

Оригинальные статьи / Original articles

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-5-97-102>
УДК 635.64:632.488:581.144.043

Лупашку Г.А.,
Михня Н.И.,
Гавзер С.И.

Институт генетики, физиологии и защиты растений
Республика Молдова, MD-2002,
Кишинев, ул. Пэдурий, 20
E-mail: galinalupascu51@gmail.com,
mihneanadea@yahoo.com

Конфликт интересов: Авторы заявляют
об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Лупашку Г.А., Михня Н.И.,
Гавзер С.И. Влияние совместного действия грибов *Fusarium* spp. и температуры на некоторые
ростовые признаки томата. *Овощи России*.
2020;(5):97-102. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-5-97-102>

Поступила в редакцию: 24.04.2020
Принята к печати: 10.08.2020
Опубликована: 25.09.2020

Nadejda I. Mihnea,
Galina A. Lupashku,
Svetlana I. Gavzer

Institute of Genetics,
Physiology and Plant Protection
20, Padurii St., Chisinau,
MD-2002, Republic of Moldova
E-mail: galinalupascu51@gmail.com,
mihneanadea@yahoo.com

Conflict of interest. The authors declare
no conflict of interest.

For citations: Lupashku G.A., Mihnea N.I., Gavzer
S.I. Influence of the combined action of *Fusarium*
spp. fungi and temperature on some tomatoes
growth traits. *Vegetable crops of Russia*.
2020;(5):97-102.. (In Russ.)
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-5-97-102>

Received: 24.04.2020
Accepted for publication: 10.08.2020
Accepted: 25.09.2020

Влияние совместного действия грибов *Fusarium* spp. и температуры на некоторые ростовые признаки томата



Резюме

Актуальность. Корневые гнили томата являются комплексным заболеванием, вызванным множеством почвообитающими грибными патогенами, среди которых *Fusarium oxysporum*, *F. solani* и *F. gibbosum* встречаются с наибольшей частотой в условиях Республики Молдова. Для получения достоверных данных относительно генетической устойчивости томата к фузариозной корневой гнили необходимо выявить особенности индивидуальной реакции образцов к наиболее опасным возбудителям. Оригинальность работы состоит в выявлении дифференцированного влияния возбудителей фузариозных корневых гнилей и температуры на вариабельность и наследуемость органов роста и развития растений томата.

Материал и методика. В качестве материала для исследования послужили 2 сорта и 3 линии томатов с хорошими хозяйствственно-ценными признаками. Для испытания реакции растений на возбудители фузариозной корневой гнили использовали культуральные фильтраты 6-ти изолятов вида *F. oxysporum*, 6-ти – *F. solani*, 4 – *F. gibbosum*, приготовленных на стандартной жидкой среде Чапека. Растения выращивали при оптимальной температуре (23...24°C) и при чередовании температур 23...24°C и 10...11°C – по два дня каждая. В качестве показателей роста и развития послужили всхожесть семян и длина корешка. Исследовали генетические параметры вариабельности и наследуемости изученных признаков.

Результаты. Анализ реакции по критериям всхожести семян и роста корешка показал значительную ее дифференциацию в системе *генотип томата x вид гриба x изолят гриба x температура*. Факторным анализом взаимодействия *генотип томата x гриб Fusarium* выявлена существенная роль генотипа растения в реакции на патогены. Установлено значительное влияние грибов *Fusarium* и температуры на генетические и фенотипические вариансы признаков роста и развития растений томата, наследуемость в широком смысле, генотипический и фенотипический коэффициент вариации, генетический прогресс. Сделан вывод о целесообразности использования реакции признаков роста и развития томата на патогены *Fusarium* для идентификации генотипов с хорошей наследуемостью признака резистентности.

Ключевые слова: томат, органы роста, грибы *Fusarium*, температура, вариабельность, наследуемость.

Influence of the combined action of *Fusarium* spp. fungi and temperature on some tomatoes growth traits

Abstract

Relevance. Tomato root rot is a complex disease caused by a variety of soil-borne fungal pathogens, among which *Fusarium oxysporum*, *F. solani* and *F. gibbosum* occur with the greatest frequency in the conditions of the Republic of Moldova. The originality of the work consists in identifying the differentiated influence of pathogens of *Fusarium* root rot and temperature on the variability and heritability of the organs of growth and development of tomato plants.

