

УДК 575:633.854.54

## ИНДУКОВАННИЙ ХІМІЧНИМ МУТАГЕНОМ СПЕКТР СПАДКОВИХ ЗМІН У ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО СОРТУ СОНЯЧНИЙ

Лях В.О., д.б.н., проф., Перетятко А. О. магістрант

*Запорізький національний університет, 69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

[lyakh@iname.com](mailto:lyakh@iname.com)

[peretyatko-lina@mail.ru](mailto:peretyatko-lina@mail.ru)

Метою роботи було встановити спектр селекційно цінних мутацій, отриманих при дії етилметансульфонату на насіння сорту олійного зі специфічним жирнокислотним складом олії та виділити зразки з різним співвідношенням жирних кислот. Об'єктом дослідження був сорт Сонячний зі зменшенням до 10 % вмістом ліноленової кислоти. Для індукування генетичної мінливості був використаний хімічний мутаген етилметансульфонат у концентрації 0,05%, експозиція складала 16 год. У другому та третьому мутантному поколінні виділяли передбачувані мутанти за морфологічними ознаками. Після підтвердження у наступному поколінні прояву ознаки, за якою була виділена рослина, її вважали мутантною. Вміст жирних кислот в олії визначали методом газорідної хроматографії. Виявлено біля 60 мутантів зі зміненими морфологічними ознаками. Серед мутантів крім вихідного блакитного відмічені такі нові кольори пелюсток віночка як світло-блакитний, синій, фіолетовий і білий. Мутанти з квіткою білого забарвлення мали як білі, так і світло-рожеві бутони. Серед забарвлень насіння вирізняли такі як світло-коричневе, темно-коричневе, гірчичне і п'ятнисте на відміну від вихідного сорту з жовтим кольором насіння. В окремих випадках змінювався не тільки колір квітки, а і її форма. 10 зразків суттєво відрізнялись за висотою від вихідного сорту Сонячний у бік зменшення рівня даної ознаки. Виділені за морфологічними ознаками мутанти були оцінені за співвідношенням насичених і ненасичених жирних кислот. Значної різниці у вмісті насичених жирних кислот, таких як пальмітинова і стеаринова, між мутантами і вихідним сортом не було. Серед мутантів сорту Сонячний зі зміненими морфологічними ознаками виявлено достатньо велику кількість зразків з модифікованим вмістом ненасичених жирних кислот у різному їх співвідношенні. Насамперед це стосується лінолевої та ліноленової кислот.

*Ключові слова: льон олійний, етилметансульфонат, спектр мутацій, забарвлення квіток і насіння, висота рослини, жирно-кислотний склад олії.*

## ИНДУЦИРОВАННЫЙ ХИМИЧЕСКИМ МУТАГЕНОМ СПЕКТР НАСЛЕДСТВЕННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ У ЛЬНА МАСЛИЧНОГО СОРТА СОЛНЕЧНЫЙ

Лях В.А., Перетятко А.А.

*Запорожский национальный университет, 69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

Целью работы было установить спектр селекционно ценных мутаций, полученных при действии этилметансульфоната на семена сорта масличного льна со специфическим жирнокислотным составом масла и выделить образцы с различным соотношением жирных кислот. Объектом исследования был сорт Солнечный с уменьшенным до 10% содержанием линоленовой кислоты. Для индукции генетической изменчивости был использован химический мутаген этилметансульфонат в концентрации 0,05% и экспозиции 16 ч. Во втором и третьем мутантном поколении выделяли предполагаемые мутанты по морфологическим признакам. После подтверждения в следующем поколении проявления признака, по которому было выделено растение, его считали мутантным. Содержание жирных кислот в масле определяли методом газожидкостной хроматографии. Выведено около 60 мутантов с измененными морфологическими признаками. Среди мутантов кроме исходной голубой отмечены такие новые окраски лепестков венчика как светло-голубая, синяя, фиолетовая и белая. Мутанты с цветком белой окраски имели как белые, так и светло-розовые бутоны. Среди окрасок семян отличали такие как светло-коричневую, темно-коричневую, горчичную и пятнистую в отличие от исходного сорта с желтым цветом семян. В отдельных случаях изменялась не только окраска цветка, но и его форма. 10 образцов существенно отличались по высоте от исходного сорта Солнечный в сторону уменьшения уровня данного признака. Выделенные по морфологическим признакам мутанты были оценены по соотношению насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Значительной разницы в содержании насыщенных жирных кислот, таких как пальмитиновая и стеариновая, между мутантами и исходным сортом не было. Среди мутантов сорта Солнечный с измененными морфологическими признаками выявлено достаточно большое количество образцов с модифицированным содержанием ненасыщенных жирных кислот в различном их соотношении. Прежде всего это касается линолевой и линоленовой кислот.

