دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
شاپا ٤٦٦٨-٢٠٠٨
http://jer.iau-arak.ac.ir

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد ۱۰، شماره۱، سال ۱۳۹۷، (۷٦-٦٥)

بررسی رفتارهای بهداشتی ونظافت‌گری زنبورعسل ایرانی (*Apis mellifera meda*) در کلنی‌های انتخاب شده نسل سوم و چهارم طرح اصلاح نژاد برای مقاومت به کنه واروآ (*Varroa destructor*)

امین منصوری ذلانی[۱]، غلامحسین طهماسبی[۲*]، ناصرامام جمعه کاشان [۳]، مهدی امین افشار [۳]، علی قاضی خانی شاد[٤]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- استاد پژوهش، موسسه تحقیقات علوم دامی ایران و سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳-به‌ترتیب استاد و استادیار، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
٤- استادیار، گروه علوم دامی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

چکیده

به‌دلیل اثرات سوء سموم شیمیایی مورد استفاده برای مبارزه با کنه واروآ در کلنی‌های زنبور عسل، استفاده از روش‌های غیر شیمیایی نظیر انتخاب برای رفتارهای بهداشتی مورد توجه قرار گرفته است. رفتار بهداشتی شامل تشخیص نوزادان مرده، آلوده و یا غیر طبیعی درون سلول‌های نوزاد، درپوش‌برداری، خارج کردن نوزادهای مرده و یا آلوده است که در کنار رفتار نظافت گری زنبور عسل علیه کنه واروآ به‌کار گرفته می‌شود. برای بررسی رفتار نظافت گری از ٦۰ کلنی (۳۰ کلنی مقاوم و ۳۰ کلنی شاهد) موسسه تحقیقات علوم دامی کشور در استان البرز در دو نوبت یعنی از شهریور تا مهر ماه ۹۳ و از خرداد تا مهر ماه ۹٤ به مدت یک روز در هفته استفاده گردید. برای اندازه‌گیری رفتار نظافت گری، صفحات آغشته به گریس در کف کندوهای کف باز آزمایشی قرار داده شد و تعداد کنه‌های سالم و غیر سالم موجود بر روی صفحات شمارش شد. میزان درپوش‌برداری و خارج نمودن نوزادان مرده در کلنی-های مقاوم و شاهد در شهریور ۹۳ و خرداد ۹٤ تعیین شد. برای تعیین میزان رفتار بهداشتی از ازت مایع برای کشتن شفیره‌ها استفاده گردید. تعداد سلول‌های درپوش‌برداری و تخلیه شده در سه مقطع زمانی پس از ریختن ازت مایع شمارش شد. کلنی‌هایی که بیش از ۹۵ در صد نوزادان مرده، آلوده و یا غیر طبیعی را در مدت ٤۸ ساعت از کندو خارج نمودند به‌عنوان کلنی‌های بسیار بهداشتی در نظر گرفته شدند. میانگین رفتار نظافت‌گری در سال‌های ۹۳ و۹٤ به‌ترتیب ۱±٦۱ و ۳±٦٥ به ازای هر کلنی به‌دست آمد که تفاوت بین آن‌ها معنی‌دار بود. طی دو سال بررسی کلنی‌های بهداشتی به‌ترتیب ۳۰ و ۳۲/۳ درصد بود و هم‌چنین درصد کلنی‌های مقاوم نسبت به شاهد بیشتر بود. همچنین درصد درپوش‌برداری و حذف شفیره‌های مرده در سلول‌ها بعد از ٤۸ساعت در سال ۹۳ و۹٤ به‌ترتیب ۸۸/۵، ۹۱/۳ و ۸۵/۵، ۸٦/٦ بود و تفاوت بین آن‌ها نیز معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری میان رفتار نظافتگری و تولید عسل و همچنین رفتار درپوش برداری و حذف شفیره‌های آلوده وجود دارد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد. که زنبور عسل ایرانی رفتارهای بهداشتی بالاتری در مقابل کنه واروآ و سایر بیماری‌های زنبور عسل نشان می‌دهد. با انتخاب و اجرای برنامه‌های اصلاح نژاد می‌توان میزان این رفتارها را در جهت ایجاد جمعیت‌های مقاوم به کنه تقویت نمود.

واژه‌های کلیدی: کنه واروآ، رفتار نظافت‌گری، رفتار بهداشتی، زنبور عسل نژاد ایرانی

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *tahmasbigholamhosein@gmail.com*

