دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی مرغان بومی ایران بر مبنای توالی ناحیه D- loop از DNA میتوکندریایی

کسری احمدیان[1]، قدرت رحیمی میانجی[2]، هادی سیاح زاده[3] و حمید دلدار[4]

۱- مدرس مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، (نویسنده مسوول: kahmadian52@gmail.com)
۲، ۳ و ۴- استاد، دانشیار و استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
تارخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۵

چکیده

در مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنی مرغان بومی ایران، ۳۹ نمونه خون از مرغان بومی مراکز اصلاح نژاد مرغ بومی کشور (اصفهان، مازندران، یزد، فارس، آذربایجان غربی و خراسان) جمع‌آوری گردید. به منظور مقایسه نتایج حاصل با دیگر نژادهای آسیایی، آفریقایی و اروپایی توالی ناحیه D-loop میتوکندری موجود در بانک جهانی ژن دریافت شد. DNA با استفاده از روش نمکی بهینه یافته استخراج و به عنوان الگو برای تکثیر و تعیین توالی ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری به کار برده شدند. با مطالعه توالی ۲- ۱۲۳۱ جفت بازی ناحیه D-Loop در نمونه‌های فوق، ۱۶ هاپلوتایپ به همراه ۱۴ جایگاه متغیر تشخیص داده شد. آنالیز واریانس مولکولی با استفاده از روش کیمورا انجام گرفت. مقادیر شاخص تثبیت با استفاده از روش کیمورا در دامنه‌ای بین ۰/۱۵۷۰- ۰/۳۷۷۶۳ قرار گرفت. میزان واریانس در داخل و بین جمعیت‌های مورد مطالعه به ترتیب برابر با ۸۱/۰۵ و ۱۸/۹۵ درصد برآورد شد. این آزمون نشان داد که در جمعیت‌های مورد مطالعه، جمعیت‌های آذربایجان غربی و اصفهان، اصفهان و فارس، اصفهان و خراسان، اصفهان و مازندران، اصفهان و یزد، فارس و خراسان و هم‌چنین فارس و یزد با یکدیگر از نظر ژنتیکی متفاوت بودند (P<۰/۰۵). از بین جمعیت‌های مورد مطالعه جمعیت اصفهان با تمامی جمعیت‌های دیگر از نظر ژنتیکی تفاوت معنی‌دار داشته است (P<۰/۰۵). به طور کلی نتایج بدست آمده نشان داد که مرغ بومی ایران دارای تنوع ژنتیکی قابل قبول بوده و درخت فیلوژنی ترسیم شده برمبنای هاپلوتایپ‌های حاصله مرغان بومی ایران در دسته هاپلو گروه A (مرغان بومی ژاپن، لکهورن سفید، ردآیلندرد)، هاپلوگروه E (مرغان بومی خاورمیانه و اروپا) و هاپلوگروه C (مرغان بومی آفریقا) قرار گرفتند. هم‌چنین نتایج فیلوژنی مشخص کرد که مرغ بومی ایران همانند مرغ بومی ژاپن، چین، خاورمیانه، اروپا و آفریقا از آسیای جنوب شرقی و هندوستان منشا گرفته و احتمالا از طریق مسیرهای باستانی، از آسیای جنوب شرقی و هندوستان به ایران و از ایران به سمت غرب امتداد یافته و به دنیای غرب معرفی شده است.

واژه‌های کلیدی: مرغ بومی ایران، DNA میتوکندری، فیلوژنی، تنوع ژنتیکی

مقدمه

وجود بیش از یک صد توده ژنتیکی دام و طیور بومی در ایران که با شرایط جغرافیایی خود به خوبی سازگار شده و نسبت به بیماری‌های منطقه‌ای مقاومت نسبی پیدا نموده‌اند، از سرمایه‌های مهم و ملی کشور به شمار می‌آیند (۲۲). انتخاب برای صفات خاص و پیشرفت‌های حاصله در حوزه بیوتکنولوژی[1] تولیدمثل به طور وسیعی نژادهای صنعتی را جایگزین نژادهای بومی که دارای راندمان تولید پایین‌تری هستند نموده و تعداد زیادی از نژادهای بومی را در معرض خطر انقراض قرار داده است. نگرانی از کاهش تنوع ژنتیکی[2] زمینه‌ای را برای پذیرفتن تعهداتی در دهه ۱۹۶۰ به دنبال داشته است مبنی بر این که نژادهایی که در حال انقراض هستند باید حفظ شوند (۱۷). در سال ۱۹۹۵ اعضای سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO)[3] تصمیم گرفتند تا بانک اطلاعات جهانی[4] برای منابع ژنتیکی حیوانات مزرعه‌ای و سیستم تنوع ژنتیکی برای حیوانات اهلی[5] را ایجاد نمایند. اطلاعات این بانک جهانی به منظور ایجاد فهرست گسترده‌ی قابل دستیابی از منابع ژنتیکی بوده و به عنوان لیست محافظت جهانی از تنوع حیوانات اهلی[6] شناخته شده است (۱۹). در این بانک جهانی، بر اساس شناخت از جمعیت‌ها و اطلاعات مرتبط با آنها نژادها را مطابق با شرایط اضطرار به چهار دسته شامل: ۱) منقرض شده[7] ۲) در شرایط بحرانی[8] ۳) در معرض خطر[9] ۴) دور از خطر و امن[10] تقسیم‌بندی نمودند (۲۵،۵).