*Ключевые слова: лен масличный, этилметансульфонат, спектр мутаций, окраска цветков и семян, высота растения, жирно-кислотный состав масла.*

## INDUCED WITH CHAMICAL MUTAGEN THE SPECTRUM OF HEREDITARY CHANGES IN LINSEED OF SOLNECHNY VARIETY

Lyakh V. O., Peretyatko A. O.

Zaporizhzhya National University, 69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky str. 66

Mutagenesis is a leader among the techniques that can be successfully used for creation of new varieties. Use of chemical and physical mutagenesis allows in a short time to create a new source material on a variety of physiological and morphological characteristics, biochemical parameters, increase the frequency and expand the range of the original mutations. The aim was to establish the spectrum of mutations obtained by the action of ethyl methane sulphonate on the seeds of variety with a specific fatty acid composition of oil and to identify the samples with different ratios of fatty acids. The object of the study was Solnechny variety of Belarusian breeding. It has a specific fatty acid composition with a reduced content of linolenic acid. To induce the genetic variability about 500 pieces of seeds were treated with ethyl methane sulphonate at a concentration of 0.05% and 16-hour exposition. In the second and third mutant generation, which consisted of more than 300 families, the predicted mutants by morphological traits were isolated. After confirmation of the mutant trait in M3 or M4 it was considered a mutant. The content of fatty acids in the oil was measured in two replications in M4 by gas-liquid chromatography. As a result, after mutagen treatment of the seeds of Solnechny variety about 60 mutants with altered morphological characters was found. The plants of the initial variety had blue flower with a purple tint. Among the mutants new colors like light blue, dark blue, purple and white are marked. Mutants with white flower had as white and light pink buds. Among the seeds such colors as light brown, dark brown, mustard and spotty unlike the initial variety with yellow seeds were distinguished. In some cases, changing not only the color of the flower but its shape was found. According to the data, 10 samples were significantly different in height from the initial variety. Moreover, changes took place only towards the reduction of this trait. The analysis noted that significant differences in the content of saturated fatty acids, such as palmitic and stearic between mutants and the initial variety, and each other, were absent. The biggest difference is noted in the ratio of unsaturated fatty acids, especially such as linoleic and linolenic. Thus, among the variety of mutants with altered morphological traits a large number of samples with modified content of unsaturated fatty acids in their different relationship was found.

*Key words: linseed, ethyl methane sulphonate, spectrum of mutations, color of flowers and seeds, plant height, fatty acid composition of the oil.*

### ВСТУП

Мутагенез займає провідне місце серед тих прийомів, які можна з успіхом використовувати для отримання нових сортів. Використання методів хімічного та фізичного мутагенезу дозволяє за короткий термін створити новий вихідний матеріал з різноманітними морфологічними і фізіологічними ознаками, біохімічними показниками, збільшити частоту і розширити спектр оригінальних мутацій [1].

У багатьох працях з експериментального мутагенезу рослин показано, що мутації, індуковані фізичними і хімічними мутагенами, якісно рівноцінні мутаціям, які виникають природно. Це означає, що якщо корисна мутація виявлена в природі, то вона може бути отримана за допомогою мутагенних факторів [2].

За допомогою мутагенів можна розірвати зчеплено успадковані ознаки, подолати несхрещуваність між віддаленими формами і стерильність власного пилку, вирішити завдання, що не піддаються вирішенню при використанні інших методів селекції. У ряді випадків виникають зовсім нові форми і ознаки, що не зустрічаються в природі, що дозволяє розширити природну різноманітність форм культурних рослин [3, 4].