تاریخ دریافت مقاله:۹٦/۵/۱۱ - تاریخ پذیرش مقاله: ۹٦/۱۱/۱٦

مقدمه

امروزه درهر سال کنه واروآ خسارت زیادی به پرورش دهندگان زنبور عسل در سراسر دنیا وارد می‌کند. استفاده از سموم شیمیایی برای مبارزه با این آفت به‌ویژه در کشور ما یک روش متداول است. ولی به دلیل آثار سوء سموم توجه محققین به روش‌های کم‌خطر برای انسان و محیط زیست معطوف شده است. از آنجایی‌که میزان شیوع آلودگی به کنه در کلنی‌ها، زنبورستان ها و مناطق مختلف متفاوت است، مطالعاتی برای شناسایی علل این تفاوت‌ها انجام شده ونتایج نشان داده که سازوکار هایی وجود دارند که رشد جمعیت کنه واروآ در کلنی‌های زنبور عسل را کاهش می‌دهند. رفتار های نظافت گری و بهداشتی به‌عنوان سازو کار های دفاعی مهم زنبور عسل علیه کنه واروآ مورد توجه قرار گرفته است. این رفتارها توسط زنبوران کارگر کلنی برای دفاع در برابر عوامل بیماری‌زای نوزاد (نظیر باکتری‌ها، قارچ‌ها و کنه واروآ) انجام می‌گیرد. رفتار بهداشتی شامل تشخیص نوزادان زنبور مرده، آلوده و یا غیر طبیعی و سپس درپوش‌برداری و خارج نمودن لاروآلوده می‌باشد (Perez-Sato *et al.*, 2009). کلنی‌هایی که بیش از ۹۵ درصد نوزادان مرده، آلوده و یا غیر طبیعی را در مدت٤٨ ساعت از کندو خارج نمایند، کلنی‌های بسیار بهداشتی محسوب می‌شوند (Perez-Sato *et al.*, 2009) رفتار بهداشتی یک نوع ایمنی اجتماعی است که به‌وسیله آن زنبوران کارگر، محرک‌های شیمیایی آزاد شده از لارو بیمار را شناسایی و در نهایت نوزاد بیمار را از حجره‌های نوزاد حذف می‌نمایند (Swanson *et al.*, 2009). رفتارهای بهداشتی برای حیات و پویایی جمعیت زنبور عسل بسیار حائزاهمیت هستند. زیرا این رفتارها از توسعه بیماری‌های نوزادان و کنه واروآ در کلنی جلوگیری می‌کنند.. رفتارهای بهداشتی تحت کنترل ژنتیکی هستند، اما به‌وسیله شرایط آب و هوایی (نظیر رطوبت، دما) و همچنین شرایط کلنی تحت تاثیر قرار گرفته و بسیارمتغیر می‌باشند (Gramacho & Goncalves, 2009b). رفتار بهداشتی تحت‌تاثیر عوامل محیطی (دما، رطوبت، شرایط شان، جریان عسل)، عوامل شیمیایی (فرومون‌های متصاعد شده از نوزادان مرده و کنه انگل)، عوامل فیزیکی (جنبش‌ها، ارتعاش، نور) و همچنین اثر متقابل بین همه این عوامل می‌باشد (Goncalves 2009b). سطح و میزان رفتار بهداشتی با عوامل ژنتیکی و فیزیولوژیکی زنبوران عسل موجود درکلنی در ارتباط بوده و شرایط عصبی– هورمونی، در شروع یا کنترل این رفتارها موثر بوده و نیز شرایط محیطی داخل و خارج کلنی بر میزان رفتار بهداشتی در یک کلنی موثر است (Masterman *et al.*, 2000). همچنین در مقایسه کلنی‌های بهداشتی و غیر بهداشتی در زنبوران زرد ایتالیایی (*Apis mellifera ligustica*) مشخص شد که جمعیت کلنی‌های بهداشتی بیشتراست. دریک تحقیق رفتارهای بهداشتی لاین زنبورعسل پریمورسکی مقاوم به کنه و کلنی‌های تجاری حساس به کنه بررسی و نتایج نشان داد که ٤١ درصد کلنی‌های لاین پریمورسکی و ٢١ درصد کلنی‌های تجاری بهداشتی بودند (Spivak & Gary, 1998). بر اساس مطالعات اسپیواک و روتر (٢٠٠١) بین کلنی‌های اصلاح شده برای رفتار بهداشتی و کلنی‌های انتخاب نشده (استارلاین)، از لحاظ تولید عسل تفاوت معنی‌داری مشاهده نکردند (Spivak & Reuter, 2001) . لذا با توجه به موارد ذکر شده در این تحقیق تلاش شد کلنی‌های مقاوم و شاهد از نظر رفتار بهداشتی و نظافت‌گری در ایران مورد مقایسه قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

ارزیابی رفتار نظافت‌گری

در تحقیق حاضر از ٦٠ کلنی (۳۰ کلنی مقاوم و ۳۰ کلنی شاهد) متعلق به طرح اصلاح نژاد زنبور عسل در استان البرز استفاده شد. درابتدا جمعیت کندوها به کندوهایی با کف کشویی انتقال یافت. سپس در کف هر کلنی یک صفحه فلزی یا پلاستیکی که به گریس بی‌بو آغشته شد تا کنه‌های جدا شده از زنبورها در کف کندو به گریس چسبیده و توانایی حرکت و برگشت به روی زنبورها را نداشته و به‌راحتی قابل شمارش باشند. حدود ۲ سانتی‌متر بالاتر از این صفحه آغشته به وازلین یک توری فلزی ۱۰ مش قرار داده شد تا کنه‌های جدا شده از بدن زنبورها از آن عبور کنند. ولی توری فلزی مانع عبور زنبورها و تماس با کنه‌های موجود در روی صفحه آغشته به گریس شود. این رفتار در دو نوبت از شهریور تا آبان ۹۳ و از خرداد تا مهر ماه ٩٤ یک بار در هفته بررسی و نمونه‌برداری شد (شکل ۱). سپس با شمارش کنه‌های موجود در روی کف کندو (کنه‌های سالم و آسیب دیده) کلنی‌های برتر و مقاوم به کنه انتخاب شد و از این کلنی‌های مقاوم، برای تولید نسل بعد استفاد شد.

شکل ۱ – اندازه‌گیری رفتار نظافت‌گری با قرار دادن صفحه آغشته به گریس در کف کندو

Fig. 1- Measuring the grooming behavior of honey bee by installing the grease-treated plates on the floor of hives

ارزیابی رفتارهای بهداشتی

ارزیابی رفتار بهداشتی در شهریور سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹٤ انجام شد. برای بررسی صفت درپوش‌برداری و خارج نمودن نوزاد مرده، از ازت مایع برای کشتن شفیره‌ها استفاده شد. برای این‌که در زمان دادن ازت تمام کلنی‌های مورد نظر، شفیره‌های هم‌سن داشته باشند، قبل از انجام آزمایش در ابتدا هر یک از کلنی‌ها بازدید شده و به هر یک از آن‌ها یک شان بافته شده یا پوکه کد گزاری شده داده شد. سپس برای تحریک ملکه‌ها به تخم‌ریزی نیز هم‌زمان کلیه کلنی‌ها به مدت سه روز تغذیه مصنوعی شدند. منطقه تخم‌ریزی ملکه در هر کلنی نیز در روی شان‌های آزمایشی علامت‌گذاری شد. ۱۵ روز بعد از تخم‌ریزی ملکه (یعنی در زمان ٦ روزگی شفیره‌ها) از ازت مایع برای کشتن شفیره‌ها استفاده شد. یک روز قبل از دادن ازت برای اطمینان از وجود شفیره‌ها کلیه کلنی‌ها بازدید شدند. برای انجام این تحقیق از سیلندر استوانه‌ای تو خالی از جنس گالوانیزه به قطر شش سانتی‌متر و ارتفاع پانزده سانتی‌متر استفاده شد. برای هر کلنی حدود سیصد میلی‌لیتر ازت مایع برای کشتن حدود یکصد و شصت سلول شفیره داخل استوانه، استفاده شد. بدین ترتیب که بر روی شفیره از قبل انتخاب شده بر روی شان به‌وسیله استوانه، یک دایره به قطر شش سانتی‌متر ایجاد کرده و استوانه را به آرامی چرخانده تا به سیم داخل‌شان برسد و استوانه کاملا داخل موم شان قرار گیرد (شکل ۲). سپس تعداد سلول‌های خالی داخل استوانه

