فوق تعیین و سپس مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه با غلظت یکسان روی ژل بارگذاری گردید. الکتروفورز با شدت جریان ۲۵ آمپر و ولتاژ ۱۵۰ ولت تا رسیدن نشانه رنگی به پایین ژل ادامه یافت. از پروتئین‌های اوترانسفرین (۷۸ کیلودالتون)، آلبومین گاوی (۶۶ کیلودالتون)، اوآلبومین (۴۵ کیلودالتون)، اکتینیدین (۲۹ کیلودالتون)، بتا-لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلودالتون) و لیزوزیم (۱۴ کیلودالتون) به‌عنوان نشانگر در ژل استفاده گردید. الکتروفورز با ولتاژ ۵۰ ولت در ژل متراکم‌کننده به‌مدت ۳۰ دقیقه و ولتاژ ۱۵۰ ولت در ژل جداکننده به‌مدت ۹۰ دقیقه با دستگاه پاورساپلای انجام گردید. و همچنین پروتئین کل نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید

بعداز الکتروفورز، رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو بریلیانت R-250 انجام شد. پس از ۱/۵ ساعت قرار گرفتن در محلول رنگ، با محلول رنگ بر (متانول، اسیداستیک گلاسیال و آب مقطر) تا روشن شدن زمینه ژل ادامه یافت و سپس ژل اسکن شد.

رتبه‌بندی و تجزیه آماری داده‌ها

آلل‌ها بر اساس حضور و عدم‌حضور در هر نمونه امتیازدهی شدند. ماتریس دوطرفه ارقام و متغیرها براساس صفر و یک تشکیل گردید سپس تجزیه داده‌ها با کمک نرم‌افزار NTsys pc Version 2.02e انجام گرفت. نمودار درختی براساس روش UPGMA با استفاده از ضرایب تشابه جاکارد ترسیم گردید.

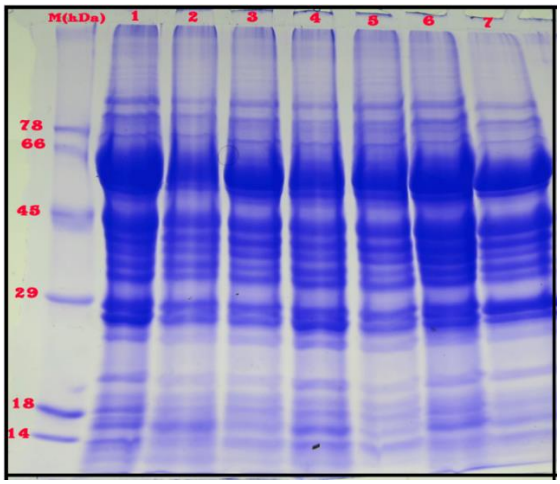
نتیجه و بحث

در بررسی الگوی الکتروفورزی، وجود تفاوت در تعداد و نوع باندهای پروتئینی در جمعیت‌های مورد بررسی نشان‌دهنده