Material and methods. Two varieties and 3 lines of tomatoes with good economically valuable characteristics were used as material for the study. To test the response of plants to pathogens of fusarium root rot, we used culture filtrates of 6 – *F. oxysporum* isolates, 6 – *F. solani*, and 4 – *F. gibbosum*, prepared in a standard liquid Czapek medium. The plants were grown at the optimum temperature (23...24°C) and with alternating temperatures of 23...24°C and 10...11°C for two days each. Seed germination and root length were used as indicators of growth and development. The genetic parameters of the variability and heritability of the studied traits were studied.

Results. An analysis of the reaction based on seeds germination and root growth showed its significant differentiation in the *tomato genotype x type of fungus x isolate of the fungus x temperature system*. A factor analysis of the interaction of the *tomato genotype x Fusarium fungus* revealed a significant role of the plant genotype in response to the pathogens. A significant effect of *Fusarium fungi* and temperature on the genetic and phenotypic variance of signs of growth and development of tomato plants, heritability in a broad sense, genotypic and phenotypic coefficient of variation, and genetic progress have been established. It is concluded that it is advisable to use the reaction of signs of growth and development of tomato to *Fusarium* pathogens in order to identify genotypes with good inheritance of the resistance trait.

Keywords: tomato, growth organs, *Fusarium* fungi, temperature, variability, heritability.

Введение

Грибы *Fusarium* spp. весьма широко распространены на томатах как в тепличных, так и полевых условиях, вызывая широкий спектр симптомов – задержка роста проростков, пожелтение и преждевременное опадение семядолей и нижних листьев. Выраженные коричневые поражения, опоясывающие гипокотили, корневая гниль, увядание и гибель проростков являются самыми обычными симптомами, приводящими к значительным потерям урожая и снижению качества плодов [4, 8, 11]. Данные патогены могут распространяться на новые площади при помощи зараженных семян, почвы или компоста [10].

Температурные условия среды имеют большое значение для патологических процессов, вызванных грибами *Fusarium*. Согласно [7], корневые гнили развиваются быстро в почве при температуре 18°C. Такая же температура почвы указана для развития специализированной формы *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* [11]. При более повышенной температуре болезнь может быть бессимптомной, но она часто является причиной коричневения или почернения тканей [10]. Помимо хорошо изученного гриба *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* известны другие виды *Fusarium*, вызывающие значительные потери продуктивности томата. В их числе можно отметить *F. solani*, *F. incarnatum-equiseti* [2]. Гриб *F. equiseti* (*F. gibbosum* App. et Wr. emend Bilai) является космополитным, типичным почвенным грибом, обитающим в регионах с теплым субтропическим климатом. Весьма часто патогенность этого гриба недооценивается, хотя его присутствие доказано в больных корневыми гнилями растениях широкого круга видов. *F. equiseti* относится к числу видов *Fusarium*, которые способны выдержать антагонизм других грибов в суровых условиях – низкое давление, полупустынные условия, высокое засоление [9].

Большое внимание уделяется генетическим методам борьбы с фузариозными корневыми гнилями. В этих целях очень важно установить основные генетические факторы растения-хозяина, вовлеченные в реакцию на патоген [6]. Использование главных R-генов при фузариозной инфекции томатов во многом помогло снижению потерь плодов томата от болезни [5].

Цель исследований – определить влияние грибов *Fusarium* spp. на всхожесть семян и рост корешка томата, а также на их вариабельность и наследуемость.

Материалы и методы

Материалом для исследований послужили 5 генотипов томата – сорта *Mihaela*, *Merisor* и линии L 120, L 121 и L 122 с хорошими хозяйствственно-ценными признаками.