شمارش و ثبت گردید. مقدار ازت مایع مورد نظر را داخل استوانه ریخته و منتظر ماندیم تا ازت کاملا تبخیر و سلول‌های شفیره کشته شوند. سپس شان و شفیره‌های کشته شده به کلنی‌های مادری منتقل شدند. ۲٤، ٤٨ و۷۲ ساعت بعد از ریختن ازت از طریق بازدید کلنی‌ها تعداد سلول‌های شفیره مرده‌ای که در منطقه مذکور درپوش‌برداری و تخلیه شدند، شمارش و ثبت گردید. چون این احتمال وجود داشت که کلنی‌ها محل مورد آزمایش را سریعا تمیز و تعمیر کنند برای جلوگیری از بروز مشکل در بازدید بعدی در شناسایی محل مورد آزمایش، شان‌های مورد نظر علامت‌گذاری شدند. در ثبت نتایج تعداد سلول‌های درپوش‌برداری شده و تخلیه شده به‌طور مجزا یاداشت گردید. کلنی‌هایی که در مدت ٤٨ ساعت پس از ریختن ازت مایع بیش از ۹۵ درصد شفیره‌های مرده را درپوش‌برداری و خارج نمودند به‌عنوان کلنی‌های بهداشتی در نظر گرفته شدند.

شکل ۲- استفاده از ازت مایع برای آزمایش رفتار بهداشتی

Fig. 2. Using the liquid nitrogen for hygienic behavior assessiment

آنالیزهای آماری

در این تحقیق دو عامل نوع ملکه (شاهد و اصلاح شده) و سال (۱۳۹٤ و ۱۳۹۵) به‌صورت یک آزمایش فاکتوریل ۲×۲ مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و میانگین تیمارها با روش دانکن و میانگین‌های حداقل مربعات[1] مورد مقایسه قرار گرفتند. همچنین برای تعیین همبستگی بین رفتارهای بهداشتی و نظافت‌گری با جمعیت و تولید عسل در کلنی‌های زنبور عسل از ضریب همبستگی پیرسون[2] استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از ارزیابی رفتارهای بهداشتی و نظافت‌گری به تفکیک سال و گروه کلنی‌های مقاوم و شاهد در جدول ۱ نشان داده شده است.

[1] LS means
[2] Pearson correlation coefficient

جدول ۱- نتایج حاصل از آنالیز رفتارهای بهداشتی و نظافت‌گری در سال‌های ۹۳ و۹٤ و در دو گروه کلنی‌های مقاوم و شاهد

Table 1. Analyses of date obtained from grooming and hygenic behavior in two groups of colonies resistant and sensitive (control) in 2014 and 2015.

Parameter / Statistic	Percentage of uncaping after 48 hours	Percentage of removing after 48 hours	Brood rearing (Frame)	Adult population (Frame)	Honey production (Kg)	Grooming
Total average in 2014	88.5± 7	85.5± 2	4.9± 4	5.4 ±1.4	6.3 ± 3.1	61 ±1
Total average in 2015	91.3± 8 *	86.6± 3 *	5.2 ±2 **	5.8 ± 2	± 2.3 ** 8.4	65 ± 0.3**
Average of control colony	87.5± 4	85.2± 2	4.44 ± 1.5	4.3 ±1.2	7 ± 2.6	60 ± 0.4
Average of resistant colony	90.3±6*	86.5±3	5.6 ±2*	4.8 ± 1*	7.8 ±2.8	63 ± 0.3

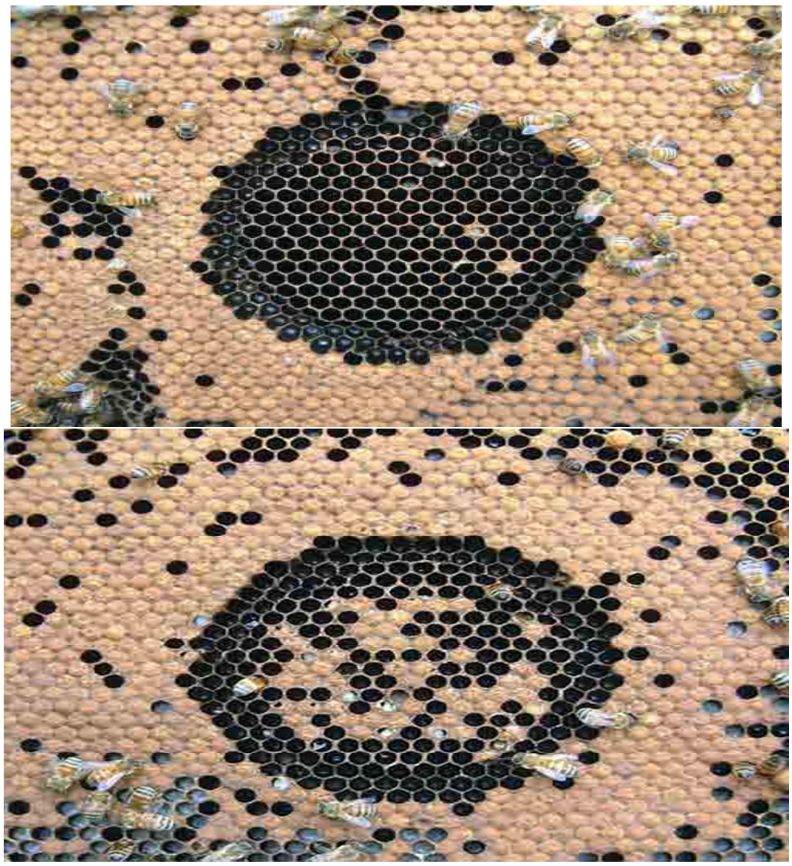
در این تحقیق دامنه وسیعی از صفات درپوش‌برداری و تخلیه لارو مرده در دو سال آزمایش مشاهده گردید. تفاوت معنی‌داری از لحاظ رفتار درپوش‌برداری در ٤٨ ساعت در دو سال مشاهده شد (p<۰/۰۵) همچنین در هر دو سال آزمایش درصد کلنی‌های بهداشتی مقاوم (۳٤/۵ درصد) نسبت به شاهد (۲۳/۷ درصد) بیشتر بود (p<۰/۰۵). نتایج این تحقیق با نتایج بانو حسینی و همکاران (۲۰۰۱) متفاوت بود که گزارش نمودند در فصل بهار نسبت به فصل تابستان رفتار بهداشتی بیشتری صورت می‌گیرد اما بین دو فصل تفاوت معنی‌دار نبود و واریانس رفتار بهداشتی در دو فصل تغییری نکرد و ازمجموع ۱۰۰ کلنی مورد تحقیق آن‌ها در مرحله اول ۲۱ درصد و در مرحله دوم ۱۸ درصد از کلنی‌ها اقدام به تخلیه ۹۵ درصد شفیره‌ها درمدت ٤٨ ساعت نمودند (Banohoseini *et al*., 2011). اما با تحقیق نجفقلیان و همکاران (۲۰۱۱a) مطابقت دارد. آن‌ها گزارش نمودند ۳۵ درصد زنبوران عسل ایرانی بهداشتی بوده و با استفاده از روش ازت مایع بیش از ۹۵ درصد شفیره‌های مرده را در مدت ٤٨ ساعت تخلیه کردند (Najafgholian *et al*., 2011a).