تنوع در گونه گندم نان می‌باشد. در تصویر شماره ۱ و ۲ الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های آندوسپرم بذر ارقام گندم نان دیده می‌شود. با توجه به این فرض که پروتئین‌ها فرآورده‌های نسبتاً مستقیم ژن‌ها می‌باشند و هر یک از نوارها به‌عنوان یک صفت در نظر گرفته می‌شود و تفاوت در الگوی پروتئینی، نمایانگر اختلاف وراثتی معنی‌دار در بین جمعیت‌های مورد مقایسه است، آلل‌ها در نمونه‌های مورد آزمایش چندشکلی‌هایی از خود نشان دادند. همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود شدت و تعداد آلل‌های موجود در ارقام اندکی با یکدیگر متفاوت هستند. به‌عبارتی هر رقم دارای آلل‌های مشترک و اختصاصی بودند که از نظر تراکم با هم تفاوت داشتند. رقم شماره ۷ با تعداد ۲۹ آلل بیش‌ترین و رقم ۱۰ با تعداد ۱۱ آلل کم‌ترین تعداد آلل را به خود اختصاص داد. بیش‌ترین تغییرات براساس الگوی آللی مشاهده شده در ناحیه سایز مارکر ۱۴ تا ۱۸ کیلودالتون و ۶۶ تا ۸۲ کیلو دالتون بود. دندروگرام حاصل از نشانگر پروتئینی براساس ضریب جاکارد، ارقام مورد مطالعه را به چهار گروه دسته‌بندی کرد (شکل ۳). با توجه به این تجزیه ارقام در فاصله‌ی ۰/۴۸ در چهار گروه قرار گرفت، گروه اول شامل ارقام شماره ۱، ۶، ۹، ۲، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۳، ۴، ۱۱، ۱۳، ۱۶ و ۵ و گروه دوم شامل رقم شماره ۸، گروه سوم نیز شامل رقم شماره ۱۵ و رقم شماره ۷ در گروه چهارم قرار گرفت. که بر این اساس ارقام شماره ۱، ۶ و ۹ با رقم شماره ۷ بیش‌ترین تفاوت فاصله‌ای را براساس آلل‌های پروتئینی مورد مطالعه با هم دارند. جدول شماره ۲ ماتریس تشابه جاکارد براساس نشانگر پروتئینی ارقام گندم نان مورد مطالعه را نمایش می‌دهد. براساس این ماتریس تشابه، کم‌ترین تشابه و بیش‌ترین فاصله‌ی ژنتیکی بین ارقام بک کراس زمستانه روشن با گاسپارد (۰/۱۸۱) و امید با گاسپارد (۰/۱۶۶) و سایسون با گاسپارد (۰/۲۰۸) بود که می‌توان جهت انتخاب والدین و تلاقی آن‌ها (در صورت وجود دیگر صفات زراعی مطلوب و قابل ترکیب در آن‌ها) بهره برد، چرا که در حال حاضر روش‌های گزینش بعد از دورگ‌گیری عمده‌ترین روش‌های اصلاح گیاهان خودبارور را تشکیل می‌دهند و می‌توان از تفکیک متجاوز در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد. بیش‌ترین تشابه و کم‌ترین فاصله‌ی ژنتیکی مربوط به رقم نوید با میهن (۰/۸۲۶)، کاسکوژن با زارع (۰/۸۳۳)، امید با گاسکوژن (۰/۸۵۱) و الموت با توس (۰/۸۱۴) بود. میقانی و ابراهیم‌زاده (۱۳۸۲)، در مطالعه پاسخ پروتئین‌های برگ دو رقم گندم به تنش شوری ابراز نمودند که مطالعه الکتروفورزی عصاره‌های پروتئینی برگ به‌روش SDS-PAGE نشان داد که در پاسخ به شوری، پلی‌پپتیدهایی حذف، کاهش یا افزایش می‌یابند.

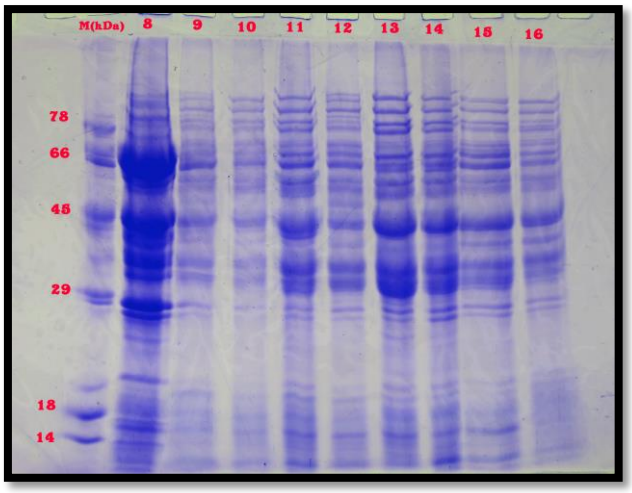
میزان پروتئین کل

شکل ۴ نمودار پروتئین کل، ارقام مورد مطالعه گندم نان را نشان می‌دهد. همان‌طوری‌که مشخص می‌باشد بین ارقام مورد مطالعه از نظر محتوای پروتئینی اختلاف وجود دارد بیش‌ترین مقدار پروتئین مربوط به رقم پیشگام و کم‌ترین مقدار آن مربوط به رقم شهریار می‌باشد.



