SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

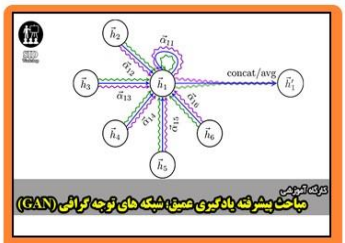
کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

## کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو




مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی (Graph Attention Networks)

کارگاه آنلاین مقاله نویسی IEEE و ISI ویژه فنی و مهندسی

Archive of SID



# مطالعه چندشکلی تک نوکلئوتیدی ژن $PRKAG_3$ در اسب‌های نژاد تروبرد و ترکمن به وسیله روش PCR-RFLP

**نوبخت[1*]، ر.، آهنی آذری[2]، م.، حسنی[2]، س.**

۱- کارشناس ارشد علوم دامی گرایش ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه گرگان. ایران nobakht.reza0@gmail.com

۲- اعضای هیئت علمی گروه علوم دامی گرایش ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه گرگان. ایران

## چکیده

در این تحقیق وضعیت چندشکلی تک نوکلئوتیدی ژن $PRKAG_3$ که نقش موثری در قابلیت ورزشی در اسب را دارد به روش PCR-RFLP در اسب‌های نژاد تروبرد موجود در استان مرکزی و اسب‌های نژاد ترکمن موجود در استان گلستان مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور از ۴۰ رأس اسب نژاد تروبرد وارداتی در استان مرکزی و ۴۰ رأس اسب نژاد ترکمن در استان گلستان خونگیری به عمل آمد و DNA با استفاده از کیت دیاتوم استخراج گردید و ژن موردنظر به روش PCR تکثیر شد. برای این منظور پرایمرهای رفت و برگشت مناسب برای این ژن ساخته شد و مورد استفاده قرار گرفت. سپس به روش RFLP وضعیت چندشکلی ژن موردنظر توسط آنزیم محدودکننده AluI روی ژل آگاروز ۳ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج حاصله در هر ۲ نژاد برای ژن مورد مطالعه چندشکلی مشاهده شد. ژن $PRKAG_3$ در اسب‌های تروبرد مورد مطالعه برای ژنوتیپ‌های CC، TT، CT به ترتیب دارای فراوانی ۷۰، ۲۲/۵، ۷/۵ درصد و فراوانی آللی C و T به ترتیب ۷۳/۷۵ و ۲۶/۲۵ درصد به دست آمد. همچنین برای اسب ترکمن مورد مطالعه فراوانی ژنوتیپ‌های CC، TT، CT به ترتیب ۴۷/۵، ۴۵، ۷/۵ درصد حاصل گردید و فراوانی آللی C و T به ترتیب ۵۱/۲۵ و ۴۸/۷۵ درصد بود. به طور کلی در روش PCR-RFLP مشخص شد که چندشکلی در دو نژاد اسب مورد مطالعه در ژن $PRKAG_3$ وجود دارد و نتایج نشان دادند که احتمالاً به دلیل تلاقی‌های نزدیک و یا انتخاب علیه حیوانات ناخالص فراوانی حیوانات خالص افزایش زیادی پیدا کرده است و حیوانات خالص برای این جایگاه از مرغوبیت بیشتری برخوردار می‌باشند.