نشان داده شده که ۲۰درصد از کلنی‌های استرالیایی بهداشتی هستند (Oldroyd *et al*., 2005). تحقیقات در آمریکا نشان دادند که رفتار بهداشتی مطلوب در ۱۰ درصد از کلنی‌های آمریکا وجود دارد (Spivak & Reuter, 2001; Boecking & Spivak, 1999; Spivak & Gary, 1998; Spivak & Downey, 1993). در ۲٦ درصد از کلنی‌های هیبرید استارلاین و نژاد ایتالیایی رفتار بهداشتی مطلوب مشاهده شده بود (Spivak & Retuer, 2001). در ترکیه با ارزیابی صفت درپوش‌برداری و تخلیه شفیره‌های مرده پس از ٤٨ ساعت، از بین ۲۵۰ کلنی تحت بررسی ۵ کلنی رفتار بهداشتی برتر را داشتند (Kekecoglu *et al*., 2015).با توجه به نتایج فوق زنبور عسل ایرانی از توانمندی قابل قبول و برتری در مقایسه با نژادهای دیگر دنیا برخوردار می‌باشد و اصلاح نژاد این نژاد برای مقاومت به کنه واروآ نتایج خوبی در پی دارد.

در این تحقیق در سال‌های ۹۳ و ۹٤ از لحاظ میانگین کل درصد حذف نوزادان مرده و آلوده در سطح احتمال ٪۹۹ تفاوت معنی‌دار بود. اما کلنی‌های شاهد و مقاوم در این صفت تفاوت معنی‌داری نداشتند. برآورد رفتار بهداشتی و حذف شفیره‌های مرده در این تحقیق در سال‌های ۹۳ و ۹٤ به‌ترتیب ۸۵ و۸٦ درصد تعیین شد که بیشتر از برآورد حذف

شفیره‌های مرده در استان آذربایجان شرقی (۷۹/۸٤ درصد) بود (Elmi *et al*., 2001) به نظر آن‌ها کلنی‌های استان از نظر این صفت در وضعیت نسبتا خوبی قرار دارند.

همچنین نتایج این تحقیق با نتایج عاکف (۲۰۰۰) که در سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۸۷با مطالعه رفتارهای درپوش‌برداری و حذف شفیره‌های مرده در کلنی‌های استان‌های خراسان، تهران، قزوین، اصفهان و مرکزی میانگین کل حذف شفیره‌های مرده و یا آلوده را به‌ترتیب ٦٥ و ۹۰ درصد اعلام کردند مشابهت داشت (Akef, 2000). بنا بر مطالعات اسپیواک و گری (۱۹۹۸) لاین‌های غیر بهداشتی و بهداشتی به‌ترتیب ۵۰ و ۹۵ درصد از شفیره‌های کشته شده به روش انجماد را ٤۸ ساعت پس از معرفی به کندو تخلیه نمودند که این نتایج تا حدی متفاوت با نتایج تحقیق حاضر است به‌طوری‌که درصد درپوش-برداری کمتر و حذف شفیره‌ها را بیشتر نشان می‌دهد (Spivak & Gari, 1998). همچنین نتایج تحقیق حاضر کمی بیشتر از بر آورد بانو حسینی و همکاران (۲۰۱۱) می‌باشد که درصد تخلیه شفیره‌ها را در بهار و تابستان به‌ترتیب ۸۲ و ۸۰ درصد اعلام کرده بودند (Banohoseini *et al*., 2011).



شکل ۳- عملکرد کلنی‌های بهداشتی و غیر بهداشتی در تخلیه نمودن شفیره‌های کشته شده بعد از ریختن ازت مایع
Fig. 4. Performans of removing dead pupae in hygienic and non-hygienic colonies after using liquid nitrogen

در تحقیق حاضر میانگین تولید عسل در سال ۹٤ نسبت به سال ۹۳ به‌طور معنی‌داری در سطح ۹۹٪ اطمینان بیشتر بود ($p< ۰/۰۱$). اما کلنی‌های مقاوم و شاهد تفاوت معنی‌داری از لحاظ تولید عسل نداشتند. بر اساس مطالعات اسپیواک و

گری (۱۹۹۸) لاین‌های بهداشتی نسبت به لاین‌های تجاری تولید عسل بیشتری داشتند و در تحقیق آن‌ها دو صفت با یکدیگر مرتبط هستند (Spivak & Gary, 1998). کلنی‌های دارای رفتار بهداشتی بالا (تخلیه بیش از ۹۵ درصد شفیره‌ها در مدت ٤٨ ساعت) تولید عسل بیشتری نیز دارند (Spivak & Giliam, 1998) . هر چند بر اساس گزارش Spivak & Retuer کلنی‌های انتخاب شده برای رفتار بهداشتی تولید عسل بیشتری از کلنی‌های انتخاب نشده داشتند (Spivak & Retuer, 2001) که با نتایج تحقیق حاضر متفاوت است. اما بر اساس مطالعات محققین بین کلنی‌های اصلاح شده برای رفتاربهداشتی و کلنی‌های انتخاب نشده (استارلاین)، از لحاظ تولید عسل تفاوت معنی‌دار دیده نشد (Spivak & Retuer, 2001) که با نتایج به‌دست آمده از این طرح مشابهت دارد.

