

УДК 581.195.7:632.11/15

ВЛИЯНИЕ ЗАСОЛЕНИЯ НА РОСТОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАСТЕНИЙ *PHASEOLUS VULGARIS* L., СОДЕРЖАНИЕ ФИТОГОРМОНОВ И ПОЛИАМИНОВ

Н.И. ШЕВЯКОВА,¹ Л.И. МУСАТЕНКО,² Л.А. СТЕЦЕНКО,¹ В.Ю. РАКИТИН,¹
Н.П. ВЕДЕНИЧЕВА,² Л.В. ВОЙТЕНКО,² Вл.В. КУЗНЕЦОВ,¹ К.М. СЫТНИК²

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук
127276 Москва, ул. Ботаническая, 35

²Институт ботаники им. Н.Г. Холодного Национальной академии наук Украины
01601 Киев, ул. Терещенковская, 2

Исследовано влияние засоления питательной среды на ростовые показатели, содержание свободных и связанных полиаминов и фитогормонов: абсцизовой, индолилуксусной кислот, различных форм цитокининов у проростков фасоли, выращенных в водной культуре. Установлена положительная корреляция между накоплением абсцизовой кислоты и кадаверина. Не обнаружена корреляция между изменениями содержания индолилуксусной кислоты, различных форм цитокининов и полиаминов.

Ключевые слова: *Phaseolus vulgaris* L., засоление, полиамины, фитогормоны.

Гормональная система растений, представленная такими классическими фитогормонами (ФГ), как цитокинины (ЦК), индолилуксусная кислота (ИУК), абсцизовая кислота (АБК), этилен и другие, участвует не только в регуляции физиологических процессов в норме, но и в формировании адаптивных реакций растений в ответ на действие абиотических стрессоров [2, 20, 23]. В этом случае качественные и количественные преобразования во всем комплексе классических ФГ происходят совместно с другими изменениями гормональных и негормональных регуляторных систем, способствующих выживанию растений в стрессовых условиях. Среди многих вторичных посредников, вовлеченных в передачу гормональных сигналов, в последнее время привлекают внимание алифатические полиамины (ПА) — универсальные органические поликатионы с высокой биологической активностью, необходимые для протекания многих физиологических процессов как в норме, так и при действии абиотических факторов, их взаимосвязь с ФГ и участие в инициации деления и растяжения клеток, морфогенезе и цветении [22]. Подобно фитогормонам ПА участвуют в процессах репликации, транскрипции и трансляции, стабилизации мембран, модуляции активности ферментов, влияют на экспрессию генома, рост и развитие растений [4, 23, 26]. Значительное внимание уделялось прямым и косвенным доказательствам взаимодействия ПА с ростостимулирующими ФГ [15]. Так, у некоторых растений ауксины, гиббереллины и ЦК стимулировали биосинтез ПА, что приводило к повышению их содержания в клетках, в то время как экзогенные ПА снижали уровень эндогенных ФГ [15]. В исследованиях с *Arabidopsis* [13, 18] показано, что в нормальных условиях произраста-

ния растений экзогенная ИУК индуцировала экспрессию гена *ACL5*, а экзогенная АБК инактивировала его работу, но одновременно повышала экспрессию одного из изогенов *SAM*, также кодирующего сперминсинтетазу. Инактивация гена *ACL5* приостанавливала элонгацию стебля и растяжение клеток *Arabidopsis* [18]. Известно, что экзогенная АБК участвует в существенном изменении метаболизма ПА в этом растении [28]. Такой механизм может функционировать при адаптации растений к стрессовым условиям, так как накопление АБК обнаружено у многих видов растений при действии засоления, засухи, других абиотических факторов [20, 23]. Необычная связь установлена также между другим стресс-гормоном — этиленом и одним из ПА — кадаверином (Кад) у галофита *Mesembryanthemum crystallinum* L. в ответ на тепловой шок [5].

