

بررسی وضعیت باتلنک در نمونه‌ای از جمعیت کبک ایرانی با استفاده از آنالیز ریز ماهواره‌ها

عباس کربلائیان*^۱، سیروس امیری نیا^۲، بهزاد همتی^۱ و حسین عمرانی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۱۱

تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۲/۱۰

چکیده

در این تحقیق، به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و احتمال بروز باتلنک در جمعیت کبک ایرانی موجود در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور که از مراتع کشور گردآوری شده بودند از ۸ نشانگر ریز ماهواره استفاده گردید. جایگاه‌های مورد استفاده عبارت بودند از: Aru 1F25، Aru 1E9، Aru 1E7، Aru 1I 125، Aru 1G49، Aru 1K10، Aru 1A1 و Aru 1D39. جمعیت مذکور برای تمامی مکان‌های ژنی مورد مطالعه انحراف معنی داری از تعادل هاردی واینبرگ را نشان دادند. بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده شده به ترتیب مربوط به جایگاه‌های Aru 1G49 با 21 آلل و Aru 1K10 با 4 آلل بود. میانگین فراوانی آللی (na)، شاخص شانون و PIC^۱ به ترتیب ۹/۳۳۳، ۱/۸۲۸۳ و ۰/۷۰۹۲ برآورد شدند. تنوع درون جمعیتی نیز بر اساس آنالیز مقادیر هتروزیگوسیتی بررسی شد. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۲۰۳ و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناریب در این جمعیت ۰/۷۹۷ بود. تعداد مورد انتظار جایگاه‌های با افزایش میزان هتروزیگوسیتی با استفاده از مدل‌های IAM و TPM به ترتیب ۳/۵۶ و ۳/۵۴ بدست آمد. مقادیر احتمالات نیز در این دو مدل به ترتیب ۰/۴۳۳۱ و ۰/۴۲۲۸ محاسبه شد. برای بررسی وجود اختلاف معنی دار بین تعداد جایگاه‌هایی که افزایش تنوع ژنتیکی دارند آزمون‌های Sign test, Standardized different test و آزمون رتبه‌ای Wilcoxon - که نسبت به دو آزمون دیگر توانمند تر است - به کار گرفته شدند و بر اساس آن می‌توان گفت که در جمعیت مذکور باتلنک اتفاق نیفتاده است.

