

四季秋海棠之多倍體化

游 宏 程¹⁾ 潘 怡 君²⁾ 陳 彥 銘³⁾

關鍵字：四季秋海棠、多倍體化、植物性狀

摘要：本試驗以四季秋海棠'Big[®]-Bronze leaf-Rose'為植物材料分別處理不同濃度之秋水仙素進行多倍體誘變，並調查誘變株倍數性、花粉稔性與外觀型態變化。試驗結果顯示以 5 g L⁻¹ 秋水仙素濃度處理下有最高之芽體存活率 (66.6%)，而以 10 g L⁻¹ 濃度多倍體誘變效率最高為 23.3% 共獲得多倍體誘變株 7 株。經調查發現誘變株與對照組相比葉片長寬比例減少、葉片厚度增加、氣孔大小增加，花徑則小於原株，但觀察其花粉外觀仍呈皺縮狀態不具稔性。

前 言

秋海棠 (*Begonia*) 為秋海棠科 (*Begoniaceae*) 秋海棠屬 (*Begonia*) 多年生草花，原生物種共計約 1,900 種 (Thomas, 2010)，主要分布於熱帶與亞熱帶氣候區 (Doorenbos *et al.*, 1998; Forrest and Hollingsworth, 2003) 為重要花卉作物之一。四季秋海棠為 2015 年美國第四大花壇作物，年產值約三千一百萬美元，僅次於矮牽牛、三色堇及鳳仙花 (USDA, 2016)。由於秋海棠可觀花亦可觀葉，故在全世界均廣泛種植，根據估計目前園藝種約超過 17,000 種 (http://tsuideni-walking.la.coocan.jp/bangai_77_Begonia.html, 2017)。四季秋海棠 'Big[®]-Bronze leaf-Rose' 為德國 Benary[®] 公司所育成之種間雜交品種 (<http://www.big-begonia.com/>, 2018)，具有快速生長與耐逆境性佳等特性且花徑可達 8 公分，然而其花粉皺縮不具稔性，故本試驗擬透過秋水仙素進行誘變，期望能恢復稔性作為後續之育種親本。

-
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
 - 2) 國立中興大學園藝系助理教授。
 - 3) 國立中興大學園藝學系助理教授，通訊作者。

材料與方法

一、試驗材料繁殖及管理

本試驗選用四季秋海棠'Big[®]-Bronze leaf-Rose'作為植物材料。取具兩對葉片之頂梢插穗進行扦插繁殖，插穗切口沾取含有 2 g kg⁻¹ IBA (Indole-3-butyric acid, Sigma Chemical, Mo., U.S.A) 發根粉扦插於商用泥炭苔混和介質 BVB 7H (7H PO441389, Bas van Buuren B.V., Coldenhovelaan 10, The Netherlands) 2 吋塑膠盆內，並置於噴霧插床促進發根。待插穗發根後移出噴霧環境於遮陰處進行馴化。移至 3 吋盆器以上則使用泥炭土 (7-03 Base substrate, Klasmann, Lithuania)與珍珠石 (好成特選珍珠岩 4-9 mm, Hoper Int'l Floriculture & Horticulture Co.)混合體積 2:1 (v/v)栽植。栽培時期每週施用 2 次 1 g L⁻¹ Jack's 水溶性肥料 (20-20-20) (Scotts-Sierra Horticultural Products Co., Marysville, OH, U.S.A.)，並適時補充 0.2 g L⁻¹ MgSO₄ (Bittersalz, K + SKALI GmbH 34111 Kassel, Germany)與 0.2 g L⁻¹ EDTA-Fe (DE-Fe-13 Chelated Iron Powder 13 %, AkzoNobel, The Netherlands)。

二、秋水仙素誘變處理

秋水仙素誘變處理方法參考自陳 (2012)進行修改。於各頂芽上放置直徑約 3 mm 大小之脫脂棉球，一日分別處理 5、10、15、20 g L⁻¹ 不同濃度之秋水仙素溶液 2 次，連續 2 天。秋水仙素吸取 2 ml 滴於棉花球上使芽體能夠充分浸潤，並連續進行兩天。各濃度均處理頂芽 30 個，共計 150 芽。並於誘變處理後八週進行存活率調查，將存活芽體以慣行方式重新扦插，以備後續調查試驗進行。

