

تأثیر شاخص انتخاب در لاین‌های والد بر مقاومت آمیخته‌های کرم ابریشم به ویروس پلی‌هیدروسیس هسته‌ای

پ. پوراسمعیلی^۱، م. غنی‌پور^۲، س. ض. میرحسینی^۳ و ع. ر. صیداوی^۴

چکیده

این آزمایش جهت بررسی تأثیر انتخاب به وسیله شاخص در چهار لاین تجاری کرم ابریشم ایران (۱۰۷، ۱۱۰، ۱۵۳ و ۱۵۴) بر مقاومت آمیخته‌های F_1 حاصل از تلاقی آنها شامل 154×153 ، 153×154 ، 110×107 و 107×110 در شرایط آلودگی به ویروس فوق اجرا شد. بدین منظور هر یک از این لاین‌ها در سطح 3P طی ۹ نسل تحت برنامه انتخاب به وسیله شاخص قرار گرفتند. والدین نسل بعد لاین‌های 3P در هر یک از این ۹ نسل، با تشکیل ماتریس انتخاب براساس پارامترهای توارث‌پذیری، همبستگی بین سه صفت وزن پيله، وزن قشر پيله و درصد قشر پيله و میانگین فنوتیپی صفات انتخاب شدند. در نسل دهم، جمعیت 2P (حاصل از آمیزش تصادفی 3P) به طور تصادفی آمیزش داده شده و جمعیت P از هر یک از این لاین‌ها تولید و در دو گروه انتخابی و شاهد در شرایط روستایی (تلنبار) پرورش یافتند. جمعیت P در گروه شاهد از تلاقی جمعیت 2P حاصل از لاین‌های 3P غیرانتخابی تولید شد. سپس آمیخته‌های F_1 تولید و در گروه‌های شاهد و انتخابی به طور همزمان پرورش داده شدند. همه لاروها تا پایان سن سوم لاروی تحت شرایط مدیریتی یکسان و طبق استانداردهای متداول پرورش یافتند و سپس اولین وعده برگ مصرفی لاروهای سن چهارم به طور یکنواخت به ویروس عامل پلی‌هیدروسیس هسته‌ای آغشته شد. طبق نتایج حاصل، آمیخته‌های 110×107 و 154×153 به طور معنی‌داری برای صفات انفرادی پيله دارای عملکرد بالاتری بودند ($P < 0.05$). در ضمن درصد پيله خوب، پيله متوسط، پيله ضعیف، پيله دوگانه، وزن کل پيله تولیدی، ماندگاری لارو و شفیره مورد مطالعه قرار گرفتند که وجود ارتباط منفی بین صفات مربوط به مقاومت و صفات تولیدی را نشان داد. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که استفاده از شاخص انتخاب علاوه بر بهبود عملکرد تولیدی و اقتصادی آمیخته‌های کرم ابریشم تأثیر منفی روی مقاومت آنها نسبت به بیماری‌ها می‌گذارد. لذا با توجه به نتایج این پژوهش توصیه می‌شود ضرایب اقتصادی و پارامترهای ژنتیکی صفات تولیدی، مقاومت و خصوصیات کمی پيله توأمأ برآورد شود و سپس انتخاب والدین برای تولید تخم نوغان تجاری کرم ابریشم براساس آن انجام پذیرد.

واژه‌های کلیدی: شاخص انتخاب، هیبرید، کرم ابریشم، پيله، پلی‌هیدروسیس هسته‌ای

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

۲- پژوهشگر مرکز تحقیقات کرم ابریشم کشور

۳- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

۴- استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت (نویسنده مسئول مقاله)

مقدمه

ابریشم به عنوان ملکه الیاف در دنیا کاربردهای گسترده‌ای داشته و از ارزش افزوده فوق‌العاده‌ای برخوردار می‌باشد. پرورش کرم ابریشم و تولید مصنوعات ابریشمی از صنایع کهن در آسیا بوده و زندگی بسیاری از مردم به آن وابسته است. از سویی دیگر هر گونه بهبود کمی و کیفی تخم نوغان تجاری کشور، به نوبه خود تاثیر مستقیم بر وضع معیشتی کشاورزان تولیدکننده ابریشم و نیز تاثیر غیر مستقیم بر زندگی بافندگان و دست اندرکاران صنعت فرش خواهد داشت.

نوغانداری کشور براساس پرورش آمیخته‌های (F₁) حاصل از لاین‌های خالص تجاری پایه ریزی شده است و به این جهت تولید لاین‌های با استعداد ژنتیکی مناسب از عوامل بسیار مهم تضمین کننده سود مناسب در این صنعت است. انتخاب مهمترین ابزار اصلاح نژادی جهت بهبود عملکرد اقتصادی این لاین‌ها می‌باشد (۵). هدف عمومی انتخاب در اصلاح نژاد حیوانات به دست آوردن نسل جدیدی است که از کارایی بالاتری نسبت به نسل فعلی برخوردار باشد (۶). استفاده از شاخص انتخاب بیشترین پیشرفت ژنتیکی در کوتاهترین زمان ممکن را نسبت به سایر روش‌های انتخاب به دنبال خواهد داشت (۸).

شاخص انتخاب اولین بار در سال ۱۹۳۶ توسط اسمیت برای استفاده در اصلاح نباتات و سپس در سال ۱۹۴۳ توسط هازل برای استفاده در اصلاح نژاد دام ارائه گردید (۹). شاخص انتخاب به صورت تابعی از مشاهدات مختلف تعریف می‌شود که وقتی حیوانات

براساس آن انتخاب می‌شوند میزان پیشرفت ژنتیکی (یک ارزش ژنتیکی کل که تابعی خطی از ارزش‌های یک صفت یا چند صفت تعریف شده است) حداکثر می‌شود. در تشکیل شاخص انتخاب برای چند صفت، لازم است پارامترهای ژنتیکی و ضرایب اقتصادی صفات موثر در انتخاب برآورد شوند. میرحسینی و همکاران (۱۲) نیز پس از برآورد ارزش‌های اقتصادی و پارامترهای ژنتیکی صفات پيله، شاخص‌های انتخاب را برای شش وارسته تجاری کرم ابریشم تعیین کردند.