**واژه‌های کلیدی: اسب، چندشکلی، ژن $PRKAG_3$.**

## مقدمه

محل پرورش اسب‌های ترکمنی که یکی از نژادهای معروف جهان است ترکمنستان روس و ترکمن صحرای ایران می‌باشد. اسب سیلمی ترکمن آتی که در سال ۱۷۸۴ میلادی متولد شد و در طی سال‌های ۱۷۹۱ تا ۱۸۰۵ میلادی در آلمان می‌زیست، بسیاری از مادیان‌های تراکنر را بارور کرد ولی در سال ۱۸۰۶ میلادی ژنرال هیلر فرانسوی آن را ربود و به فرانسه برد. از مهم‌ترین خصوصیات اسب ترکمن مقاومت به راهپیمایی‌های طولانی، تحمل گرما و حرکت بسیار سریع و تند است که طی تاریخ چند هزار ساله خود از لحاظ چابکی و استقامت مورد تحسین ترکمن‌ها بوده است(نصیریان و همکاران، ۱۳۸۸). اسب تروبرد، علاوه بر این‌که یکی از اسب‌های ممتاز مسابقه‌ای در جهان می‌باشد، نقش مهمی در اصلاح نژادهای مختلف اسب و پونی‌های قدیمی و ایجاد نژادهای جدید ایفا کرده است. یقیناً اسب ترکمن در ایجاد نژاد تروبرد نقش مهمی داشته است. آن‌چه مسلم است نژاد تروبرد از چند اسب معروف دنیا به وجود آمده(حدود ۳۰۰ سال پیش) که یکی از آن‌ها اسبی به نام بارلی ترک می‌باشد و شکی وجود ندارد که یک اسب ترکمن است. نریان دیگر، دارلی عربی می‌باشد که از اسب‌های عرب ناموفق بوده و در اثر آمیزش با اسب آخال‌تکه پدید آمده است و دیگری اسب گُدولفین عربی بود که به عنوان پدران پایه‌گذار اسب تروبرد شناخته شده‌اند. یک اسب در صورتی جز نژاد تروبرد طبقه‌بندی می‌شود که هر دو والد آن در دفتر انساب نژاد تروبرد ثبت شده باشند. این اسب، بسیار قوی، هوشیار و شجاع است و از آن در موارد مختلف مانند مسابقات اسب‌سواری، شکار و مسابقات سه روزه استفاده می‌شود(نصیریان و همکاران، ۱۳۸۸). ژن $PRKAG_3$ دارای ۱۲ اگزون می‌باشد که ۷/۹kbp است. اگزون ۸ از این ژن مورد بررسی قرار گرفت که یک شکل خاص عضله را کد می‌نماید و نظم‌دهی به وسیله زیرگروه $\gamma$ از AMPK را به عهده دارد. یک بخش بزرگی از ردیف رمزهای $PRKAG_3$ در اسب با استفاده از روش RT-PCR مطالعه شده است(پارک و همکاران، ۲۰۰۳). از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز می‌توان برای به دست آوردن نمونه خالصی از یک ژن، مورد استفاده قرار داد، چون قطعه‌ای از مولکول DNA اولیه که در خلال PCR تکثیر می‌شود، قطعه‌ای است که توسط محل اتصال دو پرایمر الیگونوکلئوتید مشخص شده است(براون، ۱۳۹۰). چندین جهش با تأثیر به عضلات اسکلتی یا عضلات قلبی در پستانداران تشخیص داده شده است که توسط ژن‌های$PRKAG_2$ و $PRKAG_3$ رمز می‌شدند و روی زیرگروه‌های $\gamma_2$ و $\gamma_3$ از AMPK موثر بودند. زیرگروه $\gamma_3$ بیشتر در عضلات سفید که مسئول عکس‌العمل‌های سریع می‌باشند یافت می‌شود که نقش کلیدی در شناخت $PRKAG_3$ در بافت‌های عضلانی را دارد(میلان و همکاران، ۲۰۰۰).



www.SID.ir

Archive of SID



## مواد و روش ها

این تحقیق به منظور بررسی چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی ژن $PRKAG_3$ اسب‌های وارداتی تروبرد در استان مرکزی و اسب‌های ترکمن استان گلستان انجام شد. در این مطالعه از تعداد ۴۰ رأس اسب تروبرد در استان مرکزی و ۴۰ رأس اسب ترکمن استان گلستان خونگیری به عمل آمد. خونگیری از حیوانات اسب‌ها با استفاده از ونوجکت‌های وکیوم‌دار حاوی EDTA از سیاهرگ گردن به میزان ۵ میلی‌لیتر انجام شد. در این لوله‌ها به مقدار موردنیاز ماده ضدانعقاد موجود می‌باشد. در صورت استفاده از لوله‌های بدون ماده ضدانعقاد می‌توان از ۲ سی‌سی ماده EDTA نیم مولار برای ۱۰ سی‌سی از خون استفاده نمود و برای تنظیم pH در صورت اسیدی بودن، سود و در صورت قلیایی بودن، اسید کلریدریک اضافه نمود. نمونه‌ها بلافاصله به فریزر انتقال داده شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شد. به منظور افزایش دقت کار و کیفیت مطلوب نمونه‌های DNA، استخراج DNA با استفاده از کیت DIAtom DNA prep۱۰۰ انجام شد. کل DNA استخراج شده توسط این روش را می‌توان سال‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمود. پرایمرهای موردنظر پرایمرهای موجود در تحقیقات پارک و همکاران (۲۰۰۳)، با مشخصات زیر به شرکت تکاپوزیست سفارش داده شد:

| پرایمر رفت ژن | Forward | PRKAG3 | پرایمر برگشت ژن | Reverse | PRKAG3 |
|---|---|---|---|---|---|
| $PRKAG_3$ | 5'-AGAGGAAGCAGGGGAAGGGTG-3'N- | | $PRKAG_3$ | 5'-GAGACCACAGGCTTGAAGCA-3' | |

طول پرایمر رفت 21 mer و با 60/2 Tm سانتیگراد می باشد. طول پرایمر برگشت 20 mer و با 54/9 Tm سانتیگراد می باشد.

**هضم ژن $PRKAG_3$:** محصول PCR را پس از خارج نمودن از دستگاه روی یونولیت قرار داده شد سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول به میکروتیوب دیگر ریخته شد سپس ۲µL از بافر آنزیم AluI و ۱µL از آنزیم AluI به میکروتیوب ها اضافه شد سپس مقدار محلول با آب دوبار تقطیر به ۲۵µL رسانده شد و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷°C قرار داده شد. بافر آنزیم AluI با جایگاه شکافت '۳→۵ به صورت AG↓CT است. شرکت سازنده آنزیم جنابایوساینس آلمان می باشد. ترکیب مواد لازم و محصول PCR جهت RFLP در جدول ۱ آورده شده است.

**جدول ۱ ترکیب مواد جهت RFLP ژن $PRKAG_3$**

| ردیف | ترکیب براساس (۲۵µL) | |
|---|---|---|
| ۱ | ۲µL | Buffer ۱۰X |
| ۲ | ۱۰µL | محصول PCR |
| ۳ | ۱µL | AluI |
| ۴ | تا کامل شدن مقدار به ۲۵µL از آب دوبار تقطیر اضافه شود | |
| | انکوباتور ۱۶h | ۳۷°C |

**محصول PCR**

پس از خارج نمودن نمونه ها از انکوباتور درون چاهک ژل ۳٪ آگاروز قرار داده شدند و در ولتاژ ۷۵V به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردیدند سپس ژل در ظرف حاوی اتیدیوم بروماید به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه داخل آب قرار داده شد و بعد از آن نتایج در دستگاه ترانسلومینیتور مشاهده گردیده و عکس گرفته شد.

## نتایج و بحث

در اثر هضم توسط آنزیم قطعات نحوه تشخیص ژنوتیپ $PRKAG_3$ براساس قطعات هضمی در جدول ۲ ارائه شده است(پارک و همکاران، ۲۰۰۳).

**جدول ۲ نحوه تشخیص ژنوتیپ‌ها در ژن $PRKAG_3$ براساس اندازه قطعات هضمی**

| ژن | CT | CC | TT |
|---|---|---|---|
| $PRKAG_3$ | ۱۱۸bp<br>۷۹bp<br>۴۵bp<br>۳۹bp<br>۱۹bp | ۱۱۸bp<br>۴۵bp<br>۱۹bp | ۷۹bp<br>۴۵bp<br>۳۹bp<br>۱۹bp |

این ژن در اسب تروبرد چندشکل بوده و هر سه ژنوتیپ مورد انتظار مشاهده شد و فراوانی ژنوتیپی و فراوانی آللی به شرح ذیل به دست آمد: از تعداد ۴۰ رأس اسب تروبرد آزمایش شده تعداد ۲۸ رأس دارای ژنوتیپ CC بودند که فراوانی ژنوتیپی آن ۰/۷ معادل ۷۰ درصد کل ژنوتیپ را به خود اختصاص داده است. تعداد ۹ رأس دارای ژنوتیپ TT بودند که فراوانی ژنوتیپی آن ۰/۲۲۵ معادل ۲۲/۵ درصد کل ژنوتیپ را به خود اختصاص داده است. تعداد ۳ رأس دارای ژنوتیپ CT بودند که فراوانی ژنوتیپی آن ۰/۰۷۵ معادل ۷/۵