تنوع ژنتیکی برای تمام موجودات زنده که در کره زمین زندگی می‌کنند از اهمیت بالایی برخوردار است. به طور کلی میزان تنوع ژنتیکی استراتژی گزینش را تعیین می‌کند. اگر گوناگونی ژنتیکی از میان برود، تفاوت‌های ناشی از عملکردهای محیطی به نسل بعدی انتقال نمی یابد. از این رو یک متخصص اصلاح نژاد برای دست یابی به عملکرد تجاری شایسته و باقی ماندن در میدان رقابت باید به حفظ تنوع ژنی، توجه فراوانی داشته باشد و بر این اساس کارهای اصلاحی خود را برنامه‌ریزی کند. سازگاری بهتر یک جمعیت نسبت به تغییرات شرایط محیطی، سبب بزرگتر شدن خزانه ژنی این جمعیت‌ها خواهد شد. در نتیجه، انتخاب طولانی مدت و هدف‌دار مخصوصا درون جمعیت کوچک، ممکن است خزانه ژنی کاهش قابل توجهی یابد و این امر سبب کاهش سازگاری شود (۲۰). یکی از راه‌های تعیین تفاوت بین جمعیت‌ها، برآورد فاصله ژنتیکی آنها بر مبنای نشانگرهای ژنتیکی است که مهم‌ترین آنها شامل نشان‌گرهای AFLP[11]، SNP[12] و بررسی

1- Biotechnology 2- Genetic diversity 3- Food and Agriculture Organization 4- Global Data Bank
5- Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS) 6- World Watch List for Domestic Animal Diversity (WWL-DAD)
7- Extinct 8- Critical 9- Endangered 10- Not at Risk
11- Ampilified Fragment Length 12- Singel Nucleotide Polymorphism

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-11]
[DOI: 10.29252/rap.8.17.140]

ژنوم میتوکندریایی[1] است. چندشکلی[2] DNA میتوکندریایی به طور وسیعی در فیلوژنتیک[3] و ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده می‌شود. از مشخصه‌های مهم DNA میتوکندریایی هاپلوئید بودن[4]، داشتن توارث مادری، دارا بودن نرخ جهش بالا در مقایسه با DNA هسته‌ای و هم‌چنین فقدان نوترکیبی است (۲۴،۲). این مشخصه‌ها آن را به یک نشان‌گر ایده‌آل برای ارزیابی ارتباطات بین گونه‌ای و درون گونه‌ای ساخته است. ناحیه D-Loop از mtDNA[5] برای شناسایی اجداد وحشی حیوانات اهلی، تنوع ژنتیکی و فرایند اهلی شدن دام‌ها استفاده می‌شود (۱). هاگ و همکاران (۸) با استفاده از توالی ناحیه D-Loop، DNA میتوکندریایی به همراه ژن کمپلکس بافت سازگار اصلی (MHC)[6]، تنوع ژنتیکی را در مرغ بومی کره ارزیابی کردند. ناحیه D-Loop از mtDNA هم‌چنین برای برآورد خویشاوندی ژنتیکی بین جمعیت‌های آسیایی (۱۷ جمعیت)، جنوب شرقی اروپا (۲۰ جمعیت) و شمال مرکزی اروپا (۲۵ جمعیت) با تجزیه و تحلیل روی ۶۴۰ پرنده مورد استفاده قرار گرفته است. ارزیابی چندشکلی mtDNA در جمعیت‌های مرغ مطالعه شده، نشان داد که بیشترین جمعیت‌های اروپایی متعلق به یک گروه از mtDNA هستند که ممکن است از هندوستان منشاءگرفته باشند (۲۵). ارزیابی توالی‌های ناحیه کنترل mtDNA نشان داد که نژادهای مرغ بومی دارای سطوح مختلفی از تنوع ژنتیکی هستند. در جمعیت مرغان زیمباوه و هندوستان مقدار تنوع ژنتیکی، متوسط (۱۸،۱۴) اما در جمعیت مرغان ژاپنی، چینی و چندین نژاد مرغ بومی آفریقا مقدار تنوع پایین گزارش شده است (۱۶،۱۵،۱۴). در مطالعه‌ای توالی ناحیه D-loop میتوکندری به طول ۲-۱۲۳۱ جفت‌باز در ۲۰ نژاد مرغ بومی ژاپنی و همچنین لگهورن سفیدف ردآیلند رد و مرغ‌های بومی اندونزیایی روابط فیلوژنتیک و منشا آنها مورد بررسی قرار گرفت که ۴۲ هاپلوتایپ و هفت هاپلو گروه (-A) تشخیص داده شد (۱۶). موچادی و همکاران (۱۴) روی ۲۸۳ قطعه مرغ بومی از ۱۴ جمعیت و از ۵ ناحیه زیمباوه به منظور شناسایی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت و مقایسه آنها با جمعیت‌هایی از دیگر مناطق جغرافیایی (مالاوی، آلمان) و دیگر سویه‌ها (طیور گوشتی، طیور تخم‌گذار) تحقیقی انجام دادند. همه پنج نژاد بومی زیمباوه در هاپلوگروه A و C قرارگرفتند. هاپلوگروه C شامل مرغان بومی زیمباوه سودان و شمال غرب اروپا است که شبیه با هاپلوگروه A اکا و همکاران (۱۶) بوده است که از آسیای جنوب شرقی منشا گرفته که احتمالا ابتدا در شبه جزیره هند تکثیر و سپس به دیگر نقاط پراکنده شدند (۱۴). ویژگی‌های مولکولی جمعیت‌های مختلف ممکن است نقش اصلی را در برآورد تنوع، توصیف و ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت ایفا نمایند. هم‌چنین می‌تواند در مدیریت ژنتیکی جمعیت‌های کوچک به منظور محدود نمودن اثرات بیش از اندازه همخونی، مفید واقع شود. آگاهی از تنوع ژنتیکی و فاصله بین جمعیت‌های مختلف برای برنامه‌های محافظتی برای نژادهای در معرض خطر ضروری است. در پژوهش حاضر با استفاده از ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری، شش جمعیت مختلف مرغ بومی ایران و دیگر جمعیت‌های مناطق مختلف جهان، از نظر تنوع و ساختار ژنتیکی و ارتباط فیلوژنتیکی آنها مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و استخراج توالی از بانک ژن