Сложный характер взаимодействия ФГ с ПА подтверждают результаты исследования быстрых реакций растений на обработку гормонами, в которых выявлена способность экзогенных ПА блокировать экспрессию генов первичного ответа на ЦК [7]. Физиологическая роль обнаруженного ингибирующего эффекта ПА, возможно, состоит в компенсаторной регуляции внутриклеточного содержания эндогенных ЦК при их избыточной концентрации, что может проявляться в экстремальных условиях, когда торможение ростовых процессов определяет выживание растений. В то же время избыточные концентрации ЦК способны вызывать апоптоз клеток растений [11].

Типичным примером мультифункциональных взаимодействий у растений в стрессовых условиях является отрицательная взаимосвязь этилена и ПА семьи путресцина (Пут) и, напротив, положительная по отношению к Кад [5, 23].

Взаимосвязь ПА и ФГ ранее установлена в экспериментах с экзогенным Пут, стимулирующим повышение уровня эндогенной ИУК [9] и снижающим активность ИУК-оксидазы у *Vigna radiata* L. [25]. У растений гороха экзогенный Пут снижал вызванное солевым стрессом повышение содержания АБК и увеличивал содержание цитокининов [19]. Аналогичные данные получены для гороха и при водном стрессе [27].

Однако системные исследования характера взаимосвязей ФГ и ПА в стрессовых условиях, сравнение эндогенного содержания ПА и ФГ у растений с различной устойчивостью до сих пор не проводились.

Целью настоящей работы было сравнение содержания свободных и конъюгированных ПА, ЦК, свободной и связанной форм АБК, ИУК у проростков фасоли, подвергнутых действию различных концентраций NaCl.

Методика

Семена фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) сорта Белозерная после стерилизации проращивали в чашках Петри, проростки переносили на водную культуру (среда Джонсон). Растения выращивали в камере фитотрона при 12-часовом фотопериоде (натриевые лампы Reflux-250, Россия), освещенности 150 Вт/м², температуре воздуха 23 ± 1/16 °С (день/ночь) и относительной влажности воздуха — 55/70 % (день/ночь). Питательную среду в сосудах непрерывно барботировали воздухом — 50 мл/мин. Через 10 сут в питательную среду опытной группы растений одноразово вносили NaCl до концентраций 50, 100, 150 и 200 мМ. Спустя 96 ч экспозиции, измеряли физиологические параметры опытных и контрольных растений, первичные листья и корни фиксировали в жидком азоте.

Экстракцию свободных ПА из растительного материала проводили 5 %-м раствором HClO_4 , затем в фильтрате после отделения осадка получали бензоильные производные индивидуальных ПА, которые определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе высокого давления HP 1090 («Hewlett-Packard», США) по прописи Флорес и Галстон [14]. Связанные конъюгаты ПА определяли также в виде бензоильных производных после кислотного гидролиза осадка [24].

ФГ выделяли и очищали по ранее описанной методике [6]. Окончательный анализ их качественного и количественного содержания проводился методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1200 LC с диодно-матричным детектором G 1315 B (США), колонка Eclipse XDB-C 18 $2,1 \times 150$ мм, размер частиц 5 мкм. Элюция осуществлялась в системе растворителей метанол : вода (37 : 63). Анализ и обработка хроматограмм выполнялась с программным обеспечением Chem Station, версия В.03.01 в непрерывном режиме.

Результаты и обсуждение

Масса проростков, линейные размеры первичных листьев и корней, а также эпикотиль уменьшались при действии всех концентраций NaCl (рис. 1). Наименьшие изменения измеряемых параметров отмечены у гипокотиль. Концентрация соли 200 мМ оказывала токсическое действие, вызывала некроз и опадение листьев, но корни при этом еще сохраняли жизнеспособность.

Конститутивный уровень свободного Пут в корнях контрольных растений фасоли по сравнению с листьями был выше в среднем в 5 раз (рис. 2, а). При действии 50 и 100 мМ NaCl содержание свободного Пут в корнях снижалось на 50–60 %, а уровень его производных — спермидина (Спд) и спермина (Спм) — практически не изменялся (см. рис. 2, а–в). В листьях, напротив, при засолении 50 и 100 мМ NaCl отмечалось повышение содержания свободных Пут, Спд и Спм (см. рис. 2, а–в). Можно предположить, что свободный Пут из корней поступал в листья и расходовался на синтез Спд и Спм, которые принимают участие во внутриклеточной антиоксидантной защите [4].

