

تجزیه و تحلیل توالی مولکولی ژن ITS جهت شناسایی گونه‌های جداسازی شده جنس فوزاریم از مناطق مختلف ایران

امیر حسین بیکی^{۱،*}

۱- دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم
۲- پژوهشکده محیط زیست، دانشگاه قم

چکیده

سابقه و هدف: شناسایی و تمایز جنس فوزاریم در سطح گونه، برای مقاصد اپیدمیولوژی و پاتولوژیکی ضروری است. هدف از این مطالعه بررسی روابط فیلوژنتیکی و یافتن الگوهای تکراری کلاستر شده مشخص در ناحیه ITS به منظور شناسایی گونه‌های متفاوت جنس فوزاریم است.

مواد و روش‌ها: ۱۶ جدایه از گونه‌های متفاوت جنس فوزاریم و از نواحی مختلف ایران جمع آوری شدند. ناحیه فاصله انداز داخلی DNA ریبوزومی توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تکثیر، توالی یابی و با ابزارهای مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. **یافته‌ها:** محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، قطعه‌های به طول به‌طور تقریبی ۵۵۰ جفت باز در تمام جدایه‌ها بود. مقایسه توالی‌ها و فیلوگرام حاصل از تجزیه و تحلیل ناحیه ITS، گونه‌های جنس فوزاریم را در ده گروه مختلف قرار داد.

بحث: ناحیه فاصله انداز داخلی بی‌ثبات و تغییر پذیر هستند. سطح بالای تنوع بین ناحیه فاصله انداز داخلی ناشی از حذف یا اضافه شدن واحدهای تکراری در ناحیه فوق است.

نتیجه‌گیری: بعضی از جدایه‌ها به‌طور قطعی شناسایی می‌شوند. بعضی از آن‌ها دارای الگوی متفاوتی هستند. وجود موتیف‌های خوشه‌شده بی‌همتا در ناحیه ITS یک گونه خاص نشان می‌دهد که این موتیف‌ها می‌توانند به‌عنوان یک ابزار شناسایی گونه مورد نظر به کار روند.

واژه‌های کلیدی: روابط فیلوژنتیکی، هم‌ردیف‌سازی، ژن ITS

مقدمه

جنس فوزاریوم یکی از جنس‌های مهم قارچ‌های رشته‌ای است که به‌طور وسیعی در خاک و گیاهان دیده می‌شود و دارای گسترش جهانی است که

بسیاری از آن‌ها موجب بیماری‌های مختلفی در گیاهان می‌شوند (۲۰). گسترش همه‌جانبه جنس فوزاریم به‌علت سازگاری در شرایط مختلف حاصل می‌شود (۲۲).

با توجه به این‌که جنس فوزاریوم دارای تنوع بسیار زیادی است، شناسایی آن‌ها بر اساس صفت‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بسیار دشوار است. تاکسونومی جنس فوزاریوم همیشه چالش بزرگی برای تعیین گونه‌های مورفولوژیکی بوده‌است (۱۲). نشانگرها و ابزارهای مولکولی مبتنی بر آنالیز DNA، به‌عنوان یک راه‌کار مناسب در مقابل شیوه‌های

*آدرس نویسنده مسئول: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم

پست الکترونیکی: amirbeiki@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۱۴

داخلی رونوشت برداری شده به اسامی ITS1 و ITS2 وجود دارد. تکثیر این نواحی به دلیل نداشتن فشار تکاملی در بررسی های فیلوژنتیکی، تاکسونومیک و تبار شناسی مولکولی از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۷). گر چه ژن های rRNA به شدت حفاظت شده می باشند، ولی توالی ناحیه ITS متغیر بوده و دارای اطلاعات مفیدی برای دسته بندی فیلوژنی محسوب می شوند. در این بررسی با بهره گیری از تجزیه و تحلیل توالی ناحیه ITS و الگوهای تکراری کلاستر شده در این ناحیه، تنوع فیلوژنتیکی گونه های مختلف جنس فوزاریوم مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه:

۱۶ جدایه از ۱۱ گونه مختلف جنس فوزاریوم از نمونه خاک های جمع آوری شده از چهار استان خوزستان، گیلان، اصفهان و زنجان با اقلیم های متفاوت جدا سازی شدند (جدول ۱).

خالص سازی جدایه ها

کلیه نمونه ها با استفاده از کشت تک هاگ خالص گردید. ابتدا با استفاده از برگ میخک سترون شده با اشعه گاما و محیط آب- آگار اقدام به تهیه محیط کشت اختصاصی CLA (Carnation Leaf Agar) شد. یک بلوک از محیط PDA (Potato Dextrose Agar) حاوی نمونه قارچی را نزدیک برگ میخک روی محیط کشت قرار داده شد. کشت های فوق به مدت ۵ تا ۷ روز در انکوباتور زیر نور ماوراء بنفش (T136w/80RsF40 BLB Philips) با فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. محیط فوق سبب تحریک هاگ دهی قارچ می شود. سپس یک لوله آزمایش کوچک حاوی ۵ میلی لیتر آب مقطر که توسط اتوکلاو سترون شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از یک لوپ روی سطح محیط حاوی هاگ ها

کلاسیک و به منظور بررسی وارپته های گونه های مختلف قارچ ها مورد استفاده است (۱۷،۹،۶). اکنون این ابزارهای مولکولی بر اساس مفاهیم فیلوژنتیک گونه ای برای تاکسونومی مولکولی فوزاریوم به کار می روند (۱۰،۱۲).

گونه های فیلوژنتیک به عنوان کوچک ترین دسته های قابل تشخیص موجوداتی که دارای جد مشترک هستند توصیف شده اند (۷، ۱۹). استفاده از روش های مولکولی برای مطالعه اجداد خویشاوند جهت تشخیص قارچ های غیر مرتبط ولی مشابه از نظر مورفولوژیکی کمک زیادی کرده است (۹، ۱۲، ۱۹). اطلاعات مولکولی، به خصوص زمانی که خصوصیت های مورفولوژیکی برای تشخیص دقیق رده بندی گروه ها کافی نیست، بسیار سودمند است (۳، ۴، ۱۵، ۲۱). برخلاف خصوصیت های فوق، استفاده از توالی های DNA در مطالعه های روابط خویشاوندی، اطلاعات زیادی را برای موجودات مورد مقایسه فراهم می نماید. نسب شناسی چندژنی (ژن های میتوکندریایی و هسته ای) ابزار قدرتمندی را برای تشخیص گونه های فیلوژنتیکی فراهم کرده است (۸، ۹، ۱۲، ۱۸، ۱۹). توالی های ITS، rRNA، MAT، EF1- α ، Histone H3 و β -tubulin رایج ترین نشانگرهای به کار رفته برای بررسی فیلوژنی مولکولی هستند (۲، ۹، ۱۱، ۱۹). ژن های فوق به طور معمول برای مطالعه گوناگونی درون گونه ای و برون گونه ای و تجزیه و تحلیل روابط خویشاوندی، در گستره وسیعی از یوکاریوت ها از جمله قارچ ها به کار می رود (۲، ۱۰، ۱۲، ۱۸، ۱۷، ۱۹).

