

## شناسایی گونه سارکوسیستیس ژیگانتیه آ با روش PCR-RFLP

عبدالحسین دلیمی اصل\* فاطمه جالوسیان فرید تحویلدار بیدرونی فاطمه غفاری فر

گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران-ایران.

(دریافت مقاله: ۱۲ مهرماه ۱۳۸۷، پذیرش نهایی: ۱۲ مهرماه ۱۳۸۸)

### چکیده

انگل سارکوسیست، یکی از مهمترین تک یاخته های متعلق به شاخه اپی کمپلکسا (Apicomplexa) می باشد که در بین حیوانات خون گرم در کلیه نقاط جهان شایع است. در مطالعه حاضر با استفاده از تکثیر قطعه ژن 18SrRNA و برش آنژیومی، گونه سارکوسیستیس ژیگانتیه آ مورد شناسایی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا کیست های ماکروسکوپی سارکوسیستیس از عضلات مری و عضلات بین دنده ای گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه شهر یار جمع آوری شدند. سپس DNA انگل با روش فنل - کلروفرم استخراج شد و قطعه ژن 18S rRNA با استفاده از پرایمر طراحی شده به روش PCR تکثیر شد. در نهایت این قطعه با آنزیم های MspI و MboI برش داده شد. با توجه به مشخصات باندهای برش شده با آنزیم، تمامی نمونه ها سارکوسیستیس ژیگانتیه آ تعیین شدند. این اولین گزارش تشخیص مولکولی سارکوسیستیس ژیگانتیه آ در ایران است.

واژه های کلیدی: سارکوسیستیس ژیگانتیا، گوسفند، PCR-RFLP، ایران.

مورد مطالعه قرار دادند. آن ها چنین نتیجه گیری کردند که الگوی ایزو آنژیومی روش مناسب و قوی برای تشخیص گونه های مختلف سارکوسیستیس است و دریافتند که این روش می تواند تفاوت های ژنتیکی بین گونه را بطور غیر مستقیم نشان دهد زیرا که تفاوت الگوی الکترو فورز ایزو آنزیم ها ناشی از تفاوت در ترادف بازهاست و باعث تفاوت در ترادف اسیدهای آمینه و نهایتاً در پروتئین ها می شود این تفاوت باعث تغییر در شارژ ملکول ها شده و در نتیجه در حرکت الکترو فورزی تغییر نشان می دهد و بدین ترتیب تغییرات گونه ها مشاهده می شود (۱۰).

برخلاف روش ایزو آنژیومی، امروزه با استفاده از روش های ملکولی می توان مستقیماً تفاوت های ژنتیکی را شناخت و براساس این تفاوت، گونه ها را از یکدیگر متمایز نمود. مطالعات برخی از محققان در نقاط مختلف جهان نشان داد که مقایسه ترادف ژن rRNA (small subunit) که بخشی از ژن 18S rRNA است برای بررسی رابطه فیلوژنتیک گونه های سارکوسیستیس با یکدیگر و با سایر کوکسیدیاهای کیست زا مانند توکسوپلازما گوندی و نئوسپورا کنینوم بسیار نتیجه بخش است. در این رابطه می توان به مطالعات Tenter و همکاران در سال ۱۹۹۲، Holmdahl و همکاران در سال ۱۹۹۳، Tenter و همکاران در سال ۱۹۹۴، Tenter در سال ۱۹۹۵، Jeffries و همکاران در سال ۱۹۹۶، Joachim و همکاران در سال ۱۹۹۶، ماگریچ و همکاران در سال ۱۹۹۹ و Heckerth و Tenter در سال ۱۹۹۹ و Yang و همکاران در سال ۲۰۰۲ اشاره کرد (۵، ۸، ۹، ۱۳، ۱۵، ۱۷).

در ایران علیرغم شیوع سارکوسیستیس در دام های مختلف، تاکنون گزارشی در مورد شناسایی گونه های انگل باروش مولکولی ارائه نشده است. در مطالعه حاضر با استفاده از تکثیر قطعه ژن 18S rRNA و برش آنژیومی، گونه سارکوسیستیس ژیگانتیه آ گوسفندان مورد شناسایی قرار گرفت.