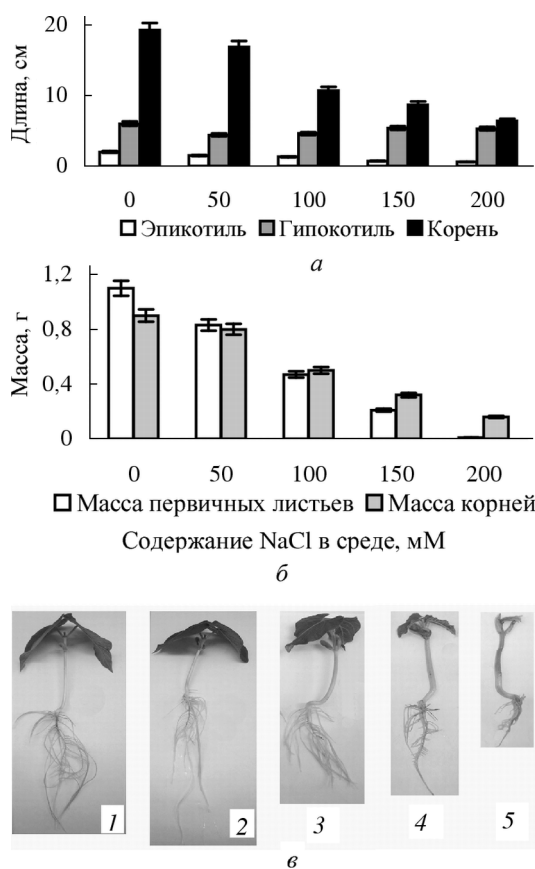


Рис. 1. Влияние засоления (0–200 мМ NaCl, 4 сут) на ростовые показатели проростков фасоли:

а — изменение длины эпикотиль, гипокотиль и корня; б — изменение массы первичных листьев и корней; в — растения фасоли, экспонированные на средах, содержащих 0 (1), 50 (2), 100 (3), 150 (4) и 200 мМ NaCl (5)