با استفاده از روش های معمول ریخت شناسی تفاوت های بین گونه ای را می توان تعیین نمود، ولی این روش ها نمی توانند بیان گر تفاوت درون گونه ای باشند. توالی هایی از DNA که RNA ریبوزومی را رمز می کنند، نواحی مناسبی جهت بررسی روابط خویشاوندی، تاکسونومیک و قرابت های ژنتیکی بین قارچ ها محسوب می شوند (۱۷). کلاستر ژنی rDNA شامل تکرارهای متوالی سه ناحیه اگزونی 18s، 5.8s و 28s و دو ناحیه اینترونی ITS و IGS است (۱۰). در حد فاصل بین ناحیه 18s و 28s دو قطعه فاصله انداز

۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط مایع PDB (Potato Dextrose Broth) منتقل گردید. کشت ها روی دستگاه شیکر در دمای اتاق با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ تا ۴ روز نگهداری شدند. جمع آوری میسلیم ها با فیلتر کردن محیط کشت به کمک کاغذ صافی، پمپ خلاء و شستشو با آب مقطر سترون صورت گرفت. میسلیم به دست آمده برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت و یا این که در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. استخراج DNA با استفاده از روش محلول نمکی DNA انجام گرفت (۱۴).

کشیده و نمونه به آب مقطر داخل لوله آزمایش اضافه گردید. در مرحله بعد زیر هود و در شرایط سترون با استفاده از لوپ محتویات لوله آزمایش روی محیط آب - آگار در امتداد خطوط فرضی پخش شدند. محیط های فوق یک شبانه روز در داخل دستگاه انکوباتور قرار گرفتند. سپس تشتک ها با میکروسکوپ بررسی شدند و هاگ های تکی جوانه زده با دقت به محیط PDA منتقل گردیدند. بعد از گذشت ۲ تا ۳ روز توده قارچی حاصل از کشت تک هاگ در سطح محیط PDA مشاهده شد.

تهیه توده میسلیمی و استخراج DNA

بلوک های کوچک حاوی نمونه قارچی از کشت ۶ روزه جدایه های قارچ روی محیط PDA به فلاسک های

جدول ۱- جدایه های مختلف شناسایی شده و شماره دسترسی آن ها در GenBank

| شماره دسترسی | گونه | محل برداشت | شماره دسترسی | گونه | محل برداشت |
|--------------|--------------------|------------|--------------|---------------------|------------|
| HM629958 | <i>acuminatum</i> | اصفهان | HM629966 | <i>moniliforme</i> | گیلان |
| HM629959 | <i>anthophilum</i> | زنجان | HM629967 | <i>oxysporum</i> | گیلان |
| HM629960 | <i>compactum</i> | خوزستان | HM629968 | <i>oxysporum</i> | اصفهان |
| HM629961 | <i>moniliforme</i> | زنجان | HM629969 | <i>poape</i> | خوزستان |
| HM629962 | <i>equiseti</i> | زنجان | HM629970 | <i>proliferatum</i> | خوزستان |
| HM629963 | <i>longipes</i> | خوزستان | HM629971 | <i>solani</i> | خوزستان |
| HM629964 | <i>moniliforme</i> | اصفهان | HM629972 | <i>solani</i> | اصفهان |
| HM629965 | <i>moniliforme</i> | خوزستان | HM629973 | <i>solani</i> | گیلان |

برای اطمینان از موفقیت عمل استخراج DNA و بررسی کمیت و کیفیت DNA استحصالی، پنج میکرولیتر از محلول DNA با یک میکرولیتر بافر رنگ (Loading buffer) شش برابر مخلوط گردید و در ژل آگارز ۰/۸ درصد بار گذاری گردید. غلظت DNA استخراج شده با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گردید.

تکثیر، خالص سازی و تعیین توالی قطعه-

های DNA

تکثیر ناحیه ITS1-5.8SrDNA-ITS2 با استفاده از آغازگر پیش رو (ITS-1-F) و آغازگر پس رو (-ITS-4) (R) (جدول ۲) انجام گرفت (۱۸، ۱۶).

| | | |
|-------------|----|-----|
| تکثیر | ۶۸ | ۳۰ |
| تکثیر نهایی | ۶۸ | ۱۰' |

محصول واکنش PCR با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR (شرکت کیاژن) بازیافت و خالص سازی شد. سپس محصول بازیافت شده توسط شرکت TAG Copenhagen (Denmark) تعیین توالی و پس از هم‌ردیف سازی موضعی (BLAST) پایگاه GenBank ثبت گردیدند.

بررسی توالی ها

هم‌ردیف سازی اولیه توالی ها با استفاده از نرم افزار ClustalW انجام گرفت و سپس با استفاده از روش Maximum Likelihood با نرم افزار Mega4 تجزیه و تحلیل گردیدند. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از برنامه Mega4 طراحی شد و با کاربرد bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار استحکام یافت.

تکرارهای خوشه شده

برای یافتن موتیف های تکراری خوشه شده در توالی ITS از ابزار Repfind (<https://zlab.bu.edu>) استفاده گردید. یافتن الگوهای خوشه ای مبتنی بر p-value می باشد که نشان می دهد احتمال این که این موتیف تکراری بر حسب تصادف یافت شده است، چقدر است. در این بررسی احتمال این که الگوهای خوشه بندی شده بر حسب تصادف بوجود آمده باشند، حداکثر یک در هزار انتخاب شده است.

یافته ها

آغازگرهای به کار رفته در این بررسی قادر به شناسایی دقیق ناحیه ITS1-5.8SrDNA-ITS2 در گونه های جنس فوزاریم هستند. استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز جهت تکثیر ناحیه فوق منجر به ایجاد قطعه ای به اندازه تقریبی ۵۵۰ جفت باز گردید (شکل ۱).

جدول ۲- توالی آغازگر ها برای تکثیر ناحیه ITS

| توالی آغازگر | آغازگر |
|-------------------------------|---------|
| 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' | ITS-1-F |
| 5'-GCATCGATGAAGAAGAACGCAGC-3' | ITS-4-R |

واکنش های زنجیره ای پلی مرز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر تیوب شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR+MgSO₄، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط dNTP ها (با غلظت ۰/۲ میلی مولار) ، یک واحد از DNA پلی مرز Pfu و یک میکرولیتر از DNA قارچ (با غلظت ۱۰۰ نانوگرم) تهیه گردید (جدول ۳).

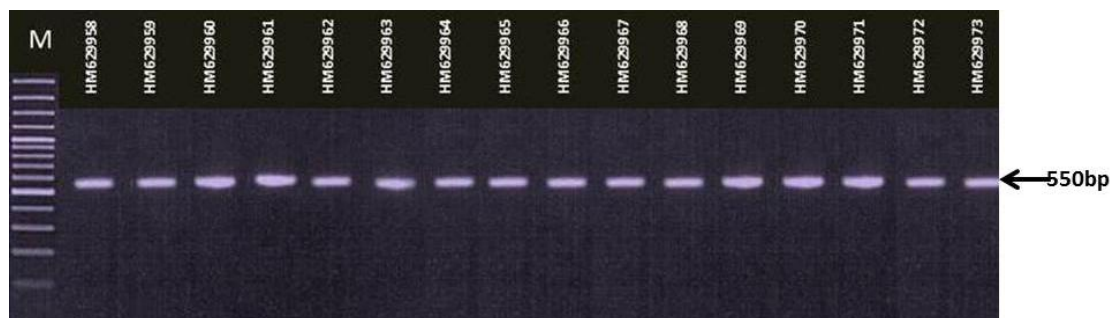
جدول ۳- مواد لازم برای انجام واکنش PCR

| غلظت نهایی | حجم واکنش (μl) | مواد |
|------------|----------------|------------------|
| ۱۰ pmol | ۱ | آغازگر F |
| ۱۰ pmol | ۱ | آغازگر R |
| ۱x | ۱۲/۵ | PCR Master Mix |
| ۱۰۰ Ng | ۱ | DNA |
| - | ۹/۵ | H ₂ O |

تمام واکنش ها از شرکت سیناژن تهیه گردید. چرخه های PCR شامل ۹۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به عنوان شروع واکنش، ۴۰ چرخه در دماهای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۸ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و در آخر واکنش یک مرحله طولی سازی رشته به مدت ده دقیقه در ۶۸ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد (جدول ۴). محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد (شکل ۲).