三、植株性狀調查

對照組與誘變株調查項目參考日本農林水產省公布之秋海棠屬性狀調查檢定表 (<http://www.hinsyu.maff.go.jp/info/sinsakijun/kijun/1720.pdf>, 2017)。調查其節間長度、葉片長寬比例、葉片厚度、葉柄長度及花徑大小。並記錄於不同濃度處理下芽體存率、倍體數誘變率與型態變異率等。

四、倍數性檢測

相對 DNA 含量檢測參考 Chen 和 Mii (2012a; 2012b)方法，以誘變株及其原株同時進行相對 DNA 含量比對，取約 0.25 cm² 嫩葉加入 400 μl 核酸萃取緩衝溶液 (Nuciel Extraction Buffer, Partec GmbH, Münster, Germany)於培養皿中以刮鬚刀片均勻剝碎後，添加 1600 μl 染色緩衝液 (Staining Buffer, Partec GmbH, Münster, Germany)均勻混合靜置 1 分鐘後，以 30 μm 尼龍濾網過濾獲得澄清溶液，以振盪機震盪再次混勻，使用流式細胞儀 (CyFlow[®] Cube 6, Partec, Germany)進行樣品相對 DNA 含量分析。

五、統計分析

試驗採用完全隨機設計 (Completely Randomized Design, CRD)，調查數據使用 CoStat 6.1 版套裝軟體 (CoHort software, U.S.A.)中 ANOVA (Analysis of variance)進行變方分析，以 Duncan's LSD 進行各處理之顯著差異比較。

結 果

試驗結果顯示，以 5 g L⁻¹ 秋水仙素處理下有最高之芽體存活率 66.6%；於處理濃度增加至 10 g L⁻¹ 與 15 g L⁻¹ 時則降低至 60.0%；秋水仙素濃度於 20 g L⁻¹ 時其芽體存活率則為 46.6%。以流式細胞儀檢測存活芽體之倍數性，結果指出不同濃度處理下均可獲得多倍體誘導植株。其中更以 10 g L⁻¹ 濃度下多倍體誘變效率最高為 23.3% 獲得 7 株，其次為 15 g L⁻¹、20 g L⁻¹ 與 5 g L⁻¹ 濃度，誘導效率依序為 13.3%、13.3% 與 10%，分別獲得 4 株、4 株與 3 株變異植株。型態變異率以 10 g L⁻¹ 濃度最高為 16.6%，15 g L⁻¹ 型態變異率僅 10.0% (表 1)。

表 1. 不同秋水仙素濃度對四季秋海棠'Big[®]-Bronze leaf-Rose'誘變效率之影響。

Table 1. Effect of different colchicine concentrations on the mutant induction in *Begonia semperflorens* 'Big[®]-Bronze leaf-Rose'.

濃度 Conc. (g L ⁻¹)	芽體存活率 ^z Survival rate (%)	倍體數誘變率 ^y Ploidy mutant rate (%)	DNA C-values			型態變異率 Trait variation (%)
			四倍體 Tetraploid	混倍體 Mixoploid	非整倍體 Aneuploidy	
5	66.6 (20/30)	10.0 (3/30)	2	-	1	20.0 (4/20)
10	60.0 (18/30)	23.3 (7/30)	3	2	2	27.8 (5/18)
15	60.0 (18/30)	13.3 (4/30)	3	1	-	16.7 (3/18)
20	46.6 (14/30)	13.3 (4/30)	3	-	1	28.6 (4/14)

^z：存活芽體數/總處理芽數，於誘變 8 週調查存活率。

^y：相對 DNA 含量與對照組具明顯差異之誘變株數量。

^z：No. of survival buds / No. of total treatment buds, evaluated the efficiency of survival ratio after treatment 8 weeks.

^y：Mutants with obviously different DNA contents compared with control donor.