www.SID.ir

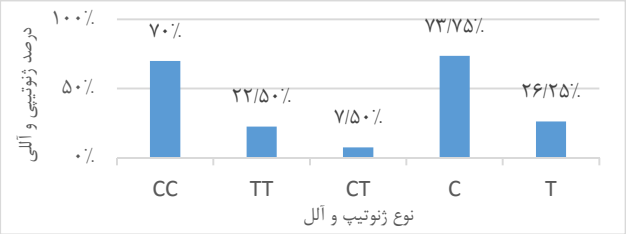
Archive of SID



درصد کل ژنوتیپ را به خود اختصاص داده است. فراوانی آللی آلل C معادل ۰/۷۳۷۵ و فراوانی آللی آلل T معادل ۰/۲۶۲۵ مـی‌باشـد. فراوانی ژنوتیپی و آللی ژن PRKAG3 در اسب تروبرد در جدول ۳ و نمودار ۱ آورده شده است.

**جدول ۳ فراوانی ژنوتیپی و آللی ژن PRKAG3 در اسب تروبرد**

| فراوانی آلل | آلل | فراوانی ژنوتیپی | تعداد حیوان | ژنوتیپ | ردیف |
|---|---|---|---|---|---|
| ۰/۷۳۷۵ | C | ۰/۷ | ۲۸ | CC | ۱ |
| | | ۰/۲۲۵ | ۹ | TT | ۲ |
| ۰/۲۶۲۵ | T | ۰/۰۷۵ | ۳ | CT | ۳ |
| ۱ | کل | ۱ | ۴۰ | کل | ۴ |

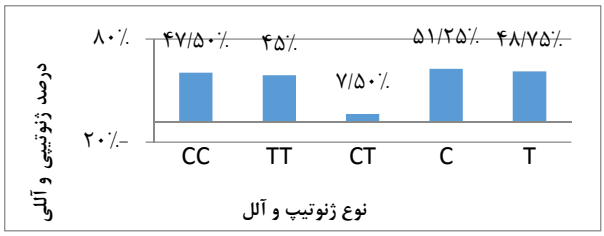



**نمودار ۱ ترکیب ژنوتیپی و آللی ژن PRKAG3 در اسب تروبرد**

این ژن در اسب ترکمن نیز چندشکل بوده و هر سه ژنوتیپ مورد انتظار مشاهده شد و فراوانی ژنوتیپی و فراوانی آللی به شرح ذیل بـه دست آمد: از تعداد ۴۰ رأس اسب ترکمن آزمایش شده تعداد ۱۹ رأس دارای ژنوتیپ CC بودند که فراوانی ژنوتیپی آن ۰/۴۷۵ معادل ۴۷/۵ درصد کل ژنوتیپ را به خود اختصاص داده است. تعداد ۱۸ رأس دارای ژنوتیپ TT بودند که فراوانی ژنـوتیپی آن ۰/۴۵ معـادل ۴۵ درصد کل ژنوتیپ را به خود اختصاص داده است. تعداد ۳ رأس دارای ژنوتیپ CT بودند که فراوانی ژنوتیپی آن ۰/۰۷۵ معادل ۷/۵ درصد کل ژنوتیپ را به خود اختصاص داده است. فراوانی آللی آلل C معادل ۰/۵۱۲۵ و فراوانی آللی آلل T معادل ۰/۴۸۷۵ مـی‌باشـد. فراوانی ژنوتیپی و آللی ژن PRKAG3 در اسب ترکمن در جدول ۴ و نمودار ۲ آورده شده است.

**جدول ۴ فراوانی ژنوتیپی و آللی ژن PRKAG3 در اسب ترکمن**

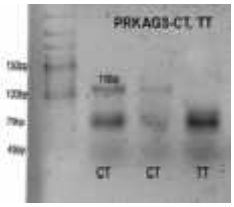
| فراوانی آلل | آلل | فراوانی ژنوتیپی | تعداد حیوان | ژنوتیپ | ردیف |
|---|---|---|---|---|---|
| ۰/۵۱۲۵ | C | ۰/۴۷۵ | ۱۹ | CC | ۱ |
| | | ۰/۴۵ | ۱۸ | TT | ۲ |
| ۰/۴۸۷۵ | T | ۰/۰۷۵ | ۳ | CT | ۳ |
| ۱ | کل | ۱ | ۴۰ | کل | ۴ |




**نمودار ۲ ترکیب ژنوتیپی و آللی ژن PRKAG3 در اسب ترکمن**

عکس‌های مربوط به ژن PRKAG3 در اسب های نژاد تروبرد و ترکمن روی ژل آگاروز ۳٪ در شکل های ۱ و ۲ آورده شده است..