از هر یک از جمعیت‌های مرغ بومی موجود در۶ ایستگاه تحقیقاتی اصلاح نژاد مرغ بومی کشور (اصفهان ۸ نمونه، یزد ۶ نمونه، آذربایجان غربی ۶ نمونه، خراسان ۶ نمونه، مازندران ۷ نمونه، فارس ۶ نمونه) در مجموع تعداد ۳۹ نمونه به صورت تصادفی انتخاب و نمونه خون تهیه شد. DNA با استفاده از روش نمکی بهینه یافته (۱۳)[7] از نمونه خون‌های جمع‌آوری شده استخراج شد و برای تکثیر ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری مورد استفاده قرار گرفت. برای مقایسه توالی‌های به دست آمده (شماره دسترسی kj399461-kj399476) با جمعیت‌های مرغ اهلی موجود در نواحی دیگر نقاط کره زمین، از سه هاپلوگروه[8] مربوط به مرغ بومی آفریقا و شمال غرب اروپا موچادی و همکاران (۱۴)، هفت هاپلوگروه شامل جمعیت‌های مرغ بومی ژاپن و چند نژاد تجاری اوکا و همکاران (۱۶) و نه هاپلوگروه شامل مرغ اهلی چین و یوراسیا خاورمیانه، هند، اندونزی و مالزی لیو و همکاران (۱۲) بود از بانک اطلاعات ژن[9] دریافت و مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

1- Mitochondrial DNA
2- Polymorphism
3- Phylogenetic
4- Hoploid
5- Mitochondrial DNA
5- Major Histocompatibility Complex
7- Modified Salting out
8- Haplogroup
9- National Center for Biotechnology Information (NCBI)

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/rap.8.17.140]

جدول ۱– نام هاپلوتایپ حاصل از ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری و شماره دسترسی آنها در پایگاه NCBI
Table 1. Thehaplotype names resulted from D-loop of mtDNA and their accession numbers at NCBI

هاپلوتایپ	شماره دسترسی	منبع
H1-H16	Kj399461-76	مطالعه حاضر
OkaA1	AB268506	۱۶
Oka A2	AB268507	۱۶
OkaA3	AB268508	۱۶
OkaA4	AB268509	۱۶
OkaA5	AB268510	۱۶
OkaA6	AB268511	۱۶
OkaA7	AB268512	۱۶
OkaA8	AB268513	۱۶
OkaA9	AB268514	۱۶
OkaA10	AB268515	۱۶
Oka B1	AB268516	۱۶
OkaC1	AB268522	۱۶
OkaD1	AB268530	۱۶
OkaE1	AB268539	۱۶
OkaF1	AB268543	۱۶
Okag1	AB268545	۱۶
LiuA1	AB114069	۱۲
LiuB1	AB007744	۱۲
LiuC1	AB114070	۱۲
LiuD1	AY588636	۱۲
LiuE1	AB114076	۱۲
LiuF1	AF512285	۱۲
LiuG1	AF512288	۱۲
LiuH1	D82904	۱۲
LiuI1	AB009434	۱۲
MuchadeyiA1	AM746024	۱۴
MuchadeyiB1	AM746033	۱۴
MuchadeyiB4	AM746036	۱۴
MuchadeyiC3	AM746042	۱۴

انتخاب آغازگر، انجام واکنش PCR و خالص‌سازی محصولات PCR

جهت تکثیر یک قطعه ۲–۱۲۳۱ جفت بازی ناحیه D-Loop از ژنوم میتوکندری از یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی رفت[1] '5'–AGGACTACGGCTTGAAAAGC-3 و برگشت[2] '5-CATCTTGGCATCTTCAGTGCC-3' استفاده شد (۱۶). واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ترکیبات ۱۷/۱ میکرولیتر آب استریل دوبار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر پی سی آر ۱/۲،10x میکرولیتر ۵۰Mgcl2 میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، هر یک از آغازگرها۱۰ پیکومول، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلی مراز ۵۰۰ واحد، DNA ۵۰ نانوگرم انجام گرفت. پروتکل حراراتی شامل ۳ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد،۳۰ سیکل شامل واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه برای ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۲ به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. بعد از تکثیر تمامی محصولات PCR به دست آمده با استفاده از کیت QIAGEN مطابق دستورالعمل شرکت سازنده محصولات پی سی آر خالص‌سازی شدند. سپس، تمامی نمونه‌ها به شرکت فزاپژوه و از طریق این شرکت برای تعیین توالی به کشور کره (کمپانی بایونیر) ارسال شدند.

بررسی تنوع موجود در توالی‌های به دست آمده

با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (۶) تمامی توالی‌های بدست آمده در مطالعه حاضر ویرایش شده و قطعاتی به طول ۱۲۳۱ تا ۱۲۳۲ جفت باز به دست آمد. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLUSTULW (۲۳) توسط توالی مرجع مرتب شده و جایگاه‌های حذف و اضافه و انواع جهش‌های به وقوع پیوسته شناسایی شدند. مقادیر تنوع هاپلوتایپ[3] (h) و نوکلئوتید (π) با استفاده از نرم‌افزار DNAsp5.10 (۱۱) محاسبه شد.

