

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.07.005

广西桑树品种遗传多样性 ISSR 分析^①

刘玲¹, 沈曦彤¹, 朱方容², 邱长玉²,
范小敏³, 陈祥平³, 柯皓天³, 陈仁芳¹

1. 西南大学 生物技术学院, 重庆 400716; 2. 广西壮族自治区蚕业科学研究院, 南宁 530011;
3. 四川省丝绸工程技术研究中心, 成都 610031

摘要: 利用 ISSR(inter-simple sequence repeat)分析了广西桑树品种的亲缘关系。刘圩7号、灵太3号、恭同5号、大寺12号、池塘1号、刘圩2号、那学8号、那陈2号、那学14号、小董1号、板朝1号、冯屋1号、邕新3号、邕新11号、恭同9号、太平2号、沙油4号、板屯车2号有较近的亲缘关系; 大寺特号、冯屋5号、池塘4号、太平新1号、恭城4号有较近的亲缘关系; 大寺5号、灵太1号、恭江1号、润盛4号、灵太2号、板罗1号、那楼14号、恭同4号有较近的亲缘关系; 钦州桑、大新白桑、广西鸡桑、全州长穗桑、环江1号、钦州长果桑、桂772、润州岛白桑、邕新荆桑12号、隆林鬼桑、隆林蒙桑有较近的亲缘关系。白桑种遗传变异大; 广东桑种亲缘关系靠近白桑, 支持中国植物志、GenBank 将广东桑置于白桑的变种。野生桑种与栽培桑种遗传背景明显不同。钦州桑、桂772、邕新荆桑12号遗传背景倾向野生桑, 在抗性、速生方面有独特优点, 在今后杂交育种中应注意利用。

关键词: 广西; 桑树品种; ISSR(inter-simple sequence repeat); 亲缘关系

中图分类号: S888.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-9868(2016)07-0030-06

广西1987年对德保、百色、隆林等18个县, 41个乡镇, 72个村点进行考察, 收集桑树资源241份。1992—1994年中国农业科学院品种资源所主持的国家科委课题(广西10万大山农作物种质资源考察), 广西蚕桑指导所和广西品种资源所参加, 再次对隆林等7个县46个乡镇进行桑资源考察, 收集桑资源162份。通过2次考察, 基本摸清了广西桑树种质资源状况。广西境内分布有白桑、广东桑、蒙桑、变种鬼桑、鸡桑、华桑、长果桑、长穗桑等7个种, 1变种。收集的桑树资源保存于广西蚕业科学研究院^[1-2]。

简单重复序列区间 ISSR(inter-simple sequence repeat)是 Zietkeiwitz 等^[3]发展起来的一种在微卫星基础上的分子标记, 它以 PCR 技术为基础, 利用真核生物基因组中广泛存在的简单重复序列来设计引物, 对2个相距较近, 方向相反的 SSR 序列之间的基因组片段进行扩增。它结合了 RAPD 和 SSR 的优点, 具有很好的稳定性和多态性, 其产物多态性远比 RFLP, SSR, RAPD 丰富, 能够提供更多的关于基因组的信息, 而且比 RAPD 更加稳定、可靠, 实验重复性更好^[4]。桑 ISSR 分析国内外均有较多研究。广西桑树品种亲缘关系林强等^[5]利用相关序列扩增多态性(Sequence-related amplified polymorphism, SRAP)进行过分析, 但是未见利用 ISSR 分析广西桑树品种的亲缘关系。本文选取广西蚕业指导所保存的恭同5号等33份桑树品种资源, 并增加笔者2008年在广西境内收集的钦州长果桑、全州长穗桑、隆林蒙桑、隆林鬼桑、凤山鸡桑、环江华桑等5个种1变种。采用 ISSR 标记分析亲缘关系, 为广西桑树杂交育种亲本选择积累分子生物学资料。