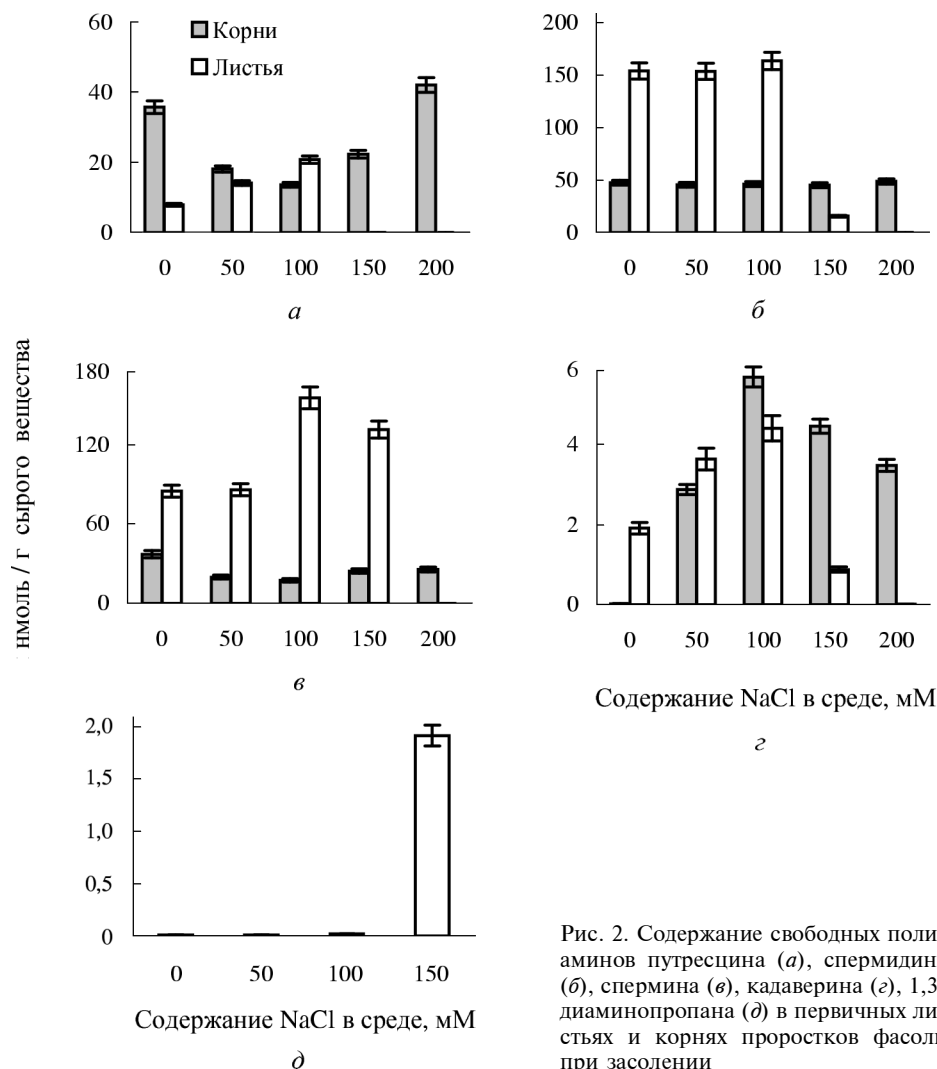


Рис. 2. Содержание свободных полиаминов путресцина (а), спермидина (б), спермина (в), кадаверина (г), 1,3-диаминопропана (д) в первичных листьях и корнях проростков фасоли при засолении

При концентрации соли в среде 150 мМ рост растений угнетался (см. рис. 1, в), содержание Кад, Спд и Спм в листьях уменьшалось (см. рис. 2, б–г). Причиной снижения уровня свободных Спд и Спм могло быть усиление их окислительной деградации, о чем косвенно свидетельствует появление в спектре экстрактов из листьев свободного 1,3-диаминопропана (Дап) при концентрации NaCl в среде 150 мМ (см. рис. 2, д). При действии 200 мМ NaCl в листьях проростков фасоли ПА не обнаружены (см. рис. 2, а–г).

Уровень свободного Кад, диамина, синтез которого осуществляется через декарбоксилирование лизина посредством лизиндекарбоксилазы, в тех же условиях засоления в отличие от свободного Пут повышался в листьях в диапазоне 50–100 мМ соли и снижался при действии 150 мМ NaCl (см. рис. 2, г). Концентрация 150 мМ NaCl была токсичной для листьев и вызывала резкое уменьшение содержания в них всех связанных конъюгатов ПА за исключением Спм (рис. 3, а). В то же время в корнях при отсутствии изменений во фракции свободных Спд и Спм (см. рис. 2, б, в) их содержание в конъюгированной форме несколько повышалось, но

наиболее значимо в связанной форме накапливался кадаверин (см. рис. 3, б).

Анализ полученных результатов показал, что для растений фасоли на стадии 10-суточных проростков максимальную способность к адаптации при действии засоления имели корни, что весьма вероятно могло зависеть от поддержания в них высокого уровня свободного и связанного Кад (см. рис. 2, з, 3, б). Как установлено нами ранее [5], Кад в стрессовых условиях способен транспортироваться по растению, поэтому можно допустить, что снижение содержания Кад в листьях вызвано его передвижением в корни, где он обнаруживался даже при явно токсичной концентрации соли (200 мМ NaCl) (см. рис. 2, з). По литературным данным [12, 16], Кад необходим для элонгации корня и образования корневых волосков, что может объяснить его наличие в корне при действии явно токсичной концентрации NaCl (см. рис. 2, з).