Відомо, що виведення і впровадження у виробництво нових високопродуктивних сортів є найбільш економічно вигідним способом підвищення врожайності будь-якої культури, в тому числі і льону. З існуючих сортів льону більша частина була отримана методом індивідуального або масового відбору з використанням гібридизації. Використання

експериментального мутагенезу дозволило значно розширити спадкову мінливість у льону олійного [5, 6].

Льон – факультативний самозапильовач, тому збільшення генотипової різноманітності і збагачення генофонду є важливим завданням при роботі з даною культурою. Застосування мутагенів на льоні дозволяє отримати новий вихідний матеріал для селекції і покращувати існуючі сорти за стійкістю до хвороб, стійкістю до вилягання та іншим ознакам [7].

Створені шляхом мутагенезу мутантні форми льону олійного володіли комплексом господарсько-цінних ознак і стали цінним вихідним матеріалом для селекції. Отриманий матеріал був включений в селекційні програми лабораторії селекції та генетики льону ІМК УААН і пройшов оцінку в різних селекційних розсадниках. Такий шлях створення сортів (шлях прямого відбору мутацій) багато хто вважає найбільш ефективним [8].

До недавнього часу різниця між сортами льону олійного за апробаційними ознаками була незначною. Тепер, завдяки спрямованій селекційній роботі і активному залученню мутантних форм, створені нові сорти, що відрізняються морфологічними (маркерними) ознаками, такими як забарвлення віночка і пиляків, форма і розмір квітки, колір насіння, хлорофільна недостатність рослин [9].

**Метою** роботи було встановити спектр селекційно цінних мутацій, отриманих при дії етилметансульфонату на насіння сорту олійного зі специфічним жирнокислотним складом олії та виділити зразки з різним співвідношенням жирних кислот.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження був сорт Сонячний – білоруської селекції, створений в Інституті льону (Білорусь). Квітки блакитного кольору з фіолетовим відтінком. Насіння жовтого кольору. Маса 1000 насінин – від 5,2 до 5,5 г. Відзначається специфічним жирно кислотним складом зі зменшенням до 10 % вмістом ліноленової кислоти [10].

Для індукування генетичної мінливості був використаний хімічний мутаген етилметансульфонат (ЕМС). Повітряно-сухе насіння льону олійного сорту Сонячний у кількості 500 шт. в марлевій вільно зав'язаній торбинці замочували у водному розчині етилметансульфонату у концентрації 0,05%. Експозиція складала 16 год. Після промивки в проточній воді насіння одразу висівали в ґрунт. У другому та третьому мутантному поколінні, яке складалося з більш ніж 300 сімей, виділяли передбачувані мутанти за морфологічними ознаками. Після підтвердження у наступному поколінні (М3 або М4) прояву ознаки, за якою була виділена рослина у М2 або М3, її вважали мутантною. Висоту рослин аналізували у трьох повтореннях по 10 рослин у кожному. Вміст жирних кислот в олії визначали у двох повтореннях в М4 методом газорідинної хроматографії на приладі «Селміхром-1».

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті обробки насіння льону олійного сорту Сонячний хімічним мутагеном етилметансульфонат було виявлено біля 60 мутантів зі зміненими морфологічними ознаками. Перелік мутантів зі зміненим забарвленням квітки, бутону і насіння наведено в таблиці 1.

Рослини вихідного сорту Сонячний мають квітки блакитного кольору з фіолетовим відтінком. Серед мутантів відмічені такі нові кольори пелюсток віночка як світло-блакитний, синій, фіолетовий і білий. Синій колір відмічений у трьох мутантів. Мутанти з квіткою білого забарвлення мали як білі, так і світло-рожеві бутони. Найменшу частину від усіх мутантних ліній становили зразки з світло-блакитним та фіолетовим кольором квітки.

Серед забарвлень насіння вирізняли такі як світло-коричневе, темно-коричневе, гірчичне і п'ятнисте на відміну від вихідного сорту з жовтим кольором насіння.

Характерно, що у більшості коричневонасінневих зразків не змінювалося вихідне забарвлення пелюсток віночка, тобто квітки мали блакитний колір. В той же час, у мутантів з синьою або білою квіткою насіння мало жовтий колір, або інколи було п'ятнистим.