① 收稿日期: 2014-02-23

基金项目: 四川省科技厅公益性行业(农业)科技计划项目(2013NZ0048)。

作者简介: 刘玲(1989-), 女, 山西大同人, 硕士研究生, 主要从事桑科植物分类研究。

通信作者: 陈仁芳, 副教授。

1 材料与方法

1.1 材 料

供试材料取于广西蚕业科学研究院桑资源圃及笔者 2008 年在广西境内收集的 5 个种 1 变种(表 1)。

表 1 供试桑品种资源材料的名称及来源

编号	材料名称	所属桑种	来源	类型
1	灵太 3 号	<i>Morus alba</i>	灵山县	栽培
2	恭同 5 号	<i>Morus alba</i>	恭城县	栽培
3	小董 1 号	<i>Morus alba</i>	钦州市	栽培
4	邕新 3 号	<i>Morus alba</i>	南宁市	栽培
5	刘圩 2 号	<i>Morus alba</i>	南宁市	栽培
6	那陈 2 号	<i>Morus alba</i>	南宁市	栽培
7	池塘 1 号	<i>Morus alba</i>	南宁市	栽培
8	那学 8 号	<i>Morus alba</i>	钦州市	栽培
9	大寺 12 号	<i>Morus alba</i>	钦州市	栽培
10	刘圩 7 号	<i>Morus alba</i>	南宁市	栽培
11	邕新 11 号	<i>Morus atropurpurea</i>	南宁市	栽培
12	冯屋 1 号	<i>Morus alba</i>	灵山县	栽培
13	太平 2 号	<i>Morus alba</i>	灵山县	栽培
14	大寺特号	<i>Morus alba</i>	钦州市	栽培
15	冯屋 5 号	<i>Morus alba</i>	灵山县	栽培
16	沙油 4 号	<i>Morus alba</i>	平乐县	栽培
17	太平新 1 号	<i>Morus alba</i>	灵山县	栽培
18	恭城 4 号	<i>Morus alba</i>	恭城县	栽培
19	板朝 1 号	<i>Morus alba</i>	钦州市	栽培
20	那学 14 号	<i>Morus alba</i>	钦州市	栽培
21	板屯车 2 号	<i>Morus alba</i>	钦州市	栽培
22	恭同 9 号	<i>Morus alba</i>	恭城县	栽培
23	大寺 5 号	<i>Morus alba</i>	钦州市	栽培
24	池塘 4 号	<i>Morus atropurpurea</i>	南宁市	栽培
25	恭江 1 号	<i>Morus atropurpurea</i>	恭城县	栽培
26	那楼 14 号	<i>Morus alba</i>	南宁市	栽培
27	恭同 4 号	<i>Morus alba</i>	恭城县	栽培
28	板罗 1 号	<i>Morus alba</i>	钦州市	栽培
29	潤盛 4 号	<i>Morus alba</i>	北海市	栽培
30	灵太 1 号	<i>Morus alba</i>	灵山县	栽培
31	灵太 2 号	<i>Morus atropurpurea</i>	灵山县	栽培
32	凤山鸡桑	<i>Morus australis</i>	凤山县	野生
33	大新白桑	<i>Morus alba</i>	大新县	野生
34	桂 772	<i>Morus atropurpurea</i> × <i>Morus alba</i>	南宁市	栽培
35	邕新荆桑 12 号	<i>Morus atropurpurea</i>	南宁市	栽培
36	环江 1 号	<i>Morus cathayana</i>	环江县	野生
37	钦州桑	<i>Morus alba</i>	钦州市	栽培
38	潤州岛白桑	<i>Morus alba</i>	北海市	野生
39	钦州长果桑	<i>Morus macroura</i>	钦州市	野生
40	全州长穗桑	<i>Morus wittiorum</i>	全州县	野生
41	隆林蒙桑	<i>Morus mongolica</i>	隆林县	野生
42	隆林鬼桑	<i>Morus mongolica</i> var. <i>diabolica</i>	隆林县	野生

1.2 DNA 提取及质量检测

总 DNA 提取采用稍加改进的 CTAB(Cetyl Triethyl Ammonium Bromide, 十六烷基三乙基溴化铵)法^[6], 从约 0.15 g 的硅胶干燥桑叶中提取。DNA 质量和质量浓度, 用 Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计(赛默飞世尔科技公司))检测确认。