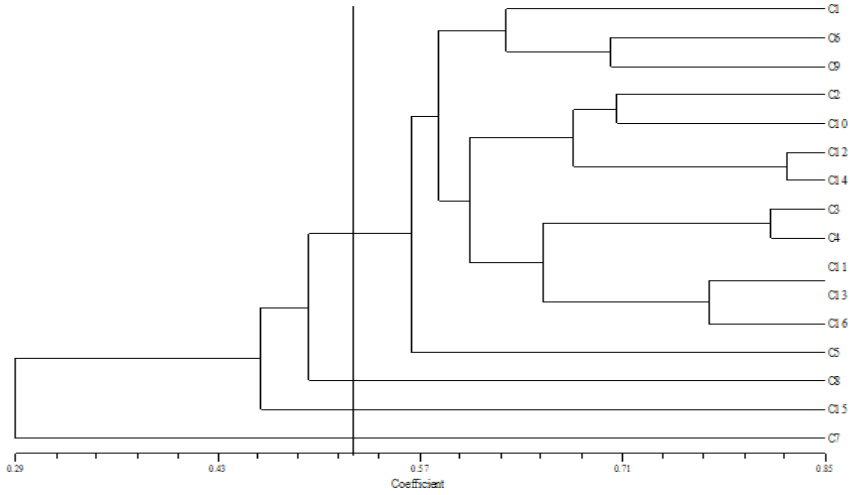
شکل ۱: تفکیک آلل‌های پروتئینی تشکیل شده حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های آندوسپرم بذر ارقام گندم نان (اسامی ارقام براساس شماره از ۱ تا ۷ براساس جدول ۱). اسامی نشانگرها و وزن مولکولی آن‌ها به‌ترتیب از بالا به پایین اوترانسفرین (۷۸ کیلودالتون)، آلبومین گاوی (۶۶ کیلودالتون)، اوآلبومین (۴۵ کیلودالتون)، اکتینیدین (۲۹ کیلودالتون)، بتا-لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلودالتون) و لیزوزیم (۱۴ کیلودالتون)

Fig. 1: Allelic separation of seed endosperm proteins of wheat using SDS-PAGE. Standard proteins were used and their molecular weights were: ovotransferrin (78 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), actinidin (29 kDa), β lactoglobulin (18 kDa) and lysozyme (14 kDa)



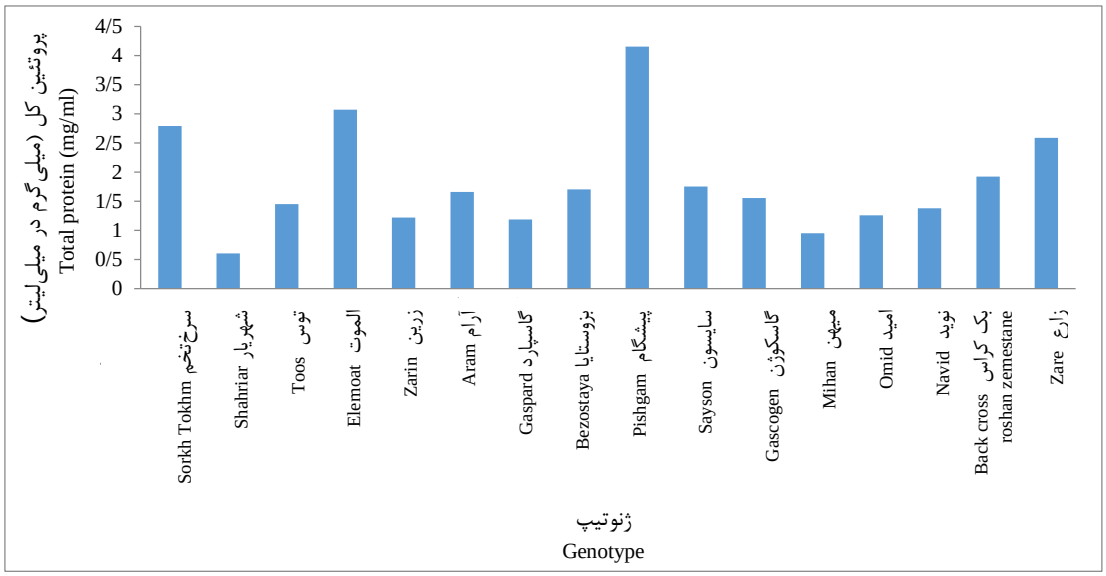
شکل ۲: تفکیک آلل‌های پروتئینی تشکیل شده حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های آندوسپرم بذر ارقام گندم نان (اسامی ارقام براساس شماره از ۸ تا ۱۶ براساس جدول ۱)

Fig. 2: Allelic separation of seed endosperm proteins of wheat using SDS-PAGE. (The cultivars name and number are in table 1)



شکل ۳: دندروگرام حاصل از نشانگر پروتئینی بر اساس ضریب تشابه جاکارد

Fig. 3: Dendrogram obtained from protein markers based on the Jaccard's coefficient



شکل ۴: پروتئین کل ارقام گندم نان مطالعه شده

Fig. 4: Total protein of the studied bread wheat cultivars

جدول ۲: ماتریس تشابه جاکارد براساس نشانگر پروتئینی ارقام گندم نان مورد مطالعه

Table 2: Jaccard's similarity matrix based on protein marker wheat cultivars under studied bread wheat cultivars