調查經秋水仙素誘變之四季秋海棠'Big[®]-Bronze leaf-Rose'結果顯示誘變株其節間長度增加，葉片長寬比例減少呈較圓整之葉片型態，且葉片厚度增加，葉柄長度明顯低於對照組 (表 2)。葉緣則出現不規則鋸齒或畸形。誘變株 Mutant 3 與 Mutant 4 其葉表出現淡綠色鑲嵌體，而 Mutant 1 與 Mutant 2 葉片則有畸形現象產生。花徑大小與對照組相比則普遍略小於原株，且誘變株 Mutant 3 其雄花出現雄蕊瓣化現象，花瓣具不規則嵌紋 (圖 1)。

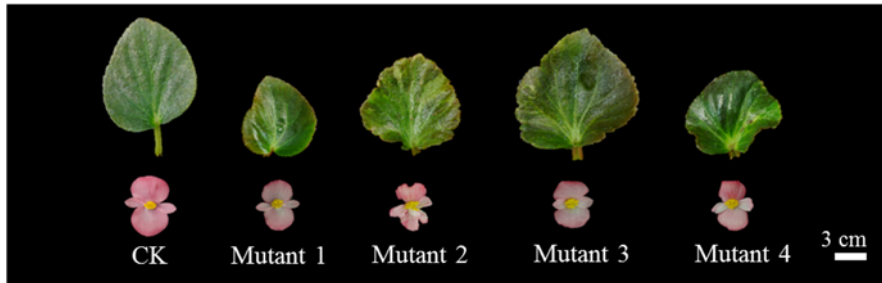


圖 1. 四季秋海棠'Big®-Bronze leaf-Rose'多倍體誘變之外觀型態變化。

Fig. 1. The characteristic variation of *Begonia semperflorans* 'Big®-Bronze leaf-Rose' by polyploidy induction.

經流式細胞儀檢測發現，Mutant 1 為三倍體誘變株，其相對 DNA 含量為 3.01 (圖 2A)；Mutant 2 為非整倍體誘變株，其相對 DNA 含量為 3.76 (圖 2B)。Mutant 3 與 Mutant 4 為混倍體與四倍體誘變株，其相對 DNA 含量則分別為 2.92 及 3.81 與 4.00 (圖 2C、D)。檢測原株與誘變株之花粉外觀形態及活力，對照組花粉皺縮平均長度約 18.59 μm (圖 3A)，四倍體誘變株 Mutant 4 其平均長度約為 21.08 μm ，但仍外觀仍為皺縮無法正常發芽 (圖 3B)。觀察四倍體誘變株之氣孔大小發現，原株氣孔直徑為 27.17 μm (圖 3C)，誘變株則增加至 36.21 μm (圖 3D)，且數量與密度均較對照組緊密。

討 論

四季秋海棠'Big®-Bronze leaf-Rose'透過秋水仙素進行瓶外誘變，其中以 10 g L^{-1} 濃度所獲得之倍體數誘變效率最高，但於四個濃度處理下均獲得混倍體或非整倍體誘變單株 (表 1)。此結果與蘭花透過秋水仙素處理實生苗或分生組織獲取多倍體結果相似，然而蘭花誘變株經常形成 2 倍與 4 倍混倍體植株 (易, 2012)。此混倍體現象推測與藥劑處理植物組織接觸效果不佳相關，進而導致形成組織細胞嵌合體造成。而非整倍體之發生則可能因化學誘變後造成染色體斷裂或缺失，抑或染色體複製後分裂發生異常所致。此現象與 Lockett (1989)棉花秋水仙素誘變試驗有相似結果。

此外本研究獲得之多倍體誘變株，其葉片厚度增加、長寬比例減少、葉形較為圓整 (表 2)。此外表型態變化與多倍體洋桔梗及白鶴芋結果相似，皆出現葉片加厚、葉綠體含量增加使葉色加深及葉片長寬比例減少等特性 (Lindsay *et al.*, 1994; Ogasawara *et al.*, 2014)。本研究獲得之多倍體單株亦可觀察到氣孔數量增加 (圖 3)，此現象推測對植物生長有其助益，因已有文獻指出高倍體葉片具有較高之光合碳吸收 (Frank, 1980; Joseph *et al.*, 1981; Warner

表 2、四季秋海棠 'Big[®]-Bronze leaf-Rose' 以秋水仙素處理獲得之誘變株型態調查^z。
 Table 2. The morphological differences between *Begonia semperflorens* 'Big[®]-Bronze leaf-Rose' and its mutants obtained from colchicine treatment^z.