1.3 引物来源及筛选

参照英属哥伦比亚大学 University of British Columbia (UBC) 公司 2006 年公布的 ISSR 引物序列及 ISSR 在桑树上的研究^[7-20], 选取 42 个引物, 交上海生物技术有限公司合成。ID: 1(AG)6TA, ID: 7(AG)8YT, ID: 13(AC)8C, ID: 19(CT)6RC, ID: 25(CT)6CC, ID: 31(GT)6CG, ID: 37(GAG)4GC, ID: 2(AG)8TA, ID: 8(AG)8YC, ID: 14(AC)8YT, ID: 20(CT)6AC, ID: 26(CT)8CC, ID: 32(GT)6CC, ID: 38(GAGT)4, ID: 3(AG)6GC, , ID: 9(AG)8S, ID: 15(ATT)6, ID: 21(CT)8AC, ID: 27(CT)8RT, ID: 33(GTG)6, ID: 39(GACA)4, ID: 4(AG)6TC, ID: 10(AC)8YT, ID: 16(CT)8G, ID: 22(CT)6TG, ID: 28(CA)8A, ID: 34(GTC)6, ID: 40(GCGT)4, ID: 5(AG)7TC, ID: 11(AC)6T, ID: 17(CT)6GC, ID: 23(CT)8TG, ID: 29(CA)8RT, ID: 35(GTGC)4, ID: 41(TG)6GT, ID: 6(AG)8 TC, ID: 12(AC)8T, ID: 18(CT)8GC, ID: 24(CT)8TC, ID: 30(CGA)6GG, ID: 36(GA)6GG, ID: 42(TG)8GT. 其中 R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, S=C/G, W=A/T, H=A/C/T, B=C/G, T=A/C/G, D=A/G/T, N=A/C/G/T.

用 2 个 DNA 样品, 对 42 个引物进行选择, 选出条带多且清晰的引物用于 ISSR 实验。

1.4 PCR 反应及产物检测

ISSR 扩增反应在 Gene Company Limited PCR 仪上进行, 反应总体积为 25 μ L, 其中含模板 1.0 μ L (25 ng/ μ L)、10 \times PCR buffer 2.0 μ L、引物 1 μ L (50 ng/ μ L)、Mg²⁺ 2 μ L (2.5 mM)、dNTPs 2 μ L (2.5 mM)、Ex-taq 0.3 μ L (5 U/ μ L), 用 ddH₂O 补至 25 μ L, 最后加矿物油一滴(约 20 μ L)。扩增程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 60 s, 50 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 90 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min. 反应结束控制在 12 °C.

PCR 反应产物经 1.5% 琼脂糖电泳, 电压为 110 V(4 V/cm, 稳压), 电泳约 30 min, 溴化乙锭(Ethidium Bromide, EB)染色 10 min, 在 BIO-RAD Gel DocTM EZ Imager 2000 凝胶成像系统(美国伯乐)拍照记录。每个反应重复 2 次, 确定所得条带的可重复性。弱带的处理, 将重复性好的弱带给予记录, 重复性不好的弱带不给记录。

1.5 数据分析

记录扩增出的总条带数, 不同迁移率带数。根据扩增条带的迁移率(同一迁移率, 有条带的记为“1”, 无条带的记为“0”), 形成数据矩阵, 按 Nei^[21]的方法, 用 Popgene 32 软件计算等位基因数(*na*), 有效等位基因数(*ne*), 基因多样性指数(*h*), Shannon's 信息指数(*I*), 遗传距离(*D*), 遗传相似系数。根据遗传距离, 用 UPGMA 法聚类分析。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及 PCR 扩增

用 2 个 DNA 样品对 42 个引物进行筛选, 选出条带多且清晰的 11 个引物用于 ISSR 实验。ID: 2(AG)8TA, ID: 7(AG)8YT, ID: 12(AC)8T, ID: 37(GAG)4GC, ID: 5(AG)7TC, ID: 8(AG)8YC, ID: 24(CT)8TC, ID: 42(TG)8GT, ID: 6(AG)8 TC, ID: 10(AC)8YT, ID: 32(GT)6CC.