Были использованы культуральные фильтраты (КФ) 6 изолятов грибов *F. oxysporum* (КФ1 ... КФ 6), 6 – *F. solani* (КФ1 ... КФ 6) и 4 – *F. gibbosum* (КФ1...КФ 4) – видов наиболее часто выделяемых из корней больных растений томата в наших условиях. КФ были приготовлены на основе жидкой среды Чапека. Семена были обработаны КФ в течение 18 час, после чего их трижды ополаскивали дистиллированной водой и помещали на увлажненной бумаге в чашках Петри. Контролем (К) служили растения, выращенные из семян, замоченных в дистиллированной воде. Растения выращивали в течение 6 дней при 2-х температурных режимах: I – постоянная температура 23-24°C и II – чередование температур 23-24/10-11/23-24°C, по 2 дня каждая. В качестве тест-параметров послужили всхожесть семян и длина корешка. Опыт закладывали по схеме двухфакторного анализа в 3-х повторностях.

С целью определения наследуемости и вариабельности количественных признаков роста пшеницы при взаимодействии с патогенами были исследованы следующие параметры: генетическая (σ^2_g – *genetic variance*) и

фенотипическая варианса (σ^2_{ph} – *phenotypic variance*), коэффициент наследуемости в широком смысле слова (h^2 – *heritability in broad sense*), фенотипический (PCV, % – *phenotypic coefficients of variation, %*) и генотипический коэффициенты вариации (GCV, % – *genotypic coefficients of variation, %*), генетический прогресс (GA, % – *genetic advance, %*) [1, 3]. Статистическая обработка данных была проведена в пакете программ STATISTICA 8.

Результаты и их обсуждение

Всхожесть семян. Выявлено, что изученные генотипы томата, в зависимости от гриба и температурных условий, по-разному отреагировали на обработку КФ грибов. При этом всегда проявлялась роль генотипического фактора. Так, например, при I у сорта *Mihaela* при обработке КФ *F. oxysporum* всхожесть семян была на уровне контроля, а у линии L 121 снизилась на 37,6%. При температуре II также отмечена дифференцированная реакция генотипов томата – у сорта *Mihaela* под влиянием КФ *F. oxysporum* всхожесть снизилась на 78,4%, а у линии L 121 – повысилась на 3,3%. Примеры специфической реакции одного и того же генотипа томата на разные КФ можно встретить и в случае грибов *F. solani* и *F. gibbosum* при обоих температурных режимах (рис. 1).

Факторным анализом установлено, что в условиях режима I доля влияния генотипа растения, изолята и взаимодействия генотип x изолят в вариабельности признака всхожести составил 33,04; 55,12 и 11,84% при действии *F. oxysporum*; 81,30; 7,24 и 11,46% – *F. solani* и 94,06; 1,00 и 4,94% – *F. gibbosum*, соответственно (табл. 1).

В условиях режима II доля влияния генотипа растения, изолята и взаимодействия генотип x изолят в вариабельности указанного признака составила 26,15; 52,98 и 20,87% при действии *F. oxysporum*; 95,42; 1,92 и 2,66% – *F. solani* и 96,02; 2,32 и 1,66% – *F. gibbosum*, соответственно.

В отношении роста корешка выявлено, что при режиме I доля влияния генотипа растения, изолята и взаимодействия генотип x изолят в вариабельность признака составила 67,03; 25,71 и 7,27% – для *F. oxysporum*; 45,36; 35,81 и 18,84% – для *F. solani* и 21,46; 73,92 и 4,63% – для *F. gibbosum*, соответственно. При режиме II доля влияния генотипа растения, изолята и взаимодействия генотип x изолят в вариабельности признака составила 78,48; 13,28 и 8,24% для *F. oxysporum*; 52,49; 34,23 и 13,08% – для *F. solani* и 52,72; 36,71 и 10,57% – для *F. gibbosum*, соответственно.

Установлено, что генетическая (σ^2_g) и фенотипическая (σ^2_{ph}) вариансы при реакции генотипов томата на *F. solani* и *F. oxysporum* выше, чем при реакции на *F. gibbosum*. Одновременно отмечено, что значения обоих генетических параметров намного выше при втором температурном режиме (табл. 2).