ترسیم درخت فیلوژنی

جهت ترسیم درخت فیلوژنی و بررسی ارتباط هاپلوتایپ‌های به دست آمده در این مطالعه با هفت هاپلوتایپ اصلی (A-G) اوکا و همکاران (۱۶)، نه هاپلوتایپ (A-I) لیو و همکاران (۱۲) و سه هاپلوتایپ موچادی و همکاران (۱۴) (جدول ۱) از نرم‌افزار MEGA4 (۲۱) به روش Neighbour-joining با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری مجدد برای هاپلوتایپ‌های مطالعه حاضر و توالی‌های به دست آمده از بانک ژن استفاده شد.

1- Forwar 2- Reverse 3- Haplotype

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/rap.8.17.140]

بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها

به منظور ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه و مقایسه آنها با یکدیگر، جدول تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)[1] و هم‌چنین مقادیر شاخص تثبیت[2] با استفاده از رابطه (۱) توسط نرم‌افزار ARLEQUIN 3.1 (۵) و به روش کیموراً[3] (۱۰) مورد برآورد قرار گرفت. کاهش در سطح هتروزیگوتی جمعیت‌ها و زیر جمعیت‌ها معمولا توسط شاخصی به نام آماره‌ی F رایت[4] که به شاخص تثبیت نیز مشهور است، اندازه‌گیری می‌شود. آماره F شاخص اندازه‌گیری تفاوت بین میانگین سطح هتروزیگوتی جمعیت‌ها و یا زیر جمعیت‌ها با سطح هتروزیگوتی جمعیت پایه با تلاقی تصادفی است (۷).

رابطه (۱) $$FST = \Phi ST = \frac{\delta_a^2}{\delta_T^2}$$

در رابطه فوق δ_a^2 واریانس بین جمعیت‌ها و δ_T^2 واریانس کل می‌باشد که از جدول آنالیز واریانس مولکولی بدست می‌آیند.

نتایج و بحث

مقایسه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه

جدول واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که بیشترین مقدار واریانس برآورد شده به واریانس درون جمعیت‌های مورد مطالعه (۸۱/۰۵) تعلق دارد (جدول ۲). آنالیز نتایج نشان داد که واریانس بین جمعیت‌های مورد بررسی دارای تفات معنی‌دار بوده است (ΦST = ۰/۱۸۹۵۲ و P=۰/۰۰۰). با توجه به معنی‌دار بودن این تفاوت، مقادیر شاخص تثبیت (ΦST) بین جفت جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از روش کیمورا (۱۰) برآورد شدند (جدول ۳). مقادیر ΦST با استفاده از این روش در دامنه‌ای بین ۰/۰۱۵۷۰- (بین جمعیت یزد و مازندران) تا۰/۳۷۷۶۳ (بین جمعیت فارس و اصفهان) به دست آمد. مقادیر ΦST با سطوح معنی‌دار مختلف نشان دادکه در جمعیت‌های مورد مطالعه، جمعیت‌های آذربایجان غربی و اصفهان، اصفهان و فارس، اصفهان و خراسان، اصفهان و مازندران، اصفهان و یزد، فارس و خراسان و هم‌چنین فارس و یزد با یکدیگر از نظر ژنتیکی متفاوت بوده و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). از بین جمعیت‌های مورد مطالعه جمعیت اصفهان با تمامی جمعیت‌های دیگر از نظر ژنتیکی تفاوت معنی دار داشته است (P<۰/۰۵). نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج پژوهش انجام شده توسط شهبازی و همکاران (۲۰) که تنوع ژنتیکی در پنج جمعیت مرغ بومی مراکز اصلاح نژاد (یزد، مازندران، اصفهان، فارس، آذربایجان غربی) را با استفاده از ۵ نشانگر ریزماهواره برآورد کردند مطابقت داشته است. به طوری که این محققین نیز از نظر ژنتیکی تفاوت معنی‌داری را برای جمعیت اصفهان نسبت به چهار جمعیت دیگر (مازندران، یزد، آذربایجان غربی و فارس) گزارش کردند. در این مطالعه، آنالیز واریانس مولکولی با استفاده از روش Kimura-2 parameter اختلاف معنی‌داری را بین جمعیت‌ها مشخص نمود (جدول ۲).

جدول ۲- برآورد واریانس ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) به روش کیمورا
Table 2. Estimation of genetic variance for within and between studied population using analysis of molecular variance (AMOVA) based on Kimura methode

منبع واریانس	آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) جمعیت‌ها	
	بین جمعیت‌ها	درون جمعیت‌ها
درجهٔ آزادی	۵	۳۳
درصد واریانس	۱۸/۹۵	۸۱/۰۵

پایین بودن تعداد جمعیت اولیه و نیز به کارگیری استراتژی یکسان انتخاب در این ایستگاه‌ها احتمالا موجب افزایش تشابه ژنتیکی درون جمعیتی شده است. بنابراین درصورتی که جمعیت‌های موجود در این ایستگاه‌ها تنها نمونه‌هایی باشند که از این جمعیت‌ها باقی مانده باشند باید با دقت هرچه بیشتر و دقیق تر دائما مورد ارزیابی ژنتیکی جمعیتی قرار گرفته تا حتی‌الامکان تنوع ژنتیکی موجود در این جمعیت‌ها در حد قابل قبولی حفظ شود.