### مقدمه

سارکوسیستیس یکی از شایع ترین انگل های آلوده کننده دام ها در سرتاسر جهان است (۴) شیوع آن در دام هایی مانند گاو، گوسفند و بز در برخی نقاط ایران تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۱). گوسفند میزبان واسط چهارگونه سارکوسیستیس است: سارکوسیستیس تنلا (مترادف سارکوسیستیس اوی کنیس)، سارکوسیستیس ژیگانتیه آ (مترادف سارکوسیستیس اوی فلیس) و سارکوسیستیس آریتی کنیس که همگی انتشار جهانی دارند و همچنین آلودگی با سارکوسیستیس مدوزی فورمیس که تنها از استرالیا و نیوزیلند و ایران گزارش شده است (۲، ۱۱). سارکوسیستیس ژیگانتیه آ و سارکوسیستیس مدوزی فورمیس توسط گربه سانان انتقال می یابند و بیماریزا نیستند. ولی سارکوسیستیس تنلا و سارکوسیستیس آریتی کنیس که توسط سگ سانان منتقل می شوند بیماریزا هستند (۴، ۱۶).

سارکوسیستیس در بدن میزبان واسط بصورت کیست های عضلانی ظاهر می شود. اندازه و شکل کیست در ارتباط با گونه انگل متفاوت است. برخی از کیست ها میکروسکوپی و برخی دیگر ماکروسکوپی و به اشکال رشته ای یا شبیه دانه برنج یا کروی می باشند. سابقاً گونه های سارکوسیستیس را براساس خصوصیات مرفولوژی کیست ها (تصویر، اندازه و ضخامت دیواره) و میزبان واسط اختصاصی طبقه بندی می کردند. در سال ۱۹۷۲ طبقه بندی جدیدی براساس اختصاصی بودن میزبان نهایی انگل ارائه گردید (۳) ولی بعدها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ثابت شد که موضوع اختصاصی بودن برخی از گونه ها با میزبانان خاص فاقد جامعیت لازم است (۳)

در اواخر دهه ۱۹۸۰ روش ایزو آنزیم برای آزمایش ارتباط ژنتیکی تعدادی از گونه های بیماری زا یا غیر بیماریزا سارکوسیستیس گوسفند و بز، گاو و موش استفاده شد. در سال ۱۹۸۶ Donghue & Ford "O" ارتباط ویژگی های بیوشیمیایی و ریخت شناسی را برای تشخیص گونه های سارکوسیستیس



پس از پایان تکثیر، ۵ میکرولیتر از محصول PCR بروی ژل آگارز ۰/۸ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید. باندهای حاصل به وسیله ترانس لامیناتور قرائت، عکس برداری و مورد بررسی قرار گرفتند.

**افزودن آنزیم‌های برش دهنده برای RFLP:** طبق روش شرکت سازنده آنزیم، مقادیر ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR و ۲ میکرولیتر از بافر ۱۰X آنزیم و مقادیر ۵ الی ۱۰ واحد آنزیم‌های MboI و MspI و مانده آب مقطر استریل اضافه شد تا حجم نهایی واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس به مدت ۱۰،۴ و ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت.

**الکتروفورز نمونه‌های RFLP شده بروی ژل آگاروز:** ابتدا ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید تهیه شد. محصول PCR نمونه‌ها، بدون آنزیم و پس از افزودن آنزیم در چاهک‌ها کنار هم در سمت کاتدود شدند و به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت در دمای اتاق الکتروفورز شدند. سپس از باندها عکس برداری شد و باندها مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

### نتایج

طبق نتایج بدست آمده همه یکصد نمونه مورد آزمایش دارای باند مشابه بوده‌اند. تصویر ۱، نتایج الکتروفورز محصول PCR قطعه ژن تکثیر شده 18S rRNA سارکوسیتیس را نشان می‌دهد. اندازه همه باندها ۹۷۵ جفت بازی است.

در گونه ژینگانه آ، آنزیم MboI جایگاه ۷۱۵ و آنزیم MspI جایگاه ۶۶ قطعه ژن تکثیر شده 18S rRNA سارکوسیتیس را برش میزنند پس انتظار می‌رود در مورد اول باندهای ۲۵۹ و ۷۱۵ جفت بازی و در مورد دوم باندهای ۶۶ و ۹۰۸ جفت باز مشاهده شود.