نجفقلیان و همکاران نشان دادند که جمعیت بالغین اثر معنی‌داری بر مقدار عسل تولیدی هر کلنی دارد. هر چند تاثیرگذاری جمعیت بالغین و مقدار عسل تولیدی بر همدیگر امری بدیهی است و در اکثر تحقیقات انجام شده نیز ذکر شده است که کلنی‌های پر جمعیت عسل بیشتری تولید می‌کنند. کلنی‌های پر جمعیت در شروع جریان شهد توانایی زیادی در جمع‌آوری شهد خواهند داشت به‌خصوص اگر جریان شهد موقتی باشد. در این تحقیق علی‌رغم اینکه کلنی‌های مقاوم از نظر جمعیت بالغین و سطح پرورش نوزادان به‌طور معنی‌داری برتر از کلنی‌های شاهد بودند ولی از نظر تولید عسل برتری شان معنی‌دار نبود.

در تحقیق حاضر از نظر میانگین جمعیت زنبوران بالغ در دو سال و در دو جمعیت مقاوم و شاهد تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بنا بر تحقیق بانو حسینی و همکاران اثر جمعیت زنبوران بالغ بر رفتار درپوش‌برداری معنی‌دار نبود اما بر رفتار تخلیه اثر معنی‌داری بوده است (Banohoseini *et al*., 2011) همچنین نجفقلیان و همکاران نیز نشان دادند که اندازه جمعیت در رفتارهای بهداشتی معنی‌دار می‌باشد (Najafgholian *et al*., 2011a) . نتایج این تحقیق با گزارش Spivak & Davani مطابقت دارد که نشان دادند کلنی‌های پر جمعیت رفتارهای بهداشتی بیشتری بروز می‌دهند و در برابر آفات به‌خصوص کنه واروآ مقاوم تر هستند (Spivak & Davani, 1993) . بنا بر تحقیق ابراهیم و همکاران برخی از کلنی‌های بسیار بهداشتی ممکن است جمعیت بالغ کمتری نسبت به کلنی‌های غیر بهداشتی داشته باشند (Ibrahim *et al*., 2007). دلیل این امر این است که کلنی‌های بسیار بهداشتی کوچک ترین اختلال در داخل سلول‌های شفیره را حتی اگر عامل آن کنه یا عامل بیماری‌زا نیز نباشد به سرعت شناسایی، درپوش‌برداری و تخلیه می‌کنند در نتیجه جمعیت نوزادان و بالغین در این کلنی‌ها کاهش پیدا می‌کند که البته این نتایج با نتایج این تحقیق مشابهت ندارد.

بر اساس نتایج به‌دست آمده از این تحقیق تفاوت معنی‌داری بین سطح پرورش نوزادان در دو سال وجود داشت. همچنین تفاوت معنی‌داری بین دو گروه کلنی‌های شاهد و مقاوم از لحاظ سطح پرورش نوزادان مشاهده شد. بر اساس تحقیق نجفقلیان و همکاران (۲۰۱۱a)جمعیت نوزادان کلنی اثر معنی‌داری بر جمعیت بالغین کلنی دارد. همچنین آن‌ها بیان داشتند که جمعیت نوزادان هر کلنی اثر معنی‌داری بر عسل تولیدی نداشته اما جمعیت بالغین تاثیر بسیار معنی‌داری بر جمعیت نوزادان هر کلنی دارند ($p< ۰/۰۱$) که مشابه نتایج به‌دست آمده در این تحقیق می‌باشد. بر اساس تحقیق لیلیا و همکاران زیاد یا کم بودن جمعیت زنبورهای بالغ و نوزاد را معیار مناسبی برای انتخاب کلنی‌های بهداشتی نمی‌دانند که با نتایج ما متفاوت است (Lilia *et al*., 2001).

رفتار نظافت‌گری

تعداد کنه‌های ریزش نموده (سالم وآسیب‌دیده) در کندوه‌های آزمایشی در دو سال ۹۳ و۹٤ به‌ترتیب ۱ ± ٦۱و ۰/۳ ± ٦٥ به ازای هر کلنی به‌دست آمد که تفاوت بین آن‌ها معنی‌دار بود. همچنین در دو سال میانگین کلنی‌های مقاوم (٦۳ عدد در هفته) بیشتر از کلنی‌های شاهد (٦۰ عدد در هفته) بود اما تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد. علمی و همکاران (۲۰۰۲) میانگین رفتار نظافت‌گری کلنی (تعداد کنه‌های جدا شده از بدن زنبورها) در استان آذربایجان شرقی را ٥۲/٤ عدد به ازای هر کلنی به‌دست آوردند (Elmi *et al*., 2002). مشایخی و همکاران (۲۰۰۱) با بررسی رفتار نظافت‌گری در کلنی‌های استان‌های تهران و خراسان نتیجه گرفتند که میانگین رفتار نظافت گری در کلنی‌های استان تهران ۹ /٥٤٪، استان خراسان ٥۳/۹ ٪ و میانگین دو استان ٥٤/٤ ٪ بود (Mashayekhi *et al*., 2001) که با نتایج این تحقیق مشابهت دارد. بحرینی (۲۰۰۰) رفتار نظافت‌گری را در ۲٥ کلنی زنبور عسل آلوده به کنه واروآ به روش صفحات چسبناک در کرج مورد بررسی قرار داده و مشاهده نمود که از ۲٤۱٥۰ عدد کنه ریزش کرده بر کف کندو تعداد ۷۲٥ عدد آن‌ها آسیب دیده‌اند و نتیجه گرفت زنبور عسل نژاد ایرانی پتانسیل دفاع در مقابل کنه واروآ را دارد (Bahreini, 2000) . در این آزمایش میانگین بالای تعداد کنه‌های ریزش کرده بر کف کندوها حاکی از این امر است که این کلنی‌ها با تشخیص کنه‌ها روی بدن خود و سایر زنبورها و دور کردن آن‌ها توان مقاومت در برابر کنه واروآ ر ا دارند. نتایج همبستگی بین رفتارهای نظافت‌گری و بهداشتی (درپوش‌برداری و تخلیه لارو مرده) و صفات عملکردی در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- همبستگی بین رفتار نظافت‌گری و بهداشتی (درپوش‌برداری و تخلیه لارو مرده) با صفات عملکرد عسل و جمعیت کلنی‌ها

Table 2. Correlation between grooming and hygienic (uncapping and removing) behaviors, with functional traits and population of colonies