Описанные изменения в метаболизме ПА фасоли в стрессовых условиях в наибольшей степени можно связать с характером стрессиндуцированного накопления АБК в листьях и корнях (рис. 4). Самые существенные изменения наблюдались в содержании свободной АБК в корнях и менее значимые — в листьях. Как следует из литературных данных [21], в корневой системе многих видов растений содержание АБК в норме в 10 раз превышает ее содержание в листьях. Известно также, что стрессиндуцированное накопление АБК связано с преимущественным биосинтезом этого гормона в корнях и ее передвижением в свободной (активной

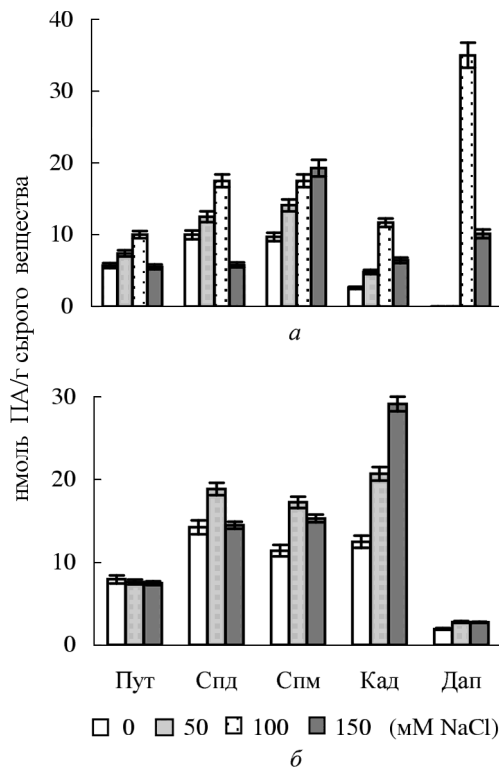


Рис. 3. Содержание связанных конъюгатов полиаминов в первичных листьях (а) и корнях (б) проростков фасоли при засолении

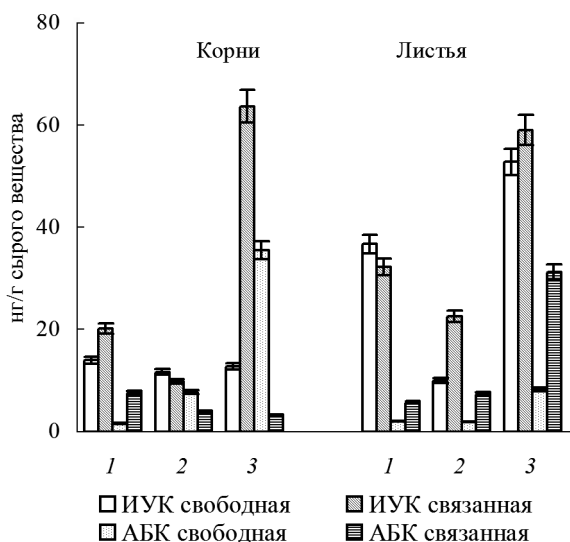


Рис. 4. Содержание индолилуксусной и абсцизовой кислот в проростках фасоли при засолении. Здесь и на рис. 5:

1 — контроль; 2 — 50 мМ NaCl; 3 — 100 мМ NaCl

форме) в надземные органы [30]. Как следует из данных, представленных на рис. 4, при концентрации 100 мМ NaCl в корнях повышается содержание свободной АБК и снижается количество связанной. Это дает основание предположить, что в корнях происходит стрессиндуцированный синтез этого гормона, и аккумулируется он преимущественно в свободной (активной) форме. В то же время в листьях содержание АБК может повышаться вследствие транспорта свободной формы из корней с последующим конъюгированием и сохранением в связанной (неактивной) форме (см. рис. 4). Поэтому вероятно, что стрессзависимая аккумуляция АБК в корнях фасоли, как было показано нами ранее [5], может индуцировать образование повышенного количества в них Кад, обуславливающего более длительное поддержание жизнеспособности корневой системы в условиях засоления. Вместе с тем АБК, поступившая в листья из корней, способна активировать в листьях образование этилена и тем самым вызвать их опадение, что показано для проростков цитрусовых [17].