کلمات کلیدی: کبک ایرانی، نشانگرهای ریز ماهواره، هتروزیگوسیتی، باتلنک

۱- گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

۲- عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

* عهده دار مکاتبات: Karbala_47@yahoo.com

تقاضا برای پرورش صنعتی سایر ماکیان و عدم وجود مزارع پشتیبان و تمرکز بخش‌های مرغ مادر، تخمگذار، گوشتی و جوجه کشی در یک مزرعه و کمبود آگاهی‌های اصلاح نژادی در بین پرورش دهندگان مخاطرات زیادی را برای این پرندگان به همراه دارد، لذا افزایش اطلاعات از ساختار ژنتیکی پرندگانی مثل کبک و بلدرچین (۳) می‌تواند مقدمه‌ای بر برنامه ریزی‌های اصلاح نژادی آتی باشد. از آنجا که تعیین خصوصیات ژنتیکی و فنوتیپی برای تعیین اهداف اصلاح نژادی و اولویت بندی نژادها برای حفظ ذخایر ژنتیکی ضروری می‌باشد از نشانگرهای مولکولی که دارای چند شکلی بالا، توارث مندلی، سهولت کار و توزیع گسترده در طول ژنوم می‌باشند استفاده می‌شود (5). در پژوهش‌های جمعیتی بر روی کبک‌های پا قرمز که توسط Ferrero و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از ۱۶ نشانگر ریز ماهواره انجام شد و همچنین تحقیقات بروفه (۱۳۸۹) که بر روی جمعیت کبک ایرانی موجود در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، با استفاده از ۸ نشانگر ریز ماهواره انجام شد، آلل‌های جدیدی که معرف وجود پلی مورفیسم در جایگاه مذکور بودند شناسایی شدند. علاوه بر این مطالعات متعددی در خصوص بررسی روابط خویشاوندی و تفاوت‌های ژنتیکی به کمک نشانگرهای ریز ماهواره‌ای برای کبک گزارش شده است (۱۲)، (۱۱، ۴). این تحقیق به عنوان دومین بررسی بر روی ساختار ژنتیکی کبک ایرانی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور انجام شده است. به طور کلی باتلنک به کاهش ناگهانی تعداد افراد جمعیت در اثر وقوع حوادث مختلف گفته می‌شود. علایم افت همخونی^۱ پس از کاهش اندازه جمعیت موثر موجب افزایش آمیزش خویشاوندی در جمعیت پدیدار می‌شود. واریانس ژنتیکی نیز معمولاً کاهش می‌یابد و بسیاری از آلل‌ها از مخزن ژنی حذف می‌شوند و لذا فراوانی‌های ژنی دستخوش تغییر می‌شوند. در جمعیت‌های مبتلا به باتلنک، احتمال باقی ماندن ژن‌هایی با فراوانی بالاتر بیشتر و همچنین احتمال کاهش و عدم وجود ژن‌های نادر بسیار زیاد است و به دلیل ثبات آلل‌های کشته و کاهش واریانس ژنتیکی بر روی مقاومت و سازگاری فرد تاثیر منفی می‌گذارد. ضمناً به دلیل کاهش اندازه موثر جمعیت، موتاسیون‌های مفید کمتری رخ می‌دهد و به سبب رانده شدن ژنی بسیاری از آلل‌های مفیدی که در اثر موتاسیون قبلاً ایجاد شده بود نیز حذف خواهند شد (۸)، لذا بسیاری از جمعیت‌های باتلنک یافته به این ترتیب منقرض شده و یا در معرض خطر انقراض قرار می‌گیرند. هدف از این تحقیق بررسی احتمال بروز باتلنک در نمونه‌ای از جمعیت کبک ایرانی موجود در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر از ۱۲۰ قطعه کبک ۵ ماهه موجود در موسسه تحقیقات علوم دامی (جمع آوری شده از مراتع کشور)، ۲۰۰ میکرولیتر خون گرفته شد و سپس استخراج نمکی DNA صورت گرفت (۷). پس از استخراج DNA،

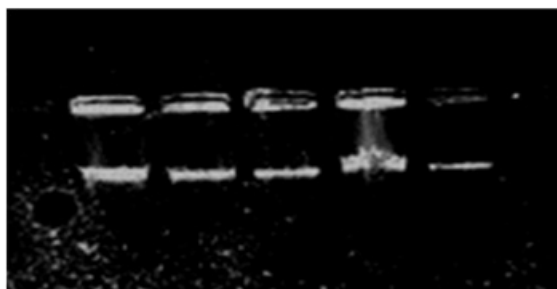
برای تعیین کیفیت DNA ژنومی از دو روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد (۵). برای تعیین میزان چند شکلی (PIC) به عنوان یکی از معیارهای مناسب در مطالعه تنوع ژنتیکی، تعداد آلل^۱، تعداد آلل موثر^۲ و میزان هتروزیگوسیتی از آغازگرهای طراحی شده توسط Ferrero (۲۰۰۷) استفاده شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق، در صورت جدول شماره ۱ مشاهده می شود. برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز از بافر PCR، dNTPs، MgCl₂ و آنزیم Taq پلیمرز ساخته شده توسط شرکت Gene Craft آلمان استفاده شد. برنامه های دمایی واکنش زنجیره ای پلیمرز شامل ۳۵ سیکل تکثیر با دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه، دمای واسرشت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر متغیر (جدول ۲) به مدت ۳۰ ثانیه، دمای گسترش ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و دمای گسترش نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز روی ژل پلی اکریلامید ۸% الکتروفورز و متعاقباً با روش نیترات نقره رنگ آمیزی گردید (۹) و سپس تعیین ژنوتیپ صورت گرفت و داده های حاصل با استفاد از نرم افزار POPGENE (۱۳) و برای اطمینان بیشتر توسط نرم افزار GENALEX مورد آنالیز قرار گرفتند و جهت برآورد میزان باتلنک از نرم افزار BOTTLENECK استفاده شد.