1393 / 1394	Grooming	Honey production	Brood population	Adult population	Percentage of uncapping after 48 hours	Percentage of removing after 48 hours
Grooming	1	0.492**	0.083	0.505**	0.241	0.231
Honey production	0.432**	1	0.0718	0.801**	0.043	0.12
Brood population	0.057	0.079	1	0.849**	0.092	0.205
Adult population	0.62**	0.715*	0.954**	1	0.069	0.237
Percentage of uncapping after 48 hours	0.249	0.417**	0.229	0.079	1	0.786**
Percentage of removing after 48 hours	0.234	0.292**	0.052	0.087	0.847**	1

* Significant at 5% level, ** Significant at 1% level. The results of 1393 (Above the axis of table). The results of 1394 (Below the axis of table)

برای به‌دست آوردن ارتباط بین رفتارهای نظافت‌گری و رفتارهای درپوش‌برداری و حذف شفیره ها با صفات عملکردی در دو سال آزمایش اقدام به تعیین ضریب همبستگی گردید. همبستگی پیرسن نشان داد که بین صفات نظافت گری با دو صفت درپوش برداری و حذف شفیره‌ها همبستگی معنی‌داری وجود نداشت. این همبستگی در سال‌های ۹۳ و ۹٤ به‌ترتیب ۰/۲٤۱، ۰/۲۳۱، ۰/۲٤۹، ۰/۲۳٤ بود. به عبارت دیگر این صفات مستقل از هم می‌باشند و بهبود و یا تضعیف یک صفت روی صفات دیگر تاثیر ندارد.

در این تحقیق بین جمعیت نوزادان و رفتار نظافت‌گری در سال ۹۳ و ۹٤ به‌ترتیب همبستگی مثبت ۰/۰۸۳ و ۰/۰۵۷ بودکه معنی‌دار نبود که متفاوت از تحقیق افشاری و همکاران است (Afshari *et al*., 2013) .

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که همبستگی میان رفتار نظافت‌گری با تولید عسل در سال‌های ۹۳ و ۹٤ به‌ترتیب ۰/٤۹۲ و۰/٤۳۲ می‌باشد که نشان می‌دهد رابطه مستقیم و معنی‌داری بین آن‌ها وجود دارد ($p<0.05$). این نتایج مشابه با تحقیق طهماسبی و همکاران (۲۰۱۸) است که همبستگی بین نظافت‌گری و تولید عسل را مثبت گزارش کردند (Tahmasbi *et al*., 2018). افشاری و همکاران (۲۰۱۳) نیز همبستگی بین رفتارهای نظافت گری با تولید عسل را منفی و غیر معنی‌دار دانستند (Afshari *et al*., 2013). نتایج به‌دست آمده از مطالعات سایر محققین نشان می‌دهد که همبستگی بین دو صفت نظافت‌گری و تولید عسل در مناطق مختلف و در سال‌های مختلف متفاوت است که این نشان می‌دهد این همبستگی تحت تاثیر عوامل مختلف مانند میزان آلودگی به کنه واروآ، میزان شهد و گرده و عوامل محیطی نیز می‌باشد.

در این تحقیق بین جمعیت نوزادان و تولید عسل در سال ۹۳ و ۹٤ به ترتیب همبستگی مثبت ۰/۰۷۱۸ و ۰/۰۷۹ به‌دست آمد که معنی‌دار نبود. از نتایج دیگر این تحقیق همبستگی مثبت و معنی‌دار بین جمعیت بالغین و عسل تولیدی در سال‌های ۹۳ و ۹٤ که به‌ترتیب ۰/۸۰۱ و۰/۷۱۵ می‌باشند که به‌ترتیب در سطح ۵ درصد و ۱ درصد معنی‌دار بودند. که این نتایج با تحقیقات بانو حسینی و همکاران (۲۰۱۱) تا حدودی مشابهت داشت که گزارش نمودند جمعیت بالغین هر کلنی با مقدار عسل تولیدی همبستگی بسیار معنی‌دار بود (Banohoseini *et al*., 2011) همبستگی بین میزان تولید عسل فصلی با جمعیت بالغین و تاثیرگذاری جمعیت بر میزان تولید عسل امری بدیهی است زیرا با افزایش جمعیت کلنی جمعیت زنبوران شهد آور نیز زیاد شده در نتیجه میزان تولید عسل افزایش خواهد یافت. همچنین بنا بر تحقیق زابو و همکاران جمعیت بالغین تاثیر معنی‌داری بر تولید عسل دارد (Szabo *et al*., 1989) . که تا حدودی مشابه نتایج این تحقیق است. همبستگی بین سطح پرورش نوازادان و درپوش برداری بعد از ٤۸ ساعت در سال ۹۳ و ۹٤ به‌ترتیب ۰/۰۹۲ و ۰/۲۲۹ حاصل شد که معنی‌دار نبود. نتایج تحقیق حاضر با نتایج افشاری و همکاران که بیان داشتند صفت درپوش برداری و حذف لارو همبستگی مثبت و معنی‌داری با میزان جمعیت نوزادان متفاوت است (Afshari *et al*., 2013).

بین رفتار درپوش‌برداری و جمعیت بالغین در این تحقیق در سال ۹۳ و ۹٤ همبستگی ۰/۰٦۹ و۰/۰۷۹ به‌دست آمد که معنی‌دار نبود که با نتایج تحقیق نجفقلیان و همکاران (۲۰۱۱a) می‌باشد که گزارش نمودند بین جمعیت بالغین و رفتار درپوش‌برداری بعد از ٤۸ ساعت همبستگی مثبت و غیر معنی‌داری وجود دارد.

نرخ تخلیه بعد از ٤۸ ساعت به‌عنوان معیار در انتخاب کلنی‌های بهداشتی می‌باشد. بین جمعیت بالغین با تخلیه سلول-ها بعد از ٤۸ ساعت در این تحقیق در سال ۹۳ و ۹٤ به‌ترتیب همبستگی ۰/۲۳۷ و۰/۰۸۷ به‌دست آمد که معنی‌دار نبود. تحقیق نجفقلیان و همکاران با بررسی صفات تخلیه سلول‌ها بعد از ٤۸ ساعت و جمعیت بالغین نتیجه گرفتند که بین این صفات همبستگی مثبت و معنی دار وجود ندارد (Najafgholian *et al*., 2011b). Lilia و همکاران نیز زیاد و کم بودن جمعیت بالغین و نوزادان را معیار مناسبی برای انتخاب کلنی‌های بهداشتی نمی‌دانند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Lilia *et al*. 2001). گراماکو و همکاران نشان دادند رفتار بهداشتی به‌شدت تحت تاثیر عوامل محیطی نظیر دما، رطوبت، جریان شهد و غیره است که با تغییر فصل بروز می‌نماید (Gramaco *et al*., 2009a). همچنین در تحقیقی دیگر بروز رفتارهای بهداشتی را وابسته به توانایی کلنی و شرایط محیطی نظیر جریان شهد دانستند (Spivak & Giliam, 1993). Boecking & Spivak بیان رفتار بهداشتی را به‌شدت تحت تاثیر عوامل محیطی دانسته و نشان دادند که در کلنی‌های ضعیف و یا در صورت عدم وجود شهد تخلیه شفیره های مرده و یا آلود کاهش می‌یابد (Boecking & Spivak, 1999).