**شکل ۱ ژنوتیپ CC**




**شکل ۲**

**ژنوتیپ های CT و TT**

آلل‌های ژن PRKAG3 در اسب‌های تروبرد شامل C و T به ترتیب فراوانی ۰/۷۳۲۵ و ۰/۲۶۲۵ را نشان داد و اختلاف فراوانی آن‌ها ۰/۴۷۵ بود. فراوانی ژنوتیپ‌های هموزیگوت CC و TT به ترتیب ۰/۷۰ و ۰/۲۲۵ بود. فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت CT، ۰/۰۷۵ به دست آمد که عدد زیادی نمی‌باشد. در اسب‌های ترکمن فراوانی آلل‌های C و T به ترتیب ۰/۵۱۲۵ و ۰/۴۸۷۵ شد. فراوانی ژنوتیپ‌های هموزیگوت CC و TT به ترتیب ۰/۴۷۵ و ۰/۴۵ بود و فراوانی حیوانات ناخالص CT در این نژاد هم ۰/۰۷۵ شد که حاکی از خلوص بالا در جایگاه مربوطه در اسب‌های ترکمن است. با توجه به نتایج حاصل در این مطالعه اختلاف فراوانی آلل‌های C و T در اسب‌های نژاد تروبرد بسیار بزرگتر از اسب‌های نژاد ترکمن بود. همچنین فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت در اسب‌های نژاد تروبرد و نژاد ترکمن برابر بود که نشان‌دهنده سطح خلوص ژنتیکی بسیار بالایی است. ژنوتیپ CC در اسب تروبرد(۰/۷۰) در مقایسه با اسب‌های ترکمن(۰/۴۷۵) فراوانی بیشتری را نشان داد ولی ژنوتیپ TT در اسب‌های نژاد تروبرد(۰/۲۲۵) که از اسب‌های نژاد ترکمن کمتر بود. ژنوتیپ CT در اسب‌های نژاد ترکمن و تروبرد تفاوت نداشت. در مطالعه صورت گرفته توسط آمارو و همکاران(۲۰۱۲) نتایج نشان دادند که ژن PRKAG3 در اسب‌های نژاد مانگالارگا فقط ژنوتیپ CC داشتند و فراوانی آللی C در این گروه از اسب ها ۱ بوده است که نشان می‌دهد احتمالاً آلل مناسب‌تری بوده که در این نژاد با انتخاب تثبیت شده است. فراوانی آلل C در اسب های مانگالارگا نسبت به فراوانی



www.SID.ir

Archive of SID



آللی C در اسب‌های تروبرد و ترکمن به ترتیب ۰/۲۶۲۵ و ۰/۴۸۷۵ بیشتر بود. فراوانی ژنوتیپ CC در اسب‌های مانگالارگا نسبت به فراوانی این ژنوتیپ در اسب‌های تروبرد و ترکمن به ترتیب ۰/۳ و ۰/۵۲۵ بیشتر بود.

## نتیجه‌گیری

فراوانی آلل‌های T و C در ژن $PRKAG_3$ در نژاد تروبرد به ترتیب ۰/۷۳۲۵ و ۰/۲۶۲۵ به دست آمد ولی فراوانی این آلل‌ها در نژاد ترکمن اختلاف اندکی را نشان می‌دادند. فراوانی حیوانات خالص در دو نژاد حدود ۹۳ درصد بود و تنها ۷ درصد اسب‌ها ناخالص بودند. این نشان می‌دهد احتمالاً به دلیل تلاقی‌های نزدیک و یا انتخاب علیه حیوانات ناخالص فراوانی حیوانات خالص افزایش زیادی پیدا کرده است و احتمالاً حیوانات خالص برای این جایگاه از مرغوبیت بیشتری برخوردار می باشند.