جدول ۳- برآورد مقادیر شاخص تثبیت (ΦST) در جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از روش کیمورا
Table 3. Estimation of fixation index values in studied population based on kimura method

جمعیت	آذربایجان غربی	اصفهان	فارس	خراسان	مازندران
اصفهان	۰/۲۱۹۷۸[a]				
فارس	۰/۳۰۰۹۰	۰/۳۷۷۶۳[b]			
خراسان	۰/۰۹۰۷۴	۰/۲۴۰۱۲[c]	۰/۲۵۹۱۰[f]		
مازندران	-۰/۰۰۹۰۳	۰/۱۷۵۲۸[d]	۰/۲۳۱۶۱	-۰/۰۱۴۵۲	
یزد	۰/۰۰۰۲۴	۰/۲۴۵۲۶[e]	۰/۳۴۳۴۹[g]	۰/۱۳۴۵۹	-۰/۰۱۵۷۰

[a] P-value = ۰/۰۴۱۹۹، [b] P-value = ۰/۰۰۱۹۵، [c] P-value =۰/۰۱۲۷۰، [d] P-value = ۰/۰۳۸۰۹، [e] P-value = ۰/۰۴۱۹۹، [f] P-value = ۰/۰۴۱۰۲، [g] P-value = ۰/۰۴۰۰۴

1- Analysis of Molecular Variance (AMOVA)
2- Fixation index (FST or ΦST)
3- Kimura-2-parameter
4- Wright´s F statistics

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-11]
[DOI: 10.29252/rap.8.17.140]

تنوع موجود در توالی‌ها

با بررسی قطعه ۲-۱۲۳۱ جفت بازی (شماره دسترسی kj399461-76) در ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری مرغ‌های بومی ایران ۱۴ جایگاه نوکلئوتیدی متغیر و ۱۶ هاپلوتایپ به دست آمد. از بین ۱۴ جایگاه متغیر در ۱۳ جایگاه، جانشینی[1] با فراوانی ۰/۸ رخ داده بود (جدول ۵). هاپلوتایپ ۳ با بیشترین فراوانی به میزان ۳۰/۷ درصد برآورد شد که شامل جمعیت‌های فارس، اصفهان، یزد، آذربایجان و خراسان می‌باشد. دومین هاپلوتایپ، هاپلوتایپ ۱ با فراوانی ۲۵/۶ درصد شامل تمام جمعیت‌ها بوده است. هاپلوتایپ‌ها و جمعیت مربوط به آنها در جدول ۶ نشان داده شد.

مقادیر تنوع هاپلوتیپی دارای دامنه ای بین ۰/۲۱۵±۰/۳۳۳ در مرغان بومی یزد تا ۰/۱۸۱±۰/۷۱۴ در مرغان بومی مازندران بود. مقادیر تنوع نوکلئوتیدی دارای دامنه‌ای بین ۰/۰۰۰۳۶±۰/۰۰۰۲۷ در مرغان بومی یزد تا ۰/۰۰۰۸±۰/۰۰۱۸۴ در مرغان بومی خراسان بوده است.

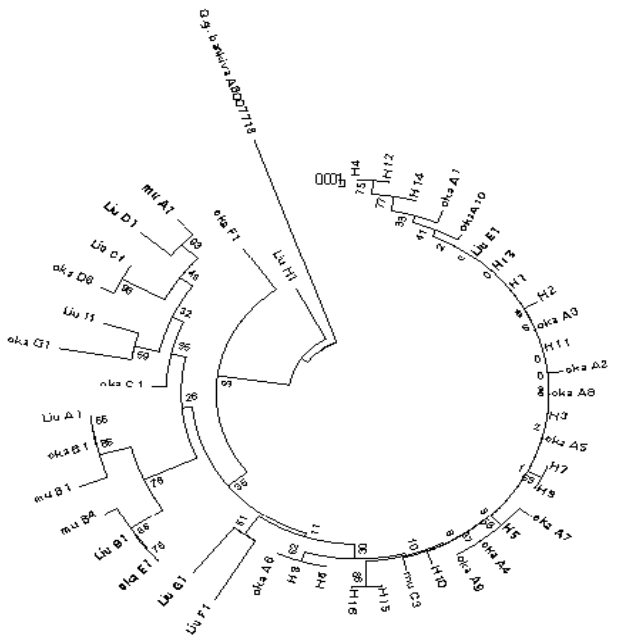
آنالیزهای فیلوژنی

درخت فیلوژنی جهت نشان دادن ارتباط میان هاپلوتایپ‌های بدست آمده مرغ بومی ایران با هاپلوتایپ‌های به دست آمده از بانک اطلاعات ژنوم ترسیم شد (شکل ۱).

جدول ۴- تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت‌های مختلف مرغ بومی ایران

Table 4. Haplotype diversity and nucleotide diversity using mitochondrial D-loop sequence for Iranian native chicken populations

جمعیت	منطقه جغرافیایی	تنوع هاپلوتایپی	تنوع نوکلئوتیدی
اصفهان	اصفهان، کهگیلویه و بویراحمد	۰/۱۲۳± ۰/۷۱۴	۰/۰۰۰۴۴ ±۰/۰۰۰۸۱
یزد	یزد	۰/۲۱۵ ± ۰/۳۳۳	۰/۰۰۰۳۶ ± ۰/۰۰۰۲۷
آذربایجان غربی	آذربایجان غربی، شرقی	۰/۲۱۵ ± ۰/۶	۰/۰۰۰۵ ± ۰/۰۰۰۵۴
خراسان	خراسان رضوی، شمالی، جنوبی	۰/۱۲۵ ± ۰/۶	۰/۰۰۰۸ ± ۰/۰۰۱۸۴
مازندران	مازندران، گلستان، سمنان	۰/۱۸۱ ± ۰/۷۱۴	۰/۰۰۰۷۴ ± ۰/۰۰۱۱۶
فارس	فارس	۰/۱۲۹ ± ۰/۶	۰/۰۰۰۵ ± ۰/۰۰۰۹۷



شکل ۱- درخت فیلوژنی ترسیم شده با روش Neighbour –joining ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری از هاپلوتایپ‌های به دست آمده در این مطالعه و توالی‌های لیو و همکاران (۱۲)، اوکا و همکاران (۱۶) و موچادی و همکاران (۱۴)

Figure 1. Neighbor-joining (NJ) tree constructed from mtDNA haplotype sequences obtained in this study and Liu et al. (12) , Oka et al. (16) and Mvchady et al. (14)