زارع Zare	بک کراس Back cross	نوید Navid	امید Omid	میهن Mihan	گاسکوژن Gascogen	سایسون Sayson	پیشگام Pishgam	بزوستایا Bezostaya	گاسپارد Gaspard	آرام Aram	زرین Zarin	الموت Elemoat	توس Toos	شهریار Shahriar	سرخ‌تخم Sorkh Tokhm	ردیف Row
															1	1
														1	0.692	2
													1	0.714	0.642	3
												1	0.814	0.620	0.607	4
											1	0.586	0.516	0.607	0.535	5
										1	0.607	0.620	0.714	0.703	0.692	6
									1	0.416	0.375	0.296	0.285	0.307	0.333	7
								1	0.333	0.428	0.56	0.518	0.555	0.6	0.583	8
							1	0.379	0.307	0.703	0.551	0.566	0.6	0.586	0.571	9
						1	0.366	0.521	0.208	0.518	0.538	0.5	0.535	0.708	0.56	10
					1	0.629	0.580	0.482	0.233	0.580	0.548	0.666	0.645	0.689	0.566	11
				1	0.714	0.666	0.5	0.5	0.32	0.551	0.629	0.533	0.566	0.666	0.592	12
			1	0.642	0.851	0.615	0.566	0.413	0.166	0.516	0.533	0.655	0.633	0.678	0.5	13
		1	0.571	0.826	0.586	0.727	0.482	0.423	0.347	0.592	0.555	0.571	0.607	0.653	0.64	14
	1	0.521	0.5	0.48	0.464	0.571	0.357	0.391	0.181	0.461	0.321	0.392	0.481	0.583	0.44	15
1	0.517	0.531	0.709	0.645	0.833	0.516	0.677	0.483	0.290	0.677	0.593	0.656	0.687	0.677	0.61	16

نتیجه‌گیری کلی

گسترده‌ترین تکنیک برای توصیف بیوشیمیایی جمعیت‌های گیاهی، روش‌های الکتروفورز پروتئین است. روش‌های الکتروفورزی موجود بسیار متنوع و گوناگون بوده و مزیت بارز آن‌ها ارزانی و سریع بودن نتیجه‌گیری در آن‌ها است. پروتئین‌های ذخیره‌ای ضمن داشتن چندشکلی زیاد، بسیار باثبات هستند. بنابراین الگوهای الکتروفورزی پروتئین ذخیره بذر به تنهایی یا با سایر نشانگرها معیار بسیار خوبی برای شناسایی جمعیت‌های گیاهی و ارقام خواهد بود *لاورنس* و همکاران (Laverens *et al*., 1987). جهت موفقیت در برنامه‌های اصلاحی، آگاهی از میزان قرابت ژنتیکی والدین حائز اهمیت است، با توجه به نتایج موجود می‌توان ضمن مطالعه صفات زراعی و انطباق با این داده‌ها در مورد برنامه‌های به‌نژادی این ارقام تصمیم‌گیری نمود. همچنین توصیه می‌شود تنوع مولکولی این ارقام از نظر نشانگرهای DNA هم بررسی گردد و با انطباق این نتایج جهت انتخاب مطلوب‌تر والدین جهت تلاقی استفاده نمود، چرا که اکثر صفات گیاهی که دارای اهمیت اقتصادی فراوانی‌اند به‌صورت کمی به ارث می‌رسند. این صفات دارای وراثت‌پذیری پایینی هستند و گزینش مستقیم در مزرعه دارای مشکلاتی می‌باشد. همچنین انجام دادن عملیات اصلاحی در ارتباط با این صفات دشوار و پیچیده می‌باشد. به‌نژادگران همیشه در پی یافتن نشانگرهای ژنتیکی و بیوشیمیایی‌اند که با این صفات همبسته باشند تا بتوانند از این نشانگرها به مثابه معیارهای غیرمستقیم گزینش استفاده نموده و در گیاهان خودگشن از تفکیک متجاوز جهت مطالعات به‌نژادی بهره‌مند شوند. در پژوهش‌های آتی، مطالعه آزمایشات مشابه به‌همراه تعداد بیشتری از ارقام و مطالعه صفات مزرعه‌ای نیز توصیه می‌گردد.

سپاس‌گزاری

از دانشگاه پیام‌نور استان همدان، همکاری مطلوب مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (جناب آقای دکتر علی مصطفایی)، و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی همدان جناب آقای مهندس چایچی به لحاظ قرار دادن ارقام مورد مطالعه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۹-۲۰ متن انگلیسی مراجعه شود.