

PHÂN TÍCH ĐA HÌNH VÀ ĐÁNH GIÁ TƯƠNG QUAN DI TRUYỀN GENE THỤ THỂ KHỨU GIÁC cOR52H9 LIÊN QUAN ĐẾN KHẢ NĂNG PHÁT HIỆN MÙI CỦA CHÓ NGHIỆP VỤ

Đỗ Văn Thu¹, Đoàn Việt Bình^{1*}, Nguyễn Trọng Chí², Lê Xuân Phong²,
Nguyễn Ngọc Hưng², Lê Thị Huệ¹, Trần Xuân Khôi¹, Võ Thị Ninh¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

²Cục Cảnh sát Quản lý, Huấn luyện và Sử dụng động vật nghiệp vụ, Bộ Công An

TÓM TẮT: Cho đến nay, việc tuyển chọn huấn luyện chó nghiệp vụ cho đến nay thường dựa trên ngoại hình của chó. Trong số chó được chọn để huấn luyện phát hiện ma túy, thuốc nổ, chỉ có khoảng 30% đạt yêu cầu sau khi được huấn luyện. COR52H9 là gene nằm trên nhiễm sắc thể 21 của chó, mã hóa cho thụ thể khứu giác nằm trên bề mặt biểu mô thần kinh ở hốc mũi, có vai trò quan trọng trong việc nhận biết mùi. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu về đa hình của gene thụ thể khứu giác cOR52H9 và mối tương quan với khả năng phát hiện ngửi mùi của chó Berger (*Canis lupus familiaris*). Mẫu máu của 28 các thể chó nghiệp vụ của Cục quản lý, huấn luyện và sử dụng động vật nghiệp vụ, Bộ Công An đã được thu để phân lập gene và phân tích tương quan kiểu hình-kiểu gene. Gene phân lập được có độ tương đồng hơn 99% với trình tự gene cOR52H9 đã đăng ký trong ngân hàng gene. Gene cOR52H9 có 5 điểm có đa hình đơn nucleotid (SNP) ở các vị trí: T87A, G370A, T414G, G450A và G814T. Đã xác định có mối tương quan ở mức độ vừa giữa kiểu gene và khả năng phát hiện ma túy của chó tại T414G và G450A ($p=0,002$, $r=0,554$), G814T ($p=0,007$, $r=0,498$). Kết hợp sử dụng 3 SNPs: T414G, G450A và G814T sẽ tuyển chọn được những con chó có khả năng phát hiện mùi tốt nhất cho các lớp huấn luyện chó phát hiện ma túy.

Từ khóa: Chó nghiệp vụ, cOR52H9, đa hình đơn nucleotit, gene thụ thể khứu giác, khả năng phát hiện mùi, phát hiện ma túy, tuyển chọn chó

MỞ ĐẦU

Việc tạo được đàn chó có chất lượng cao là nhiệm vụ cần thiết nhằm phục vụ cho công tác đấu tranh phòng, chống tội phạm. Việc huấn luyện chó nghiệp vụ đòi hỏi nhiều thời gian và kinh phí. Trong khi đó, việc tuyển chọn chó để đưa vào huấn luyện cho đến nay thường chủ yếu dựa trên các đặc điểm ngoại hình của chó, do đó chưa chọn được những con chó tốt cho một mục đích nhất định. Trong số chó được chọn để huấn luyện phát hiện ma túy, thuốc nổ, chỉ có khoảng 30% đạt yêu cầu sau khi huấn luyện (Maejiima et al., 2007). Vì vậy, cần phải có những phương pháp mới có hiệu quả tốt hơn. Gần đây, đã có một số công trình nghiên cứu các chỉ thị phân tử để chọn chó có khả năng phát hiện mùi tốt cho các khóa huấn luyện (Lesniak et al., 2008).