Таблиця 1 – Характеристика мутантів сорту Сонячний за кольором насіння, квітки та бутону

Генотип	Забарвлення насіння	Колір квітки та бутону
Сонячний	жовте	блакитна квітка з фіолетовим відтінком
1	жовте	синя квітка
2	коричневе	світло-блакитна квітка
9	жовте	синя квітка
11	коричневе	блакитна квітка
13	коричневе	блакитна квітка
17	коричневе	блакитна квітка
20	коричневе	блакитна квітка
21	гірчичне	фіолетова квітка
27	коричневе	блакитна квітка
28	коричневе	блакитна квітка
30	п'ятнисте	біла квітка, білий бутон
34	жовте	синя квітка*
35	жовте	блакитна квітка*
38	гірчичне	біла квітка, рожевий бутон
40	жовте	біла квітка, рожевий бутон
42	жовте	біла квітка, білий бутон
44	коричневе	блакитна квітка
47	коричневе	блакитна квітка
52	жовте	біла квітка, білий бутон
56	коричневе	блакитна квітка

Прим. \* – змінена форма квітки з відкритої на напівзгорнутий віночок.



В окремих випадках змінювався не тільки колір квітки, а і її форма. Зокрема у двох зразків як з блакитним, так і з синім забарвленням квітки, віночок з типової для льону відкритої форми змінився на напівзгорнутий (рис. 1).

Як свідчать дані таблиці 2, 10 зразків суттєво відрізнялись за висотою від вихідного сорту Сонячний. Причому зміни відбувались лише у бік зменшення рівня даної ознаки.



Рис. 1. Мутант з напівзгорнутим віночком (праворуч) у порівнянні з вихідним сортом Сонячний (ліворуч)

Таблиця 2 – Характеристика мутантів сорту Сонячний за висотою рослин, см

Генотип	Рік	
	2014	2015
Сонячний	54,8	52,3
33	46,0	45,8
34	36,1	35,5
35	47,2	46,7
36	38,5	43,3
38	39,4	43,3
42	38,3	42,3
44	48,1	44
55	35,8	37,7
НІР <sub>05</sub>	5,2	4,81

Виділені за морфологічними ознаками мутанти були оцінені за співвідношенням насичених і ненасичених жирних кислот. За результатами аналізу відмічено, що значної різниці у вмісті насичених жирних кислот, таких як пальмітинова і стеаринова, між мутантами і вихідним сортом, а також між собою, немає. Найбільша різниця відмічена у співвідношенні ненасичених жирних кислот, особливо таких як лінолева і ліноленова (табл. 3).

Таблиця 3 – Відмінність мутантних зразків за ненасиченими жирними кислотами від вихідного сорту Сонячний

Генотип	Ненасичені жирні кислоти		
	олеїнова	лінолева	ліноленова
Сорт Сонячний	17,7 ± 1,25	68,0 ± 0,95	4,9 ± 0,74
2	17,0 ± 0,88	43,3 ± 1,12	30,6 ± 0,95
28	17,5 ± 0,94	28,0 ± 1,15	45,6 ± 1,12
17	18,7 ± 1,15	11,2 ± 0,98	61,2 ± 1,22
10	18,2 ± 0,93	32,1 ± 1,14	40,6 ± 1,08
1	20,7 ± 1,44	32,6 ± 1,18	37,8 ± 0,74
13	15,7 ± 1,52	21,6 ± 1,43	54,2 ± 1,41
47	19,1 ± 1,09	44,2 ± 1,35	27,3 ± 0,94
27	17,8 ± 0,85	23,5 ± 0,94	48,4 ± 0,71
8	18,3 ± 0,48	17,3 ± 0,54	55,1 ± 1,25
9	20,4 ± 1,07	21,6 ± 0,63	48,7 ± 1,12
11	19,8 ± 0,75	24,1 ± 0,73	45,2 ± 0,95
5	16,7 ± 0,62	47,6 ± 0,83	26,7 ± 0,48
20	18,3 ± 0,83	26,4 ± 1,09	44,8 ± 1,15
<b>НІР 0,5</b>	1,95	5,50	4,90

За вмістом олеїнової кислоти діапазон мінливості був невеликим і варіював у межах 15,7% - 20,7%. У порівнянні з вихідним сортом лише мутанти 1, 9, 11 та 13 достовірно відрізняються від нього.