## سپاسگزاری

همکاری و همراهی دوستان عزیزم جناب آقایان دکتر سیدرضا طبری پور، دکتر محمدرضا یوسفی و زحمات سرکار خانم مهندس الهام طاهرنژاد، سرکار خانم مهندس زهرا حاتمی را صمیمانه پاس می دارم و از خداوند سعادت و سلامتی و پیشرفت در عرصه علم و دانش را برایشان مسئلت می نمایم.

## فهرست منابع


- براون، ت. ا. ۱۳۹۰. مقدمه‌ای بر کلون‌سازی ژن‌ها و آنالیز DNA، ناشر خانه زیست‌شناسی، ۳۱-۲۵ ص.
- نصیریان، ع.، حاجی سید جوادی، س. م. م.، حاجی سید جوادی، س. م. ع.، عباس، م.، اقبالی، م.، نوری، م.، پشمی، م. ۱۳۸۸. نژادهای اسب ایران و جهان، سراوا همکار آوای مسیح، ۱۲-۲ و ۶۱-۴۰ و ۹۶-۹۲ ص.
- Park, H.B., Marklund, S., Jeon J. T., Mickelson, J. R., Varberg, S. J., Sandberg, K. and Andersson, L. 2003. Molecular characterization and Mutational screen of the PRKAG3 gene in the horse. Cytogenet. Genom Res. 102: 211-216.
- Armeiro, L. C. M., Curi, R. A., Chardulo, L. A. L., Puoli Filho, J. N. P. and Silveira da Mota, M. D. 2012 Polymorphism of Candidate Genes for Muscle Performance and Male Fertility in Brazilian Mangalarga Horses. I. R. J. AAS: 199-202.
- Milan, D., Jcon, J. T., Looft, C., Amarger, V., Robic, A., Thelander, M., Rogel-Gaillard, C., Paul, S., Iannuccelli, N., Rask, L., Ronne, H., Lundstrom, K., Reinsch, N., Gellin, J., Kalm, E., Roy, P.L., Chardon, P., Andersson, L. 2000. A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle Science. 288: 1248-1251.


**Study of Single Nucleotide Polymorphism of $PRKAG_3$ gene in Throughbred and Turkman horse breeds using PCR-RFLP procedure**

Nobakht[1*], R., Ahaniazari[2], M., Hasani[2], S.
1-M.S.c of animal breeding and genetic, Animal Science Department, University of Gorgan, I.R. Iran. Email: nobakht.reza0@gmail.com
2-Animal Science Department, animal breeding and genetic, University of Gorgan, I.R. Iran

## Abstract

The single nucleotide polymorphism variations of $PRKAG_3$ gene was studied in Throughbred and Turkman horses using PCR-RFLP procedure. Blood samples were collected from 40 Throughbred horses in Markazy province and 40 Turkman horses in Golestan province. DNA of samples was extracted using Diatom's kit. $PRKAG_3$ gene was amplified succesfully using polymerase chain reaction(PCR) and it was collected individually in microtube. PCR procedure was used from forward and reverse primer of the gene that it has been built. For RFLP procedure the product was effected with AluI endonuclease enzyme. The products were electrophoresed on 3% agarose gel. For $PRKAG_3$ gene in Thoughbred horse genotypes and alleles frequency was 70%، 22.5% and 7.5% for CC، TT and CT genotypes and 73.75% and 26.25% for C and T alleles respectively. In Turkman horse genotypes and alleles' frequency was 47.5%، 45% and 7.5% for CC، TT and CT genotypes and 51.25% and 48.75% for C and T alleles respectively. The results show that possibly due to relative mating or selection against heterozygous animals, the frequency of homozygous animals has increased and probably homozygous animals has dominant locus among others. Overally $PRKAG_3$ gene is polymorphic in two breeds of horses that was studied. However future investigation is needed to determine favorite genotype and allele.



www.SID.ir

Archive of SID



***Keywords:*** horse, polymorphism (SNP), $PRKAG_3$ gene.



www.SID.ir

SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

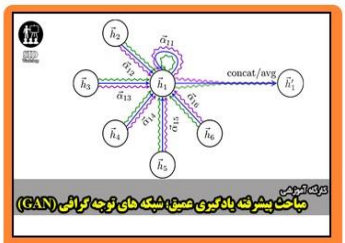
کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

## کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو




مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی (Graph Attention Networks)

کارگاه آنلاین مقاله نویسی IEEE و ISI ویژه فنی و مهندسی