



**EFEITO DE ANA E BAP NO ALONGAMENTO *IN VITRO* DE *Aechmea ramosa*
MARTIUS EX SCHULTES F. E *Billbergia euphemiae* E. MORREN
(BROMELIACEAE)**

Daniele Vidal Faria¹, Andreia Barcelos Passos Lima², Mariela Justiniano Simão³,
Elias Terra Werner⁴, Taís Cristina Bastos Soares⁵

- 1 e 3 Graduandas em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), 29500-000, Alegre-ES, Brasil
2. Professora do Departamento de Produção Vegetal do CCA-UFES, 29500-000, Alegre-ES, Brasil (albarcelos@hotmail.com)
4. Pós-graduando em Produção Vegetal do CCA-UFES, 29500-000, Alegre-ES, Brasil
5. Professora do Departamento de Zootecnia do CCA-UFES, 29500-000, Alegre-ES, Brasil

Recebido em: 04/05/2012 – Aprovado em: 15/06/2012 – Publicado em: 30/06/2012

RESUMO

A exploração para fins ornamentais e a fragmentação da Floresta Atlântica contribuem para que muitas espécies da família *Bromeliaceae* se tornem vulneráveis à extinção, levando à adoção de medidas que assegurem a conservação *ex situ* de germoplasma vegetal. O cultivo *in vitro* de bromélias permite o estabelecimento de sistemas de micropropagação que podem auxiliar de forma significativa, na preservação e propagação destas espécies. Meios de cultura suplementados com ANA e BAP têm sido associados com respostas morfogênicas na cultura *in vitro* de bromeliáceas. O objetivo deste trabalho foi testar o efeito de diferentes concentrações de ANA e BAP no desenvolvimento da parte aérea de *A. ramosa* e *B. euphemiae*. Plântulas pré-estabelecidas *in vitro* foram inoculadas em meio MS com 0, 1,5 e 4,5 μM de ANA, 0, 5 e 10 μM de BAP, 1,5 μM ANA e 10 μM BAP e 4,5 μM de ANA e 5 μM BAP. Foram avaliados o tamanho da parte aérea após 30 e 60 dias de cultivo e o ganho médio alcançado pelas plântulas para esta variável. Os meios suplementados com ANA e BAP ou BAP sozinho não mostraram diferenças significativas para o alongamento *in vitro* de ambas espécies. Para *A. ramosa* não houve diferenças estatísticas significativas aos 30 e 60 dias de cultivo, para o comprimento médio das plântulas nos diferentes tratamentos avaliados. Os melhores resultados para o incremento da parte aérea foram observados nos meios suplementados com 0; 1,5; e 4,5 μM ANA e 10 μM BAP. Para *B. euphemiae*, o comprimento médio das plântulas aos 60 dias de cultivo e ganho médio da parte aérea apresentaram valores estatisticamente significativos nos meios suplementados com 1,5 e 4,5 μM ANA. Assim, a suplementação do meio de cultura com ANA promoveu o alongamento *in vitro* de *A. ramosa* e *B. euphemiae*.

PALAVRAS-CHAVE: bromélias, conservação, propagação *in vitro*, reguladores de crescimento.

EFFECT OF NAA AND BAP ON *IN VITRO* ELONGATION OF *Aechmea ramosa* MARTIUS EX SCHULTES F. and *Billbergia euphemiae* E. MORREN (BROMELIACEAE)

The exploitation for ornamental purposes and fragmentation of the Atlantic Forest contributes to many species of Bromeliaceae become vulnerable to extinction, leading to the adoption of measures to ensure the *ex situ* conservation of plant germplasm. The *in vitro* cultivation of bromeliads allows the establishment of micropropagation systems that can help significantly in the preservation and propagation of these species. Culture medium supplemented with NAA and BAP have been associated with morphogenetic responses in vitro culture of bromeliads. The aim of this work was to evaluate the effect of different concentrations of NAA and BAP on shoot growth of *A. ramosa* and *B. euphemiae*. Pre-established *in vitro* seedlings were inoculated in MS medium with 0, 1.5 and 4.5 μM NAA; 0, 5 and 10 μM BAP; 1.5 μM NAA and 10 μM BAP; 4.5 μM NAA and 5 μM BAP. We evaluated the aerial part length after 30 and 60 days and the average gain of growth achieved by the seedlings for this variable. The medium supplemented with NAA and BAP or BAP alone showed no significant differences for *in vitro* elongation of both species. For *A. ramosa*, no statistical significant differences at 30 and 60 days of cultivation, for the average length of the seedlings in different treatments. The best results for the growth of shoots were observed in media supplemented with 0, 1.5, 4.5 mM and 10 mM NAA and BAP. For *B. euphemiae*, the average length of the seedlings at 60 days of cultivation and average gain of the aerial part showed statistically significant differences in media supplemented with 1.5 and 4.5 mM NAA. Thus, supplementation of NAA to the culture medium promoted *in vitro* elongation in the *A. ramosa* and *B. euphemiae*.