جدول ۴- چرخه دمایی واکنش PCR

| مرحله | تعداد چرخه | دما (°C) | زمان |
|---------------------|------------|----------|------|
| واسرشت سازی ابتدایی | ۱ | ۹۴ | ۹۰" |
| واسرشت سازی | | ۹۴ | ۳۰" |
| اتصال | ۴۰ | ۶۰ | ۳۰" |

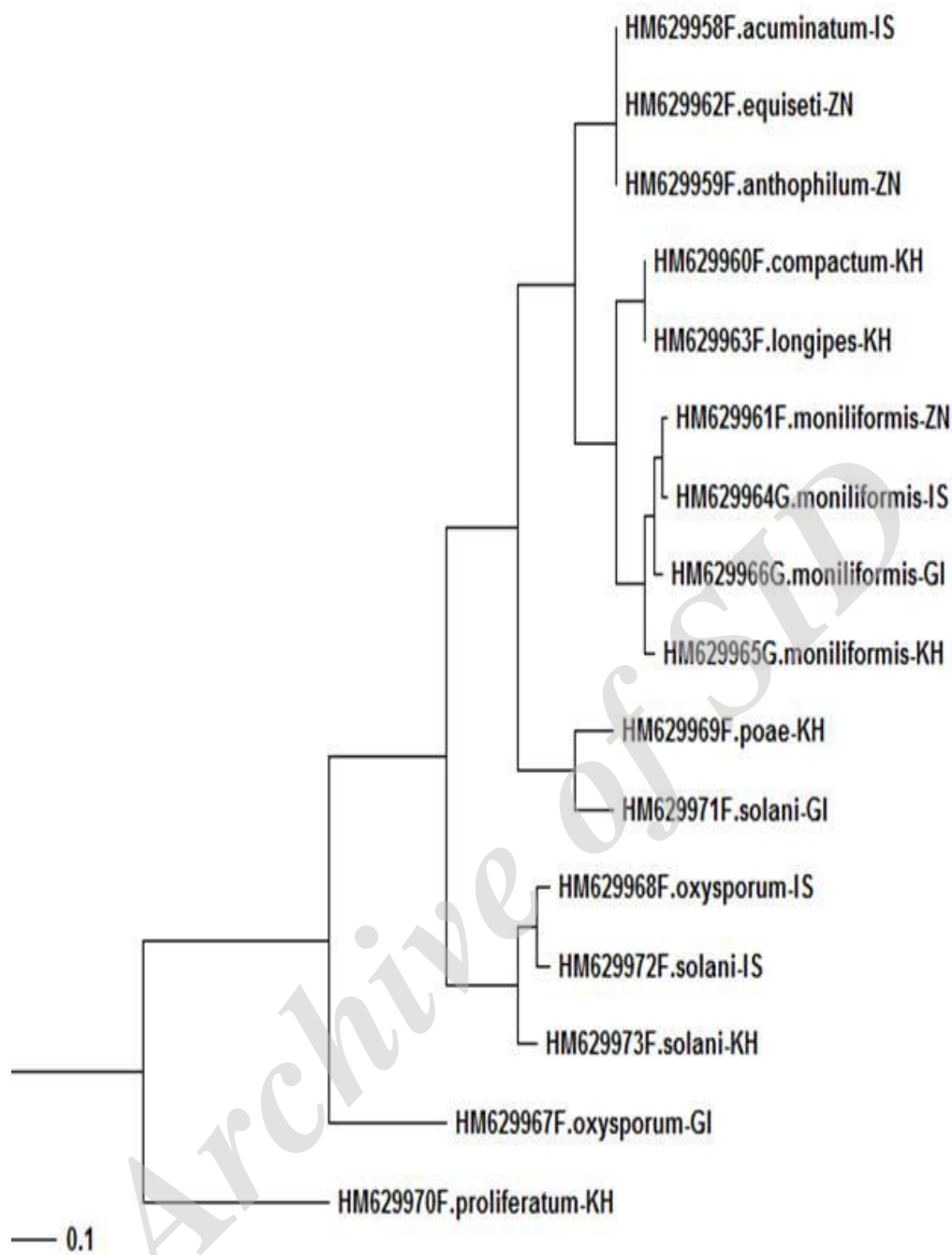


شکل ۱- محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیه ITS برای ۱۶ جدایه مورد بررسی به ترتیب از چپ به راست با شماره دست‌یابی از HM629958 تا HM629973.

به ۷ گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول شامل سه جدایه متعلق به سه گونه مختلف *acuminatum*، *equiseti* و *anthophilum* از دو استان زنجان و گروه دوم شامل *compactum* و *longipes* هر دو از استان خوزستان هستند. گروه سوم شامل چهار جدایه از چهار استان و همگی از گونه *moniliforme* هستند. گروه چهارم شامل *poae* و *solani* از دو استان خوزستان و گیلان و گروه پنجم شامل *oxysporum* و *solani* از دو استان اصفهان و گیلان هستند. دسته ششم و هفتم هر کدام با یک جدایه به ترتیب با گونه-های *oxysporum* از گیلان و *proliferatum* از خوزستان هستند.

بررسی توالی‌ها:

پس از تعیین توالی‌های به دست آمده از ناحیه ITS، توسط ClustalW هم‌ردیف شدند. نتایج هم‌ردیف سازی (شکل ۱ ضمیمه) و ماتریس شباهت‌ها (جدول ۲ ضمیمه) نشان می‌دهد، بیش‌ترین شباهت بین جدایه *acuminatum* از استان اصفهان با جدایه‌های *Equiseti* و *anthophilum* از زنجان هست. کم‌ترین شباهت مربوط به جدایه‌های *oxysporum* از گیلان و *proliferatum* از خوزستان است. فیلوگرام به دست آمده در شکل ۲ قابل رویت است. این فیلوگرام نشان می‌دهد که جدایه‌های مورد تحقیق



شکل ۲- روابط خویشاوندی جدایه های جنس فوزاریوم بر اساس توالی ناحیه ITS به روش Maximum Likelihood