نمونه ها عاری از هر گونه کشیدگی و شکستگی بودند که نشان دهنده کیفیت خوب و عدم آلودگی آنها بود و کیفیت آنها برای انجام واکنش PCR مناسب ارزیابی گردید. کلیه نشانگرهای مورد مطالعه در این تحقیق، به جز دو نشانگر Aru1A1 و Aru1F25، پس از بهینه سازی میزان دماها و غلظت اجزای مورد استفاده در واکنشهای زنجیره ای پلیمرز به خوبی تکثیر شدند. محاسبه تنوع ژنی مورد انتظار در این جمعیت از روی تعداد آلل های مشاهده شده انجام می پذیرد به این ترتیب برای انجام آزمون باتلنک مدل TPM (جهش دو مرحله ای) که حد واسط دو مدل SMM (جهش مرحله ای) و IAM (آلل نامحدود) می باشد و نسبت به این دو مدل، برای ریز ماهواره ها مناسب تر می باشد، پیشنهاد می گردد (۲). برای تعیین معنی دار بودن یا نبودن تعداد جایگاه هایی که افزایش تنوع ژنتیکی دارند سه آزمون به کار گرفته شد. آزمون Sign test، که از لحاظ آماری آزمونی ضعیف شناخته می شود، آزمون Standardized different test یا آزمون تفاوت های استاندارد شده که این آزمون به حداقل ۱۰ جایگاه چند شکل برای داشتن دقت بالا نیاز دارد و آزمون رتبه ای Wilcoxon (آزمون ناپارامتری) که نسبت به دو آزمون دیگر توانمندتر است، زیرا برای تعداد جایگاه کم و یا برای هر جمعیت با هر تعداد فرد می تواند مورد استفاده قرار گیرد (۲).

1- Polymorphism Information Content

2- Number of alleles

3- Number of effective alleles



شکل ۱- DNA استخراج شده پس از الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز

جدول ۱- مشخصات جایگاه‌های انتخاب شده در تحقیق حاضر

نام جایگاه	توالی آغازگرها	سایز (bp)	واحد تکرار شونده	شماره دسترسی	
Aru1A1	GGAAGCCAGATGAACCAAGG ATGCATGCGTGGAGGCTGAG	F R	۲۳۲-۲۵۲	(CCAT)19	AEF54663
Aru 1D39	ATGTGGAGACCTGGCGAGGA CCACTTCACATCAACACCCA	F R	۱۵۰-۱۶۰	(GT)16	EF546639
Aru 1E7	CCACTTCACATCAACACCCA GACTGCTGATTTTCGGTTTGG	F R	۱۷۶-۲۱۲	(GGAT)12	EF546640
Aru 1G49	TTCTACGATCTGGTCAGCCTC GCACTTCTCAGGCGCAGCT	F R	۲۳۳-۲۳۳	(GAGAA)31	EF546648
Aru 1H121	TTCTACGATCTGGTCAGCCTC TGCCTGCTAAGGAGCCCAC	F R	۹۱-۹۷	(GCT)8	EF546649
Aru 1E93	CACGTCAATATGCTAGAGCG TGCCTGCTAAGGAGCCCAC	F R	۸۲-۱۲۶	(GACA)32	EF546642
Aru 1K10	GTGGAGAAGATATTGTTT GGGAGCATTCAATTTATTG	F R	۹۱-۹۷	(GT)14	EF546651
Aru 1F25	CCTAATGCTGTGTCCACCTC CCTAATGCTGTGTCCACCTC	F R	۱۷۴-۲۴۰	(CCAT)15	EF546645