Коэффициент наследуемости в широком смысле слова (h^2) был высоким во всех вариантах: 0,96...1,00, что свидетельствует о хорошей наследуемости признака всхожесть семян независимо от действия грибов и температуры. Выявлено также, что значения GCV (%) и PCV (%) коэффициентов вариации были выше при температуре II, что свидетельствует о том, что при неблагоприятной температуре генотипический фактор растения проявляется в большей степени. Довольно низкие значения PCV-GCV (%) свидетельствуют о большем вкладе генотипа в проявлении признака всхожесть семян.

Генетический прогресс при 5%-ном селекционном дифференциале был на уровне 11,94...27,34% при температуре I и 21,58...50,73% – при II. Это свидетельствует о том, что отбор на резистентность более эффективен при совместном действии гриба и пониженной температуры.

Длина корешка. Установлено, что КФ грибов оказал неоднозначное влияние на рост корешка томата (рис. 2).

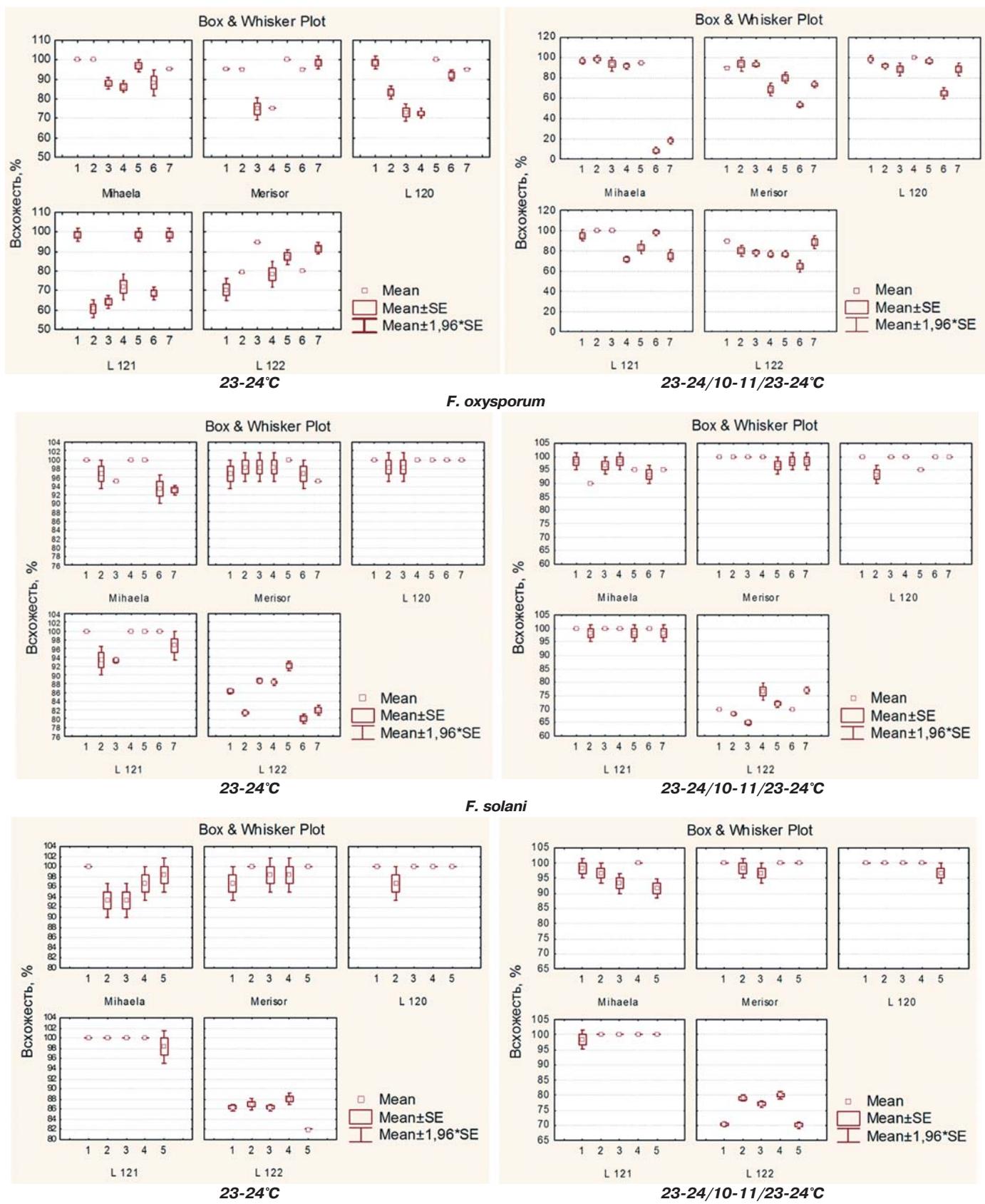


Рис. 1. Влияние культурального фильтрата грибов *Fusarium* на всхожесть семян томата при разных температурных условиях
Fig. 1. The effect of the culture filtrate of *Fusarium* fungi on the germination of tomato seeds under different temperature conditions

Так, КФ гриба *F. oxysporum* проявил стимулирующее влияние при режиме I и ингибирующее при II у всех изученных генотипов томата. Данный эффект следует рассматривать в связи с особенностями всхожести. Почти во всех вариантах всхожесть была сильно подавлена при оптимальной температуре и менее сильно – при чередовании температур. Это сказалось на отборе жизнеспособных растений с хорошими показателями роста корешка.

В случае КФ *F. solani*, 24°C отмечено, что за исключением КФ2 у линии L 121 (при которой произошло ингибирование роста), длина корешка во всех вариантах была на уровне контроля. Учитывая, что всхожесть в большинстве случаев не потерпела сильных изменений, можем сделать вывод о том, что генотипы томата не проявили сильную чувствительность к изолятам гриба.