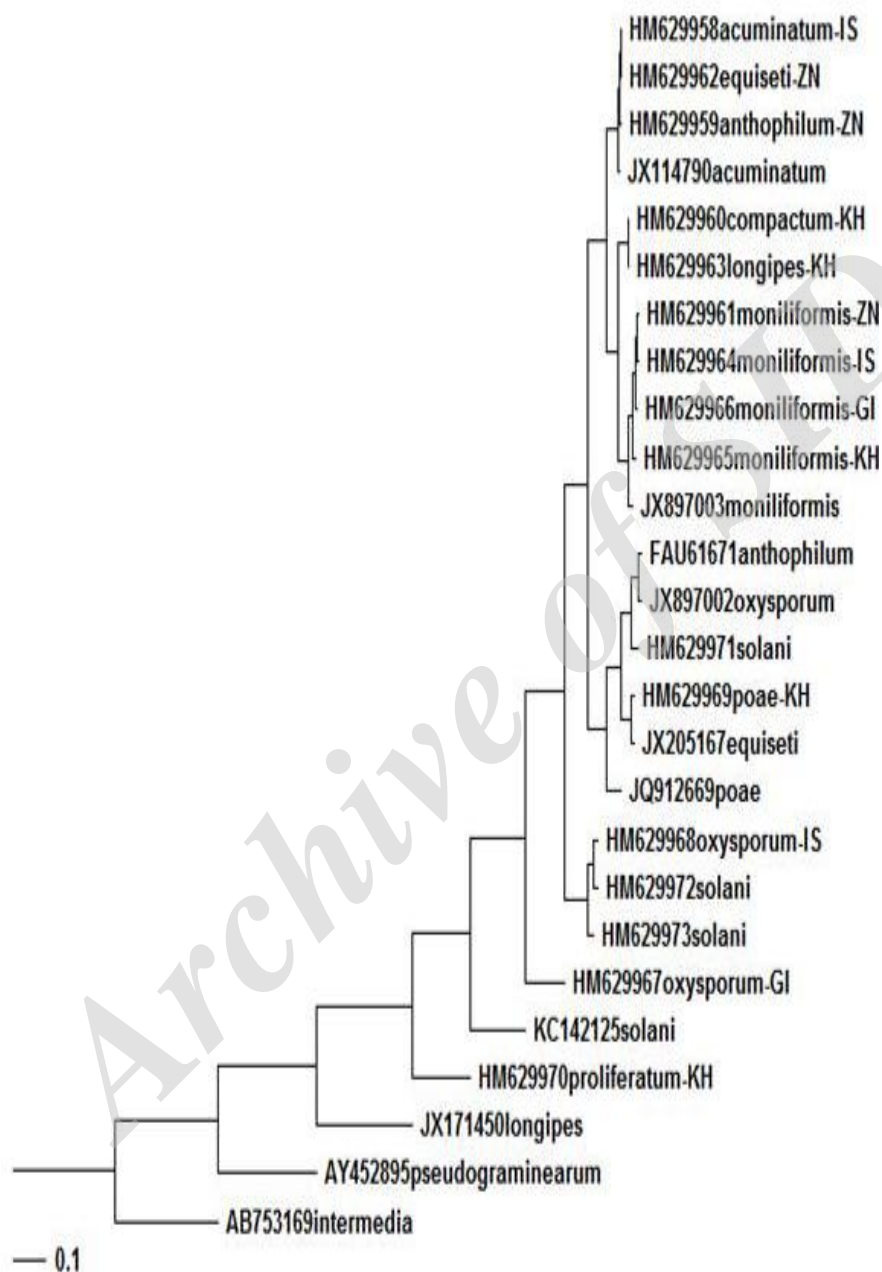
تکرارهای خوشه شده

نتیجه بررسی الگوهای تکراری خوشه شده نشان می دهد، ۳ نسخه از موتیف GAAT در همه گونه ها به جزء گونه *moniliform* و *proliferatum* دیده

می شود. الگو TAG فقط در گونه *solani* جمع آوری شده از استان خوزستان مشاهده می شود. در گونه فوق نیز ۳ نسخه از این الگو تکرار شده است. موتیف TGGTATT با خوشه سه تکراری، موتیف TTA با ۶ نسخه کلاستر شده، الگوی GAA با ۷ نسخه کلاستر

۳ تکرار خوشه شده در ناحیه ITS فقط گونه های *solani* و *oxyssporum* اصفهان دیده می شود. توالی ۴ تایی TTGG نیز در گونه های *acuaminatum* و *equiseti* وجود دارد (جدول ۲).

شده و الگوی TTTAATTA با دو نسخه تکراری فقط در گونه *proliferatum* مشاهده می شود (شکل ۴). خوشه ۳ تکراری GTGAA فقط در گونه *moniliforme* دیده می شود. موتیف TGTTTTT با



شکل ۳- درخت روابط خویشاوندی جدایه های جنس فوزاریوم مورد بررسی و توالی های منتخب از پایگاه GenBank بر اساس توالی ناحیه ITS به روش Maximum Likelihood

بحث

| | | | |
|----------|---|--------------|----------|
| 0/003410 | 2 | solani | TGTTTT |
| 0/003359 | 2 | oxysporum | TGTTTT |
| 0/003620 | 6 | proliferatum | TTA |
| 0/003620 | 4 | equiseti | TTGG |
| 0/00362 | 4 | accuminatum | TTGG |
| 0/00907 | 2 | proliferatum | TTTAATTA |

* در سایر گونه ها به جز این دو گونه مشاهده می شود

در این تحقیق ۷۰ جدایه فارچی حاصل از تک هاگها بدست آمد. جدایه های جنس فوزاریوم جهت تشخیص گونه مورد بررسی دقیق تر قرار گرفتند و بر اساس کلید شناسایی اوکوبو و همکاران (۱۳)، ۱۱ گونه مختلف شناسایی و در مجموع ۱۶ جدایه برای بررسی مولکولی انتخاب گردیدند (جدول ۱).

بررسی فیلوگرامها (شکل ۳ و ۴) نشان می دهد که جدایه های مناطق جغرافیایی مختلف، علی رغم این که به گونه های متفاوتی تعلق دارند، تا حدودی در کنار هم قرار گرفته اند. این مطلب می تواند مؤید این نظر باشد که در استان های مختلف با توجه به شرایط آب و هوایی مختلف زیرگونه های متفاوتی امکان ظهور و بروز می یابند. تنها گروهی که همگی به یک گونه تعلق دارند گروه سوم است که نشان می دهد که گونه فوق دارای تنوع کمتری نسبت به سایر گونه های مورد بررسی است و یا زیر گونه های کمتری ظهور و بروز یافته است. با توجه به شرایط آب و هوایی به طور کامل متفاوتی که در استان های مورد بررسی وجود دارد می توان گفت: شرایط آب و هوایی متفاوت سبب تنوع گونه *moniliforme* نمی تواند باشد. با توجه به این که تمام نمونه های استان گیلان در گروه های مختلف قرار دارند، می توان چنین نتیجه گرفت که شرایط آب و هوایی استان در گونه های مختلف سبب تغییرهای غیر یکسان و با دامنه وسیع تری می شود. با توجه به تهیه نمونه از خاک، ممکن است بافت خاک نیز در ایجاد تنوع بیش تر مؤثر باشد. جدایه *proliferatum* با توجه به اینکه به تنهایی در یک گروه واقع شده، شباهت کمتری با سایر گونه ها می تواند داشته باشد. داده های ریخت شناسی نیز این موضوع را تأیید می کند.

جدول ۵- موتیف های بسیار معنی دار و تعداد خوشه ها یافت شده در گونه های مختلف جنس فوزاریوم همراه با P-Value

| موتیف | گونه | تعداد خوشه | p-Value |
|---------|---------------|------------|---------|
| GAAT | Proliferatum* | 4 | 0/00356 |
| GAAT | Moniliforme* | 4 | 0/00239 |
| GTGAA | moniliforme | 3 | 0/00081 |
| TAG | solani | 3 | 0/00542 |
| TGGTATT | proliferatum | 3 | 0/00182 |

جدایه های *solani* استخراج شده از استان های اصفهان و خوزستان با جدایه *oxysprom* استخراج شده از استان اصفهان خویشاوندی نزدیک تری دارند تا جدایه *oxysporum* استخراج شده از استان گیلان. اتحاد جدایه های گونه *moniliforme* با گونه های *compactum* و *longipes* نشانه خویشاوندی این سه گونه می تواند باشد. وجود تشابه ها و رابطه خویشاوندی بین جدایه های مورد بررسی می تواند نشانگر رفتار بیماری زایی فوزاریوم های مختلف را بازتاب دهد و با توجه به گسترش جهانی جنس فوزاریوم، پراکنش آن ها می تواند با گونه های گیاهی خاص نیز مرتبط باشد.