جدول ۲- غلظت و میزان اجزاء مورد استفاده در این تحقیق

غلظت	اجزاء واکنش
1x	Buffer PCR
2 mM	MgCL ₂
1.5μM	Primer Forward
1.5μM	Primer Reverse
200μM	dNTP _s
0.5u/reaction	Taq
150 ng/reaction	DNA
-	ddH ₂ O
20ML	حجم نهایی

نتایج و بحث

قبل از انجام واکنش‌های PCR، اجزا و چرخه‌های دمایی PCR طبق پیشنهاد Ferrero و همکاران (۱۹۹۶) بهینه سازی شد. اندازه آلی، تعداد آلی مشاهده شده و دمای اتصال برای هر جایگاه بررسی و به شرح جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همچنین غلظت و میزان اجزای مورد استفاده PCR در این تحقیق به شرح جدول ۲ ارائه شده است. در این تحقیق، دامنه مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) از ۰/۹۴ تا یک متغیر می‌باشد که کمترین مقدار در جایگاه Aru 1D39 و بیشترین مقدار در جایگاه‌های Aru 1E7, Aru 1G49 می‌باشد و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این مطالعه ۰/۷۹۴ بدست آمد.

میانگین آلی موثر در این مطالعه ۶/۲۲ بدست آمد در حالیکه Ferrero و همکاران (۲۰۰۷) که از جایگاه‌های مشابه تحقیق حاضر بر روی کبک‌های اسپانیا استفاده کرده بودند، میانگین آلی واقعی (برای ۶ جایگاه مشابه در این تحقیق) در منطقه Cadiz را ۷/۴۵ مورد و برای منطقه Alava، ۸/۱۵ مورد گزارش نمودند. با توجه به مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) محاسبه شده مربوط به نشانگر Aru 1G49 در جمعیت کبک‌های مورد مطالعه، با وجود تعداد ۲۱ آلی مشاهده شده در آن دارای بیشترین چندشکلی است. شاخص اطلاعات شانون (I) نیز تایید کننده این مطلب است. همچنین نشانگر Aru 1K10 که ۴ آلی دارد، چند شکلی کمتری دارد.

با توجه به اینکه جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی واینبرگ نمی‌باشد (جدول شماره ۴)، لذا محاسبه تنوع ژنی مورد انتظار در این جمعیت از روی تعداد آلی‌های مشاهده شده انجام می‌پذیرد به این ترتیب برای انجام آزمون باتلنک مدل TPM (جهش دو مرحله‌ای) که حدواسط دومدل SMM (جهش مرحله‌ای) و IAM (آلی نامحدود) می‌باشد و نسبت به این دو مدل، برای ریز ماهواره‌ها مناسب‌تر می‌باشد، پیشنهاد می‌گردد (۲). برای تعیین معنی دار بودن یا نبودن تعداد جایگاه‌هایی که افزایش تنوع ژنتیکی دارند سه آزمون به کار گرفته شد. آزمون Sign

بررسی وضعیت باتلنک در نمونه‌ای از جمعیت کبک ایرانی با استفاده از آنالیز ریز ماهواره‌ها

test، که از لحاظ آماری آزمونی ضعیف شناخته می‌شود، آزمون Standardized different test یا آزمون تفاوت‌های استاندارد شده که این آزمون به حداقل ۱۰ جایگاه چند شکل برای داشتن دقت بالا نیاز دارد و آزمون رتبه‌ای Wilcoxon (آزمون ناپارامتری) که نسبت به دو آزمون دیگر توانمندتر است، زیرا برای تعداد جایگاه کم و یا برای هر جمعیت با هر تعداد فرد می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۲).