هرگونه بهبود در پتانسیل ژنتیکی وارسته‌های مورد استفاده برای تولید تخم نوغان داخلی و ارائه وارسته‌های مقاوم به بیماری‌های شایع، موجب افزایش کارایی و درآمد کشاورزان تولیدکننده ابریشم خواهد شد. بیماری گراسری از بیماری‌های حاد ویروسی کرم ابریشم است که موجب خسارات زیادی به نوغانداران می‌شود. عامل بروز بیماری، ویروس پلی‌هیدروسیس هسته‌ای^۱ است که علاوه بر ایجاد تلفات لاروی، بر کمیت و کیفیت پيله ابریشم تولید شده تأثیر منفی ایجاد می‌نماید (۱۷). اجرای طرح‌های اصلاح نژادی به منظور جداسازی و خالص نمودن لاینهای مقاوم به بیماری در وارسته‌های پر تولید بدون کاهش سطح تولید باید در اولویت قرار گیرد. هاکيو و همکاران (۷)، سوهن و همکاران (۱۹) و تیاگاراگان و همکاران (۲۲) بکارگیری روش‌های به نژادی، وجود وارسته‌های جدید پرتولید مقاوم به بیماری را گزارش کردند (۷، ۱۹ و ۲۲). به علاوه واتاناب (۲۳) نشان داد که مقاومت به بیماری در کرم

ابریشم، تحت تاثیر عوامل ژنتیکی است. از این رو نقش اصلاح نژاد را در پدید آوردن واریته‌های پرتولید مقاوم پر رنگ تر نمود. پژوهشگران دیگر هم نحوه مقاوم‌سازی لاین‌های کرم ابریشم در برابر عامل بیماری گراسری یعنی ویروس پلی هیدروسیس هسته‌ای را تشریح کردند (۱۳ و ۲۱). زو و همکاران (۲۴) نیز گزارش کردند مقاومت در برابر ویروس پلی هیدروسیس هسته‌ای در کرم ابریشم از توارث کمی - کیفی تبعیت می‌کند. در جوامع کرم ابریشم، آمیزش‌های تصادفی در نسل‌های متوالی به همراه انتخاب طبیعی، باعث افزایش فراوانی ژن‌های اصلی و ژن‌های تنظیم کننده خواهد شد. از طرف دیگر در اکثر گونه‌های جانداران وجود همبستگی ژنتیکی منفی بین خصوصیات مقاومت و خصوصیات تولیدی به اثبات رسیده است. بنابراین انتظار می‌رود در صورت وجود آمیزش تصادفی، طبیعت با مقاوم ساختن حیوانات در برابر محیط خارجی بومی، تعادل هاردی واینبرگ صفات تولیدی را بر خلاف خواست و منافع انسان تغییر دهد. به این علت است که حیوانات بومی دارای مقاومت مطلوب بوده و در اکثر صفات تولیدی از کمیت نامطلوبی برخوردارند. بر عکس با انتخاب روی خصوصیات تولیدی لاین‌های کرم ابریشم و افزایش چشمگیر توان تولیدی آنها در نسل‌های متوالی، مقاومت آنها به شدت کاهش پیدا خواهد کرد. این موضوع باید هنگام طراحی برنامه‌های اصلاحی و انتخاب لاین‌ها مد نظر قرار گیرد تا با در نظر گرفتن ارزش اقتصادی و رابطه بین صفات، تعادل لازم را

برقرار نمود. بهره‌گیری از روش شاخص انتخاب علاوه بر بهبود عملکرد لاین‌ها، تأثیر چشمگیر و غیر قابل انکاری در افزایش تولید آمیخته‌های کرم ابریشم دارد (۱۴). نوغانداران کرم ابریشم آمیخته (F_1) را پرورش می‌دهند. بنابراین مقاومت آمیخته‌های کرم ابریشم به گراسری اهمیت زیادی دارد. بر این اساس لازم است تاثیر انتخاب به‌وسیله شاخص روی مقاومت آمیخته‌ها (پس از طی مراحل 2P, 3P و P) بررسی شود. در واقع با توجه به احتمال وجود همبستگی منفی بین تولید و مقاومت، لازم است عملکرد آمیخته‌های حاصل از لاین‌های انتخاب شده به روش شاخص انتخاب مورد بررسی قرار گیرد. هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر انتخاب به وسیله شاخص در لاین‌های 3P بر مقاومت آمیخته‌های F_1 کرم ابریشم به ویروس پلی هیدروسیس هسته‌ای می‌باشد.

مواد و روشها

هر یک از لاین‌های تجاری ۱۰۷، ۱۱۰، ۱۵۳ و ۱۵۴ در سطح 3P^۱ طی ۹ نسل تحت برنامه انتخاب به وسیله شاخص قرار گرفتند. ضرایب شاخص انتخاب استفاده شده برای هر یک از لاین‌های تجاری در جدول ۱ نشان داده شده است (۴). در پایان انتخاب در نسل نهم، جمعیت 2P^۲ بدون انجام انتخاب از لاین‌های انتخابی (3P) تولید گردید. جمعیت‌های 2P^۲ پرورش یافته و تخم نوغان مادر (P^۳) بدون انتخاب تولید گردید. جمعیت P^۳ انتخابی در شرایط روستایی (تلنبار) پرورش یافتند. همچنین تخم نوغان P حاصل از لاین‌های

1- Great grand parent

2- Grand parent

3- Parent

خوب (۲۵ نر و ۲۵ ماده) هر تکرار بر وزن کل پنجاه پیله خوب آن تکرار محاسبه و به صورت درصد بیان گردید. برای تشخیص شفیره‌های نر و ماده از یکدیگر، رؤیت اندام‌های جنسی شفیره‌ها ملاک عمل قرار گرفت، به این ترتیب که شفیره‌های دارای اندام‌های جنسی X شکل ماده و مابقی نر در نظر گرفته شدند.