1- Transition

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/rap.8.17.140]

جدول ۵- جایگاه‌های متغیر شناسایی شده در توالی D-loop(1231bp-2)ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی ایران در مقایسه با توالی موجود در NCBI با شماره دسترسی AP003317

Table 5. The identified variable site in mitochondrial D-loop sequence (1231-2 bp) of Iranian native population compared with NCBI sequence with AP003317 accession number

Variable nucleotide position																		
شماره شناسایی بانک ژن	هاپلوتایپ ها	۱۹۹	۲۲۲	۲۴۶	۲۴۹	۲۵۴	۲۶۱	۳۱۰	۳۱۳	۳۵۵	۳۹۱	۴۱۷	۶۸۶	۸۵۹	۹۶۵			
AP003317		T	A	C	A	T	T	T	C	T	C	C	G	–	G	n	فراوانی نسبی	
	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	۱۰	۰/۲۵۶	
	H2	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	۱	۰/۰۲۵۶	
	H3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	۱۲	۰/۳۰۷	
	H4	.	G	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	۱	۰/۰۲۵۶	
	H5	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	۱	۰/۰۲۵۶	
	H6	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	۳	۰/۰۷۶۹	
	H7	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	۱	۰/۰۲۵۶	
	H8	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	۱	۰/۰۲۵۶	
	H9	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	۱	۰/۰۲۵۶	
	H10	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	۱	۰/۰۲۵۶	
	H11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	۱	۰/۰۲۵۶	
	H12	.	G	.	G	.	.	C	.	C	.	.	A	.	.	۱	۰/۰۲۵۶	
	H13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	۱	۰/۰۲۵۶	
	H14	.	G	.	G	.	.	.	.	C	.	.	.	C	.	۱	۰/۰۲۵۶	
	H15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	۲	۰/۰۵۱۳	
	H16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	C	.	۱	۰/۰۲۵۶	

هر یک از هاپلوتایپ‌های به دست آمده با هفت هاپلوگروه (A-G) اوکا و همکاران (۱۶) و سه هاپلوگروه (A-C) موچادی و همکاران (۱۴) و ۹ هاپلوگروه (A-H)، لیو و همکاران (۱۲) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تمام ۱۶ هاپلوتایپ به دست آمده برای مرغان بومی ایران در دسته هاپلوگروه A اوکا و همکاران (۱۶) قرار گرفتند. این هاپلوگروه شامل مرغ بومی ژاپن (Gifu-Jidori،Shokoku) و نژادهای وابسته به آنها، لگهورن سفید و ردآیلندرد می‌باشند. اوکا و همکاران (۱۶) اشاره کردند که این هاپلوگروه ابتدا در آسیای جنوب شرقی و شبه قاره هند اهلی شدند و سپس از طریق چین به ژاپن و اروپا پراکنده شدند.

جدول۶- انواع هاپلوتایپ‌های مشاهده شده درجمعیت‌های مورد مطالعه به همراه شماره دسترسی آنها در پایگاه NCBI

Table 6. Type of Haplotype observed in the studied population with accession numbers at NCBI

هاپلوتایپ	جمعیت (تعداد نمونه)	شماره دسترسی بانک جهانی ژن
H1	فارس(۱)*-اصفهان(۱)-مازندران(۴)-خراسان(۲)-آذربایجان غربی(۲)	kj399461
H2	آذربایجان غربی(۱)	kj399462
H3	فارس(۲)- اصفهان(۱)-یزد(۵)- خراسان(۲)- آذربایجان غربی(۲)	kj399463
H4	خراسان(۱)	kj399464
H5	مازندران(۱)	kj399465
H6	اصفهان(۳)	kj399466
H7	اصفهان(۱)	kj399467
H8	اصفهان(۱)	kj399468
H9	اصفهان(۱)	kj399469
H10	یزد(۱)	kj399470
H11	آذربایجان غربی(۱)	kj399471
H12	خراسان(۱)	kj399472
H13	مازندران(۱)	kj399473
H14	مازندران(۱)	kj399474
H15	فارس(۲)	kj399475
H16	فارس(۱)	kj399476

*: تعداد نمونه مرغ هر جمعیت مربوط به هر هاپلوتایپ

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/rap.8.17.140]