Cơ quan khứu giác của chó có khả năng phân biệt nhiều chất có mùi khác nhau, ở các nồng độ khác nhau, có các cấu trúc khác nhau. Các chất có mùi hoạt hóa các thụ thể khứu giác (OR) trên bề mặt tế bào của biểu mô thần kinh,

tạo thành tín hiệu thần kinh truyền lên não. Có khoảng 1300 gene mã hóa cho OR của các loài chó đã được xác định (Olender et al., 2004). Mỗi một gene OR có cấu tạo gồm một exon mã hóa đơn lẻ khoảng 1kb (Quignon et al., 2003). Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy nhiều gene OR của chó có đa hình đơn nucleotide (SNPs) (Tacher et al., 2005). Trong số các SNPs đã được phát hiện có đến 47% làm thay đổi axit amin của OR, 25% chỉ tìm thấy ở một giống chó (Robin et al., 2009). Sự thay đổi một axit amin có thể làm thay đổi về mức độ kết hợp với phân tử mùi, do đó thay đổi khả năng nhận biết mùi và tạo nên sự khác biệt về khả năng khứu giác của mỗi cá thể (Mainland et al., 2014). Vì vậy, đã có công trình nghiên cứu chứng minh có thể dùng SNPs của gene OR làm chỉ thị phân tử để tuyển chọn chó dùng phát hiện mùi hơi (Lesniak et al., 2008).

Gene cOR52H9 là 1 trong những gene có nhiều SNPs nhất thuộc phân họ cOR52H. COR52H9 nằm trên nhiễm sắc thể 21 của chó,

cấu trúc bao gồm 1 exon, có trình tự đã đăng trong ngân hàng gene là XM_005633593.1. Gene cOR52H9 mã hóa cho thụ thể khứu giác cấu tạo bởi 389 axit amin.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu về đa hình của gene thụ thể khứu giác cOR52H9 và mối tương quan với khả năng ngửi mùi của chó Berger với mục đích sử dụng gene này làm chỉ thị phân tử phục vụ cho công tác tuyển chọn chó để huấn luyện phát hiện ma túy, thuốc nổ.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu bao gồm mẫu máu của 28 chó nghiệp vụ Berger (*Canis lupus familiaris*) của Cục quản lý, huấn luyện và sử dụng động vật nghiệp vụ, Bộ Công An. Mỗi chó sau khi đã được huấn luyện, sẽ được 3 chuyên gia đánh giá độc lập và cho điểm về khả năng phát hiện ma túy theo thang điểm chuẩn của quy trình huấn luyện.

Tách chiết DNA

Tách chiết DNA hệ gene từ máu bằng Kit Purelink™ Genomic DNA minikit K1820-01 (Invitrogen-USA). Đánh giá mẫu DNA tổng số đã tách chiết được trên điện di gel agarose 1% và đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260/280nm trên máy NanoDrop lite (hãng Thermo scientific).

Phản ứng PCR

Phân lập gene cOR52H9 bằng 2 cặp mồi Fn (ATCGCTAATGTGTCCTCAGG) Rn (AACTTCTCCTTCAGTGACTCTCC) và Ft (GATCC CAGACTGAGGAGACC) và Rt (TCAGTGACTCTCCCCACTC). Phản ứng PCR được thực hiện trên máy chu trình nhiệt Veriti (hãng Applied Biosystems) có thể tích 25µl chứa các thành phần như sau: Mastermix (hãng Thermo Fisher scientific) 12,5 µl, nước 8,5 µl, mồi xuôi F 1 µl, mồi ngược R 1 µl và DNA 2 µl. Phản ứng PCR được chạy làm hai vòng, vòng 1 dùng các cặp mồi Fn và Rn, vòng 2 Ft và Rt. Chu trình nhiệt của phản ứng như sau: Biến tính ở 95°C trong 3 phút. Tiếp theo là 35 chu kỳ nối tiếp nhau: 95°C/30 giây, 58°C/30 giây, 72°C/1 phút 20 giây. Kết thúc phản ứng ở 72°C trong 8 phút. Chu trình nhiệt cho vòng 2 tương tự chu

trình nhiệt của vòng 1 nhưng nhiệt độ bắt cặp giảm xuống còn 56°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel garose 1%, đệm TAE 1X, DNA Maker 1kb (hãng Fermentas). Sau khi phân lập được gene, thổi gel sản phẩm PCR rồi đọc trình tự trên máy 3730XL DNA Analyser (Macrogen, Hàn Quốc). Xác định cấu trúc liên kết (topology) của thụ thể khứu giác theo phương pháp của Krogh et al. (2001).