همچنین رکوردهای خانوادگی مربوط به تولید و مقاومت مانند درصد پیله‌های خوب، متوسط، ضعیف و دوگانه، وزن کل پیله تولیدی، درصد ماندگاری لارو، درصد ماندگاری شفیره خوب و کل شفیرگی نیز اندازه‌گیری گردید. به این منظور پیله‌ها براساس فرم ظاهری، سختی و نرمی قشر و تمیزی سطوح داخلی و بیرونی قشر به چهار دسته پیله‌های خوب، متوسط، ضعیف و دوگانه دسته‌بندی شده و درصد پیله‌های هر دسته از تقسیم تعداد پیله‌های آن دسته بر تعداد کل پیله‌های آن تکرار محاسبه شد. درصد ماندگاری لاروها از تقسیم تعداد لاروهای زنده انتهای دوره پرورش بر تعداد لاروهای موجود در ابتدای دوره پرورش حاصل شد که به صورت درصد بیان گردید. همچنین کلیه پیله‌ها از نظر سلامت یا بیماری و تلفات شفیره داخل آن مورد بررسی قرار گرفت. درصد ماندگاری شفیره در هر تکرار نیز از تقسیم تعداد شفیره‌های زنده موجود در هر دسته پیله آن تکرار بر تعداد کل شفیره‌های زنده و مرده آن دسته پیله در آن تکرار محاسبه گردید. درصد ماندگاری کل شفیرگی در هر تکرار نیز از تقسیم تعداد شفیره‌های زنده موجود در آن تکرار بر تعداد کل شفیره‌های زنده و مرده آن

غیرانتخابی به عنوان جمعیت شاهد تهیه و به طور همزمان پرورش داده شدند. پس از ظهور پروانه‌ها، پروانه‌های نر و ماده به گونه‌ای با هم تلاقی داده شدند که تخم نوغان آمیخته‌های F_1 یعنی آمیخته‌های مادر ژاپنی 154×153 و 110×107 و آمیخته‌های مادر چینی 153×154 و 107×110 تولید شود. هر آمیخته در دو گروه شاهد و انتخابی پرورش داده شد. گروه شاهد شامل آمیخته‌هایی بود که در والدین 3P آنها روش شاخص انتخاب اعمال نشده بود. گروه انتخابی هم شامل آمیخته‌هایی بود که در والدین 3P آنها به مدت نه نسل متوالی روش شاخص انتخاب اعمال شده بود. هر آمیخته در شش تکرار (هر تکرار شامل ۳۰۰ لارو) پرورش یافت. کلیه لاروهای آزمایش با غلظت LD_{50} از ویروس پلی‌هیدروسیس هسته‌ای (NPV) آلوده شدند. به منظور آلوده‌سازی، برگ توت مصرفی نخستین وعده غذایی در شروع سن چهارم لاروها به وسیله محلول تهیه شده از ویروس آلوده‌سازی شد.

در پایان پرورش رکوردهای انفرادی از قبیل وزن پیله، وزن قشر پیله و درصد قشر پیله ثبت شد. وزن پیله از تقسیم وزن پنجاه پیله خوب هر تکرار (۲۵ نر و ۲۵ ماده) بر عدد پنجاه محاسبه شد. وزن قشر پیله از تقسیم وزن قشر پنجاه پیله خوب هر تکرار (۲۵ نر و ۲۵ ماده) بر عدد پنجاه محاسبه شد. برای اندازه‌گیری وزن قشر پیله، ابتدا سر پیله با تیغ بریده شده و شفیره و پوسته آن خارج گردید، سپس وزن قشر باقیمانده توزین گردید. درصد قشر پیله هم از تقسیم وزن قشر پنجاه پیله

تکرار محاسبه گردید. سپس داده‌ها توسط نرم‌افزار EXCEL در کامپیوتر ثبت و ذخیره شدند.

جدول ۱- ضرایب شاخص انتخاب (ضرایب اقتصادی) در واریته‌های مورد مطالعه

واریته مورد مطالعه	وزن پيله	وزن قشر	درصد قشر
۱۱۰	-۴۴۱۸۰/۰۶	۲۸۳۴۷۱/۰۵	-۳۱۱۸/۹۱
۱۰۷	۸۶۶۶/۵۵	۲۸۶۹۷/۲۹	۱۰۲۶/۹۶
۱۵۳	-۷۵۲۱۸/۹۸	۵۹۱۴۳۰/۷۱	-۶۰۸۱/۸
۱۵۴	۳۲۶۹/۰۸	۴۷۵۵۸/۶۴	۶۲۴/۷۳

منفی بودن ضرایب شاخص انتخاب به این مفهوم است که پیشرفت ژنتیکی مربوطه، مطلوب نیست.

آمیخته‌های مختلف بر صفات انفرادی پيله بسیار معنی‌دار بود ($P < 0/01$). معنی‌دار شدن اثر آمیخته‌ها نشان دهنده این است که میزان مقاومت به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر پتانسیل ژنتیکی جمعیت‌ها قرار دارد. آمیخته‌های مختلف از تنوع ژنتیکی گوناگونی برخوردار بوده و توانایی‌های متفاوتی را بروز می‌دهد. این توانایی تابعی از ساختار ژنتیکی هر آمیخته در شرایط خاص محیطی می‌باشد. پیش از این هم محققانی نظیر بارمان و همکاران (۱) و سن و همکاران (۲۰) وجود اختلاف بین آمیخته‌ها را گزارش کردند. یکی از مهم‌ترین علل تفاوت آمیخته‌ها با یکدیگر می‌تواند تفاوت ساختار ژنتیکی و مولفه‌های موثر بر عملکرد آنها باشد (۱ و ۲۰).

تاثیر جنس نیز روی صفات وزن پيله، وزن قشر پيله و درصد قشر پيله به شدت معنی‌دار می‌باشد ($P < 0/05$). همچنین اثر متقابل آمیخته و گروه هم فقط برای صفت وزن قشر پيله معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

با استفاده از مدل آماری زیر کل اطلاعات جمع‌آوری شده برای صفات انفرادی و گروهی تجزیه و تحلیل شدند. به‌منظور تجزیه و تحلیل صفات از رویه GLM نرم‌افزار SAS، ویرایش 6.12 استفاده گردید. برای مقایسه میانگین صفات در گروه‌های مختلف و تفاوت بین آنان از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ استفاده شد (۳).