Уровень свободной ИУК в корнях в условиях засоления менялся незначительно, а в связанной форме при концентрации NaCl 50 мМ снижался вдвое, при концентрации 100 мМ — повышался в три раза (см. рис. 4). Содержание свободной и связанной ИУК в листьях изменялось подобным образом: при действии 50 мМ NaCl концентрация гормона снижалась, при 100 мМ — повышалась в 1,5–1,8 раза (см. рис. 4). Такое же дифференцированное влияние оказывали различные концентрации NaCl и на содержание ЦК. В корнях обнаружено резкое (в десятки раз) повышение уровня зеатина (З), зеатинрибозид (ЗР), зеатинглюкозид (ЗГ) под влиянием 50 мМ NaCl, тогда как при засолении 100 мМ NaCl содержание этих ЦК возрастало не более чем в 3 раза по сравнению с контролем (рис. 5). В листьях наблюдалась обратная зависимость: экспозиция проростков при действии 50 мМ NaCl приводила к снижению концентрации зеатиновых ЦК, при 100 мМ — к ее резкому повышению в десятки раз (см. рис. 5). Наблюдаемые изменения содержания изопентениладенозина (иПА) в листьях и корнях были подобны таковым для ЦК зеатинового ряда, уровень же изопентениладенина (иП) изменялся незначительно.

Ранее при изучении динамики содержания фитогормонов в ответ на засоление получены несколько разнородные результаты. Так, под дей-

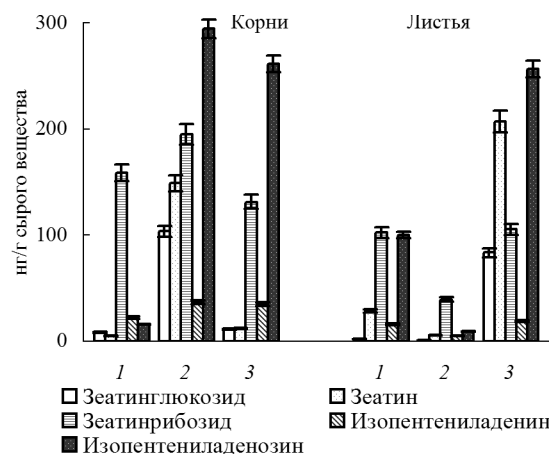


Рис. 5. Содержание цитокининов в листьях и корнях проростков фасоли при засолении

ствием NaCl содержание ИУК резко уменьшалось в растениях томата [8], ириса [29] и повышалось в листьях пшеницы [1], корнях кукурузы [3]. Очевидно, при интерпретации полученных данных необходимо учитывать как концентрацию соли, так и тип растительной ткани, а также продолжительность стресса [1]. Немногочисленные сведения о динамике ЦК при засолении указывали на снижение общего количества этих гормонов в ответ на солевой стресс [19]. Однако

уровень различных форм ЦК изменялся в различной степени. Так, в корнях кукурузы при действии NaCl содержание ЗР значительно повышалось, а З — снижалось [3], в листьях томата на фоне суммарного снижения концентрации ЦК наиболее существенно снижался уровень ЗР [8], у гороха возрастало содержание изопентенильных форм [10]. В целом можно сказать, что под влиянием засоления изменялся фитогормональный баланс, что приводило к снижению ростовых показателей у различных растений.

Таким образом, при исследовании влияния засоления на изменения гомеостаза ПА и гормонального статуса растений фасоли — представителя гликофитов — выявлена мультифункциональная взаимосвязь между ПА и стресс-гормоном АБК. Для ростстимулирующих ФГ (ИУК, ЦК) четких зависимостей не обнаружено. Можно предположить, что взаимодействие ПА и ФГ в процессе адаптации растений фасоли к засолению происходит на уровне определенных форм гормонов и ПА, для их выявления необходимы дальнейшие углубленные исследования с использованием стрессустойчивых растений, в том числе с применением экзогенных обработок ПА и ФГ.