KEYWORDS: Bromeliads, Conservation, *in vitro* propagation, growth regulators.

INTRODUÇÃO

As bromélias são importantes componentes para a manutenção da biodiversidade do bioma Mata Atlântica, devido a suas características estruturais e funcionais peculiares (BENCKE & DROSTE 2008). Muitas espécies apresentam valor ornamental e comercial, o que as torna especialmente vulneráveis ao extrativismo.

No entanto, a acelerada destruição da Mata Atlântica é tida como a principal causa do desaparecimento de populações de bromélias (PÁDUA & PÁDUA, 2002). O extrativismo para fins comerciais tem se tornado uma das principais fontes de abastecimento do mercado e também é outro fator que ameaça muitas populações naturais (MENDES et al.; 2007).

O cultivo *in vitro* de bromeliáceas tem sido muito utilizado para fins comerciais e a possibilidade de obter plantas usando técnicas de cultura de tecidos levou ao estabelecimento de sistemas de micropropagação que vem auxiliando de forma significativa, a preservação e propagação de espécies raras ou ameaçadas de extinção (MOREIRA, 2008). Além disso, tem auxiliado também os programas de recuperação e manejo de comunidades degradadas, contribuindo indiretamente para a redução do extrativismo (ZORNIG, 1996).

Os sistemas de trabalho com micropropagação de bromélias incluem a obtenção de plantas *in vitro* a partir de sementes, ápices caulinares e segmentos

nodais, meristemas e folhas (PICKENS et al., 2003; MATHEWS; RAO, 1982; CARNEIRO et al., 1999, CARNEIRO & MANSUR, 2004).

Como as respostas morfo-genéticas *in vitro* são genótipo-específicas torna-se necessário a avaliação de fatores como tipo de explante, meio de cultura, tipo e concentração de reguladores de crescimento e condições de cultivo para que se possa obter um protocolo eficiente para estabelecimento e propagação *in vitro* de espécies de *Bromeliaceae*.

Assim, o objetivo deste trabalho foi testar o efeito de diferentes concentrações de ANA e BAP no desenvolvimento da parte aérea de *A. ramosa* e *B. euphemiae*.

METODOLOGIA

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias da UFES, em Alegre-ES.

Frutos de *A. ramosa* e *B. euphemiae* foram coletados de diferentes indivíduos nativos pertencentes à remanescentes florestais de Floresta Atlântica do Distrito de Burarama, município de Cachoeiro de Itapemirim ao sul do estado do Espírito Santo, nas coordenadas geográficas 20°41'S 41°21'W. Após a coleta, os frutos foram secos ao ar livre, em local sombreado, por sete dias, para completarem sua maturação e facilitar a extração das sementes. Posteriormente os frutos foram armazenados em embalagens de papel em geladeira até o uso.

Os vouchers do espécime-testemunho de *A. ramosa* e *B. euphemiae* foram depositados no herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, sob os números CESJ 55670 e CESJ 55660, respectivamente.

Para a montagem do experimento foi criado um *bulk* de sementes, em que um ou dois frutos de cada indivíduo tiveram suas sementes extraídas manualmente e misturadas às sementes dos demais indivíduos. Em função das sementes de *A. ramosa* possuírem intensa quantidade de mucilagem, foi necessário a lavagem em água destilada e posterior secagem em B.O.D. à 37° C por 24h. Após este procedimento foram armazenadas em embalagens de papel filtro em geladeira à 4° C até o uso.

Em condições assépticas em fluxo laminar, as sementes de *A. ramosa* e *B. euphemiae* foram desinfetadas por um minuto em álcool 70%, posteriormente em hipoclorito de sódio comercial por cinco minutos e enxaguadas em água destilada estéril por três vezes. Este processo foi repetido por duas vezes e então as sementes foram colocadas em papel filtro até o momento da inoculação.

As sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGUE & SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (30g.L⁻¹) e ágar (7 g.L⁻¹), tendo o pH ajustado a 5,8 e autoclavados por 20 minutos a 121° C. As condições de cultivo da sala de crescimento foram ajustadas para temperatura de 25 ± 2 ° C e fotoperíodo 16 horas de luz branca do tipo luz do dia (fluorescentes), com fluência de 1,6 W/m².

Após a germinação, plântulas com 42 dias foram transferidas para meio MS acrescido dos reguladores de crescimento ANA (0; 1,5 e 4,5 uM) e BAP (0; 5 e 10 uM) e das combinações 1,5µM ANA + 10 µM BAP e 4,5µM de ANA + 5µM BAP, suplementado com sacarose (30g.L⁻¹) e ágar (7g.L⁻¹) e mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições descritas acima. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x7 (duas espécies e 7 tratamentos), com 3 repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio com um explante. O crescimento da parte aérea foi avaliado aos 30 e 60 dias após a inoculação. Ao final deste período também foi determinado o ganho médio

para a variável tamanho da parte aérea, segundo a fórmula: $GM = CT_2 - CT_1$, onde GM = ganho médio; CT_2 = tamanho da parte aérea das plântulas após 60 dias de cultivo; CT_1 = tamanho da parte aérea das plântulas após 30 dias de cultivo.

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias obtidas comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa Assistat 7.6 beta (SILVA & AZEVEDO, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância mostrou a ocorrência de valores estatisticamente significativos para o comprimento da parte aérea das plântulas de *A. ramosa* e *B. euphemiae* aos 30 e 60 dias de cultivo (Tabela 1). Para a interação entre as duas espécies e a variável analisada, a significância foi apenas após 60 dias de cultivo.

TABELA 1. Análise de variância para o comprimento médio da parte aérea de plântulas de *A. ramosa* e *B. euphemiae* e a interação entre espécie e variável, após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS contendo ANA e BAP.

| Análise de variância para o comprimento médio das plântulas | | |
|--|-----------|------------|
| | 30 dias | 60 dias |
| Espécies <i>A. ramosa</i> e <i>B. euphemiae</i> (BRO) | 0.6854 ns | 2.1705 ns |
| Comprimento médio das plântulas (CP) | 0.1133 * | 18.8555 ** |
| Interação entre BRO e CP | 2.2797 ns | 5.4065 ** |

** Valor de F significativo ao nível de 1% de probabilidade; * Valor de F significativo ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

A suplementação do meio de cultura com ANA e BAP ou BAP sozinho não promoveu valores estatisticamente significativos para o alongamento *in vitro* de *A. ramosa* e *B. euphemiae* (Tabela 2; Figura 1. b e d).

Para *A. ramosa* não foi observada diferença estatística entre os tratamentos, para as plântulas cultivadas aos 30 e 60 dias (Tabela 2).

Para *B. euphemiae* foi observada diferença significativa somente aos 60 dias de cultivo (Tabela 2). Os maiores valores para o comprimento médio das plântulas foram observados nos meios contendo 1,5 μ M ANA (5.18 cm) e 4,5 μ M ANA (5.56 cm).

Os meios de cultura suplementados com 1,5 e 4,5 μ M ANA foram estatisticamente mais eficientes para *B. euphemiae* quando comparado com *A. ramosa*, promovendo maiores valores para o comprimento médio das plântulas após 60 dias de cultivo (Figura 1. a e c).

TABELA 2. Comprimento médio da parte aérea das plântulas de *A. ramosa* e *B. euphemiae* após 30 e 60 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.

| Comprimento médio da parte aérea das plântulas | | | | |
|--|------------------|---------------------|------------------|---------------------|
| | 30 dias | | 60 dias | |
| | <i>A. ramosa</i> | <i>B. euphemiae</i> | <i>A. ramosa</i> | <i>B. euphemiae</i> |
| MS 0 | 2.03 a | 1.76 a | 2.68 aA | 2.21 aB |
| 1,5 µM ANA | 1.69 a | 2.00 a | 3.55 bA | 5.18 aA |
| 4,5 µM ANA | 1.50 a | 1.99 a | 3.29 bA | 5.56 aA |
| 5 µM BAP | 1.96 a | 1.75 a | 2.35 aA | 1.79 aB |
| 10 µM BAP | 2.08 a | 1.62 a | 2.62 aA | 2.19 aB |
| 1,5 µM ANA + µM 10 BAP | 1.78 a | 1.95 a | 2.13 aA | 2.03 aB |
| 4,5 µM ANA + 5 µM BAP | 2.15 a | 1.51 a | 2.17 aA | 1.79 aB |

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Em trabalhos de cultivo *in vitro*, a altura da parte aérea se torna uma variável importante, pois está diretamente relacionada com o número de nós que serão recuperados em novas brotações (MOREIRA, et al., 2003), conseqüentemente permitindo maior multiplicação.