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + H_j + S_k + (GH)_{ij} + e_{ijk} \quad (1)$$

Y_{ijk} : مقدار مشاهده

μ : میانگین جمعیت

G_i : اثر i امین گروه آزمایشی (شاهد و انتخابی)

H_j : اثر j امین آمیخته (چهار آمیخته)

S_k : اثر i امین جنس (نر و ماده)

$(GH)_{ij}$: اثر متقابل j امین آمیخته در

i امین گروه

e_{ijk} : عوامل باقیمانده

نتایج و بحث

همان‌گونه که جدول ۲ نشان می‌دهد تاثیر گروه آزمایشی (انتخابی و شاهد) و نیز تاثیر

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات پیله (میانگین مربعات) برای منابع تغییر مختلف

منبع تغییر	درجه آزادی	وزن پیله	وزن قشر پیله	درصد قشر پیله
گروه	۱	۰/۴۱۵**	۰/۱۲۷**	۱۹۶/۱۸۱**
آمیخته	۳	۲/۲۱۴**	۰/۱۰۷**	۱۹/۵۹۹**
جنس	۱	۴۰/۳۹۳**	۰/۰۰۰	۷۷۵۱/۶۶۹**
آمیخته «گروه»	۳	۰/۰۵۲	۰/۰۰۴*	۲/۲۱۲

*: معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و **: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱.

جدول ۳ بیانگر مقایسه صفات وزن پیله، وزن قشر پیله و درصد قشر پیله در گروه‌های شاهد و انتخابی است. به‌طور کلی برای این صفات بین گروه شاهد و انتخابی تفاوت‌ها معنی‌دار بودند ($P < 0/05$).

جدول ۳- مقایسه میانگین \pm خطای استاندارد (SE) صفات پیله بین دو گروه شاهد و انتخابی

گروه	وزن پیله (گرم)	وزن قشر پیله (گرم)	درصد قشر پیله
انتخابی	۱/۵۱۶ ^a \pm ۰/۰۳۶	۰/۳۱۶ ^a \pm ۰/۰۱۵	۲۰/۹۶۹ ^a \pm ۰/۰۷۰
شاهد	۱/۴۸۹ ^b \pm ۰/۰۴۹	۰/۳۰۱ ^b \pm ۰/۰۱۹	۲۰/۳۹۱ ^b \pm ۰/۰۸۱

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف متفاوت از نظر آماری تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0/05$).

جدول ۴ نمایانگر آن است که وزن پیله در هر آمیخته، تحت تأثیر اثر متقابل پتانسیل وراثتی آن آمیخته و شرایط محیطی قرار دارد. از بین شرایط محیطی مؤثر می‌توان به نحوه تغذیه از برگ توت، و چگونگی تکامل و توسعه غده‌های ابریشمی اشاره نمود (۴). نتایج به دست آمده در جدول ۴ بیانگر برتری گروه انتخابی بر گروه شاهد در دو آمیخته ۱۱۰×۱۰۷ و ۱۵۴×۱۵۳ برای صفت وزن پیله می‌باشد. این نشان می‌دهد که علیرغم افزایش عملکرد تولیدی این دو آمیخته توسط انتخاب به وسیله سیستم شاخص، کاهش در عملکرد مقاومتی آنها به‌وجود نیامده است. البته برای دو آمیخته ۱۰۷×۱۱۰ و ۱۵۴×۱۵۳ افزایش حساسیت زیادی نسبت به عوامل محیطی (ویروس پلی‌هیدروسیس هسته‌ای) وجود داشت. لذا عملکرد و وزن پیله گروه انتخابی مشابه عملکرد و وزن پیله گروه شاهد بود. به عبارت دیگر به دلیل شرایط نامساعد محیطی و اثر متقابل ژنوتیپ و محیط، امکان بهبود پتانسیل تولید بر اثر استفاده از سیستم شاخص انتخاب وجود نداشت. در آمیخته ۱۵۴×۱۵۳ لاروهای دارای توان ژنتیکی بالا برای وزن پیله قبل از رسیدن به مرحله پیله‌تنی از بین رفتند. این امر موجب کاهش میانگین وزن پیله لاروهای باقیمانده گردید.

جدول ۴ نمایانگر آن است که وزن پیله در هر آمیخته، تحت تأثیر اثر متقابل پتانسیل وراثتی آن آمیخته و شرایط محیطی قرار دارد. از بین شرایط محیطی مؤثر می‌توان به نحوه تغذیه از برگ توت، و چگونگی تکامل و توسعه غده‌های ابریشمی اشاره نمود (۴). نتایج به دست آمده در جدول ۴ بیانگر برتری گروه انتخابی بر گروه شاهد در دو آمیخته ۱۱۰×۱۰۷ و ۱۵۴×۱۵۳ برای صفت وزن پیله می‌باشد. این نشان می‌دهد که علیرغم افزایش عملکرد تولیدی این دو آمیخته توسط انتخاب به وسیله سیستم شاخص، کاهش در عملکرد مقاومتی آنها به‌وجود نیامده است. البته برای

شده است، درصد ماندگاری کل شفیرگی این آمیخته در شرایط شاهد و انتخابی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارد. این امر به این مفهوم است که اعمال شاخص انتخاب سبب کاهش معنی‌دار مقاومت این آمیخته در شرایط تنش بیماری می‌گردد. در همین راستا لی و همکاران (۱۰) هم عنوان کردند برخی واریته‌ها هنگام بروز بیماری گراسری از لحاظ مقاومت تفاوت معنی‌داری با سایر واریته‌ها نشان می‌دهند.