با توجه به تصویر (۲) و پس از برش با آنزیم MboI باندهایی واضح در نواحی ۲۵۹ و ۷۱۵ جفت بازی و پس از برش با آنزیم MspI یک باند واضح در ناحیه ۹۰۸ جفت بازی مشاهده شد که این حالت مطابق با الگوی سارکوسیتیس ژینگانه آ است. همه نمونه‌ها الگوی واحدی را نشان دادند.

### بحث

امروزه برای تشخیص گونه‌های سارکوسیتیس از روش‌های مولکولی استفاده می‌شود از این روش حتی برای تشخیص آلودگی در دام زنده هم می‌توان استفاده کرد (۵). هدف از مطالعه حاضر معرفی یک روش حساس و اختصاصی برای شناسایی گونه‌های سارکوسیتیس مربوط به کیست‌های بزرگ در گوسفندان از طریق تکثیر ژن ssu rRNA انگل مورد مطالعه بوده است. این ژن برای تشخیص گونه‌های مختلف انگل کاملاً اختصاصی است (۱۴). بر همین اساس آزمایش PCR مبتنی بر تکثیر این ژن از کارآمدی خوبی برای تشخیص گونه‌های انگل برخوردار است. و چون اختلاف کمی بین گونه‌های مختلف انگل وجود دارد (۱۳) لذا با انتخاب آنزیم مناسب و انجام RFLP می‌توان گونه‌های مختلف انگل را شناسایی کرد. محققین متعددی از این شیوه برای شناسایی گونه‌ها استفاده کرده‌اند (۱۳-۱۵ و ۸،

### مواد و روش کار

**جدا کردن و آماده سازی کیست‌ها:** با مراجعه به یکی از کشتارگاه‌های شهرستان شهریار کرج عضلات بین دنده‌ای و مری آلوده به سارکوسیتیس از لاشه گوسفندان کشتارگاه جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. سارکوسیتیس‌ها که با چشم براحتی مشاهده می‌شدند با اسکالپر بدقت از عضله خارج شده و در ظروف جداگانه جمع آوری شدند سپس سارکوسیتیس‌ها ابتدا یکبار با نرمال سالین استریل و دو بار با بافر TE (10mM Tris-HCL, 1mMEDTA) (pH 8) شستشوداده شدند. مجموعاً تعداد یکصد کیست بزرگ از بیست راس گوسفند مورد مطالعه قرار گرفتند.

**استخراج DNA ژنومی:** برای استخراج DNA، ابتدا انگل را سه بار با روش ذوب و انجماد سریع له کرده، پس از سانتریفیوژ کردن آن، رسوب حاصل را به بافر لیز (0.2% sodium dodecyl sulfate, mM sodium citrate, 15 450mM NaCl) حاوی پروتئیناز K مخلوط و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. سپس با استفاده از روش فنل کلروفرم DNA انگل استخراج و در اتانل رسوب داده شد و در بافر TE نگهداری شد (۱۲).

**طراحی و انتقال پرایمرهای PCR:** توالی نوکلئوتیدی کامل ژن rRNA 18S سارکوسیتیس تنلا (Accession no. L24383) و سارکوسیتیس آریتی کنیس (Accession no. L24382) و سارکوسیتیس ژینگانه آ (Accession no. L24384) از انتخاب شد. سپس با استفاده از این توالی‌های نوکلئوتیدی، به کمک نرم افزار Gene Runner یک جفت پرایمر طراحی شد. طول بهینه بازها در پرایمرها حدود ۲۱ باز می‌باشد و دمای ذوب مطلوب ۶۰-۵۸ درجه سانتیگراد و نسبت GC تقریباً ۶۰ درصد بوده است.

**توالی پرایمرها:**

Sarco F 5' - GCT TTCGAC GGT AGTGTG TTTG -3'

Sarco R 5' - TCAAGAAAG AGCTAT CAAT CTG -3'

**شرایط PCR:**

۱- یک سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه

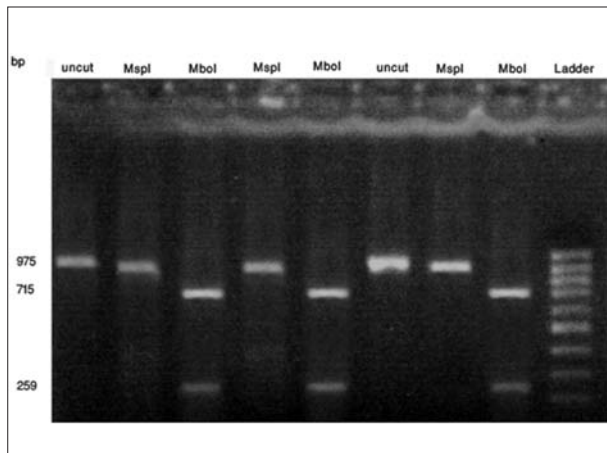
۲- ۳۰ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه

۳- ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه

۴- نگهداری در ۴ درجه سانتیگراد

**بهینه سازی پارامترهای PCR - برای تهیه محلول واکنش (PCR Mixed)** بروش زیر عمل شد- در ۳۰ میکرولیتر محلول واکنش: بافر ۱۰X Tris-HCl, 50 mM potassium chloride, 0.1% Triton X-100) 1.75mM، 10mM، 0.1 mM برای هریک از بازهای dNTP و 100pmol از هر پرایمر و ۱۰ میکرولیتر از DNA و ۱/۵ واحد آنزیم تک پلی مراز استفاده شد.



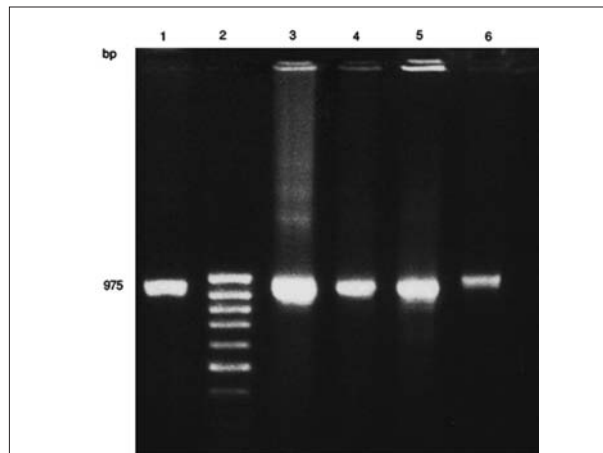


تصویر ۲- الکتروفورز محصول ژن 18S rRNA که در آن قطعه ۹۷۵ جفت بازی با آنزیم های MspI و MboI برش داده شده است. (از چپ به راست) ردیف های (۶) uncut) محصول قبل از برش، ردیف های ۲، ۴ و ۷- برش قطعه با MspI، ردیف های ۳، ۵ و ۸ برش قطعه با MboI و ردیف ۹ مارکر نشان می دهد.

کیست های مطالعه شده در این تحقیق (به جز سه مورد) گواه بر گونه ژیگانتیه آ است. این اولین گزارش تشخیص مولکولی سارکوسیستیس ژیگانتیه آ در ایران است.

سارکوسیستیس ژیگانتیه آ یا سارکوسیستیس اووی فلیس علاوه بر ایران دارای انتشار جهانی است. میزبان قطعی آن گربه اهلی گزارش شده است. کیست های سارکوسیستیس ژیگانتیه آ در عضلات مری، حنجره، زبان و واحد کمتری در دیافراگم و سایر عضلات گوسفندان یافت می شوند. سارکوسیستیس ها در عضلات قلب و سیستم اعصاب مرکزی وجود ندارند. معمولاً کیست های ماکروسکوپی در گوسفندان مسن دیده می شود. این کیست ها تا یک سانتیمتر طول داشته به رنگ سفید کدر با شکل کروی بیضوی یا گلابی شکل بوده و گاهی به دانه های برنج شباهت دارند. سارکوسیستیس ژیگانتیه آ بیماریزایی خفیفی برای گوسفند دارد (۴). ولی از لحاظ بازرسی گوشت دارای اهمیت فراوانی است و در آلودگی شدید ممکن است به ضبط لاشه منتهی شود. اکثر گزارش های کشتارگاهی آلودگی سارکوسیستیس دامی احتمالاً مربوط به این انگل است زیرا که فقط این گونه و گونه مدوزی فورمیس در گوسفندان کیست های بزرگ ایجاد می کنند و کیست های آن ها قابل روئیت هستند. سارکوسیستیس تنلا و سارکوسیستیس آریتی کنیس به عنوان دو گونه بیماریزا و خطرناک، در عضلات گوسفندان کیست های کوچک و میکروسکوپی تولید می کنند. این کیست ها با چشم غیر مسلح قابل روئیت نیستند.