Діапазон мінливості за вмістом лінолевої кислоти становив 11,2% - 72,4 %. Найвищий вміст лінолевої кислоти встановлений у мутантів 12 і 19, а її найнижчий вміст – у зразків 8, 9, 13 і 17.

За вмістом ліноленової кислоти діапазон мінливості складав 3,1% - 61,2 %. Найбільший вміст цієї кислоти відмічений у мутантів 8 та 17, а найнижчий – у генотипів 12 і 19. Слід

зазначити, що серед зразків зустрічались як генотипи з рівнем ліноленової кислоти 20% - 30%, так і 30% - 40% і 40% - 50%/

За даними ФАОstat, лляну олію за вмістом ліноленової кислоти розділяють на 4 категорії:

1. Вміст ліноленової кислоти більше 50 % – високий, олія придатна переважно для використання на технічні цілі. Серед мутантів з таким вмістом ліноленової кислоти виділені такі: 17 – 61,2%, 8 – 55,1%, 13 – 54,2%.
2. Вміст ліноленової кислоти 36-49% – середній, масло придатне на технічні цілі, в медицині, парфумерії. Серед мутантів з таким вмістом ліноленової кислоти виділені такі зразки: 9 – 48,7%, 27 – 48,4%, 11 – 45,2%, 20 – 44,8%, 10 – 40,6%, 1 – 37,8%.
3. Вміст ліноленової кислоти 10-35% – низький, олія придатна в основному на харчові цілі. Серед мутантів з таким вмістом ліноленової кислоти виділені такі: 2 – 30,6%, 47 – 27,3%, 5 – 26,7%.
4. Вміст ліноленової кислоти менше 10% – дуже низький, олія придатна тільки на харчові цілі. Такий рівень ліноленової кислоти був характерним для інших морфологічних мутантів та для вихідного сорту Сонячний.

Отже, серед мутантів сорту Сонячний зі зміненими морфологічними ознаками виявлено достатньо велику кількість зразків з модифікованим вмістом ненасичених жирних кислот у різному їх співвідношенні. Насамперед це стосується лінолевої та ліноленової кислот.

## ВИСНОВКИ

1. У результаті обробки насіння сорту Сонячний хімічним мутагеном етилметансульфонат у концентрації 0,05% та експозиції 16 год у другому та третьому мутантному поколіннях з 300 оцінених сімей виділено біля 60 мутантів зі зміненими морфологічними ознаками.
2. Серед мутантів крім вихідного блакитного відмічені такі нові кольори пелюсток віночка як світло-блакитний, синій, фіолетовий і білий. Серед забарвлень насіння вирізняли такі як світло-коричневе, темно-коричневе, гірчичне і п'ятнисте на відміну від вихідного сорту з жовтим кольором насіння. В окремих випадках змінювався не тільки колір квітки, а і її форма. 10 зразків суттєво відрізнялись за висотою від вихідного сорту у бік зменшення рівня даної ознаки.
3. Виділені за морфологічними ознаками мутанти були оцінені за співвідношенням насичених і ненасичених жирних кислот. Значної різниці у вмісті насичених жирних кислот, таких як пальмітинова і стеаринова, між мутантами і вихідним сортом не було. Натомість, виявлено достатньо велику кількість зразків з модифікованим вмістом ненасичених жирних кислот, насамперед лінолевої та ліноленової, у різному їх співвідношенні.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Алексеева Е.С. Экспериментальный мутагенез как метод селекции / Алексеева Е.С. Радиационный мутагенез растений – М., 1985. – С. 49- 54.
2. Купянская Н.А. Действие химических мутагенов на лен-долгунец / Купянская Н.А. – Труды ВНИИЛ. – Торжок, 1978. – Вып.15 – С. 3-5.
3. Рапопорт И.А. Химический мутагенез и задачи сельскохозяйственного производства / Рапопорт И.А. – М.: Российская академия наук, 1993. – 241 с.