جهت بررسی این نکته که جدایه های مورد آزمایش با کدام گونه منتخب (توالی های ثبت شده در پایگاه GenBank) شباهت بیش تری دارند، اقدام به هم-ردیف سازی توالی های فوق با توالی های استاندارد موجود در داده پایگاه انجام شد. هم ردیف سازی فوق (شکل ضمیمه ۲) و ماتریس شباهت ها (جدول ضمیمه ۲) نشان می دهد جدایه های مورد بررسی کمترین شباهت را با توالی های AB753169 از گونه *intermedia*، JX171450 از گونه *longipes* و AY452895 از گونه *pseudograminearum* و بیش ترین شباهت را با JX114790 از گونه *acuminatum* و JX897002 از گونه *oxysporum* دارند. سطح بالای تنوع بین ITS ناشی از حذف یا اضافه شدن واحدهای تکراری در ناحیه فوق است که از نظر وجود تنوع با نتایج به دست آمده از تحقیق های قبلی یکسان است (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۲۲) اما از نظر تمایز بین گونه ها با نتایج حاصل از بررسی های مورفولوژیک مطابقت ندارد.

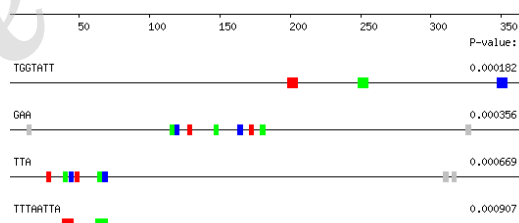
روابط خویشاوندی بین جدایه های مورد بررسی و نمونه های منتخب در شکل ۴ قابل رویت است. این

بین ۳۳ تا ۵۰ درصد خطای تشخیص وجود دارد، به طوری که تا اواخر قرن بیستم، اکثر جدایه های فوزاریم مطالعه شده توسط پاتولوژیست ها اشتباه تشخیص داده می شدند (۱۰). به هر حال استفاده از خصوصیت های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی زمان بر بوده و تنها متخصصین ماهر قادر به شناسایی گونه های جنس فوزاریم هستند (۵). با توجه خطای بالای شناسایی و تمایز گونه ها و با ملاحظه نتایج بررسی فوق، به نظر می رسد نحوه تعیین گونه های جنس فوزاریم بر اساس شیوه های کلاسیک نیازمند تجدید نظر جدی است. به عبارت بهتر توصیه می شود، شناسایی گونه ها از طریق سیستم توامان مولکولی و کلاسیک انجام پذیرد. در سالهای اخیر علی رغم وجود روش های پیشرفته، نیاز به روش های سریع، قابل اعتماد و دقیق مولکولی مبتنی بر DNA احساس می شود.

وجود موتیف های خوشه شده بی همتا در ناحیه ITS یک گونه خاص نشان می دهد که این موتیف ها می توانند به عنوان یک ابزار شناسایی گونه مورد نظر به کار روند. این شیوه می تواند مکمل روش-PCR RFLP برای شناسایی گونه های جنس فوزاریم استفاده شود که در آن محصول PCR با آنزیم های محدود کننده برش یافته و روی ژل تفاوت باند ایجاد شده گونه ها را از هم متمایز می سازد.

در حال حاضر تمایز و شناسایی گونه های جنس فوزاریم بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی انجام می گیرد. تعیین یک گونه ممکن است بر اساس تفاوت تنها یک خصوصیت باشد (۲). در این مطالعه راه کاری پیشنهاد می شود که بتوان با دقت و حساسیت بسیار بالا گونه های جنس فوزاریم را شناسایی نمود. برای این منظور پیشنهاد می شود که با تکثیر ناحیه ITS، توالی یابی آن و سپس هم ردیف سازی آن با توالی های شناخته شده، نزدیک ترین توالی را با توالی مورد نظر بازیابی نمود. هم ردیف سازی می تواند به آسانی تفاوت دو توالی نزدیک به هم را نشان دهد. هم چنین فرصتی را برای برگشتن و بررسی مجدد هر ناحیه چند شکلی را برای خطاهای بازی فراهم می سازد و استنتجاتی را به وجود می آورد که بسیار قوی تر از آنالیزهای رایج

فیلوگرام وجود ۱۱ گروه را مشخص می کند. به جز گروه سوم که همه به گونه *moniliforme* تعلق دارند، عناصر بقیه گروه ها از گونه های متفاوت تشکیل شده اند. می توان چنین نتیجه گیری کرد که گونه فوق تنوع کمتری داشته ولی سایر گونه های مورد بررسی در این تحقیق هم در داخل و هم در سطح جهانی دارای تنوع بیشتری هستند. همه نمونه های مربوط به گونه *acuminatum* در گروه اول همراه با جدایه های متعلق به دو گونه مختلف *equiseti* و *anthophilum* قرار گرفته اند. دوباره گروه دوم شامل دو جدایه از *compactum* و *longipes* هستند. گروه چهارم شامل گونه های متفاوت *anthophilum*، *oxysporum*، *equiseti*، *poae* و *solani* هستند. دو جدایه از گونه *solani* در گروه پنجم همراه با یک جدایه از گونه *oxysporum* دیده می شوند. دسته های ششم تا یازدهم نیز هر کدام با یک جدایه گروه بندی شده اند. جدایه های داخلی در مقایسه با جدایه های خارجی تمایل بیشتری دارند تا در یک گروه قرار گیرند.



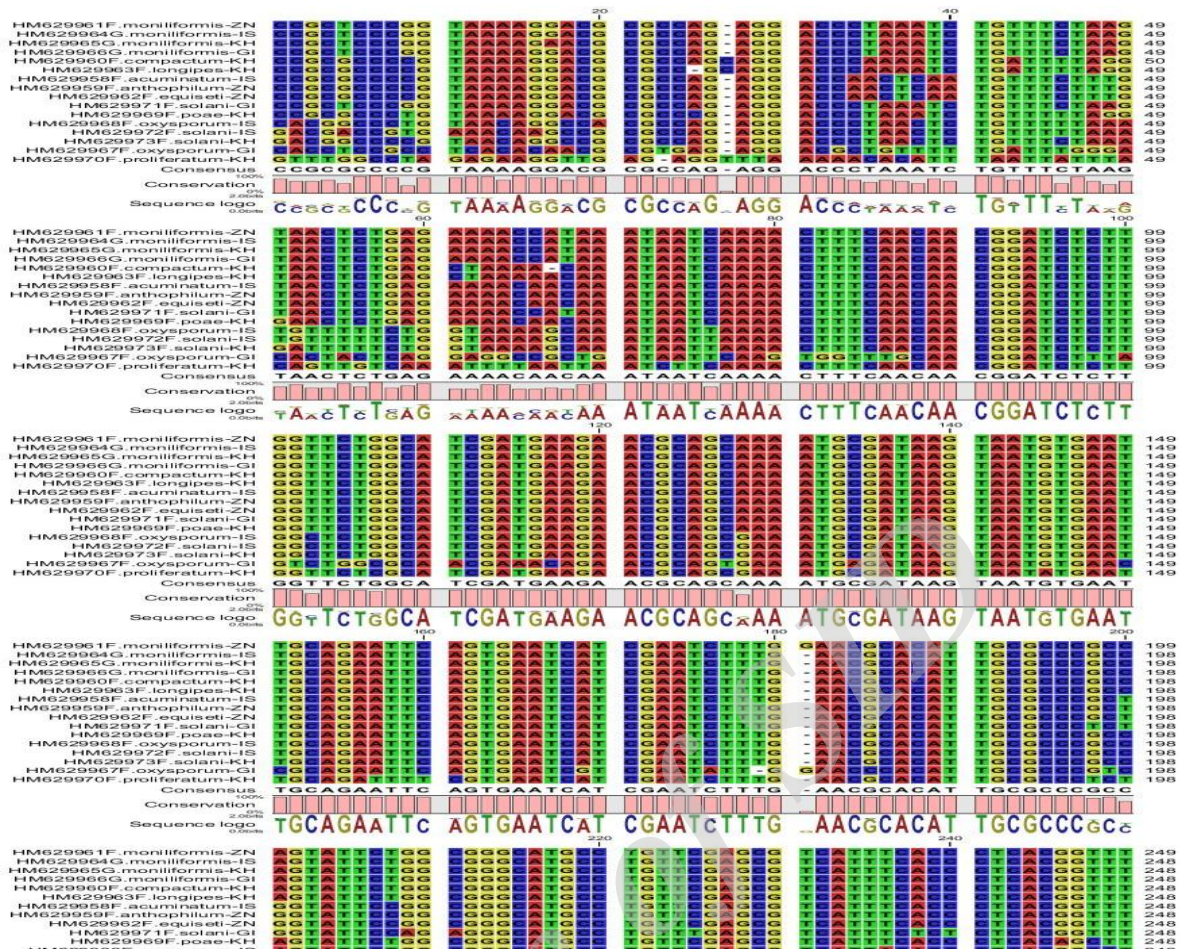
شکل ۴- موتیف های مختلف معنی دار در توالی گونه *proliferatum*