Таблица 1. Факторный анализ вариабельности всхожести семян томата при взаимодействии с грибами *Fusarium* при различных температурных условиях
Table 1. Factor analysis of the variability of germination of tomato seeds when interacting with *Fusarium* fungi under different temperature conditions

Источник вариабельности	Степень свободы	Сумма квадратов	Вклад в источник вариабельности, %	Степень свободы	Сумма квадратов	Вклад в источник вариабельности, %
<i>F. oxysporum</i> , I		<i>F. oxysporum</i> , II		<i>F. solani</i> , I		<i>F. solani</i> , II
Генотип томата	4	622,5	33,86	4	1227,6	24,79
Изолят	6	946,0	51,46	6	2762,5	55,79
Генотип х изолят	24	261,2	14,21	24	946,8	19,12
Остаточные эффекты	70	8,6	0,47	70	14,8	0,30
<i>F. gibbosum</i> , I		<i>F. gibbosum</i> , II		<i>F. solani</i> , I		<i>F. solani</i> , II
Генотип томата	4	664,2	89,18	4	3047,1	97,98
Изолят	6	60,2	8,08	6	41,3	1,33
Генотип х изолят	24	17,6	2,36	24	18,6	0,60
Остаточные эффекты	70	2,8	0,38	70	3,0	0,10

Таблица 2. Вариабельность и наследуемость признака всхожесть семян томата при взаимодействии с грибными патогенами
Table 2. Variability and heritability of the germination of tomato seeds trait when interacting with fungal pathogens

Параметр	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. solani</i>		<i>F. gibbosum</i>	
	I	II	I	II	I	II
σ^2_G	204,63	404,27	220,47	1014,70	165,37	549,53
σ^2_{Ph}	213,23	419,07	223,27	1017,70	168,47	552,33
h^2	0,9597	0,9647	0,9875	0,9971	0,9816	0,9949
GCV, %	16,45	24,61	15,56	34,39	13,40	24,98
PCV, %	16,79	25,05	15,66	34,44	13,52	25,04
PCV, % - GCV, %	0,34	0,44	0,10	0,05	0,12	0,06
GA	23,76	41,46	12,02	23,03	4,83	20,25
GAM, %	27,34	50,73	12,60	24,88	11,94	21,58