Phân tích số liệu

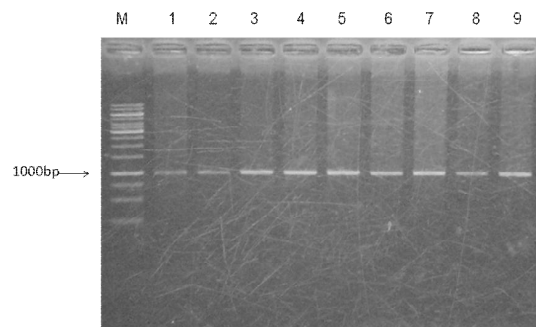
So sánh trình tự gene cOR52H9 của các cá thể chó với trình tự đăng ký trong ngân hàng gene và dịch từ trình tự nucleotide sang cấu tạo axit amin của thụ thể khứu giác bằng phần mềm BioEdit.

Điểm đánh giá khả năng phát hiện ma túy của mỗi chó sẽ được kết nối với kết quả phân tích kiểu gene để phân tích mối tương quan di truyền kiểu hình- kiểu gene theo phương pháp ANOVA một nhân tố và xác định hệ số tương quan Pearson bằng phần mềm Minitab 15.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

DNA của các mẫu máu sau khi tách chiết đều có tỷ số OD 260/280 nằm trong khoảng 1,7-2,0 khi đo trên máy quang phổ hấp thụ, đảm bảo độ tinh sạch cho các bước phân tích tiếp theo.

Sản phẩm PCR phân lập gene cOR52H9 từ DNA hệ gene có kích thước khoảng 1.000 bp, tương đương với lý thuyết (hình 1). Sau khi so sánh với trình tự của gene cOR52H9 đã đăng trong ngân hàng gene XM_005633593.1, sản phẩm PCR đạt được độ tương đồng hơn 99% với vùng mã hóa của gene đó.



Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm PCR đoạn gene cOR52H9. M: Thang DNA chuẩn; số 1-9 là thứ tự các mẫu máu của chó.

Kết quả so sánh trình tự gene cOR52H9 của 28 cá thể chó Berger đã phát hiện được 5 điểm SNPs bao gồm các vị trí: T87A, G370A, T414G, G450A và G814T (bảng 1). Trong đó, vị trí G370A đã dẫn đến thay đổi axit amin valine thành isoleucine của thụ thể khứu giác của chó, G814T làm thay đổi valine thành leucine. Tại các vị trí còn lại không có sự thay đổi axit amin của OR.

Tại các vị trí T87A, T414G, G450A và G814T, các kiểu gene dị hợp tử đều có tỷ lệ phần trăm cao hơn so với các kiểu gene đồng

hợp tử. Tại vị trí G370A, chỉ có hai kiểu gene được phát hiện, trong đó kiểu gene đồng hợp tử GG có tỷ lệ cao hơn hẳn (71,43%) so với kiểu gene dị hợp tử GA (28,57%). Tại tất cả 5 vị trí SNPs, tất cả các kiểu gene đồng hợp tử không có nucleotide bị thay thế, tạm gọi là các kiểu gene gốc, đều có điểm phát hiện ma túy cao nhất. Đó là những kiểu gene TT tại các SNPs T87A và T414G, hay kiểu gene GG tại G370A, G450A và G814T. Những kiểu gene còn lại là những kiểu gene dị hợp tử và đồng hợp tử có nucleotide bị thay thế đều có điểm phát hiện ma túy thấp hơn (bảng 1).

Bảng 1: Các SNPs, kiểu gene và mối tương quan giữa kiểu gene với điểm phát hiện ma túy của chó nghiệp vụ

SNP	Kiểu gene	Số lượng		Điểm phát hiện ma túy	Phân tích ANOVA		Hệ số tương quan	
		N	%		f	p	r	p
T87A	TT	9	32,14	67,22 ^a ± 1,79	2,27	0,124		
	TA	13	46,43	62,69 ± 2,33				
	AA	6	21,43	60,00 ^a ± 2,45				
G370A	GG	20	71,43	64,75 ± 1,46	2,03	0,166		
	GA	8	28,57	60,63 ± 3,10				
T414G	TT	8	28,57	68,13 ^b ± 1,90	5,75	0,09	0,554	0,002
	TG	11	39,29	64,54 ± 2,18				
G450A	GG	8	28,57	68,13 ^c ± 1,90	5,75	0,09	0,554	0,002
	GA	11	39,29	64,54 ± 2,18				
	AA	9	32,14	58,33 ^c ± 1,98				
G814T	GG	5	17,86	68,57 ^d ± 0,99	4,13	0,028	0,498	0,007
	GT	16	57,14	63,13 ± 2,05				
	TT	7	25,00	58,00 ^d ± 1,37				

Các trị số có chữ cái giống nhau biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê theo cặp, a ($p < 0,05$); b,c ($p < 0,01$); d ($p < 0,001$).