نتیجه گیری

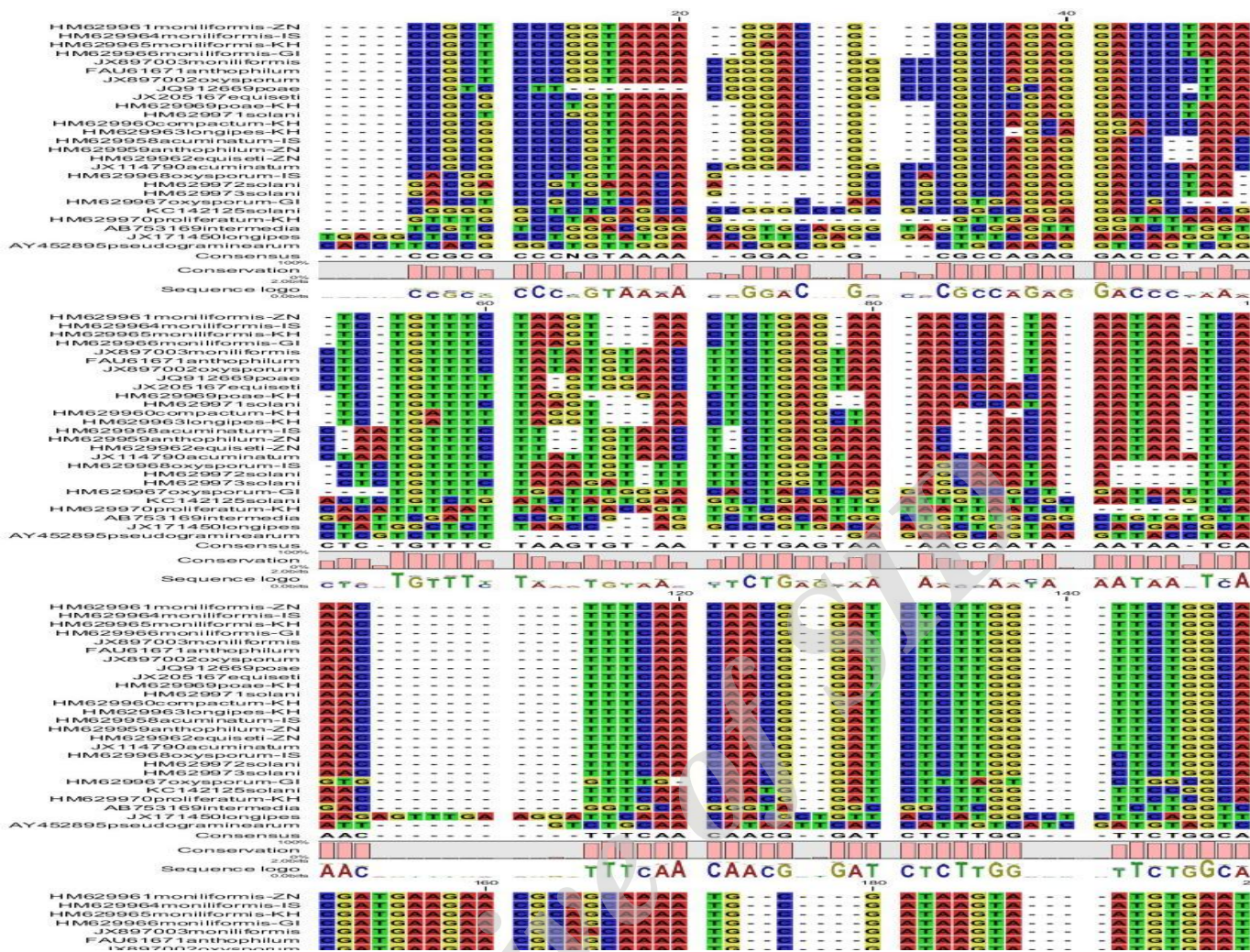
شرایط متفاوت آب و هوایی و خاک می توانند سبب تنوع گونه ها شوند. در بعضی از استان ها مثل گیلان، شرایط آب و هوایی، سبب تغییرهای غیریکسان و با دامنه وسیع تر می شود.

فوزاریم یکی از جنس های بسیار گسترده و پیچیده قارچی است که اکثر جدایه های آن را نمی توان فقط با سیستم تشخیص کلاسیک و مرسوم به درستی تشخیص داد (۲۲، ۵). در شیوه کلاسیک به طور معمول

است. قدرت این استنباطها به میزان توالی قابل دسترس و میزان محتوی اطلاعات سودمند دارد. اگر توالی مورد بررسی با یک توالی استاندارد ثبت شده مطابقت کامل داشته باشد یا تطابق بسیار بالایی داشته باشد، جدایه مورد نظر شناسایی شده است. در چنین حالتی پلی مورفیسم نوکلئوتیدی اندکی دیده می شود. در این موارد، با هم ردیف سازی و کلیدهای مورفولوژیکی می توان شناسایی گونه جنس فوزاریم را انجام داد. برای تأیید گونه شناسایی شده آنالیز فیلوژنتیکی توالی ITS هم زمان با توالی ژن های رمز کننده پروتئین غنی از اینترون توصیه می شود. متأسفانه به علت نداشتن پایگاه اطلاعاتی دقیق و کمبود یا نبود اطلاعات مورفولوژیکی و مولکولی بعضی از گونه ها، امکان شناسایی گونه های جنس فوزاریم با چالش بزرگی روبرو است.