به طور کلی با توجه به سرعت و دقت نتایج PCR-RFLP، پیشنهاد می شود محققین با استفاده از پرایمرها و روش بکار گرفته شده در این مطالعه، نسبت به شناسایی سایر گونه های سارکوسیستیس دامی در سراسر کشور اقدام نمایند.



تصویر ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن 18S rRNA که در آن قطعه ۹۷۵ جفت بازی تکثیر شده است. باندهای ۵،۴،۳،۱۶ مریوط به نمونه و باند ۲ مارکر است.

۹ و ۱۷). علاوه بر این محققین با مقایسه ترادف ssu rRNA نشان دادند که گونه های جنس سارکوسیستیس و توکسوپلازما اصل مشترکی دارند (۱۶). همچنین بر اساس مطالعه ssu rRNA انگل، برای گونه های سارکوسیستیس بیماریزا و غیر بیماریزا طبقه بندی درختی ترسیم گردیده است بدین ترتیب که گونه های سارکوسیستیس بیماریزای منتقله از سگ سانان به عنوان یک گروه مجزا و متفاوت از گونه های سارکوسیستیس غیر بیماریزای منتقله از گربه سانان معرفی شده اند (۱۴).

از آن جایی که این مطالعات همگی بر اساس مطالعه ssu rRNA بود به همین دلیل در این مطالعه نیز قطعه ژن 18S rRNA برای تعیین گونه های سارکوسیستیس گوسفندی انتخاب شد. طول این قطعه در گونه های تنلا، ژیگانتیه آ و آریتی کنیس به ترتیب ۹۷۵، ۹۶۶ و ۹۶۶ جفت باز است. آنزیم هاپس از برش قطعه، برای هر گونه، الگوی الکتروفورزی و یا باندهایی با اندازه متفاوت ایجاد می کنند.

آنزیم MboI در گونه تنلا جایگاه های ۴۷۰ و ۶۷۴ قطعه ژن تکثیر شده 18S rRNA را برش میزند و باندهای ۲۰۴، ۲۵۹ و ۴۷۰ جفت بازی را بوجود می آورد. این آنزیم در گونه ژیگانتیه آ جایگاه ۷۱۵ و در گونه آریتی کنیس جایگاه های ۴۳۴ و ۷۰۸ را برش میزند و در حالت اول باندهای ۲۵۹ و ۷۱۵ جفت بازی و در حالت دوم باندهای ۲۵۸، ۲۷۴ و ۴۳۴ جفت بازی را تولید می کند.

آنزیم MspI در گونه تنلا جایگاه های ۶۶ و ۳۹۴ قطعه ژن تکثیر شده 18S rRNA را برش میزند و باندهای ۶۶، ۳۲۸ و ۵۳۹ جفت بازی را بوجود می آورد. این آنزیم در گونه ژیگانتیه آ جایگاه ۶۶ و در گونه آریتی کنیس جایگاه های ۶۶ و ۸۷۶ را برش میزند و در مورد اول باندهای ۶۶ و ۹۰۸ جفت بازی و در مورد دوم باندهای ۶۶، ۹۰ و ۸۱۰ جفت بازی را ایجاد می کند.

گرچه آنزیم MspI قطعه ژن تکثیر شده 18S rRNA گونه ژیگانتیه آ را بدو قطعه ۹۰۸ و ۶۶ جفت بازی تقسیم می کند ولی چون باند ۶۶ ناحیه ای قرار می گیرد که پرایمر دایمرها باند می دهند لذا بروی ژل تنها باند ۹۰۸ جفت بازی مشاهده می شود که وجه تشخیص این گونه است. الگوی آنزیمی همه