Kết quả phân tích tương quan di truyền gene cOR52H9 với tính trạng kiểu hình cho thấy, tại các vị trí T87A và G370A không thấy có mối tương quan giữa kiểu gene với khả năng phát hiện mùi của chó. Tại các SNPs: T414G, G450A và G814T có mối tương quan ở mức độ vừa ($r=0,554$, $r=0,554$ và $r=0,498$), giữa kiểu gene và khả năng phát hiện ma túy của chó (bảng 1).

Thụ thể khứu giác là một protein xuyên màng tế bào. Kết quả phân tích cấu trúc liên kết của protein thụ thể cho biết vị trí axit amin mã

hóa bởi các SNPs tại các phần khác nhau của thụ thể khứu giác như sau: Các SNPs T87A, G450A và G814T mã hóa cho các axit amin isoleucine 29, Valine 150 và Valine 272 của các phần xuyên màng tế bào TM1, TM4 và TM7. Các axit amin được mã hóa bởi 2 SNPs còn lại nằm ở phần nằm trong tế bào (IC2) (bảng 2).

Chó là loài động vật được con người thuần hóa rất sớm, từ cách đây hơn 10.000 năm (Olender et al., 2004). Trong quá trình thuần hóa, con người thường chú ý cùng một lúc chọn lọc nhiều đặc tính quý khác nhau của chó, đôi

lúc cộng thêm điều kiện môi trường sống thay đổi đã tác động bất lợi nên một số đặc tính tốt nguyên thủy của chó. Theo kết quả nghiên cứu về đa hình gene cOR52H9, tất cả các kiểu gene đồng hợp tử không có nucleotide bị thay thế, đều có điểm phát hiện ma túy cao nhất. Những kiểu gene còn lại là những kiểu gene dị hợp tử

và đồng hợp tử có nucleotide bị thay thế so với kiểu gene gốc đều có điểm phát hiện ma túy thấp hơn. Điều này chứng tỏ các đột biến đã có tác động bất lợi tới gene gốc và tới khả năng phát hiện ma túy của chó. Hiện tượng này cũng đã được Lesniak et al. (2008) phát hiện tại vị trí A176G của gene cOR52N9.

Bảng 2. Vị trí axit amin của các điểm đột biến trong thụ thể khứu giác

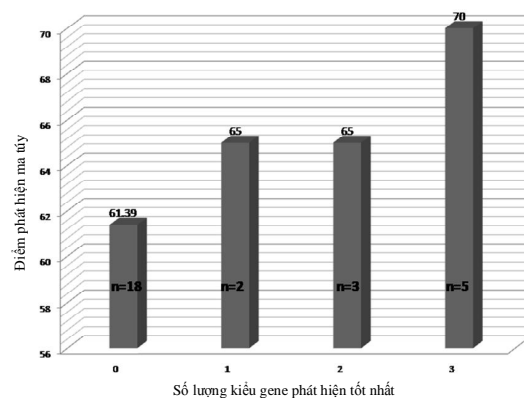
SNP	Axit amin	Phần thụ thể khứu giác
T87A	Ile29	TM1
G370A	Val124	IC2
T414G	Pro138	IC2
G450A	Val150	TM4
G814T	Val272	TM7

TM: phần xuyên màng; IC: phần nằm trong tế bào.

Những thay đổi nucleotide của gene có thể dẫn đến thay đổi axit amin, vì vậy, làm thay đổi cấu trúc và hoạt tính của protein tương ứng, tùy thuộc vào vị trí và vai trò của axit amin bị thay đổi. Tại 2 vị trí G370A và G814T của gene cOR52H9 đều có sự thay đổi axit amin, nhưng chỉ có vị trí G814T là có mối tương quan giữa điểm phát hiện ma túy và kiểu gene. SNP tại vị trí G814T làm thay đổi axit amin valine số 272 thành leucine tại đoạn xuyên màng thứ 7 (TM7) của thụ thể khứu giác. SNP tại vị trí G370A cũng làm thay đổi axit amin nhưng tại phần nằm bên trong tế bào (IC2). Theo Hilbert et al. (1991) và Pilpell et al. (1999), các đoạn xuyên màng của protein thường là nơi xảy ra phản ứng gắn kết của protein với phối tử. Có thể vì thế, sự thay đổi axit amin do G814T đã làm ảnh hưởng đến khả năng phát hiện mùi của thụ thể khứu giác, trong khi sự thay đổi do G370A gây ra không có tác động nhiều. Như vậy, vị trí G814T có thể được coi là một chỉ thị phân tử tiềm năng dùng để phát hiện chó có khả năng phát hiện ma túy.