شکل ۱ ضمیمه - همریف سازی جداییه های مورد بررسی



شکل ۲ ضمیمه- همدریف سازی جدایه های مورد بررسی همراه با توالی های منتخب

جدول ۱ ضمیمه - ماتریس شباهت‌ها برای جدایه های مورد بررسی

| | HM629958 | HM629962 | HM629959 | HM629960 | HM629963 | HM629961 | HM629964 | HM629965 | HM629966 | HM629968 | HM629972 | HM629973 | HM629969 | HM629971 | HM629967 | HM629970 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| HM629958 | | 100 | 100 | 92 | 92 | 91 | 92 | 92 | 91 | 84 | 84 | 86 | 87 | 87 | 74 | 64 |
| HM629962 | 100 | | 100 | 92 | 92 | 91 | 92 | 92 | 91 | 84 | 84 | 86 | 87 | 87 | 74 | 64 |
| HM629959 | 100 | 100 | | 91 | 91 | 91 | 92 | 92 | 91 | 85 | 85 | 86 | 88 | 87 | 74 | 64 |
| HM629960 | 92 | 92 | 91 | | 99 | 93 | 94 | 94 | 93 | 86 | 86 | 87 | 89 | 87 | 75 | 63 |
| HM629963 | 92 | 92 | 91 | 99 | | 93 | 94 | 94 | 93 | 86 | 86 | 87 | 89 | 87 | 75 | 63 |
| HM629961 | 91 | 91 | 91 | 93 | 93 | | 99 | 98 | 98 | 86 | 84 | 86 | 90 | 90 | 76 | 63 |
| HM629964 | 92 | 92 | 92 | 94 | 94 | 99 | | 99 | 98 | 86 | 86 | 88 | 90 | 91 | 76 | 63 |
| HM629965 | 92 | 92 | 92 | 94 | 94 | 98 | 99 | | 97 | 86 | 86 | 88 | 90 | 91 | 77 | 63 |
| HM629966 | 91 | 91 | 91 | 93 | 93 | 98 | 98 | 97 | | 88 | 86 | 88 | 90 | 91 | 78 | 63 |
| HM629968 | 84 | 84 | 85 | 86 | 86 | 86 | 86 | 86 | 88 | | 97 | 96 | 86 | 83 | 81 | 62 |
| HM629972 | 84 | 84 | 85 | 86 | 86 | 84 | 86 | 86 | 86 | 97 | | 97 | 84 | 81 | 81 | 62 |
| HM629973 | 86 | 86 | 86 | 87 | 87 | 86 | 88 | 88 | 88 | 96 | 97 | | 86 | 83 | 82 | 62 |
| HM629969 | 87 | 87 | 88 | 89 | 89 | 90 | 90 | 90 | 90 | 86 | 84 | 86 | | 92 | 75 | 62 |
| HM629971 | 87 | 87 | 87 | 87 | 87 | 90 | 91 | 91 | 91 | 83 | 81 | 83 | 92 | | 72 | 65 |
| HM629967 | 74 | 74 | 74 | 75 | 75 | 76 | 76 | 77 | 78 | 81 | 81 | 82 | 75 | 72 | | 53 |
| HM629970 | 64 | 64 | 64 | 63 | 63 | 63 | 63 | 63 | 63 | 62 | 62 | 62 | 62 | 65 | 53 | |

تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی دوره هشتم شماره سی ام - تجزیه و تحلیل ..

جدول ۲ ضمیمه- ماتریس شباهت‌ها برای جدایه های مورد بررسی و جدایه های منتخب

| | HM629958 | HM629962 | HM629959 | HM629960 | HM629963 | JX114790 | FAU61671 | JX897002 | HM629961 | HM629964 | HM629969 | JX205167 | HM629965 | JX897003 | HM629966 | HM629968 | HM629972 | HM629973 | HM629971 | JQ912669 | HM629967 | KC142125 | HM629970 | AY452895 | AB753169 | JX171450 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| HM629958 | 100 | 100 | 100 | 94 | 94 | 99 | 88 | 87 | 93 | 94 | 89 | 88 | 94 | 92 | 93 | 87 | 87 | 88 | 88 | 85 | 76 | 70 | 69 | 45 | 41 | 45 |
| HM629962 | 100 | 100 | 100 | 94 | 94 | 99 | 88 | 87 | 93 | 94 | 89 | 88 | 94 | 92 | 93 | 87 | 87 | 88 | 88 | 85 | 76 | 70 | 69 | 45 | 41 | 45 |
| HM629959 | 100 | 100 | 100 | 94 | 94 | 98 | 88 | 87 | 93 | 94 | 89 | 89 | 94 | 92 | 93 | 87 | 87 | 88 | 88 | 85 | 76 | 70 | 69 | 45 | 41 | 45 |
| HM629960 | 94 | 94 | 94 | 100 | 100 | 93 | 89 | 89 | 94 | 95 | 90 | 90 | 94 | 94 | 93 | 87 | 87 | 88 | 88 | 87 | 78 | 69 | 69 | 44 | 42 | 44 |
| HM629963 | 94 | 94 | 94 | 100 | 100 | 93 | 89 | 89 | 94 | 95 | 90 | 90 | 94 | 94 | 93 | 87 | 87 | 88 | 88 | 87 | 78 | 69 | 69 | 44 | 42 | 45 |
| JX114790 | 99 | 99 | 98 | 93 | 93 | 100 | 86 | 86 | 92 | 92 | 87 | 87 | 93 | 91 | 91 | 86 | 86 | 87 | 86 | 84 | 75 | 68 | 67 | 43 | 40 | 44 |
| FAU61671 | 88 | 88 | 88 | 89 | 89 | 86 | 100 | 99 | 92 | 92 | 94 | 95 | 92 | 93 | 91 | 85 | 84 | 85 | 95 | 91 | 75 | 65 | 65 | 42 | 40 | 44 |
| JX897002 | 87 | 87 | 87 | 89 | 89 | 86 | 99 | 100 | 92 | 91 | 95 | 95 | 91 | 92 | 91 | 86 | 84 | 85 | 96 | 91 | 75 | 65 | 65 | 41 | 39 | 44 |
| HM629961 | 93 | 93 | 93 | 94 | 94 | 92 | 92 | 92 | 100 | 99 | 91 | 90 | 98 | 98 | 99 | 89 | 87 | 88 | 91 | 87 | 78 | 68 | 68 | 43 | 42 | 45 |
| HM629964 | 94 | 94 | 94 | 95 | 95 | 92 | 92 | 91 | 99 | 100 | 91 | 90 | 99 | 98 | 98 | 88 | 88 | 89 | 90 | 87 | 78 | 69 | 68 | 44 | 42 | 45 |
| HM629969 | 89 | 89 | 89 | 90 | 90 | 87 | 94 | 95 | 91 | 91 | 100 | 98 | 90 | 89 | 91 | 87 | 85 | 86 | 92 | 93 | 76 | 68 | 64 | 43 | 39 | 45 |
| JX205167 | 88 | 88 | 89 | 90 | 90 | 87 | 95 | 95 | 90 | 90 | 98 | 100 | 90 | 90 | 90 | 85 | 84 | 86 | 92 | 92 | 76 | 67 | 65 | 42 | 39 | 44 |
| HM629965 | 94 | 94 | 94 | 94 | 94 | 93 | 92 | 91 | 98 | 99 | 90 | 100 | 100 | 97 | 97 | 88 | 88 | 90 | 90 | 87 | 79 | 69 | 68 | 43 | 42 | 45 |
| JX897003 | 92 | 92 | 92 | 94 | 94 | 91 | 93 | 92 | 98 | 98 | 89 | 90 | 97 | 100 | 97 | 87 | 85 | 87 | 89 | 87 | 77 | 67 | 66 | 42 | 40 | 44 |
| HM629966 | 93 | 93 | 93 | 93 | 93 | 91 | 91 | 91 | 99 | 98 | 91 | 90 | 97 | 97 | 100 | 90 | 88 | 90 | 90 | 87 | 80 | 69 | 68 | 44 | 42 | 45 |
| HM629968 | 87 | 87 | 87 | 87 | 87 | 86 | 85 | 86 | 89 | 88 | 87 | 85 | 88 | 87 | 90 | 100 | 97 | 96 | 85 | 82 | 82 | 70 | 64 | 44 | 41 | 45 |
| HM629972 | 87 | 87 | 87 | 87 | 87 | 86 | 84 | 84 | 87 | 88 | 85 | 84 | 88 | 85 | 88 | 97 | 100 | 97 | 83 | 81 | 82 | 69 | 64 | 44 | 41 | 44 |
| HM629973 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 87 | 85 | 85 | 88 | 89 | 86 | 86 | 90 | 87 | 90 | 96 | 97 | 100 | 84 | 83 | 82 | 70 | 64 | 43 | 41 | 44 |
| HM629971 | 88 | 88 | 88 | 88 | 88 | 86 | 95 | 96 | 91 | 90 | 92 | 92 | 90 | 89 | 90 | 85 | 83 | 84 | 100 | 88 | 74 | 68 | 69 | 42 | 40 | 46 |
| JQ912669 | 85 | 85 | 85 | 87 | 87 | 84 | 91 | 91 | 87 | 87 | 93 | 92 | 87 | 87 | 87 | 82 | 81 | 83 | 88 | 100 | 73 | 65 | 64 | 44 | 38 | 43 |
| HM629967 | 76 | 76 | 76 | 78 | 78 | 75 | 75 | 75 | 78 | 78 | 76 | 76 | 79 | 77 | 80 | 82 | 82 | 82 | 74 | 73 | 100 | 59 | 57 | 40 | 38 | 41 |
| KC142125 | 70 | 70 | 70 | 69 | 69 | 68 | 65 | 65 | 68 | 69 | 68 | 67 | 69 | 67 | 69 | 70 | 69 | 70 | 68 | 65 | 59 | 100 | 60 | 37 | 37 | 37 |
| HM629970 | 69 | 69 | 69 | 69 | 69 | 67 | 65 | 65 | 68 | 68 | 64 | 65 | 68 | 66 | 68 | 64 | 64 | 64 | 69 | 64 | 57 | 60 | 100 | 38 | 38 | 39 |
| AY452895 | 45 | 45 | 45 | 44 | 44 | 43 | 42 | 41 | 43 | 44 | 43 | 42 | 43 | 42 | 44 | 44 | 44 | 43 | 42 | 44 | 40 | 37 | 38 | 100 | 31 | 29 |
| AB753169 | 41 | 41 | 41 | 42 | 42 | 40 | 40 | 39 | 42 | 42 | 39 | 39 | 42 | 40 | 42 | 41 | 41 | 41 | 40 | 38 | 38 | 37 | 38 | 31 | 100 | 32 |
| JX171450 | 45 | 45 | 45 | 44 | 45 | 44 | 44 | 44 | 45 | 45 | 45 | 44 | 45 | 44 | 45 | 45 | 44 | 44 | 46 | 43 | 41 | 37 | 39 | 29 | 32 | 100 |