Таблица 3. Факторный анализ вариабельности длины корешка томата при взаимодействии с грибами *Fusarium* при различных температурных условиях
Table 3. Factor analysis of the variability of the length of the tomato root when interacting with *Fusarium* fungi under various temperature conditions

Источник вариабельности	Степень свободы	Сумма квадратов	Вклад в источник вариабельности, %	Степень свободы	Сумма квадратов	Вклад в источник вариабельности, %
<i>F. oxysporum</i> , I		<i>F. oxysporum</i> , II		<i>F. solani</i> , I		<i>F. solani</i> , II
Генотип томата	4	4590	51,42	4	2088,5	59,69
Изолят	6	3528	39,53	6	1146,6	32,77
Генотип х изолят	24	462	5,18	24	223,1	6,38
Остаточные эффекты	1769	346	3,88	1769	40,5	1,16
<i>F. solani</i> , I		<i>F. solani</i> , II		<i>F. gibbosum</i> , I		<i>F. gibbosum</i> , II
Генотип томата	4	1500	42,53	4	3175	51,70
Изолят	6	1184	33,57	6	2063	33,59
Генотип х изолят	24	623	17,66	24	788	12,83
Остаточные эффекты	1616	220	6,24	1616	115	1,87
<i>F. gibbosum</i> , I		<i>F. gibbosum</i> , II		<i>F. solani</i> , I		<i>F. solani</i> , II
Генотип томата	4	1252	20,82	4	1921,8	51,42
Изолят	4	4312	71,71	4	1338,0	35,80
Генотип х изолят	16	270	4,49	16	385,4	10,31
Остаточные эффекты	1091	179	2,98	1091	92,3	2,47