سازوکارهای مقاومتی زنبوران عسل در تمام نژادها و جمعیت‌ها یکسان نیست. به‌عنوان مثال باروری کمتر کنه در برزیل یکی از علل اصلی مقاومت زنبوران این کشور در برابر کنه واروا می‌باشد ولی ممکن است در سایر کشورها میزان جذابیت کمتر لاروها به کنه واروا، رفتار نظافت‌گری و رفتار بهداشتی (درپوش‌برداری و خارج کردن شفیره‌های آلوده) از علت‌های مقاومت در برابر کنه واروا محسوب شوند. به‌طور کلی سازو کارهای مقاومتی در زنبوران عسل یک کشور ممکن است که در سایر کشورها به‌عنوان عامل اصلی مقاومت ژنتیکی در برابر کنه واروا مطرح نباشد. بنابراین برای شروع و ادامه برنامه اصلاح نژادی موفق در برابر آفات و بیماری‌ها ، باید به سازو کارهای اصلی مقاومت ژنتیکی در توده اصلاح شده نیز توجه شود. همچنین برای مبارزه با آفات باید به تشخیص دقیق آفات،دوره زندگی، عادات و رفتار، نقش آن‌ها در اکوسیستم، تخمین جمعیت ، نوع و میزان خسارت و سطح زیان اقتصادی آن‌ها توجه نمود. روش‌های جدیدی برای کنترل آفات کشاورزی در حال اجرا است که بنام مدیریت تلفیقی آفات یا کنترل تلفیقی و مهم‌تر از همه مقاومت ژنتیکی می-باشد. در این روش در صورت ضرورت از سموم شیمیائی استفاده می‌شود. لذا برای کنترل و مبارزه با آفات، شکارچیان و بیماری‌های زنبور عسل می‌توان از روش‌های غیر شیمیایی از جمله کنترل فیزیکی و توده‌های مقاوم زنبور عسل به انگل‌ها و پاتوژن‌ها استفاده کرد. در رابطه با کاربرد مواد شیمیایی هم عقیده بر این است که در موقع زیاد شدن آلودگی به آفات و بیماری‌ها، در صورت نیاز از مواد شیمیایی کم‌خطر که اثرات سوء زیست محیطی کمتری را در پی دارند استفاده شود. در انتخاب لاین‌های بهداشتی علاوه بر رفتار بهداشتی می‌توان سایر صفات مهم اقتصادی نظیر زمستان‌گذرانی، تولید عسل، رفتار دفاعی و بچه‌دهی نیز توجه کرد. علاوه بر این با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد که ارتباط سازو کارهای مقاومتی بررسی شده به همراه سایر سازوکارهای مقاومتی نظیر مومیایی کردن کنه در موم، طول دوره شفیرگی کوتاه مدت، ناباروری کنه در توده مورد نظر بررسی و انتخاب چند جمعیت را در راستای ایجاد لاین مقاوم به امراض ملی نمود و در واقع نتایج به‌دست آمده نشان دهنده پتانسیل بالای زنبور عسل ایرانی از نظر رفتارهای بهداشتی و اصلاح نژاد آن برای مقاومت به کنه واروآ می‌باشد.

Reference

Afshari, M., Tahmasbi, G. H. and Jafari, R. 2013. Study of hygienic and grooming behaviors of Iranain honey bees (*Apis mellifera meda*) against *Varroa destrauctor.* M.S. thesis, Islamic Azad University Brojerd .Lorestan.

Akef, M. 2000. A Study of some hygienic behavior Uncapping and Removing of some Honey bee Population *(Apis Mellifera meda*) and their brood attractiveness Varroa mite in Iran. M.S. thesis, Imam Khomaini Higher Eduction Center, Tehran.

Bahreini, R. 2000. Study of hygienic behavior grooming in the honeybees colonies Karaj. Journal of Pajouhesh and Sazandagi, 50:88-90.

Banohoseini, S., Tahmasbi, G. H., Eskandadi Nasab, M .P. and Babaei. M. 2011. Study of hygienic behavior in Honey bee colonies *(Apis Mellifera meda*) against *Varroa destrauctor***.** M.S. thesis, Zanjan University, Zanjan.

Boecking, O. and Spivak, M. 1999. Behavioral defenses of honey bee againt *Varroa jacobsonioud*. Journal of Apidologie, 30 (2): 141-158.

Elmi, M., Shad Del, A. and Maheri, N. 2006. The study of hygienic behavior in Honey bee colonies East Azarbaijan against *Varroa destrauctor.* Journal of Danesh Navin Keshavarzu, 3:6-10**.**

Gramacho, K, P. and Gonçalves, L. S. 2009a. Sequential hygienic behavior in Carniolan honey bees (*Apis mellifera carnica*). Journal of Genetics and Molecular Research, 8 (2): 655-663**.**

Gramacho, K. P. and Gonçalves, L. S. 2009b. Comparative study of the hygienic behavior of Carniolan and Africanized honey bees directed towards grouped versus isolated dead brood cells. Journal of Genetics and Molecular Research, 8 (2): 744-750.

Ibrahim, A. Gary, S. and Spivak, M. 2007. Field trail of honey bee colonies bred for mechanisms of resistanc against *Varroa destrauctor.* Journal of Apidologie, 38(1): 67-76.

Kekecoglu, M., Gocrasgele, P., Burgut, A. and Kambur, M. 2015. Breeding and selection of ylca honey bee (*Apis mellifera* L.) 44th Apimondia International Apicultural Congress, Deajeon, Korea**,** P.149.

Lilia, I., Guzman, N. and Rinderer, T. 2001. Hygienic behavior by honeybees from Far-eastern Russia. American Bee Journal, 3: 58-60.