對照組/ 誘變株 Control/ Mutants	節間 長度 Internode length (mm)		葉長 葉寬 Leaf length Leaf width (mm)		葉身長 寬比 Leaf ratio (%)		葉身 厚度 Leaf thick (mm)		葉柄長 Petiole length (mm)		雄花直徑 Diameter of male flower (mm)		相對 DNA 含量 Relative DNA content (units) ^y		獲得 濃度 Conc. (g L ⁻¹)	
	CK	33.93c	77.91c	62.71c	1.24	0.36c	24.61a	46.98ab	2.00	-						
Mutant 1	48.28a	82.34b	76.84b	1.07	0.38c	16.91b	45.36b	3.01	20							
Mutant 2	40.51b	66.17d	57.95d	1.14	0.43b	10.19d	48.45a	3.76	5							
Mutant 3	44.98a	63.02d	64.27c	0.98	0.59a	9.32d	34.92c	2.94/ 3.81	10							
Mutant 4	45.05a	86.85a	82.92a	1.04	0.45b	14.71c	33.54c	4.00	15							

^z : 數據以鄧肯氏多變域顯著性測試作顯著差異比較， $p \leq 0.05$ 具有差異顯著。

^y : 相對 DNA 含量與對照組具明顯差異之誘變株數量。

^z : Means separation within columns by Duncan's multiple range test, $p \leq 0.05$.

^y : Mutants with obviously different DNA content compare with control donor.

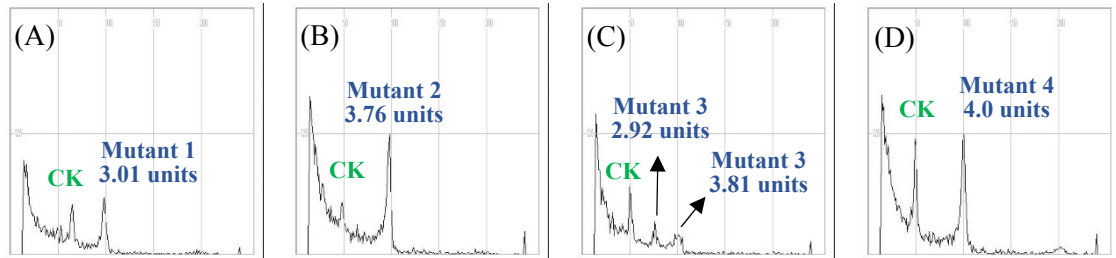


圖 2. 四季秋海棠'Big[®]-Bronze leaf-Rose'經秋水仙素誘變獲得之誘變株相對 DNA 含量。

(A)三倍體誘變株。(B)非整倍體誘變株。(C)混倍體誘變株。(D)四倍體誘變株。

Fig. 2. The relative DNA content of colchicine mutants in *Begonia semperflorens* 'Big[®]-Bronze leaf-Rose'. (A) Triploidy mutant, (B) Aneuploid mutant, (C) Mixoploidy mutant, (D) Tetraploid mutant.