## References

1. Arshad, M., Dalimi, A., Ghaffarifar F. (2007) Comparative study on Sarcocystis diagnosis in meat of slaughtered sheep in Tabriz. Pajouhesh va Sazandagi 75:68-72.
2. Collins, G.H., Atkinson, E., Charleston, W.A.G. (1979) Studies on Sarcocystis species III: the macrocystic species of sheep. New Zealand Vet. J. 27:204-6.
3. Dalimi, A., Khodashenas, M., Noori, A., Morovati, M. (1989) Ultrastructural study of Sarcocystis isolated from water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Khozestan province, in Iran. Pajouhesh va Sazandagi 43:47-9.
4. Dubey, J. P., Speer, C. A., Fayer, R. (1989) Sarcocystosis of animals and man. Boca Raton: CRC Press. Florida, USA. pp. 166-170.
5. Heckerroth, A. R., Tenter, A. M. (1999) Development and validation of species-specific nested PCRs for diagnosis of acute sarcocystiosis in sheep. Int. J. Parasitol. 29:1331-1349.
6. Holmdahl, O. J. M., Mattsson, J. G., Ugglä, A. Johansson, K. E. (1993) Oligonucleotide probes complementary to variable regions of 18S rRNA from Sarcocystis species. Mol. Cell. Probes. 7:481-486.
7. Jeffries, A. C., Amaro, N., Tenter, A. M., Johnson, A.M. (1996) Genetic diversity in Sarcocystis gigantea assessed by RFLP analysis of the ITS1 region. Appl. Parasitol. 37:275-283.
8. Joachim, A., Tenter, A. M., Jeffries, A. C., Johnson, A. M. (1996) A RAPD-PCR derived marker can differentiate between pathogenic and non-pathogenic Sarcocystis species of sheep. Mol. Cell. Probes. 10:165-172.
9. Mugridge, N. B., Morrison, D. A., Johnson, A. M., Luton, K., Dubey, J. P., Votykka, J., Tenter, A. M. (1999) Phylogenetic relationships of the genus Frenkelia: a review of its history and new knowledge gained from comparison of large subunit ribosomal ribonucleic acid gene sequences. Int. J. Parasitol. 29:957-972.
10. Munday, B. L., Barker, I. K., Rickard, M. D. (1975) The developmental cycle of a species of Sarcocystis occurring in dogs and sheep, with observations on the pathogenicity in the intermediate host. Z. Parasitenkd. 46:111-23.
11. O'Donoghue, P. J., Ford, G. E. (1986) The prevalence and intensity of Sarcocystis spp. infections in sheep. Aust. Vet. J. 63:273-8.
12. Sambrook, J., Russell, D. W. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. (3<sup>rd</sup> ed.) Cold Spring Harbor, New York, USA.
13. Tenter, A. M., Luton, K., Johnson, A. M. (1994) Species-specific identification of Sarcocystis and Toxoplasma by PCR amplification of small subunit ribosomal RNA gene fragments. Appl. Parasitol. 35:173-88.
14. Tenter, A. M. (1995) Current research on Sarcocystis species of domestic animals. Int. J. Parasitol. 25:1311-30.
15. Tenter, A. M., Johnson, A. M. (1997) Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. Adv. Parasitol. 39:69-139.
16. Ugglä, A., Buxton, D. (1990) Immune responses against Toxoplasma and Sarcocystis infections in ruminants: diagnosis and prospects for vaccination. Rev. Sci. Tech. Int. Epiz. 9:441-62.
17. Yang, Z., Li, Q., Zuo, Y., Chen, X., Chen, Y., Nie, L., Wei, C., Zen, J. S., Attwood, S. W., Zhang, X. Z., Zhang, Y. P. (2002) Characterization of Sarcocystis species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. Exp. Parasitol. 102:212-217.



# IDENTIFICATION OF *SARCOCYSTIS GIGANTEA* BY PCR- RFLP

Dalimi, A.\*, Jalosian, F., Tahvildar Biderouni, F., Ghaffarifar, F.

Department of Parasitology, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran-Iran.

(Received 5 October 2007, Accepted 5 October 2008)

---

**Abstract:**

Sarcocyst is one of the most important protozoa belonged to apicomplexa. This parasite is prevalent among warm blooded animals throughout the world. In the present work, *Sarcocystis gigantea* was identified by amplification of 18S rRNA gene using PCR- RFLP. In this regard macroscopic cysts of sarcocystis were collected from esophagus and intra costal muscles of sheep in Shahriar slaughterhouse. Then genomic DNA of the parasites was extracted from specimens using phenol-chloroform method. 18S rRNA gene was amplified with specific primers. For RFLP two restricted enzymes of MspI and MobI were used and the patterns were analyzed accordingly. According to the resulted band, all the specimens were identified as *Sarcocystis gigantea*. This is the first report of molecular identification of *Sarcocystis gigantea* in Iran.

**Key words:** *Sarcocystis gigantea*, sheep, PCR-RFLP, Iran.

\*Corresponding author's email: dalimi\_a@modares.ac.ir, Tel: 021-33119708, Fax: 021-88013030