1. Ахиярова Г.Р., Сабиржанова И.Б., Веселов Д.С., Фрике В. Участие гормонов в возобновлении роста побегов пшеницы при кратковременном засолении NaCl // Физиология растений. — 2005. — 52, № 6. — С. 891—896.
2. Веденичева Н.П. Роль цитокінінів у регуляції ростових процесів різних органів рослин // Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку. — К.: Логос, 2009. — Т. 1. — С. 612—624.
3. Калинина Н.А., Драгозов И.В., Яворская В.К. Фитогормональный баланс корней кукурузы на фоне действия хлоридного засоления и 6-БАП // Уч. зап. Таврич. ун-та им. В.И. Вернадского. — 2001. — Ч. 1, № 14 (53). — С. 84—87.
4. Кузнецов Вл.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И. Полиамины при стрессе: биологическая роль, метаболизм и регуляция // Физиология растений. — 2006. — 53, № 5. — С. 658—683.
5. Кузнецов Вл.В., Ракитин В.Ю., Садонов Н.Г. и др. Участвуют ли полиамины в дистанционной передаче стрессорного сигнала у растений? // Там же. — 2002. — 49, № 1. — С. 136—147.
6. Мусатенко Л.И., Веденичева Н.П., Васюк В.А. и др. Комплекс фитогормонов в проростках различных по устойчивости к повышенным температурам гибридов кукурузы // Там же. — 2003. — 50, № 4. — С. 499—504.
7. Ракова Н.Ю., Романов Г.А. Полиамины препятствуют проявлению первичных эффектов цитокининов // Там же. — 2005. — 52, № 1. — С. 59—67.
8. Albacete A., Ghanem M.E., Martinez-Andujar C. et al. Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants // J. Exp. Bot. — 2008. — 59, N 15. — P. 4119—4131.
9. Altman A. Polyamines and plant hormones // The Physiology of Polyamines, V. II. — Boca Raton: CRC Press, 1989. — P. 122—145.
10. Atanasova L., Pissurska M., Stoyanov I. Cytokinins and growth responses of maize and pea plants to salt stress // Bulg. J. Plant Physiol. — 1996. — 22, N 1—2. — P. 22—31.
11. Carimi F., Zottini M., Formentin E. et al. Cytokinins: New apoptotic inducers in plants // Planta. — 2003. — 216, N 2. — P. 413—421.
12. Carrizo C., Pitta-Alvarez S., Kogan M. et al. Occurrence of cadaverine in hairy roots of *Brugmansia candida* // Phytochemistry. — 2001. — 57, N 5. — P. 759—763.
13. Espartero J., Pintor-Toro J.A., Pardo J.N. Different accumulation of S-adenosylmethionine synthase transcripts in response to salt stress // Plant Mol. Biol. — 1994. — 25. — P. 217—227.
14. Flores H.E., Galston A.W. Analysis of polyamines in higher plants by performance liquid chromatography // Plant Physiol. — 1982. — 69. — P. 701—708.
15. Galston A.W., Kaur-Sawhney R. Polyamines in plant physiology // Ibid. — 1990. — 94. — P. 406—410.
16. Gamarnik A., Frydman R.B. Effect of cadaverine on root elongation and secondary root formation in soybean (*Glycine max*) seedlings // Int. Symp. on Polyamines and Molecular and Medical Biology. — Kyoto, 1990. — P. 28.
17. Gomez-Cadenas A., Tadeo F.R., Primo-Millo E., Talon M. Involvement of abscisic acid and ethylen in the responses of citrus seedlings to salt shock // Physiol. Plant. — 1998. — 103, N 2. — P. 475—484.