11 个引物, 42 个样品, PCR 共扩增出迁移率(相对分子质量)不同的 DNA 条带 92 条, 其中 2 号引物最多为 12 条, 42 号引物最少为 6 条, 平均每个引物 8.36 条, 最长 2 200 bp, 最短 200 bp.

2.2 遗传多样性及聚类分析

将 ISSR 扩增反应有条带的记为“1”, 无条带的记为“0”, 形成数据矩阵, 输入 popgen 32 软件计算 Nei^[21]等位基因数(*na*)为 2.000 0, 有效等位基因数(*ne*)为 1.6811, 基因多样性指数(*h*)为 0.386 4, Shannon's 信息指数(*I*)为 0.566 5, 遗传距离(*D*)为 0.178 0~0.966 4, 遗传相似系数为 0.380 4~0.837 0.

根据遗传距离,用邻接法,UPGMA聚类,得聚类图(图1).

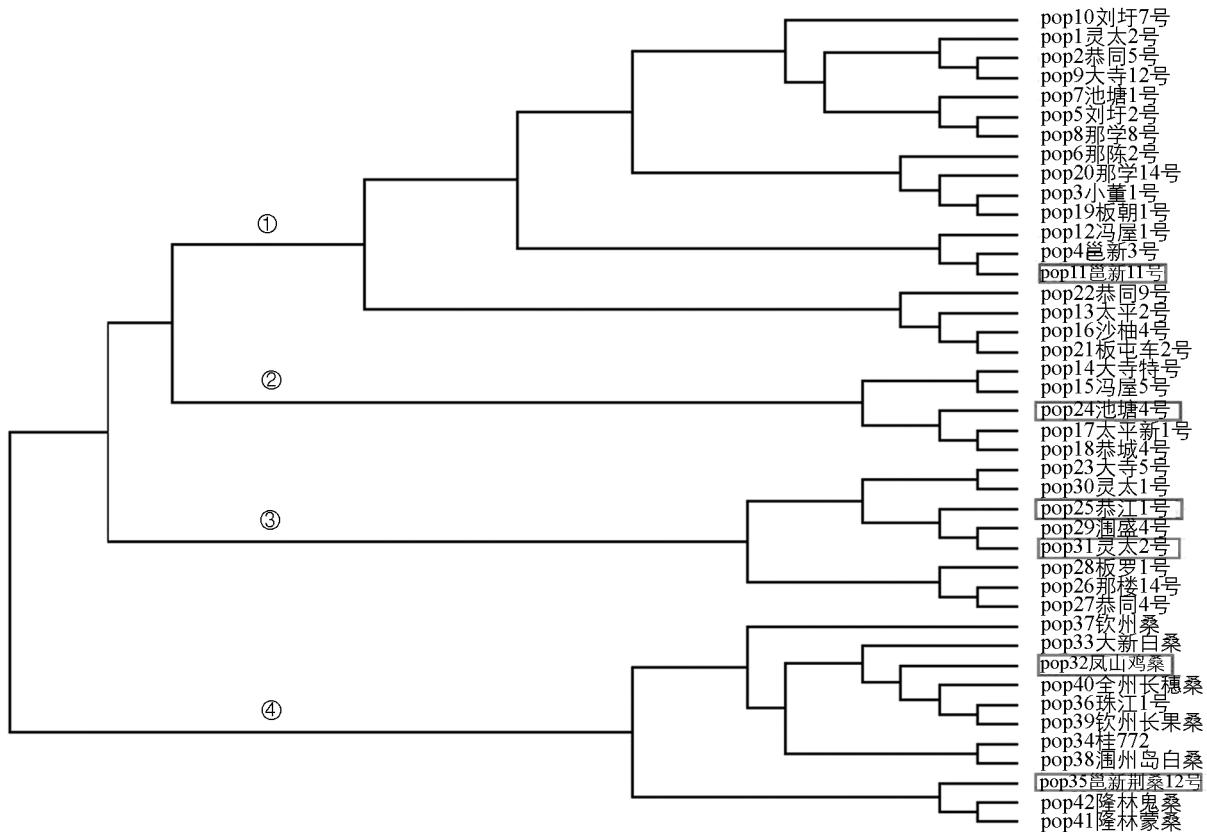


图1 基于ISSR资料、邻接法、UPGMA聚类图

由图1可知,聚类图将供试材料聚为4支,刘圩7号、灵太3号、恭同5号、大寺12号、池塘1号、刘圩2号、那学8号、那陈2号、那学14号、小董1号、板朝1号、冯屋1号、邕新11号、恭同9号、太平2号、沙油4号、板屯车2号为第一支;大寺特号、冯屋5号、池塘4号、太平新1号、恭城4号为第二支;大寺5号、灵太1号、恭江1号、涠盛4号、灵太2号、板罗1号、那楼14号、恭同4号为第三支;钦州桑、大新白桑、广西鸡桑、全州长穗桑、环江1号、钦州长果桑、桂772、涠州岛白桑、邕新荆桑12号、隆林鬼桑、隆林蒙桑为第4支。

3 讨论

3.1 白桑种遗传变异大

本研究的聚类图在4个大支中均有白桑种,因此认为白桑种遗传变异大。从地理分布来看,白桑种主要分布于东亚,但北可达俄远东、蒙古鞑靼地区(60°N),南可达越南、印度、马来西亚、巴基斯坦、斯里兰卡(6°N),在美洲可达墨西哥、巴西(23.5°S)和美国纽约州、加利福尼亚州、佛罗里达州等(46°N - 26°N , 116° - 73°E),西达中亚、西亚的伊朗、叙利亚。