البته در آمیخته ۱۵۴×۱۵۳ علی‌رغم معنی‌دار نشدن مقایسه‌ها، جهت‌دار بودن انتخاب انجام گرفته را می‌توان از طریق میانگین عددی بالاتر به دست آمده در گروه انتخابی نسبت به شاهد نتیجه‌گیری نمود. مقایسه میانگین‌های دو گروه شاهد و انتخابی در آمیخته ۱۱۰×۱۰۷، نشانگر استعداد بالقوه این تنوع ژنتیکی در ابتلا به بیماری ناشی از وجود ویروس پلی‌هیدروسیس هسته‌ای (NPV) و تنش‌های محیطی بیماریزا می‌باشد. زیرا همان‌طوری که در جدول ۶ هم نشان داده

جدول ۴- مقایسه میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (SEM) صفات پيله به تفکیک آمیخته‌های مختلف

درصد قشر پيله	وزن قشر پيله (گرم)	وزن پيله (گرم)	گروه	آمیخته
۲۰/۸۶۱ ^a \pm ۰/۷۳	۰/۳۰۵ ^a \pm ۰/۰۱۱	۱/۴۷۳ \pm ۰/۰۲۶	انتخابی	۱۰۷×۱۱۰
۲۰/۳۸۲ ^b \pm ۰/۸۹	۰/۲۹۴ ^b \pm ۰/۰۲۶	۱/۴۵۹ \pm ۰/۰۳۸	شاهد	
۲۰/۹۷۰ ^a \pm ۰/۷۰	۰/۳۰۳ ^a \pm ۰/۰۱۱	۱/۴۵۵ ^a \pm ۰/۰۱۹	انتخابی	۱۱۰×۱۰۷
۲۰/۳۶۴ ^b \pm ۰/۸۴	۰/۲۸۶ ^b \pm ۰/۰۱۹	۱/۴۱۶ ^b \pm ۰/۰۲۸	شاهد	
۲۰/۷۵۱ ^a \pm ۰/۶۲	۰/۳۲۱ ^a \pm ۰/۰۱۵	۱/۵۵۸ \pm ۰/۰۲۱	انتخابی	۱۵۳×۱۵۴
۲۰/۲۵۴ ^b \pm ۰/۷۸	۰/۳۱۱ ^b \pm ۰/۰۱۶	۱/۵۵۱ \pm ۰/۰۲۹	شاهد	
۲۱/۲۹۳ ^a \pm ۰/۶۹	۰/۳۳۳ ^a \pm ۰/۰۱۰	۱/۵۷۶ ^a \pm ۰/۰۳۳	انتخابی	۱۵۴×۱۵۳
۲۰/۵۶۴ ^b \pm ۰/۸۲	۰/۳۱۲ ^b \pm ۰/۰۱۷	۱/۵۳۱ ^b \pm ۰/۰۳۷	شاهد	

در هر ستون مربوط به هر آمیخته، میانگین‌های دارای حروف متفاوت از نظر آماری تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

(۲ و ۱۱).

بررسی تاثیر آلاینده‌های بیولوژیک شامل NPV با شاخص LD₅₀ روی هیبریدهای چهارگانه کرم ابریشم بر صفت وزن قشر پيله و درصد قشر پيله نشان می‌دهد که انتخاب بدون تاثیر منفی بر مقاومت کرم ابریشم باعث بهبود عملکرد این صفات می‌شوند. به عبارت دیگر آلاینده‌های بیولوژیک اثر بازدارنده‌ای روی صفات فوق ندارند. لذا بهبود صفت وزن قشر پيله و درصد قشر پيله توسط انتخاب به وسیله

مقاومت یک صفت کمی دارای توزیع پیوسته بوده و متأثر از ژن‌های دارای اثرات اصلی و نیز ژن‌های دارای اثرات جزئی می‌باشد. منگ (۱۱) و چن و همکاران (۲) اعلام کردند که مقاومت در برابر ویروس پلی‌هیدروسیس هسته‌ای به وسیله یک جفت ژن غالب روی کروموزوم بدنی یا غیر جنسی کنترل می‌شود. آنها همچنین نشان دادند که این خصوصیت تحت کنترل ژن‌های تنظیم کننده روی کروموزوم جنسی قرار دارد

دوران لاروی و مقاومت در دوران شفیرگی تفکیک می‌شوند. ماندگاری^۱ که معیاری عمومی برای اندازه‌گیری باروری و مقاومت به بیماری در حیوان است. این معیار گاهی هم به صورت بقاء^۲ و یا طول عمر تولیدی^۳ بیان می‌شود. قابلیت ماندگاری شفیره‌ها در داخل پيله به دلیل انتقال تمام صفات از نسلی به نسل دیگر توسط شفیره‌ها که بالقوه قابلیت تبدیل شدن به حشره بالغ را دارند، بسیار حائز اهمیت است. براساس جدول ۵ گروه آزمایشی (انتخابی و شاهد) اثر معنی‌داری بر تنوع صفات تولیدی مربوط به مقاومت دارد. تأثیر آمیخته‌ها بر درصد پيله خوب می‌تواند معیار مناسبی برای بیان یک صفت تولیدی محسوب شود. تأثیر آمیخته‌ها بر مقاومت لاروی معنی‌دار نبود، در صورتی که بر درصد ماندگاری شفیره خوب ($P < 0/05$) و درصد ماندگاری کل شفیرگی ($P < 0/01$) معنی‌دار بود.

جدول ۶ سطح دیگری از مقایسه‌های میانگین برای صفات تولیدی و مقاومتی که با استفاده از سیستم خانوادگی رکوردگیری شده‌اند را در شرایطی که تحت تیمار آلودگی با ویروس پلی‌هیدروسیس هسته‌ای قرار گرفته‌اند را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین دو گروه انتخابی و شاهد برای صفات تولیدی پيله وجود نداشت، با این وجود میانگین عددی صفت درصد پيله خوب برای کلیه آمیخته‌های مورد مطالعه به جز آمیخته 153×154 توسط سیستم انتخاب به وسیله شاخص بهبود یافت.

شاخص را می‌توان در مقایسه بین دو گروه انتخابی و شاهد که هر دو تحت شرایط یکسان محیطی بوده‌اند، ملاحظه نمود.