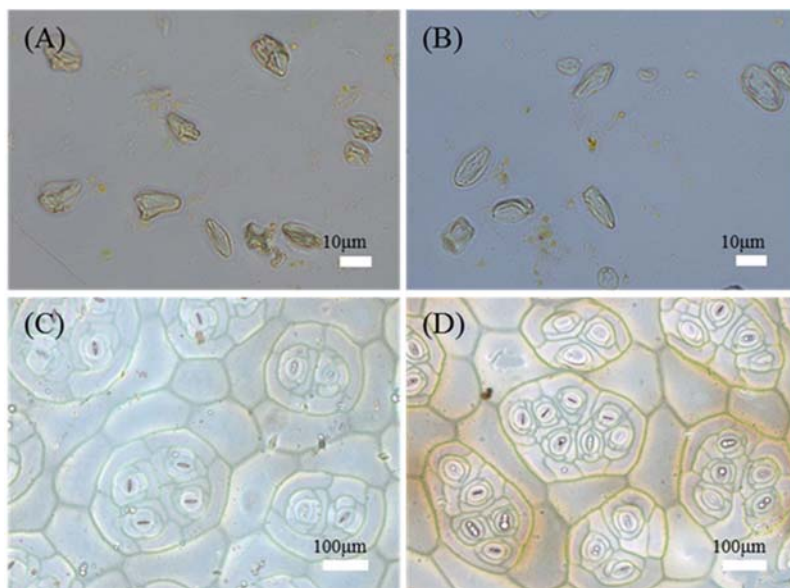


圖 3. 四季秋海棠'Big[®]-Bronze leaf-Rose'對照組與誘變株之花粉外觀型態與氣孔大小變化。

(A)對照組花粉粒外觀。(B)四倍體誘變株(Mutant 4)之花粉外觀變化。(C)對照組之氣孔大小。(D)四倍體誘變株(Mutant 4) 之氣孔大小變化。

Fig. 3. The differences of pollen and stoma between *Begonia semperflorens* 'Big[®]-Bronze leaf-Rose' and mutants. (A) Pollen characteristic of original material. (B) Pollen morphological variation of Mutant 4. (C) Stoma size of control material. (D) Stoma size variation of Mutant 4.

et al., 1987)。而觀察氣孔變化已被認為判定多倍體之方法之一，而氣孔大小與基因組大小有關 (Laere *et al.*, 2010; Rayburn *et al.*, 2009)。多倍體化已被證實可增加火鶴 (*Anthurium andraeanum*) (Chen *et al.*, 2011)、非洲菊 (*Gerbera jamesonii*) (Gantait *et al.*, 2011)與油點草 (*Tricyrtis sp.*) (Otani *et al.*, 2014)之氣孔大小，唯其氣孔單位面積數量則會降低 (Chen *et al.*, 2011; Gantait *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2005)。而本研究四季秋海棠誘變株之氣孔直徑較原株長約 9.04 μm ，密度也較為緊密 (圖 3C、D)，此現象與多數研究結果相異。推測可能與 *TMM* (*Too Many Mouths*)基因相關。*TMM* (*Too Many Mouths*)為調控擬南芥氣孔發育的基因之一，當此基因不表現時將導致氣孔細胞數目增多，並簇集在一起 (Bhave *et al.*, 2009)。故本試驗四季秋海棠誘變株可能因 *TMM* 基因發生突變，造成氣孔數目及密度增加。

而本試驗獲得部分誘變株其雄花出現雄蕊瓣化現象 (圖 1)，推測與顯隱性基因、調控花器官發育及 MADS-box 基因有關。四季秋海棠已被證實重瓣花型受到一對同質隱性基因所控制 (Reimann-philipp and Lorenz, 1978)。透過秋水仙素誘變，可能造成隱性基因成對因而表現重瓣性狀。此外雙子葉植物為由花萼、花瓣、雄蕊及心皮所組成的四輪結構，其中 A、B、C 三類基因影響花器形成。A 類基因分別調控花萼與花瓣發育，然而花瓣仍須 B 類基因供參與才能生成；C 類基因分別調控雄蕊與心皮發育，然而其雄蕊仍須 B 類基因供參與才能生成，並且 A、C 兩類基因為負調控 (Coen, 1991)。當擬南芥 C 類基因 *AGAMOUS* 不表達時，其花器官出現同源轉化現象，雄蕊位置轉變為花瓣。此現象已於矮牽牛研究，利用 VIGS 抑制 C 類基因 *pMADS3* 與 *FBP6*，造成矮牽牛雄蕊瓣化表現 (Noor *et al.*, 2014)。故推測本研究誘變株出現雄蕊瓣化現象可能也與控制花器官表現的 C 類基因發生突變所致。