在欧洲西班牙、德国、法国、比利时(50°N - 26°N , 0° - 60°E)也有分布,是桑属中分布最广的一个种。且变种颇多,其变种有鞑靼桑 *M. alba* var. *tatarlica*、垂枝桑 *M. alba* var. *pendula*、大叶白桑 *M. alba* var. *macrophylla*、白脉桑 *M. alba* var. *venose*、花叶桑 *M. alba* var. *skeletoniana*、塔桑 *M. alba* var. *pyramidalis*、鲁桑 *M. alba* var. *multicaulis*。在印度有印度桑 *M. indica*,在泰国有暹罗桑 *M. rotundifolia*,在中国台湾有台湾桑 *M. formosensis* 地理替代^[22],这也说明白桑种遗传变异大。

3.2 广东桑与白桑亲缘关系近

本试验参试的广东桑种有邕新11号、池塘4号、恭江1号、灵太2号、邕新荆桑12号,这几份材料均与白桑聚在一起,说明广东桑与白桑有较近的亲缘关系。中国植物志、GenBank均将广东桑置于白桑种中,

为白桑的变种 *Morus alba* Var. *atropurpurea*^[23], 而 Koidzumi^[24] 将广东桑列为种级单位。本研究支持中国植物志、GenBank 将广东桑置于白桑的变种。

3.3 野生桑种与栽培桑种遗传背景明显不同

聚类图 1-3 支均为栽培种, 野生桑种均聚在第 4 支, 说明野生桑种与栽培桑种遗传背景明显不同。栽培种通过人为栽培、驯化, 遗传多样性丢失; 而野生种在长期自然选择下, 保存有较多的遗传变异, 是桑树种质资源开发、利用、保存的重点。本研究的聚类图得到 42 份参试材料之间的亲缘关系, 为广西桑树杂交育种亲本选择提供了分子生物学证据。特别是在第 4 支中的钦州桑、桂 772、邕新荆桑 12 号 3 个材料, 遗传背景倾向野生桑, 在抗性、速生等方面有独特优点, 在今后杂交育种中应注意利用。