لیو و همکاران (۱۲) با بررسی مرغ بومی مناطق وسیعی از چین، یوراسیا، خاورمیانه (ایران، آذربایجان، ترکمنستان) هندوستان، اندونزی، مالزی، اروپا، آن‌ها را به ۹ هاپلوگروه (A-I) تقسیم کردند. با ترسیم درخت فیلوژنی، این ۹ هاپلوگروه به طور کاملا مشخص از گالوس گالوس بانکیوا[1] از جاوا[2] اندونزی جدا شده به طوری که هاپلوگروه A-I را گروه قاره‌ای[3] و گالوس گالوس بانکیوا را گروه جزیره‌ای[4] نامیدند. گروه قاره‌ای مرغان اهلی و زیرگونه‌های مرغ جنگلی قرمز را شامل می‌شد. فاصله میان دو گروه (قاره‌ای و جزیره‌ای) بیشتر از فاصله بین هاپلوگروه‌های (A-I) در درون گروه قاره ای بوده است. با توجه به درخت ترسیم شده (شکل ۱) نتایج پژوهش حاضر با پژوهش لیو و همکاران (۱۲) مطابقت دارد به طوری که مرغان بومی ایران هم به طور مشخص به همراه دیگر مرغان اهلی از گالوس گالوس بانکیوا جدا شده‌اند. هاپلوگروه E، در مطالعه لیو و همکاران (۱۲) شامل مرغان بومی خاورمیانه و اروپا بوده است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که هاپلوتایپ‌های مرغان بومی ایران در این هاپلوگروه قرار گرفتند. لیو و همکاران (۱۲) اشاره کردند که این هاپلوگروه (E) از شبه قاره هند و آسیای جنوب شرقی منشاء گرفته و سپس به مناطق دیگر پراکنده شده اند. الخیاط و همکاران (۳) با بررسی D-loop میتوکندری ۳۶ قطعه از مرغ بومی مصر ۵ هاپلوتایپ بدست آوردند که با هاپلوتایپ‌های E1، لیو و همکاران (۱۲) و C3، موچادی و همکاران (۱۴) هم گروه شدند و گزارش کردند که که مرغ بومی مصر ریشه در آسیای جنوب شرقی و شبه جزیره هندوستان دارد. بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲۹ مرغ بومی لائوس و مقایسه آنها با هاپلوتایپ های لیو و همکاران (۱۲)، اوکا و همکاران (۱۶)، ۲۹ هاپلوتایپ و پنج هاپلوگروه بدست آمد و نشان دادند که مرغ بومی لائوس از آسیای جنوب شرقی و چین منشا گرفته است (۹). هاپلوتایپ‌های مرغ بومی ایران با هاپلوتایپ (C3) در مطالعه موچادی و همکاران (۱۴) نیز هم گروه بوده است. موچادی و همکاران (۱۴) با بررسی مرغ‌های زیمباوه، سودان، مالاوی، مرغ محلی شمال غرب اروپا و شش نژاد خالص تجاری، ۳ هاپلوگروه (A-C) به دست آوردند که هاپلوتایپ C3 با بیشترین فراوانی از هاپلوگروه C که شامل زیمباوه، سودان، مرغ محلی شمال غرب اروپا و شش نژاد خالص تجاری است را شامل می‌شد. موچادی و همکاران (۱۴) اشاره کردند که این هاپلوگروه (C) همانند هاپلو گروه (A)، در مطالعه اوکا و همکاران (۱۶) و هاپلوگروه (E)، در مطالعه لیو و همکاران (۱۲) از شبه قاره هند و آسیای جنوب شرقی منشاء گرفته و سپس به مناطق دیگری پراکنده شده‌اند. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهدکه احتمالا خط مادری مرغ‌های بومی ایران ریشه در مناطق آسیای جنوب شرقی و شبه جزیره هند دارد (شکل ۱).

در کشورهای در حال توسعه طیور بومی به عنوان سرمایه‌ای ملی به شمار می‌رود و ارزیابی دقیق این گونه منابع ژنتیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که جمعیت مرغ بومی اصفهان با تمامی جمعیت‌های مورد بررسی فاصله ژنتیکی معنی‌داری دارد. البته در بین جمعیت‌های دیگر نیز این تفاوت ژنتیکی مشاهده شده است. یکی از دلایل عمده مرتبط به این تفاوت‌های ژنتیکی می‌تواند فاصله جغرافیایی فی ما بین این جمعیت‌ها، اندازه این جمعیت‌ها در مراکز پرورشی، اندازه جمعیت موثر در شکل‌گیری این جمعیت‌ها و نیز تفاوت در شدت انتخاب در بین جمعیت‌های ایستگاه‌های مختلف باشد. در خصوص چگونگی گسترش جمعیت مرغ در جهان، شواهد باستان شناسی و سنگ واره های به دست آمده از نواحی آسیای جنوب شرقی، این ناحیه را به عنوان نخستین مکان اهلی شدن مرغ اهلی بیان می کنند. این در حالی است که اطلاعات ژنتیکی به دست آمده از تحقیقات مختلف در دیگر کشورها از جمله داده‌های حاصل از پژوهش حاضر نیز موید این فرضیه هم می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که مرغان اهلی امروزی از جمعیت مرغان اجدادی خود واقع در ناحیه آسیای جنوب شرقی منشا گرفته و از این نقطه به دیگر نقاط جهان از جمله ایران پراکنده شدند. در ادامه از آن جایی که ایران نیز در مسیرهای باستانی قرار گرفته بود (جاده ابریشم)، نقش عمده‌ای را در پراکنده شدن آن به دیگر نقاط جهان از جمله غرب، بر عهده داشته است.

تشکر و قدردانی

از معاونت بهبود تولیدات دامی وزارت جهادکشاورزی و ایستگاه‌های پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی کشور جهت فراهم نمودن نمونه‌های این پژوهش، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

1- Gallus gallusbankiva 2- Java 3- Continental clade 4- Island clade

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/rap.8.17.140]