而多倍體誘變可獲得具花粉稔性之誘變株，其主要原理在於透過染色體加倍使同源染色體配對達到平衡從而恢復稔性。本試驗獲得之非整倍體或混倍體誘變株 (圖 2)，推測其染色體仍無法順利配對因而花粉母細胞無法正常減數分裂正常花粉而花粉粒無法萌發 (圖 3A、B)。而本試驗雖有獲得四倍體誘變株，其結果仍無法獲得恢復花粉稔性之誘變株。推測試驗材料可能為非偶數倍體，造成加倍後成為同源異質染色體，減數分裂後亦無法形成有效配子相關。

參 考 文 獻

- 易美秀。2012。蘭花多倍體誘導及鑑定。台中區農業改良場一〇一年專題討論專集。p.247-251。
- 陳俊源。2012。麒麟花種間雜交及多倍體誘導。國立中興大學園藝學系研究所碩士論文。67pp。
- Baer, G. R. and L. E. Schrader. 1985. Relationships between CO₂ exchange rates and activities

- of pyruvate, Pi dikinase and ribulose bisphosphate carboxylase, chlorophyll concentration, and cell volume in maize leaves. *Plant Physiol.* 77(3): 612-616.
- Bhave, N. S., K. M. Veley, J. A. Nadeau, J. R. Lucas, S. L. Bhave, and F. D. Sack. 2009. *TOO MANY MOUTHS* promotes cell fate progression in stomatal development of *Arabidopsis* stems. *Planta* 229(2): 357-367.
- Chen, C., X. Hou, H. Zhang, G. Wang, and L. Tian. 2011. Induction of *Anthurium andraeanum* 'Arizona' tetraploid by colchicine in vitro. *Euphytica* 181(2): 137-145.
- Chen, Y. M. and M. Mii. 2012a. Interspecific hybridization of *Begonia semperflorens* (section *Begonia*) with *B. pearcei* (section *Eupetalum*) for introducing yellow flower color. *Plant Biotechnol.* 29(1): 77-85.
- Chen, Y. M. and M. Mii. 2012b. Inter-sectional hybrids obtained from reciprocal crosses between *Begonia semperflorens* (section *Begonia*) and *B. 'Orange Rubra'* (section *Gaerdita* x section *Pritzelia*). *Breed Sci.* 62(2): 113-123.
- Coen, E. and E. M. Meyerowitz. 1991. The war of the whorls: genetic interaction controlling flower development. *Nature* 353(6399): 31-37.
- Doorenbos, J. M. Sosef and J. de Wilde. 1998. The sections of *Begonia* including descriptions, keys and species lists (Studies in Begoniaceae VI). Wageningen Agricultural University. No. 98-2. 266pp.
- Forrest, L. L. and P. M. Hollingsworth. 2003. A recircumscription of *Begonia* based on nuclear ribosomal sequences. *Plant systematic and evolution.* 241(3-4): 193-211.
- Frank, A. B. 1980. Photosynthesis, transpiration, and ribulose bisphosphate carboxylase of selected crested wheatgrass plants. *Agron. J.* 72(2): 313-316.
- Gantait, S., N. Mandal, S. Bhattacharyya, and P. K. Das. 2011. Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106: 485-493.
- Gu, X. F., A. F. Yang, H. Meng, and J. R. Zhang. 2005. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. cv. Zhanhua. *Plant Cell Rep.* 24(11): 671-676.
- Joseph, M. C., D. D. Randall, and C. J. Nelson. 1981. Photosynthesis in polyploid tall fescue II. Photosynthesis and ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase of polyploid tall fescue. *Plant Physiol.* 68(4): 894-89.
- Laere, K. V., S. C. Franc, H. Vansteenkiste, J. V. Huylenbroeck, K. Steppe, and M. V. Labeke. 2010. Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. *Acta Physiol. Plant.* 33(4): 1149-1156.
- Lindsay, G. C., M. E. Hopping, and I. E. W. O'Brien. 1994. Detection of protoplast-derived DNA tetraploid *Lisianthus (Eustoma grandiflorum)* plants by leaf and flower characteristics