Các SNPs T414G, G450A không làm thay đổi axit amin nhưng tại 2 vị trí này cũng có mối tương quan giữa điểm phát hiện ma túy với kiểu gene. Thêm vào đó, G450A mã hóa cho axit amin valine tại đoạn xuyên màng 4 (TM4), là một phần có vai trò quyết định đối với khả năng phân biệt mùi của của thụ thể khứu giác (Liu et al., 2003). Vì vậy, có thể sử dụng 2 vị trí này kết hợp với G814T để tuyển chọn chó.

Điểm phát hiện ma túy của các kiểu gene đồng hợp tử gốc luôn cao hơn điểm của các kiểu gene có nucleotide bị thay thế (bảng 1). Vì vậy, cá thể chó có kiểu gene đồng hợp tử gốc sẽ có điểm phát hiện ma túy cao hơn cá thể chó không có kiểu gene này và chỉ có các kiểu gene có nucleotide bị thay thế. Nếu chỉ xét 3 vị trí T414G, G450A và G814T thì cá thể chó có càng nhiều số kiểu gene đồng hợp tử gốc của 3 vị trí này thì có số điểm phát hiện ma túy càng cao (hình 2). Vì vậy, sử dụng kết hợp 3 SNPs này sẽ tuyển chọn được những con chó có khả năng phát hiện mùi tốt nhất cho các lớp huấn luyện chó phát hiện ma túy.



Hình 2. Điểm phát hiện ma túy của chó theo số lượng kiểu gene phát hiện ma túy tốt nhất tại các vị trí T414G, G450A và G814T (n=số cá thể chó có số lượng kiểu gene tương ứng).

Khả năng làm việc của chó nghiệp vụ phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: công tác huấn luyện, môi trường làm việc, tập tính và yếu tố di truyền của mỗi cá thể (Jeziński et al., 2014). Việc phát hiện mùi của chó cũng thường lại là một yếu tố đa gene. Vì vậy, trên đây mới là những kết quả bước đầu nghiên cứu về đa hình của gene cOR52H9. Cần tiếp tục nghiên cứu để khẳng định và mở rộng các kết quả nghiên cứu trên.