广西在清末, 桑蚕已遍及桂江、西江、钦江、浔江流域, 主要分布在广西苍梧、藤县、平南、容县、钦州、灵山、恭城、平乐等县。种植的桑树为广东荆桑, 没有严格意义的桑品种, 20 世纪 50 年代后才开始品种选育, 在老蚕区选取性状相对较优的植株, 繁殖、保存, 并且在 20 世纪 50 至 80 年代桑品种交流频繁, 因此本研究未出现地理分布的变化规律。广西桑树品种的遗传多样性, 林强等^[5] 利用 SRAP 进行过分析, 遗传相似系数为 0.826~1.000; 而本研究遗传相似系数为 0.380~0.837, 这可能是林强等^[5] 分析用的材料全是栽培品种, 而本研究的材料增加了广西分布的一些野生种的原因。

参考文献:

- [1] 雷扶生, 莫现会, 吴昌鳌, 等. 广西桑树品种资源考察收集初报 [J]. 广西蚕业, 1989, 1(1): 4—8.
- [2] 朱方容, 雷扶生, 林 强, 等. 桑树品种资源的收集引进与创新研究 [J]. 广西蚕业, 2009, 46(3): 8—14.
- [3] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genom e fngerp rin ting by sin ple sequen ce rep eat(SSR)-an Chored Pokym Erase Chain Reaction Anp Lification [J]. Genom ics, 1994, 20(1): 176—183.
- [4] FANG D Q, ROOSE M L. Identification of Closely Related *Citrus* Cultivars with Inter-Simple Sequence Repeat Markers [J]. Theor Appl Genet, 1999, 95(3): 408—417.
- [5] 林 强, 朱方容, 邱长玉, 等. 广西桑树种质资源亲缘关系的 SRAP 分析 [J]. 南方农业学报, 2011, 42(4): 358—363.
- [6] WEISING K H, WOLFF K, MEYER W. DNA Fingerprinting in Plants and Fungi [M]. Boca Raton: CRC Press, 1995.
- [7] ARVIND K AWASTHI1, GM NAGARAJAL, GV NAIK, et al. Genetic Diversity and Relationships in Mulberry (Genus *Morus*) as Revealed by RAPD and ISSR Marker Assays [J]. Genetics, 2004, 5(1): 1—9.
- [8] VIJAYAN K, CHATTERJEE S N. ISSR Profiling of Indian Cultivars of Mulberry (*Morus* spp.) and Its Relevance to Breeding Programs [J]. Euphytica, 2003, 131(1): 53—63.
- [9] VIJAYAN K, SRIVATSAVA P P, NAIR C V, et al. Molecular Characterization and Identification of Markers Associated with Yield Traits in Mulberry Using ISSR Markers [J]. Plant Breeding, 2006 125(3): 298—301.
- [10] DURAISAMY KALPANAA, SI HYUK CHOIA, TAE KI CHOIA, et al. Assessment of Genetic Diversity Among Varieties of Mulberry Using RAPD and ISSR Fingerprinting [J]. Scientia Horticulturae 2012, 134(1): 79—87.
- [11] 赵卫国. 桑种质资源的遗传多样性及分子系统学研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2005.
- [12] ZHAO Wei-guo, MIAO Xue-xia, ZANG Bo, et al. Construction of Fingerprinting and Genetic Diversity of Mulberry Cultivars in China by ISSR Markers [J]. Acta Genetica Sinica, September, 2006, 33(9): 851—860.
- [13] 赵卫国, 汪 伟, 杨永华, 等. 我国不同生态类型桑树地方品种遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 蚕业科学, 2008; 34(1): 1—5.
- [14] ZHAO Wei-guo, ZHOU Zhi-hua, MIAO Xue-xia, et al. A Comparison of Genetic Variation Among Wild and Cultivated *Morus* Species (Moraceae: *Morus*) as Revealed by ISSR and SSR Markers [J]. Biodiversity and Conservation, 2007, 16(2): 275—290.
- [15] 黄 勇, 张 林, 赵卫国, 等. 24 个白桑(*Morus alba* L.)地方品种的遗传多样性分析 [J]. 蚕业科学, 2008, 34(2): 302—306.
- [16] 戴瑞强. 华桑遗传多样性分析及核心种质构建 [D]. 镇江: 江苏科技大学, 2010.
- [17] 张 林, 黄 勇, 沈兴家, 等. 基于 ISSR 标记的黄河下游区域鲁桑地方品种遗传关系分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2010, 19(2): 21—27.
- [18] 张 林, 陈俊百, 黄 勇, 等. 山西省桑树地方品种遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(2): 24—27.
- [19] 高丽丽, 张 林, 刘 利, 等. 利用 ISSR 标记对 93 份广东桑树种质资源的遗传多样性分析 [J]. 蚕业科学, 2011,