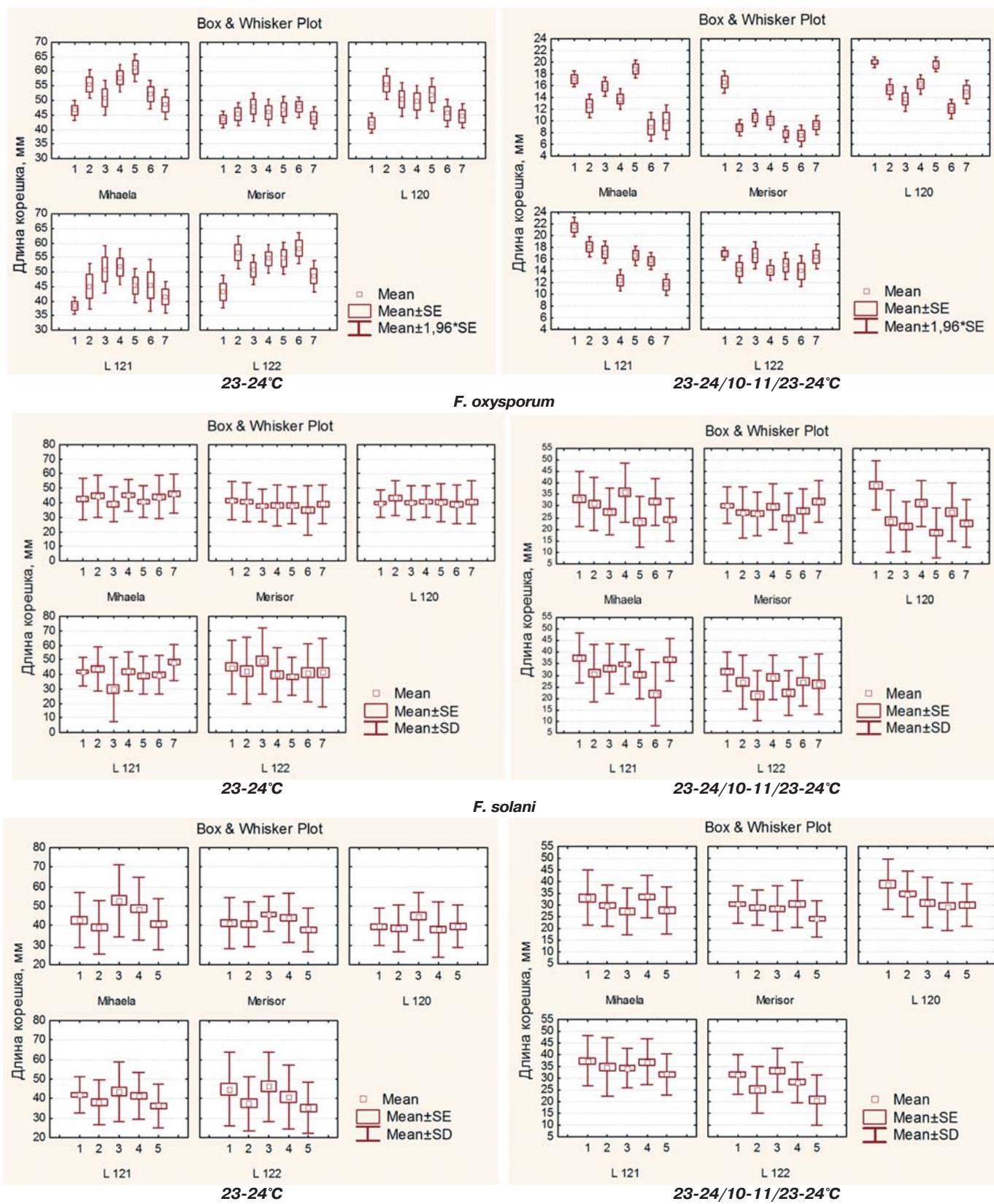


Рис. 2. Влияние культурального фильтрата грибов *Fusarium* на длину корешка томата при разных температурных условиях
Fig. 2. The effect of the *Fusarium* fungi culture filtrate on the length of the tomato root at different temperature conditions

По сравнению с оптимальной температурой при режиме II во многих вариантах рост корешка был существенно ингибирован, особенно заметно это было у линии L 120, у которой снижение показателя варьировало в пределах -29,3...-52,4%. Наиболее устойчивым оказался сорт Merisor, длина корешка которого в вариантах с КФ была практически на уровне контроля.

В случае гриба *F. gibbosum* отмечено, что показатель в варианте с КФ не потерпел существенных изменений, а

при чередовании температур произошло ингибиование роста, особенно это было заметно для L 120 (КФ2, КФ3, КФ4), L 122 (КФ1, КФ4).

Факторным анализом взаимодействия гриб x температура по параметру длины корешка выявлено, что сумма квадратов варьировала в значительной степени в изученных вариантах. За исключением варианта «*F. gibbosum*, I», в случае которого изолят гриба имел наибольший вклад в источник вариабельности изученного признака, генотипи-

Таблица 4. Вариабельность и наследуемость длины корешка томата при взаимодействии с грибными патогенами
Table 4. Variability and inheritance of the length of the tomato root when interacting with fungal pathogens

Параметр	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. solani</i>		<i>F. gibbosum</i>	
	I	II	I	II	I	II
σ²G	141,47	68,27	42,67	102,0	35,77	60,98
σ²Ph	487,47	108,77	262,67	217,0	214,77	153,28
h²	0,290	0,628	0,163	0,47	0,167	0,398
GCV, %	24,33	55,90	15,94	36,53	14,41	25,88
PCV, %	45,16	70,56	39,56	53,28	35,51	41,04
PCV-GCV, %	20,83	14,66	23,62	16,75	21,1	15,16
GA	11,46	9,32	5,09	11,31	4,90	8,45
GAM, %	23,44	63,05	12,23	40,90	11,79	28,02

ческий фактор томата имел наибольшее значение в реакции корешка на патоген и температуру (табл. 3).

В связи с вышесказанным, генетические и фенотипические вариансы варьировали в значительной степени в зависимости от гриба и температуры, что отразилось на широкой амплитуде коэффициента наследуемости: 0,16 ... 0,63. При этом отмечено, что значения h^2 признака при действии грибов были намного выше в случае чередования оптимальной и низкой температуры (табл. 4).

Разница PCV-GCV колебалась в пределах 14,66...23,62%, что свидетельствует о довольно значительном влиянии среды, т.е. гриба и температуры на изученный признак. При этом она была ниже при втором режиме, что связано, по-видимому, с повышением значимости генотипического фактора в реакции на совместное действие гриба и неблагоприятной температуры.