Mashayekhi, M. 2001. Study of hygienic (uncapping and removing) and grooming behaviors in the honey bees colonies Provaines Khorasan and Tehran. M.S. thesis Imam Khomaini Higher Eduction Center, Tehran.

Masterman, R., Smith, H. and Spivak, M .2000. Evalaution brood order discrimination abilities in hygienic honey bee (*Apis mellifera*) using proboscis extention reflex conditioning. Journal of Insect Behavior, 13: 87-101.

Najafgholian, J., Thahmasbi, G., Pakdel, A. and Nehzati, G. 2011a. Effect of population size on the expression of hygienic behavior in the Iranian honey bee *(Apis Mellifera meda*). Journal of Biotecnology Resources, 2(4): 364-373.

Najafgholian, J., Pakdel, A., Thahmasbi, G. and Nehzati, G. 2011b. Assessing hygienic behavior and attraction to varroa mite (Acari: Varroidae) in Iranian, honey bee (*Apis Mellifera meda*) African. Journal of Biotecnology, l10 (6): 1011-1021.

Oldroyd, B. and Oxeley, P. **2008**. Development of two marker for hygienic behavior of honey bees. Rural Industries and Develpment Corporation, 2: 1-131.

Perez-Sato, J. A., Chaline, N., Martin, S. J., Hughes, W. H. O. and Ratnieks, F .L. W. 2009. Multi-level selection for hygienic behaviour in honey bees Heredity. Journal of Heredity, 102: 609–615**.**

Rosenkranz, P. 1999. Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to Varroa jacobsoni Oud. in South America. Apidologie, 30(2): 159-172.

Spivak, M. 1996. Honey bee hygienic behavior and mite Varroa jacobsoni. Journal of Apidologic, 27:245-260 .

Spivak, M. and Downey, D. 1998. Field assays for hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae). Journal of Economical Entomology. 91: 64-70.

Spivak, M. and Gary, S. 1998. Performans of hygienic honey bee colonies in commercial apiary. Journal of Apidologie, 29: 291-302.

Spivak, M. and Gilliam, M. 1998. Hygienic behaviour of honey bees and its application for contro l of broo diseases and *Varroa* mites. Part I: hygienic behaviour and resistance to American foulbrood. Journal of Bee World, 79: 124–134.

Spivak, M. and Gilliam, M. 1993. Facultative expressionof hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. Journal of Apicultural Research, 32: 147-157.

Spivak, M. and Reuter, G. 2001. Varroa destractor infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behaviour. Journal of Apiculture and Social Insects, 94 (2): 326-331.

Szabo, T. I. and Lefkovitch, L. P. 1989. Effect of brood production and population size on honey production of honey bee colonies in Alberta, Canada. Apidologie, 20:157-163**.**

Swanson, J. A., Torto, B., Kells, S. A., Mesce, K. A., Tumlinson, J. H. and Spivak, M. 2009. Odorants that induce hygienic behavior in honey bees: identification of volatile compounds in chalkbrood-infected honey bee larvae. Journal of Chemical Ecology, 35(9):1108-1116.

Tahmasbi, Gh., Ebadi, R., Abasi, M. A., Bahraini, A. R., Babaei, M., Akef, M., Afrouzan, H. and Seify, E. 2018. Honeybee (*Apis mellifera* L.) breeding for resistance to varroa mite (*Varroa destructor* Anderson & Truman). Final Report, Animal Science Research Institute of Iran, 109pp.

Journal of Entomological Research
Volume 10, Issue 1, pages: 65-76

Islamic Azad University, Arak Branch
ISSN 2008-4668
http://jer.iau-arak.ac.ir

Study on the hygenic and grooming behaviours of Iranain honeybees colonies (*Apis mellifera meda*) in the third and fourth generation of breeding plan for resistance to *Varroa distructor*

A. Mansourizalani[1], G. H. Tahmasbi[2*], N. Emam Jomeh kashani[3], M. Amin Afshar[3], A. Ghazi Khani Shad.[4]

1- Ph.D. Student, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Professor, Honeybee Department, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension organization of Iran, Karaj, Iran
3- Respectively Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Animal Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Abstract

Due to the harmful effects of using chemical pesticides to control V*arroa* in honey bee colonies, the use of non-chemical methods such as hygenic behaviors of honey bee has been considered. The hygenic behaviour includes detection of dead, infected or abnormal infants in breed cells, uncapping, removing the broods and grooming to remove *Varroa* from the body. These hygenic behaviours are important defense mechanisms against a variety of pathogens such as bee bacteria, fungi and also *Varroa* mites. In this research, the hygenic mechanism and grooming behaviour of Iranian honey bees against *Varroa* mite was investigated in two generations. The study was accomplished on 60 colonies (30 resistant and 30 sensitive colonies as control) of Alborz National Institute of Animal Science Research in two sessions: one day a week from September to October 2014, and from June to October 2015. To measure the grooming behaviour, grease-treated plates were installed in the floor of the test bed and the number of healthy and unhealthy *Varroa* Mite on the plates was counted. The rate of uncapping and removed of dead broods was determined in resistant and control colonies on June 2014 and October 2015. To determine the hygenic behaviour, liquid Nitrogen was used to kill pupae. The number of uncapped and discharged cells was counted in three periods of 24, 48 and 72 hours after the application of liquid nitrogen. Colonies that removed more than 95% of dead, infected or abnormal broods within 48 hours were considered as very hygienic colonies.The average of grooming behaviour in 2014 and 2015 was 61 ± 1 and 65 ± 3 per colony respectively ($p<0.01$). Hygenic colonies were 30% and 32.3% in 2014 and 2015 respectively. Also, the percentage of uncapping and removing after 48 hours in 2014 and 2015 Were 88.5, 91.3 and 85, 5.86.6 respectively, which was different significantly ($p<0.01$). The results showed, the correlation between grooming behaviour and honey production was significant. Also, the correlation between uncapping and removing behaviours was significant. The results of this research and other studies conducted by other Iranian researchers showed that the Iranian honeybee has shows higher hygenic behaviour against *Varroa* and other bee diseases. By selecting and implementing good breeding programs, it is possible to increase the rate of these behaviours in order to create V*arroa* mite-resistant populations.

Keywords: Varroa mite, Grooming behavior, Hygenic behavior, Genetic resistance

* Corresponding Author, E-mail*: tahmasbigholamhosein@gmail.com*
Received: 2 Aug. 2017 – Accepted: 5 Feb. 2018