- and by flow cytometry. *Plant Cell Tissue. Org. Cult.* 38(1): 53-55.
- Luckett, D. J. 1989. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. *Euphytica* 42(1-2): 177-182.
- Noor, S. H., K Ushijima, A. Murata, K. yoshida, M. Tanabe, T. Tanigawa, K. Yasutaka, and R. Nakano. 2014. Double flower formation induced by silencing of C-class MADS-box genes and its variation among *Petunia* Cultivars. *Sci. Hort.* 178(23): 1-7.
- Ogasawara, R., M. Ochiai, K. Nishikawa, and H. Fukui. 2014. Induction of polyploidy by in vitro colchicine treatment of apical meristem of *Spathiphyllum wallisii* Regel 'New merry'. *Hort. Res.* 13(3): 213-219.
- Otani, M., M. Ishibe, P. Inthima, K. Supaibulwatana, S. Mori, T. Niki, T. Nishijima, M. Koshioka, and M. Nakano. 2014. Horticultural characterization of a tetraploid transgenic plant of *Tricyrtis* sp. carrying the gibberellin 2-oxidase gene. *Plant Biotechnol.* 31(4): 335-340.
- Rayburn, A. L., J. Crawford, C. M. Rayburn, and J. A. Juvik. 2009. Genome size of three *Miscanthus* Species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 27: 184-188.
- Reimann-Philipp. R. and A. Lorenz. 1978. Zur Vererbung des Merkmals 'braune Laubfarbe' bei *Begonia semperflorens* Link und Otto. *Z. Pflanzenzüchtg.* 81: 166-175.
- Thomas, D. C. 2010. Phylogenetics and historical biogeography of Southeast Asian *Begonia* L. (Begoniaceae). PhD Thesis, University of Glasgow. USDA. 2016. Floriculture Crops 2015 Summary. April 2016.
- Warner, D. A. and G. E. Edwards. 1989. Effects of Polyploidy on Photosynthetic Rates, Photosynthetic Enzymes, Contents of DNA, Chlorophyll, and Sizes and Numbers of Photosynthetic Cells in the C4 Dicot *Atriplex confertifolia*. *Plant Physiol.* 91(3): 1143-1151.
- Warner, D. A., M. S. B. Ku, and G. E. Edwards. 1987. Photosynthesis, leaf anatomy, and cellular constituents in the polyploid C4 grass *Panicum virgatum*. *Plant Physiol.* 84(2): 461-466.
- http://tsuideni-walking.la.coocan.jp/bangai_77_Begonia.html. January 2018. ベゴニア.
- <http://www.hinsyu.maff.go.jp/info/sinsakijun/kijun/1720.pdf>. June 2017. ベゴニア（根茎性ベゴニア、エラチ オールベゴニア及び球根 ベゴニアを除く。）
- <http://www.big-begonia.com/>. June 2017. Great Gardens Begin with Great Plants.

The Polyploidization of *Begonia semperflorens*

Hung-Cheng Yu¹⁾ Yi-Chun Pan²⁾ Yen-Ming Chen³⁾

Key words: *Begonia semperflorens*, polyploidy induction, plant characteristic

Summary

In the present study, *Begonia semperflorens* 'Big®-Bronze leaf-Rose' were treated with different concentrations of colchicine for polyploidy induction. It also evaluated the ploidy level, pollen fertility, and plant characteristics of mutants. The results indicated the highest survival buds ratio (66.6%) on 5 g L⁻¹ colchicine concentration, and the highest polyploidy induction efficiency (23.3%, 7 polyploidy mutants) on 10 g L⁻¹ colchicine. Compare with the original material, the leaf aspect ratio and flower diameter of mutants was reduce and the leaf thickness and stoma diameter was bigger than original. Unfortunately, the mutant's pollen was still abnormal, empty, and sterile.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

3) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.