KẾT LUẬN

Đã phân lập gene cOR52H9 có độ tương đồng hơn 99% với trình tự gene cOR52H9 đã đăng ký trong ngân hàng gene. Gene cOR52H9 có 5 điểm có đa hình đơn nucleotid (SNP) ở các vị trí: T87A, G370A, T414G, G450A và G814T. Đã xác định có mối tương quan ở mức độ vừa giữa kiểu gene và khả năng phát hiện ma túy của chó tại T414G và G450A ($p=0,002$, $r=0,554$), G814T ($p=0,007$, $r=0,498$). Kết hợp sử dụng 3 SNPs: T414G, G450A và G814T sẽ tuyển chọn được những con chó có khả năng phát hiện mùi tốt nhất cho các lớp huấn luyện chó phát hiện ma túy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hibert M. F., Trumpp-Kallmeyer A., Hoflack J., 1991. Three-dimensional models of neurotransmitter G-binding protein coupled receptors. *Mol Pharmacol.*, 40(1): 8-15.
- Jeziński T., Adamkiewicz E., Walczak M., Sobczyńska M., Górecka-Bruzda A., Ensminger J., Papet E., 2014. Efficacy of drug detection by fully-trained police dogs varies by breed, training level, type of drug and search environment. *Forensic Science International*, 237(237): 112-118.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G., Sonnhammer E. L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Mol Biol.*, 305(3): 567-580.
- Lesniak A., Walczak M., Jeziński T., Sacharczuk M., Gawkowski M., Jaszczak K., 2008. Canine Olfactory Receptor Gene Polymorphism and Its Relation to Odor Detection Performance by Sniffer Dogs. *Journal of Heredity*, 99(5): 518-527.
- Liu A. H., Zhang X., Stolovitzky G. A., Califano A., Firestein S. J., 2003. Motifbased construction of a functional map for mammalian olfactory receptors. *Genomics*, 81(5): 443-456.
- Mainland J. D., Keller A., Li Y. R., Zhou T., Trimmer C., Snyder L. L., Moberly A. H., Adipietro K. A., Liu W. L. L., Zhuang H., Zhan S., Lee S. S., Lin A., Matsunami H., 2014. The missense of smell: functional variability in the human odorant receptor repertoire. *Nature neuroscience*, 17(1): 114-120.
- Maejiima M., Inoue-Murayama M., Tonosaki K., Matsuura N., Kato S., Saito Y., Weiss A., Murayama Y., Ito S., 2007. Traits and genotypes may predict the successful training of drug detection dogs. *Applied Animal Behavior Science*, 107(3-4): 287-298.
- Olender T., Fuchs T., Linhart C., Shamir R., Adams M., Kalush F., Keh M, Lancet D., 2004. The canine olfactory subgenome. *Genomics.*, 83(3): 361-372.
- Pilpell Y., Lancet D., 1999. The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins. *Protein Sci.*, 8(5): 969-977.
- Quignon P., Kirkness E., Cadieu E., Touleimat N., Guyon R., Renier C., Hitte C., André C., Fraser C., Galibert F., 2003. Comparison of the canine and human olfactory receptor gene repertoires. *Genome Biology*, 4: R80.
- Robin S., Tacher S., Rimbault M., Vaysse1 A., Dréano S., André C., Hitte C., Galibert F., 2009. Genetic diversity of canine olfactory receptors. *BMC Genomics*, 10:21.
- Tacher S., Quignon P., Rimbault M., Dréano S., André C., Galibert F., 2005. Olfactory Receptor Sequence Polymorphism Within and Between Breeds of Dogs. *Journal of Heredity*, 96(7): 812-816.

**POLYMORPHISM ANALYSIS OF CANINE OLFACTORY GENE cOR52H9
AND EVALUATION OF ITS RELATION TO ODOR DETECTION
PERFORMANCE BY POLICE DOGS**

**Do Van Thu¹, Doan Viet Binh^{1*}, Nguyen Trong Chi², Le Xuan Phong²,
Nguyen Ngoc Hung², Le Thi Hue², Tran Xuan Khoi¹, Vo Thi Ninh¹**

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Department management, training and professional use of animals, Ministry of Public security

SUMMARY

The recruitment of professional dog training to date rely on the external appearance of the dog. Among selected to train dogs to detect drugs, explosives, as a result only about 30% of trained dogs are satisfied with training.

COR52H9 gene is located on chromosome 21, coding for olfactory receptors located on the surface of neuroepithelium in the nasal cavity, have an important role in identifying odors. In this report, we present the results of polymorphism studies of olfactory receptor gene cOR52H9 and its relation to odor detection performance of Berger dogs.

Blood samples of 28 dogs (*Canis lupus familiaris*) of Administration Department management, training and professional use of animals - Ministry of Public security has been collected for the Isolation and Analysis of the correlation between genotype and phenotype. Isolated gene has more than 99% homology with the gene sequence registered in gene banks. There are 5 SNPS detected: T87A, G370A, T414G, G450A and G814T. Moderate correlations between genotype and drug detection performance of dog were identified in T414G, G450A ($p = 0.002$, $r = 0.554$) and G814T ($p = 0.007$, $r = 0.498$). Combined use of these SNPs selected will be the dogs have the ability to detect odors best for training detect drugs.

Keywords: Ability to detect smell, cOR52H9, drug discovery, olfactory receptor genes, police dog, selection of dogs, single nucleotide polymorphisms.

Citation: Do Van Thu, Doan Viet Binh, Nguyen Trong Chi, Le Xuan Phong, Nguyen Ngoc Hung, Le Thi Hue, Tran Xuan Khoi, Vo Thi Ninh, 2017. Polymorphism analysis of canine olfactory gene *cor52h9* and evaluation of its relation to odor detection performance by police dogs. Tap chi Sinh hoc, 39(1): 102-107. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n1.7130.

*Corresponding author: dvietbinh@yahoo.com

Received 22 September 2015, accepted 20 March 2017