18. Hanzawa Y., Takahashi T., Mitchael A.J. et al. *ACAULISS*, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase // EMBO. J. — 2000. — **19**. — P. 4248–4256.
19. Hussein M.M., Nadia H., El-Geready M., El-Desuki M. Role of putrescine in resistance to salinity of pea plants (*Pisum sativum* L.) // J. Appl. Sci. Res. — 2006. — **2(9)**. — P. 598–604.
20. Jeks V.A., Hasegawa P.M. Plant abiotic stress. — Springer: Blackwell Publ., 2005. — 350 p.
21. Jia W., Wang Y., Zhang S., Zhang J. Salt-stress-induced ABA accumulated is more sensitively triggered in roots than in shoots // J. Exp. Bot. — 2003. — **52**. — P. 2201–2206.
22. Kaur-Sawhney R., Tiburcio A., Altabella T., Galston A.W. Polyamines in plants: An overview // J. Cell Mol. Biol. — 2003. — **2**. — P. 1–12.
23. Kuznetsov V.I., Shevyakova N.I. Polyamines and stress tolerance of plants // Plant Stress. Global Sci. Books. — 2007. — **1**, N 1. — P. 50–71.
24. Langebartels C., Kerner K., Leonardi S. et al. Biochemical plant responses to ozone. I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco // Plant Physiol. — 1991. — **95**. — P. 882–887.
25. Nag S., Saha K., Choudhuri M.A. Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to change in compounds involved in rooting // J. Plant Growth Regul. — 2001. — **20**, N 2. — P. 182–194.
26. Paschalidis K.A., Roubelakis-Angelakis K.A. Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs (Tissues of tobacco plants. Correlations with age, cell division, expansion and differentiation) // Plant Physiol. — 2005. — **138**. — P. 142–152.
27. Sairam R.K., Aruna T. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants // Curr. Sci. — 2004. — **86**, N 3. — P. 407–421.
28. Urano K., Yoshida Y.M., Nanjo T. et al. Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages // Plant Cell Environ. — 2003. — **26**. — P. 1917–1926.
29. Yongyin W., Mopper S., Hasenstein K.H. Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA and SA in *Iris hexagona* // J. Chem. Ecol. — 2001. — **27**, N 2. — P. 327–342.
30. Zhao Z., Chen G., Zhang C. Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings // Aust. J. Plant Physiol. — 2001. — **28**. — P. 1055–1061.

Получено 08.08.2010

ВПЛИВ ЗАСОЛЕННЯ НА РОСТОВІ ПОКАЗНИКИ РОСЛИН
PHASEOLUS VULGARIS L., ВМІСТ ФІТОГОРМОНІВ ТА ПОЛІАМІНІВ

Н.І. Шевякова,¹ Л.І. Мусатенко,² Л.О. Стеценко,¹ В.Ю. Ракітін,¹ Н.П. Веденічева,²
Л.В. Войтенко,² Вол.В. Кузнецов,¹ К.М. Ситник²

¹Інститут фізіології рослин ім. К.А. Тимірязєва Російської академії наук, Москва

²Інститут ботаніки ім. Н.Г. Холодного Національної академії наук України, Київ

Досліджено вплив засолення поживного середовища на ростові показники, вміст вільних і зв'язаних поліамінів та фітогормонів: абсцизової, індолілоцтової кислот, різних форм цитокінінів у проростках квасолі, вирощених у водній культурі. Встановлено позитивну кореляцію між накопиченням абсцизової кислоти і кадаверину. Не виявлено кореляції між змінами вмісту індолілоцтової кислоти, різних форм цитокінінів і поліамінів.

SALINITY EFFECT ON GROWTH PARAMETERS, POLYAMINES AND
PHYTOHORMONES CONTENT IN *PHASEOLUS VULGARIS* L. PLANTS

N.I. Shevyakova,¹ L.I. Musatenko,² L.A. Stetsenko,¹ V.Yu. Rakitin,¹ N.P. Vedenicheva,²
L.V. Vojtenko,² V.I. Kuznetsov,¹ K.M. Sytnik²

¹K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences

35 Botanicheskaya St., Moscow, 127276, Russia

²M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine

2 Tereshchenkivska St., Kyiv, 01601, Ukraine

Effects of nutritive medium salinity (50, 100, 150, 200 mM NaCl, 4 d) on growth parameters, endogenous free and conjugated polyamines and phytohormones (ABA, IAA, cytokinins) content in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings grown in water culture were studied. Positive correlation between ABA and cadaverine accumulation was shown. Correlative relations between changes in IAA, cytokinins and polyamines content were not established.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., salinity, polyamines, phytohormones.