منابع

1. Bruford, M.W., D.G. Bradley and G. Luikart. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication .Nature Reviews Genetics, 4: 900-910.
2. Coble, M.D., R.S. Just, J.E. O'Callaghan, I.H. Letmanyi, C.T. Peterson, J.A. Irwin and T.J. Parsons. 2004. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increases the power of forensic testing in Caucasians. International journal of Legal Medicine, 118(3): 137-146.
3. Elkhaiat I., K. Kawabe, K. Saleh, H. Younis, R. Nofal, S. Masuda, T. Shimogiri and S Okamoto. 2014. Genetic diversity analysis of Egyptian native chickens using mtDNA D-loop region. The Journal of Poultry Science, 51: 359-363.
4. Excoffier L., G. Laval and S. Schneider. 2006. ARLEQUIN: An integrated Software package for Population Genetic (Version 3.1). Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Berne, Baltzerstrasse, Switzerland.
5. FAO 2007. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. Rome (Italy) (http://www.fao.org/docrep/010/a1250e/a1250e00.htm).
6. Hall, T.A.1999. BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98NT. Nucleic Acids Symposium Series, 4: 95-98.
7. Hartl, D.L. and A.G. Clark. 1997. Principles of population Genetics. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA. 542 pp.
8. Hoque, R., C.J. Kie, K. Bo-Seok, L. Hee-Kyong, Ch. Kang-Duk and L. Jun-Heon. 2010. Breed discrimination in chicken using mitochondrial DNA sequence and MHC polymorphisms Proceedings of the 32nd International Conference on Animal Genetics, 76 pp, Edinburgh, Scotland (UK).
9. Kawabe, K., R. Worawut, S. Taura, T. Shimogiri, T. Nishida and S. Okamoto. 2014. Genetic diversity of mtDNA D-loop polymorphisms in Laotian native fowl populations. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 27(1): 19-23.
10. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16: 111-120.
11. Librado, P. and J. Rozas. 2009. DNASP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25: 1451-1452.
12. Liu, P., G.S. Wu, Y.G. Yao, Y.W. Miao, G. Luikart, M. Baig, A. Beja-Pereira, Z.L. Ding, M.G. Palanichamy and Y.P. Zhang. 2006. Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungles. Molecular Phylogenetics and Evolution, 38:12-19.
13. Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky.1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16(3): 1215.
14. Muchadeyi, F.C., H. Eding, H. Simianer, C.B.A. Wollny, E. Groeneveld and S. Weigend. 2008. Mitochondrial DNA D-loop sequences suggest a Southeast Asian and Indian origin of Zimbabwean village chickens. Animal Genetics, 39: 615-622.
15. Niu. D., Y. Fu, J. Luo, H. Ruan, X.P. Yu, G. Chen and Y.P. Zhang. 2002. The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breeds. Biochem Genet, 40: 163-174.
16. Oka, T., Y. Ino, K. Nomura, S. Kawashima, T. Kuwayama, H. Hanada, T. Amano, M Takada, N. Takahata, Y. Hayashi and F. Akishinonomiya. 2007. Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. Animal Genetics, 38: 287-293
17. Olivier, L. 1998. Guest editorial. Livestock Production Science, 54: 67-70.
18. Pirany, N., M.N. Romanov, S.P. Ganpule, G. Dewagowda and D.T. Prasad. 2007. Microsatellite analysis of genetic diversity in Indian chicken population. Journal of Poultry Science, 44: 19-28.
19. Scherf, B.D. 2000. World Watch List for Domestic Animal Diversity, 3rd edn, FAO, Rome (Italy), 726 pp.
20. Shahbazi, S., S.Z. Mirhosseini and M.N. Romanov. 2007. Genetic diversity in five Iranian native chicken populations estimated by microsatellite markers. Biochemical Genetics, 45: 63-75 (In Persian).
21. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596-1599.
22. Tavakolian, J. 1999. A look at livestock and chicken genetic pool of Iran. Animal research Institute of Iran, (In Persian).
23. Thompson, H.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680.
24. Vallone, P.M., R.S. Just, M.D. Coble, J.M. Butler and T.J. Parsons 2004. A multiplex allele specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. International journal of Legal Medicine, 118: 147-157.
25. Weigend, S. and M.N. Romanov. 2002. The World Watch List for Domestic Animal Diversity in the context of conservation and utilization of poultry biodiversity. The worlds Poultry Science Journal, 58 (4): 411-430.
26. Weigend, S., L.F. Groeneveld and H. Eding. 2010. Mitochondrial DNA D-loop sequence variation among clusters of diverse chicken populations. Proceedings of the 32nd International Conference on Animal Genetics, pp: 77-79, Edinburgh, Scotland (UK).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/rap.8.17.140]

Assessment of Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship of Iranian Indigenous Chickens Based on Mitochondrial D-Loop Sequences

Kasra Ahmadian[1], Ghodrat Rahimi Mianji[2], Hadi Sayahzadeh[3] and Hamid Deldar[4]

1- Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center
(Corresponding author: kahmadian52@gmail.com)
2, 3 and 4- Professor Associate Professor and Assistant Professor Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
Received: 6 January 2016 Accepted: 25 Jun 2016

Abstract

In the present study for evaluation of genetic variability within and between Iranian native fowls, thirty nine blood samples were randomly collected from native fowls breeding stations of west Azarbayjan, Khorasan, Fars, Mazandaran, Yazd and Esfahan provinces. Inorder to compare the obtained results with other Asian, African and European breeds the D-loop sequences of mtDNA taken from GenBank. Total DNA of the samples was extracted by salting out procedure and was used as a template for amplification and sequencing of D-loop region of mtDNA. Sequence analysis of the 1231-2 bp D-loop region in all samples revealed a total of 16 haplotypes with 14 polymorphic sites. Analysis of molecular variance (AMOVA) was carried out based on Kimura method .The Fixation index values using kimura-2 parameter method ranged from -0.157 to 0.37763. The variation within and between the populations was estimate as (81.05 and 18.95, respectively). The genetic distance between Esfahan and West Azarbayejan, Esfahan and Fars, Esfahan and Khorasan, Esfahan and Mazandaran, Esfahan and Yazd, Fars and khorasan, Fars and Yazd populations were significantly different ($p<0/05$). The genetic distance was statistically significant ($P<0.05$) between Esfahan and all other populations. The result obtained in the present study showed an acceptable genetic variation in Iranian native chicken and according to the phylogenic tree, based on obtained haplotypes the Iranian breeds was clustred in haplogroup A (Japanese native, white leghorn, Rhode Island Red), haplogroup E (middle east and eruption chicken) and haplogroup C(African native chicken). AlSo in order to these results the Iranian native fowls like China, Japan, Middle east and African local fowls originated from Southeast Asia and Indian subcontinent then from this ancient way of Iran may probably extended and introduced to the western world.

Keywords: Genetic diversity, Genetic distance, Iranian native chickens, mtDNA, Phylogenic

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/rap.8.17.140]