جدول ضمیمه ۳ - الگو های بسیار معنی دار و تعداد تکرار آنها در توالی ITS در گونه های مختلف جنس فوزاریوم

| موتیف | گونه فوزاریوم | acuminatum | anthophilum | compactum | Fusarium sp | equiseti | longipes | moniliforme | moniliforme | moniliforme | moniliforme | oxysporum | poae | proliferatum | solani | solani | solani |
|----------|---------------|------------|-------------|-----------|-------------|----------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|------|--------------|--------|--------|--------|
| AAC | | 6 | 6 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AAT | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 |
| CAA | | 5 | 5 | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GAA | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 8 | 0 | 7 | 0 | 8 | 8 |
| GAAT | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 4 | 4 | 0 | 4 | 4 | 4 |
| GTA | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| GTGAA | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TAG | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| TGGTATT | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| TGTTTTT | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| TTA | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| TTGG | | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TTTAATTA | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |

منابع

1. بیکی ا، جهانشاهی ا، صفایی ن احمدی ج. بررسی روابط فیلوژنتیکی قارچ *Fusarium graminearum sensu lato* در ایران با استفاده از آنالیز توالی MAT. ۱۳۸۹. ژنتیک نوین: ۳(۱۵): ۹۳-۹۸.
2. Brasileiro B T R V, Coimbra M R M, Morais Jr, M A d, Oliveira N T. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. *Braz J Microbiol.* 2004; 35(3): 205-210.
3. Bruns TD, White T J, Taylor J W. Fungal molecular systematics. *Annu Rev Ecol Evol Syst.*1991; 22 : 525-564.
4. Gardiner DM, Kazan K Manners JM. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol.* 2009; 46: 604-613.
5. Geiser D M, del Mar Jiménez-Gasco M, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward T J, Zhang N, Kuldau G A, O'Donnell, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol.* 2004; 110: 473-479.
6. Goswami R S, Kistler H C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology.* 2004; 5(6): 515-525.
7. Lattanzio V M, Visconti A, Haidukowski M, Pascale M. Identification and characterization of new *Fusarium* masked mycotoxins, T2 and HT2 glycosyl derivatives, in naturally contaminated wheat and oats by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2012; 47(4): 466-475.
8. Leslie J F, Summerell B A. *The Fusarium laboratory manual.* Blackwell publishing. 2006
9. Llorens A, Hinojo M, Mateo R, Gonzalez-Jaen M, Valle-Algarra F, Logrieco A, Jiménez M. Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *Int J Food Microbiol.* 2006; 106(3): 297-306.
10. O'Donnell K, Humber R A, Geiser D M, Kang S, Park B, Robert V A, Crous P W, Johnston P R, Aoki T, Rooney A P, Rehner S A. Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLST. *Mycologia.* 2012; 104(2): 427-445.
11. O'Donnell K, Sutton D A, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi M G, Brandt M E, Zhang N, Geiser D M. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(8): 2477-2490.
12. O'Donnell K, Ward T J, Geiser D M, Corby Kistler H, Aoki T. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet Biol.* 2004; 41(6): 600-623.
13. Okubo Y, Shinozaki M, Wakayama M, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Nemoto T, Naobumi T, Shibuya K. Applied gene histopathology: identification of *Fusarium* species in FFPE tissue sections by in situ hybridization, *Fungal Diagnostics.* Springer 2013.141-147.
14. Richardson M D, Warnock D W. *Fungal infection: diagnosis and management.* John Wiley and Sons. 2012.
15. Salazar O, Julian M, Rubio V. Primers based on specific rDNA-ITS sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG 2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia*. *Mycol Res.* 2000; 104(03): 281-285.
16. Sangalang A, Burgess L, Backhouse D, Duff J, Wurst M. 1995. Mycogeography of *Fusarium* species in soils from tropical, arid and mediterranean regions of Australia. *Mycol Res.* 1995; 99(5): 523-528.
17. Sever Z, Ivic D, Kos T, Milicevic T. Identification of fusarium species isolated from stored apple fruit in croatia. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2012; 63(4): 463-470.
18. Taylor J W, Jacobson D J, Kroken S, Kasuga T, Geiser D M, Hibbett D S, Fisher M C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol.* 2000; 31(1): 21-32.
19. White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols :a guide to methods and applications.* 1990; 18: 315-322.
20. Worrall J J. *Structure and dynamics of fungal populations.* Springer.1999.
21. Yun S-H, Arie T, Kaneko I, Yoder O, Turgeon B G. Molecular Organization of Mating Type Loci in Heterothallic ,Homothallic, and Asexual *Gibberella Fusarium* Species. *Fungal Genet Biol.* 2000; 31(1): 7-20.
22. Zarrin M, Ganj F, Faramarzi S. Analysis of the rDNA internal transcribed spacer region of the *Fusarium* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Biomed Rep.*2016; (4): 471-474.