4. Новикова А.Ф. Использование химических мутагенов в селекции льна-долгунца / Новикова А.Ф. Химический мутагенез в создании сортов с новыми свойствами. – 1986. – С. 162-164.
5. Галкин Ф.М. Использование химических мутагенов в селекции льна масличного / Галкин Ф.М. Селекция и семеноводство масличных культур. – Краснодар, 1980. – С. 144-148.
6. Лагрон В.А. Спектр мутаций, индуцированных этилметансульфонатом у льна масличного / Лагрон В.А. Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур УААН. – 2004. – Вип. 9. – 278 с.
7. Лях В.А. Теоретические основы создания сортов льна масличного запорожской селекции / Лях В.А. Науково-технічний бюлетень Інституту олійних культур НААН Запоріжжя. – 2014. – Вип. 20. – С. 62-71.
8. Моргун В.В. Мутационная селекция пшеницы / В.В. Моргун, В.Ф. Логвиненко. – Киев: Наукова думка, 1995. – 652 с.
9. Лях В.О. Селекція льону олійного: методичні рекомендації / Лях В.О., І.О. Полякова. – Запоріжжя: ЗНУ 2008. – 38 с.
10. Феськова Е.В. Семена льна масличного сорта Солнечный – источник биологически активных веществ / Феськова Е.В., Леонтьев В.Н., Титок В.В. Труды БГТУ. Серия 4: Химия и технология органических веществ. – 2009. – Выпуск № 4. – Том 1. – С. 201-203.

#### REFERENCES

1. Alekseeva E.S. Eksperimentalniy mutahenez kak metod selektsyy / Alekseeva E.S. Radyatsyonniy mutahenez rastenyu – M., 1985. – S. 49-54.
2. Kupyanskaya N.A. Deystviye khymycheskykh mutahenov na len-dolhunets / Kupyanskaya N.A. – Trudy VNYYL. – Torzhok, 1978. – Vyp. 15 – S. 3-5.
3. Rapoport Y.A. Khymychesky mutahenez I zadachy selskokhozyaystvennogo proyzvodstva / Rapoport Y.A. – M.: Rosyyskaya akademyya nauk, 1993. – 241 s.
4. Novykova A.F. Ispolzovanye khymycheskykh mutahenov v selektsyy lna-dolhunetsa / Novykova A.F. Khymychesky mutahenez v sozdanyy sortov s novimy svoystvamy. – 1986. – S. 162-164.
5. Halkyn F.M. Ispolzovanye khymycheskykh mutahenov v selektsyy lna maslychnoho / Halkyn F.M. Seleksyya y semenovodstvo maslychnykh kultur. – Krasnodar, 1980. – S. 144-148.
6. Lahron V.A. Spektr mutatsyy, indutsyrovannikh etylmetansulfonatom u lna maslychnoho / Lahron V.A. Naukovo-tekhnichnyy byuleten Instytutu oliynykh kultur UAAN. – 2004. – Vyp. 9. – 278 s.
7. Lyakh V.A. Teoretycheskiye osnovi sozdaniya sortov lna maslychnoho zaporozhskoy selektsyy / Lyakh V.A. Naukovo-tekhnichnyy byuleten Instytutu oliynykh kultur NAAN Zaporizhzhya. – 2014. – Vyp. 20. – S. 62-71.
8. Morhun V.V. Mutatsyonnaya selektsyya pshenytsi / V.V. Morhun, V.F. Lohvynenko. – Kyev: Naukova dumka, 1995. – 652 s.
9. Lyakh V.O. Seleksiya lonu oliynoho: metodychni rekomendatsiyi / Lyakh V.O., I.O. Polyakova. – Zaporizhzhya: ZNU 2008. – 38 s.



10. Feskova E.V. Semena lna maslychnho sorta Solnechny – istochnyk byolohychesky aktyvnykh veshchestv / Feskova E.V., Leontev V.N., Tytok V.V. Trudi BHTU. Seryya 4: Khymyya y tekhnolohyya orhanycheskykh veshchestv. – 2009. – Vipusk № 4. – Tom 1. – S. 201- 203.

Рецензенти: Сорока А.І., д. с.-г. н., с.н.с., зав. відділом генетики та біотехнології Інституту олійних культур НААНУ;

Полякова І.О., к.б.н., доцент кафедри садово-паркового господарства та генетики ЗНУ.