Выводы

1. Изучением реакции растений пяти перспективных генотипов томата на культуральные фильтраты грибов *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. gibbosum* установили выраженную

специфичность всхожести семян и роста корешка. При этом чередование оптимальной и низкой температур вызвало усиление действия грибов, способствуя тем самым идентификации наиболее устойчивых генотипов томата – линий L 120 и L 121.

2. Совместное действие КФ грибов Fusarium и чередование оптимальной и низкой температур (23...24°C и 10...11°C) на этапе прорастания семян и раннего развития растений томата способствовало увеличению генетической и фенотипической вариансы признака всхожести, однако для роста корешка оба типа вариабельности имели индивидуальный характер, в зависимости от вида гриба.

3. Наиболее высокие показатели коэффициента наследуемости и генетического прогресса для всхожести семян и длины корешка при чередовании оптимальной и пониженной температуры во взаимодействии растений с патогенами Fusarium свидетельствуют о значительном вкладе генетической аддитивной вариансы в величину признаков, что имеет немаловажное значение для разработки систем ускоренной идентификации резистентных форм томата.

Об авторах:

Лупашку Галина Алексеевна – доктор биологических наук, профессор, зав. лаб. прикладной генетики
Михня Надежда Ильинична – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаб. прикладной генетики
Гавзэр Светлана Ивановна – научный сотрудник лаборатории прикладной генетики

About the authors:

Galina A. Lupashku – Doc.Sci.(Biology), professor,
head of laboratory applied genetics
Nadejda I. Mihnea – Doc.Sci.(Biology),
Leader Researcher of laboratory applied genetics
Svetlana I. Gavzer – Scientific Researcher laboratory
of applied genetics

● Литература / References

- Adeniji O.T. Genetic variation and heritability for foliage yield and yield component traits in edible *Amaranthus cruentus* [L.] genotypes. *Bangladesh J. Agril. Res.* 2018;43(3):513-524.
- Akbar A., Hussain S., Ullah K., Fahim M., Ali G.S. Detection, virulence and genetic diversity of *Fusarium* species infecting tomato in Northern Pakistan. *PLoS ONE.* 2018;13(9):e0203613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203613>
- Balkan A. Genetic variability, heritability and genetic advance for yield and quality traits in M2-4 generations of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Turkish J. of Field Crops.* 2018;(23):173-179.
- Bodah E.T. Root rot diseases in plants: a review of common causal agents and management strategies. *Agri Res & Tech: Open Access J.* 2017;5(3). DOI: 10.19080/ARTOAJ.2017.04.555661
- Carmona S.L., Burbano-David D., Gómez M.R. et al. Characterization of Pathogenic and Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates Associated with Commercial Tomato Crops in the Andean Region of Colombia. *Pathogens.* 2020;9(1):70. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010070>
- Fazio G., Stevens M.R., Scott J.W. Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (Frl) in tomato. *Euphytica.* 1999;105(3):205-210.
- Kim J.T., Park I.H., Oung I.H., Yu S.H. Crown and root rot of greenhouse tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Korea. *Plant Pathol. J.* 2001;17(5):290-294.
- Ozbay N., Newman S.E. Fusarium Crown and Root Rot of Tomato and Control Methods. *Plant Pathology J.* 2004;3(1):9-18.
- Palmero D., de Cara M., Iglesias C. et al. Comparative study of the pathogenicity of seabed isolates of *Fusarium equiseti* and the effect of the composition of the mineral salt medium and temperature on mycelial growth. *Brazilian J. of Microbiology.* 2011;42(3):948-953.
- Ślusarski Cz. Choroby odglebowe pomidorów (cz. II). W bezglebowej uprawie pod oslonami. *Haslo Ogrodnicze.* 2000;(2):46-49.
- Szczechura W., Staniaszek M., Habdas H. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* – the cause of *Fusarium* crown and root rot in tomato cultivation. *J. of Plant Protection Research.* 2013;53(2):172-176.