جدول ۳- خلاصه‌ای از وضعیت تکثیر جایگاه‌های مورد مطالعه

نام جایگاه	دمای اتصال در این تحقیق	تعداد آلل مشاهده شده	تعداد آلل موثر در گزارش FERRERO CADIZ /ALAVA	دامنه اندازه آلی مشاهده شده (BP)	دامنه اندازه آلی در گزارش FERRERO
Aru1D39	۵۸	۷	۴/۵	۱۴۰-۱۷۰	۱۵۰-۱۶۰
Aru1E7	۵۵	۹	۷/۸	۱۷۵-۲۱۵	۱۷۶-۲۱۲
Aru1G49	۶۲	۲۱	۱۵/۱۵	۲۳۵-۳۳۵	۲۳۳-۳۳۳
Aru1I121	۶۲	۶	۲/۳	۹۰-۹۸	۹۱-۹۷
Aru K10	۵۲	۴	۲/۴	۹۰-۹۷	۹۱-۹۷
Aru1E93	۵۶	۹	۷/۷	۸۰-۱۲۰	۸۲-۱۲۶

جدول ۴- نتایج آزمون X^2 برای تعادل هاردی-وینبرگ

نام جایگاه	دمای اتصال در این تحقیق	تعداد آلل مشاهده شده	تعداد آلل موثر در گزارش FERRERO CADIZ /ALAVA	دامنه اندازه آلی مشاهده شده (BP)	دامنه اندازه آلی در گزارش FERRERO
Aru1D39	۵۸	۷	۴/۵	۱۴۰-۱۷۰	۱۵۰-۱۶۰
Aru1E7	۵۵	۹	۷/۸	۱۷۵-۲۱۵	۱۷۶-۲۱۲
Aru1G49	۶۲	۲۱	۱۵/۱۵	۲۳۵-۳۳۵	۲۳۳-۳۳۳
Aru1I121	۶۲	۶	۲/۳	۹۰-۹۸	۹۱-۹۷
Aru K10	۵۲	۴	۲/۴	۹۰-۹۷	۹۱-۹۷
Aru1E93	۵۶	۹	۷/۷	۸۰-۱۲۰	۸۲-۱۲۶

Key: ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

جدول ۵- آزمون فرض صفر با استفاده از ۳ مدل تکامل ریزماهوره‌ای

Test/Model	IAM		TPM		SMM	
	انتظار	احتمال	انتظار	احتمال	انتظار	احتمال
Sign test	۳/۵۶	۰/۴۳۳۱	۳/۵۴	۰/۰۴۲۲۸	۳/۵۵	۰/۵۲۵۶۶
Wilcoxon test	۳/۵۱۷	۰/۰۰۰۲۲	۲/۹۱۰	۰/۰۰۱۸۰	۱/۲۳۴	۰/۰۱۰۸۵
Standardized different test	۱/۰۰۰	۰/۰۰۷۸۱	۱/۰۰۰	۰/۰۰۷۸۱	۰/۹۷۶۵۶	۰/۳۹۰۶

در مطالعه حاضر تعداد مورد انتظار جایگاه‌های با افزایش میزان هتروزایگوسیتی با استفاده از مدل IAM و TPM به ترتیب ۳/۵۶ و ۳/۵۴ بدست آمد. مقادیر احتمالات نیز در این دو مدل به ترتیب ۰/۴۳۳۱ و ۰/۰۴۲۲۸ محاسبه شد که بر اساس آن می‌توان گفت *باتلنک* اتفاق نیفتاده است (جدول ۵).