در آمیخته‌های 107×110 و 153×154 علیرغم عدم تفاوت معنی‌دار میانگین وزن پيله، مشاهده می‌شود که میانگین وزن قشر پيله و درصد قشر پيله در گروه انتخابی همچنان بالاتر است. بنابراین کاهش میانگین وزن پيله و در نتیجه کاهش وزن لاروی و (شفیرگی) به دلیل اختلالات فیزیولوژیک بوده و لاروهای دارای وزن پایین‌تر، همچنان توان تولید ابریشم خود را حفظ نموده‌اند، که این امر دلیل افزایش وزن و درصد قشر پيله در گروه انتخابی می‌باشد. با توجه به عدم اندازه‌گیری این فاکتورها در آزمایش فعلی، لازم است در آزمایش‌های بعدی، وزن لاروی و وزن شفیرگی هم اندازه‌گیری شوند تا این استدلال ثابت گردد. می‌توان نتیجه‌گیری نمود که میان صفات مقاومت و قشر پيله همبستگی وجود ندارد، در حالیکه بین وزن لاروی و (در نتیجه وزن پيله) و مقاومت همبستگی معنی‌داری موجود است. پیش از این مقدار این همبستگی ژنتیکی بین $0/64 - 0/58$ در واریته‌های مختلف گزارش شده بود (۴ و ۵). در جدول ۵ نتایج تجزیه واریانس برخی از صفات تولیدی و مقاومتی پيله نشان داده شده است. پتانسیل تولید هر موجود زنده‌ای ارتباط مستقیم با خصوصیات مقاومت آن دارد. از این رو صفات هر موجود زنده به دو دسته صفات تولیدی و صفات مقاومت تقسیم می‌شوند. صفات مقاومت خود به دو بخش مقاومت در

جدول ۵- تجزیه واریانس صفات تولیدی و مقاومت (میانگین مربعات) برای منابع تغییر مختلف

منبع تغییر	درجه آزادی	درصد پيله خوب	درصد پيله متوسط	درصد پيله ضعيف	درصد پيله دوگانه	وزن كل پيله توليدي	درصد ماندگاري لارو	درصد ماندگاري شفيه خوب	درصد ماندگاري كل شفيه رگي
گروه	۱	۲۰۱/۱۵۱	۲۳۱/۰۹۹*	۴/۸۶۲	۱/۴۰۶	۲۷۳/۵۹۱*	۱۱۴۲/۳۱۰	۳۲۱/۸۸۸*	۳۸۷/۳۶۲**
آميخته	۳	۱۰۵/۷۳۳	۳۱/۱۲۵	۳۷/۰۹۹**	۱۳/۳۹۳*	۱۳۱/۰۸	۱۶۸۹/۹۵۶	۱۷۳/۵۹۷*	۲۱۷/۵۷۱**
آميخته×گروه	۳	۱۱۸/۸۰۳	۵۹/۷۹۰	۴/۷۲۲	۵/۴۶۲	۲۸/۴۱۹	۱۴۶۷/۴۶۴	۸۳/۹۱۲	۱۰۴/۶۱۶
خطا	۴۰	۵۸/۳۰۱	۳۳/۲۵۶	۶/۱۶۰	۳/۹۸۹	۶۶/۹۳۷	۱۳۰۲/۵۳۷	۵۲/۷۰۸	۴۵/۹۶۴

*: معنی دار در سطح ۰/۰۵ و **: معنی دار در سطح ۰/۰۱.

جدول ۶- مقایسه میانگین ± خطای استاندارد میانگین (SEM) صفات تولیدی و مقاومت بین دو گروه انتخابی و شاهد به تفکیک آمیخته‌های مختلف

آميخته	گروه	درصد پيله خوب	درصد پيله متوسط	درصد پيله ضعيف	درصد پيله دوگانه	وزن كل پيله توليدي (گرم)	درصد ماندگاري لارو	درصد ماندگاري شفيه خوب	درصد ماندگاري كل شفيه رگي
۱۰۷×۱۱۰	انتخابی	۷۲/۵۶۰ ± ۴/۰۱	۱۹/۵۴۶ ± ۱/۹۸	۴/۱۲۸ ± ۰/۴۸	۳/۷۶۶ ± ۰/۲۵	± ۱۰/۱۷ ۲۴۷/۷۴	۵۹/۱۱۱ ± ۲/۱۵	۷۲/۱۷۳ ± ۳/۶۹	۶۶/۹۵۷ ^b ± ۳/۱۱
	شاهد	۶۶/۶۹۰ ± ۴/۴۵	۲۳/۶۷۷ ± ۲/۶۶	۴/۲۳۷ ± ۰/۴۴	۵/۳۹۶ ± ۰/۳۱	± ۱۱/۳۴ ۲۸۳/۲۸	۶۷/۷۷۸ ± ۲/۳۹	۸۲/۰۴۰ ± ۳/۹۹	۷۶/۲۴۶ ^a ± ۳/۸۰
۱۱۰×۱۰۷	انتخابی	۷۳/۹۴۶ ± ۴/۳۶	۱۸/۵۲۰ ± ۱/۴۳	۳/۲۳۵ ^a ± ۰/۳۶	۴/۲۹۸ ± ۰/۲۸	۲۴۷/۰۳ ± ۹/۶۵	۵۹/۲۷۸ ± ۲/۵۷	۷۷/۰۳۵ ± ۳/۸۷	۷۱/۸۰۷ ^b ± ۳/۹۱
	شاهد	۷۲/۹۰۴ ± ۴/۹۶	۲۲/۶۱۷ ± ۱/۹۰	۱/۵۸۸ ^b ± ۰/۲۹	۲/۸۹۰ ± ۰/۱۹	± ۱۰/۷۵ ۲۴۲/۵۲	۶۱/۰۵۶ ± ۳/۲۰	۸۶/۵۰۰ ± ۴/۵۲	۸۲/۵۷۷ ^a ± ۴/۱۹
۱۵۳×۱۵۴	انتخابی	۶۹/۵۳۵ ± ۵/۳۱	۲۰/۷۳۶ ± ۲/۳۲	۷/۴۱۳ ± ۰/۵۶	۲/۳۱۶ ± ۰/۱۷	۲۵۶/۰۱ ± ۱۱/۳۲	۵۵/۹۴۴ ± ۱/۸۷	۷۹/۲۳۷ ± ۳/۴۴	۶۹/۵۰۸ ± ۳/۰۸
	شاهد	۷۲/۰۶۶ ± ۵/۸۴	۱۹/۹۴۴ ± ۲/۱۱	۵/۶۶۳ ± ۰/۳۸	۲/۲۳۷ ± ۰/۲۴	± ۱۲/۳۸ ۲۷۵/۹۳	۶۱/۶۶۷ ± ۲/۵۰	۸۱/۲۱۴ ± ۴/۵۳	۷۴/۵۷۷ ± ۳/۸۷
۱۵۴×۱۵۳	انتخابی	۸۲/۲۹۶ ± ۴/۷۹	۱۲/۷۵۷ ± ۱/۱۳	۳/۰۳۷ ± ۰/۳۲	۱/۹۰۹ ± ۰/۱۳	± ۱۰/۵۹ ۲۵۱/۵۸	۵۴/۰۰۰ ± ۱/۶۸	۸۶/۵۴۰ ± ۳/۸۵	۸۱/۵۶۱ ± ۴/۵۶
	شاهد	۷۰/۳۰۰ ± ۵/۳۶	۲۲/۸۷۳ ± ۲/۱۴	۳/۷۸۰ ± ۰/۴۱	۳/۰۴۶ ± ۰/۲۷	۲۳۹/۳۸ ± ۹/۷۸	۵۶/۹۳۳ ± ۲/۸۱	۸۵/۹۴۸ ± ۳/۹۰	۷۹/۲۴۹ ± ۳/۹۳