37(6): 969—977.

- [20] GAO Li-li, ZHANG Lin, PAN Yi-le. Analysis of Genetic Relationship of 64 Local Varieties of *Morus atropurpurea* Roxb. in Guangdong Based on ISSR Marker [J]. Agricultural Science & Technology, 2011, 12(7): 966—970.
- [21] NEI M. Unbiased Measures of Genetic Identity and Genetic Distance [J]. Genetics, 1978, 89(1): 583—590.
- [22] 陈仁芳. 桑属系统学研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [23] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 23 卷第一分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [24] KOIDZUMI G. Taxonomy and phytogeography of *Morus* [J]. Bulletin of Sericultural Experimental Station (Tokyo), 1917, 23(3): 1—62.

The ISSR Analysis of Genetic Diversity among Guangxi Mulberry Varieties

LIU Ling¹, SHEN Xi-tong¹, ZHU Fang-rong², QIU Chang-yu¹,
FAN Xiao-min³, CHEN Xiang-ping³, KE Hao-tian³, CHEN Ren-fang¹

1. School of Biotechnology, Southwestern University, Chongqing 400716, China;

2. Sericulture Sciences Academy of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530011, China;

3. Silk Engineering Technology Research Center of Sichuan Province, Chengdu 610031, China

Abstract: ISSR was used to analyze the genetic relationship among mulberry varieties from Guangxi Province. The study had shown that there were four groups of mulberry species had closer genetic relationship. The first group includes Liu xu NO. 7, Ling tai NO. 3, Gong tong NO. 5, Da si NO. 12, Chi tang NO. 1, Liu xu NO. 2, Na xue NO. 8, Na chen NO. 2, Na xue NO. 14, Xiao dong NO. 1, Ban chao NO. 1, Feng wu NO. 1, Yong xin NO. 3, Yong xin NO. 11, Gong tong NO. 9, Tai ping NO. 2, Sha you NO. 4 and Ban tun che NO. 2. There were 5 kinds of mulberry varieties in the second group, they were Da si te hao, Feng wu NO. 5, Chi tang NO. 4, Tai ping xin NO. 1, Gong cheng NO. 4. The third group was composed of Da si NO. 5, Ling tai NO. 1, Gong jiang NO. 1, Wei sheng NO. 4, Ling tai NO. 2, Ban luo NO. 1, Na lou NO. 14, Gong tong NO. 4. The fourth group includes Qin zhou sang, Da Xin bai sang, Guang Xi ji sang, Quan zhou chang sui sang, Huan jiang NO. 1, Qin zhou chang guo sang, Gui NO. 772, Wei zhou dao bai sang, Yong xin jing sang NO. 12, Long lin gui sang, Long lin meng sang. The other result was that *Morus alba* is large genetic variation. *Morus atropurpurea* had close relationship with the *Morus alba*, which supported a fact that *Morus atropurpurea* was a variety of *Morus alba* in Flora China and GenBank. The genetic background between wild mulberry species and cultivated mulberry was different. The genetic background among Qin zhou sang, Gui NO. 772, Yongxin jingsang NO. 12 tended to wild mulberry, they had some advantages, for example, resistance, the characteristics should be used in hybrid breeding.

Key words: Guangxi; mulberry varieties; ISSR(inter-simple sequence repeat); genetic relationship

责任编辑 夏娟