تشکر و قدردانی

این مطالعه در محل موسسه تحقیقات علوم دامی کشور انجام گرفته است، که بدینوسیله از کلیه مسئولین، هیئت علمی، کارشناسان و کلیه کارکنان محترم آن موسسه و گروه محترم علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- ۱- بروفه ۱۳۸۹. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت کبک ایرانی موجود در مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور با استفاده از آنالیز ریز ماهواره. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.
- ۲ - سیدآبادی حمیدرضا و همکاران. ۱۳۸۸. بررسی تنوع ژنتیکی و احتمال وقوع باتلنک در جمعیت اسبچه خزر با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره.
- ۳- عمرانی. ح.، نجاتی. ا.، امیری نیا. س.، اسماعیل خانیان. س.، علیوردی نسب. ر.، جوانروح. ع.، ۱۳۸۸. آنالیز تنوع ژنتیکی در جمعیت بلدرچین با استفاده از مارکرهای ریز ماهواره. مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور. گزارش نهایی.
- 4-Arruga, M. V. , HandJisterkotis E. , Monteagudo, L. V. , 2007. A comparative genetic study of two groups of chukar partridges (*Alectorise chukar*) from Cyprus and Argentia using micro satellite analysis. European Journal of wild life research.
- 5-Ferrero, M. E. , Gonzalez, P. , DAVILA P. , 2007. Sixteen new polymorphic microsatellite markers isolated for red legged partridge (*Alectoris rufa*) and related species. Molecular Ecology Notes. 2007. Volume 7 Issue 6, Pages 1349 – 1351
- 6-Karp. A. , P. G. Isaac and D. S. Ingram. 1988. Molecular tools for screening biodiversity, Plants and Animals, First edition. Chapman & Hall, London. UK.
- 7-Luikart G. , Allendorf F. W. , Cornuet J. M. and Sherwin W. B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. The Journal of Heredity 89, 238-247.
- 8- Miller S. A. , Dykes D. D. and Polesky H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16, 1215.
- 9-Reed D. H, E. H. Lowe, D. A. Briscoe and R. Frankham, 2003. Fitness and adaptation in novel environment: Effect of inbreeding, prior environment and lineage.
- 10-Sanguinetti C. J. , Neto E. D. and Simpson A. J. G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR product separated on polyacrylamide gels. Biotechniques 17, 915-919.
- 11- M. T. Tejedor, L. V. Monteagudo, E. Hadjisterkotis, M. V. Arruga. 2005. Genetic variability and population structure in Cypriot chukar partridges (*Alectoris chukar cypriotes*) as determined by microsatellite analysis. European Journal of Wildlife Research. (2005) 51: 232–236.

12-Xin Zhou, Yu Xu, Jianghong Ran, Bisong Yue, Lusha Cao and Jing Li. 2009. Polymorphic microsatellites in Buff-throated partridge developed by cross-species amplification. European Journal of Wildlife Research (2009) 55:81–83.

13- Yeh, F. C. , Yang, R. and Boyle, T. 1999. POPGENE Version 1. 31. Microsoft windows based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta. Edmonton. AB. Canada. pp. 26.

An investigation on bottleneck in a Persian Partridge population sample using microsatellite markers

A. Karbalaein*¹, S. Amirinia², B. Hemati¹ and H. Omrani²

Received Date: 01/11/2012

Accepted Date: 28/02/2013

Abstract

This study was aimed to investigate the genetic variation and bottleneck probability in a Persian partridge population of the Iranian animal science institute using 8 microsatellite markers. The loci used in this study were Aru 1F25, Aru 1E93, Aru 1E7, Aru 1I 125, Aru 1G49, Aru 1K10, Aru 1A1 and Aru 1D39. All loci in this population showed significant bias from the Hardy-Weinberg equilibrium. The maximum and minimum number for observed alleles in this study were Aru 1 G49 (21 alleles) and Aru 1K10 (4 alleles) respectively. The average allele frequency (n_a), Shannon diversity index and Polymorphism Information Content (PIC) were 9.333, 1.8283 and 0.7092 respectively. Intra-population diversity investigated based on heterozygosity values. The averages of observed and expected unbiased heterozygosity were 0.203 and 0.797 respectively based on data analysis of the population. The numbers of expected loci with increasing of heterozygosity determined by IAM and TPM models were 3.56 and 3.54 respectively. Probability for each model was obtained 0.4331 and 0.0423 respectively. Standardized different test, Sign test and Wilcoxon test, probability values calculated in these models showed no bottleneck occurrences in the population.

Key words: Persian partridge - micro satellite markers - heterozygosity- Bottleneck

1- Department of animal science, Karaj branch, Islamic azad university, Karaj, Iran,

2- Faculty member of animal science institute

* Corresponding author (Karbala_47@yahoo.com)