در هر ستون مربوط به هر آمیخته، میانگین‌های دارای حروف متفاوت از نظر آماری تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

باز هم علت این مسئله را می‌توان به توارث‌پذیری بالای (۰/۶۲-۰/۵۳) واریته‌های به‌وجود آورنده این آمیخته نسبت داد (۵). راجو و کریشنا موثری (۱۵) نیز عملکرد آمیخته‌ها را مورد بررسی قرار دادند و اختلاف توان تولیدی ژنوتیپ‌های مختلف را تایید نمودند. در همین رابطه رایبر و گوویندان (۱۶)

برای صفت مقاومت در دوران لاروی و شفیگی نیز اختلاف معنی‌داری بین دو گروه شاهد و انتخابی وجود نداشت، با این وجود باز هم برتری میانگین عددی آمیخته ۱۵۳×۱۵۴ بین دو گروه انتخابی و شاهد نسبت به سایر آمیخته‌ها در پاسخ به انتخاب در شرایط افزایش حساسیت محیطی مشهود می‌باشد. که

روند صعودی سودآوری صنعت در سطح ملی ضروری به نظر می‌رسد. طبق نتایج این تحقیق، شاخص انتخاب روی صفات مربوط به مقاومت لاروی نسبت به بیماری‌ها تأثیر منفی می‌گذارد. بنابراین لازم است تحقیقات بیشتری درباره این گروه از صفات انجام شود. همچنین لازم است ضرایب اقتصادی و پارامترهای ژنتیکی صفات تولیدی، مقاومت و خصوصیات کمی پيله تواماً و براساس شرایط و سیستم مدیریتی مراکز حفظ و تکثیر لاین‌های کرم ابریشم کشور برآورد شود. به علاوه باید انتخاب سطوح والدین برای تولید تخم نوغان تجاری کرم ابریشم براساس این ضرایب اقتصادی و پارامترهای ژنتیکی انجام پذیرد، تا در مجموع بتوان عملکرد کلی ناشی از اعمال سیستم شاخص انتخاب را افزایش داد. در آینده توصیه می‌شود با طراحی آزمایشی جدید، بین آمیخته‌های مختلف نیز مقایساتی انجام شده و مشخص گردد کدام آمیخته بهترین عملکرد را در شرایط آلودگی دارد.

تشکر و قدردانی:

تحقیق حاضر با مساعدت و همکاری مرکز تحقیقات کرم ابریشم کشور صورت گرفت. بدین وسیله مؤلفین مراتب تشکر و قدردانی خود را از ریاست، کارشناسان و کارکنان مرکز ابراز می‌دارند.

عملکرد ۲۹ آمیخته کرم ابریشم را مورد بررسی قرار دادند و وجود اختلاف در توان تولیدی این آمیخته‌ها را عنوان کردند.

پیش از این هم گزارش شده بود که بیشترین تأثیر منفی ویروس، به ترتیب روی خصوصیات تعداد شفیره زنده و درصد ماندگاری شفیره ظاهر می‌گردد. این مسئله نشان می‌دهد که اوج بیماریزایی ویروس در مرحله شفیرگی است که موجب کاهش کیفیت پيله و ابریشم استحصالی خواهد گردید. در نتیجه انتظار می‌رود خسارت وارده در نتیجه بروز این بیماری بر کارخانجات ابریشم کشی و مراکز تولید کننده تخم نوغان بیشتر از نوغانداران تولید کننده پيله باشد (۴). سینگ و همکاران (۱۸) هم گزارشاتی مبنی بر وجود تفاوت در مقاومت آمیخته‌های کرم ابریشم در شرایط طبیعی منتشر ساختند که نتایج تحقیق حاضر تایید کننده آن می‌باشد.

نتایج تحقیق حاضر آشکار ساخت که کاربرد سیستم شاخص انتخاب در لاین‌های کرم ابریشم، علاوه بر بهبود عملکرد تولیدی آمیخته‌های کرم ابریشم تأثیر معنی‌داری بر مقاومت آمیخته‌های مورد مطالعه دارد. در دو آمیخته 110×107 و 154×153 ، در صورت استفاده از سیستم شاخص انتخاب، همبستگی منفی بین صفات تولیدی و مقاومتی به وجود نمی‌آید. بنابراین استفاده از این دو آمیخته برای افزایش کارایی اقتصادی سیستم تولید و

منابع:

1. Barman, A.C., K. Pasha, Anahar and S.U. Ahmed. 1988. Screening for resistance to per os infection with nuclear polyhedrosis virus in different multivoltine races of the silkworm. *Bangladesh J. Zool.*, 16(2): 85-92.
2. Chen, K.P., C.Q. Lin and Q. Yao. 1996. Studies on the resistance and heredity of silkworms to nuclear polyhedrosis virus disease. *Acta Sericol. Sinica*. 22: 160-164.
3. Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*. 11: 1-42.
4. ESCAP. 1993. Principles and techniques of silkworm breeding. New York, 169 pp.
5. Ghanipoor, M. 2002. Determination of selection indices for three commercial Iranian silkworm varieties. MSc thesis of Animal Sciences Department, Guilan University, Rasht, Iran, 160 pp.
6. Groen, A.F. 1990. Influences of Production circumstances on the economic revenues of cattle breeding programmes. *Anim. Sci.*, 51: 469-480.
7. Haque, M.T., S.M. Rahman and M.A. Salam. 1997. Development of high yielding bivoltine silkworm races of *Bombyx mori* L. suitable for the climatic conditions of Bangladesh. *Bangladesh J. Zool.* 25: 71-76.
8. Harris, D.L. 1970. Breeding for efficiency in livestock production: Defining the economic objectives. *J. Anim. Sci.*, 30: 860-865.
9. Hazel, L.N. 1943. The genetic basis for constructing selection indexes. *Genetics*. 30: 476-490.
10. Li, W.G., G.J. Zhang, H.L. Wang and T.Y. Zhang. 1994. Studies on free praline contents and resistance to NPV in different varieties of Chinese silkworm. *J. Shandong Agric. Univ.* 25(3): 272-276.
11. Meng, Z.Q. 1982. Inheritance of resistance to nuclear polyhedrosis by peroral inoculation in the silkworm (*Bombyx mori* L.). *Acta Sericol. Sinica*. 8: 133-138.
12. Mirhosseini, S.Z., M. Ghanipoor, A. Shadparvar and K. Etebari. 2005. Selection indices for cocoon traits in six commercial silkworm (*Bombyx mori* L.) lines. *Philippine Agric. Sci.*, 88: 328-336.
13. Palhan, V.B. and K.P. Gopinathan. 1996. Characterization of a local isolate of *Bombyx mori* nuclear polydedrosis virus. *Current Sci.*, 70: 147-153.
14. Pouresmaeli, P. 2007. Effect of index selection in 3P lines on production and resistance characteristics of commercial F₁ hybrids of Iranian silkworm. MSc thesis of Animal Sciences Department, Guilan University, Rasht, Iran, 114 pp.
15. Raju, P.J. and N.B. Krishnamurthy. 1995. Comparative evaluation of traditional and new multi-bi hybrids of silkworm (*Bombyx mori* L.) across seasons. *Indian J. Seric.* 34(1): 38-41.
16. Rayar, S.G. and R. Govindan. 1990. Performance of some single and three-way cross hybrids of silkworm *Bombyx mori* L. for larval traits. *Entomon.*, 15(3-4): 183-186.
17. Seidavi. A.R., M.R. Biabani and M.R. Gholami. 2004. The selection of highest resistant of silkworm commercial hybrids to viral disease of grasserie by means of screening technique. In Proceedings of "Biology in Asia International Conference". pp. 114-119.
18. Sen, R., A.K. Patnaik, M. Maheswari., and R.K. Datta. 1997. Susceptibility status of the silkworm germplasm stocks in India to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Indian J. Seric.* 36: 51-55.

- تأثیر شاخص انتخاب در لاین‌های والد بر مقاومت آمیخته‌های کرم ابریشم ۴۰
19. Singh, B.D., M. Biag., M. Balavenkatasubbaiah., S.D. Sharma, K. Sengupta and N.S. Reddy. 1990. Studies on the relative susceptibility of different breeds of silkworm to disease under natural conditions. *Indian J. Seric.* 29(1): 142-144.
 20. Sohn, K.W., K.W. Hong, S.J. Hwang, K.S. Ryu, K.M. Kim, S.R. Choi, K.Y. Kim and S.P. Lee. 1990. Breeding of Samkwangjam, a F1 hybrid silkworm variety suitable for summer-autumn rearing with the high silk yielding ability and a sex limited parent. *Research Reports of the Rural Development Administration, Farm Management, Agricultural Engineering and Sericulture.* 32: 1-6.
 21. Tewari, S.K., K. Vineet, R.K. Datta and V. Kumar. 1996. Ultrastructural studies on nuclear polyhedrosis virus infecting silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Exp. Biol.*, 34: 141-150.
 22. Thiagarajan, V., S. Masilamani, M.M. Ahsan and R.K. Datta. 1994. Stability analysis of economic traits in silkworm (*Bombyx mori* L.). *J. Genetics. Breed.*, 48: 345-351.
 23. Watanabe, H. 1986. Resistance of the silkworm *Bombyx mori* L. to viral infection. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 15: 131-139.
 24. Xu, C.W., H.D. Mo and Y. Ao. 2000. Maximum likelihood method for the qualitative-quantitative inheritance of endosperm traits and its application in the genetic analysis for amylase content in *Indica* rice. *Scientia Agric. Sinica.* 33: 23-29.

Effect of Selection Index on Resistance of Silkworm F₁ Hybrids to Nuclear Polyhedrosis Virus

P. Pouresmaeli¹, M. Ghanipoor², S.Z. Mirhosseini³ and A.R. Seidavi⁴

Abstract

This experiment was conducted to determine the effect of selection index in four iranian commercial silkworm lines (107, 110, 153, 154) on resistance of their hybrids including 107×110, 110×107, 153×154, 154×153 under stress of nuclear polyhedrosis virus (N.P.V) Infection. Selection index program was performed on 3P commercial lines during 9 generations. Later generation parents of 3P lines were selected in each generation, by forming selection matrix based on heritability parameters, correlation between cocoon weight, cocoon shell weight and cocoon shell percentage and phenotypic mean of traits. In the 10th generation, 2P populations (produced by random cross of 3P) were mated randomly and P (parent) silkworm eggs were produced by random mating of 2P population. P populations in selected and random groups were reared in village conditions (growths silkworm rearing house silkworm). Control P population was produced by crossing 2P population (produced by non-selected 3P lines). F₁ hybrids of control group (non-selected) were reared simultaneously. From the obtained results, the hybrids of 110×107 and 154×153 significantly showed the highest performance for individual cocoon traits (P<0.05). The best cocoon percentage, middle cocoon percentage, low cocoon percentage, double cocoon percentage, total cocoon weight, larva survival rate and pupation rate were studied, that showed negative relationship between resistance and production characteristics. The results demonstrated that selection index method have a negative effect on resistance of silkworm hybrids as well as improving production and economic performance of silkworm hybrids. It is recommended that economical coefficients and genetically parameters are estimated for productive, resistance and quantitative cocoon characters together. Then parents would be selected on the basis of those parameters.

Keywords: Selection Index, Hybrid, Silkworm, Cocoon, Nuclear Polyhedrosis

1- Former M.Sc. Student, College of agriculture, Guilan University

2- Researcher, Iran Silkworm Research Center

3- Associate Professor, College of agriculture, Guilan University

4- Assistant Professor, College of agriculture, Islamic Azad University, Rasht Branch (Corresponding Author)