PAIVA et al. (2009) trabalhando com *Nidularium fulgens* (Bromeliaceae) observaram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho, onde o maior comprimento dos brotos regenerados foi alcançado no meio MS suplementado com 2,6 µM ANA (1,85 cm) na ausência de BAP, após 120 dias de cultivo. Para as bromeliáceas *Guzmania minor*, *G. lingulata* e *Vriesea splendens*, concentrações entre 2,6 e 4,2 µM de ANA também foram mais eficientes para promover o crescimento de brotos *in vitro* (PIERIK et al. 1984).

PASQUAL et al. (2008) mostraram que os melhores resultados para comprimento médio da parte aérea de *Ananas comosus* var. *erectifolius* foram obtidos com o emprego de 0,48 mg L⁻¹ de ANA, atingindo em média 9,11 cm.

Em *Guzmania* 'Hilda' os maiores valores para o tamanho da parte aérea das plântulas, 5.7 e 5.6 cm, também ocorreram em meio suplementado com ANA, nas concentrações de 2,69 e 5,37 µM de ANA, respectivamente (HUANG et al., 2011).

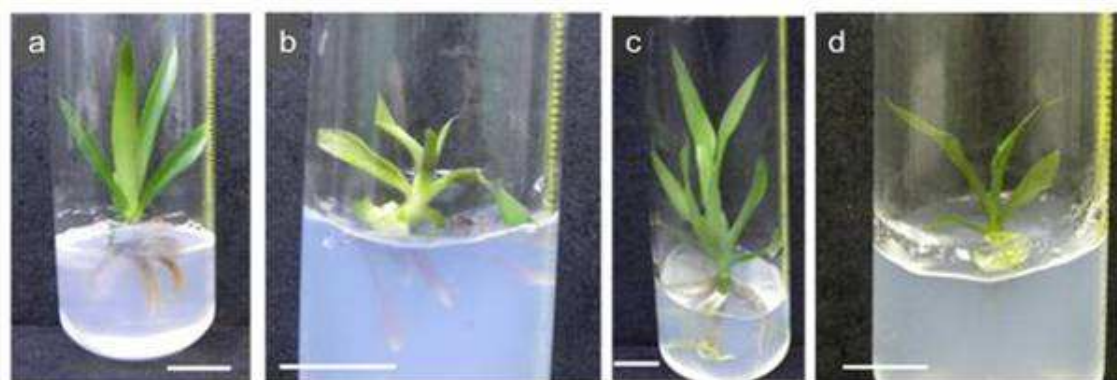


FIGURA 1. Desenvolvimento da parte aérea de plântulas de *A. ramosa* e *B. euphemiae* estabelecidas *in vitro* após 60 dias de cultivo. (a e b) *A. ramosa* em meio MS com 1,5 µM de ANA e 5 µM de BAP, respectivamente; (c e d) *B. euphemiae* em meio MS com 4,5 µM de ANA e 10 µM de BAP, respectivamente. Barra = 1cm.

Segundo GUERRA & VESCO (2010) o principal fator que influencia o sucesso da aclimatização de plantas oriundas de micropropagação é o tamanho das plântulas. Desse modo foi realizado também o cálculo para o ganho médio do comprimento da parte aérea das plântulas durante o cultivo (Figura 2).

Em *A. ramosa* os maiores valores para o ganho médio da variável tamanho da parte aérea foram observados no meio MS 1 (1,86 cm), mas sem diferenças estatísticas entre os meios MS 2 (1,79 cm), MS 0 (0,66 cm) e MS 4 (0,54 cm) (Figura 2). Os tratamentos contendo BAP não diferiram estatisticamente entre si.

Para *B. euphemiae* os meios MS 2 e MS 1 apresentaram valores significativamente maiores para o ganho médio da parte aérea das plântulas, 3,58 e 3,18 cm, respectivamente (Figura 2).

HUANG et al. (2011) mostraram que plântulas de *G. 'Hilda'* cultivadas em meio suplementado com 2,69 e 5,37 μM de ANA tiveram um incremento médio de parte aérea de 4,7 a 4,2 cm e 4,6 a 4,1 cm, respectivamente, a partir de um tamanho médio inicial de 1 a 1,5 cm.

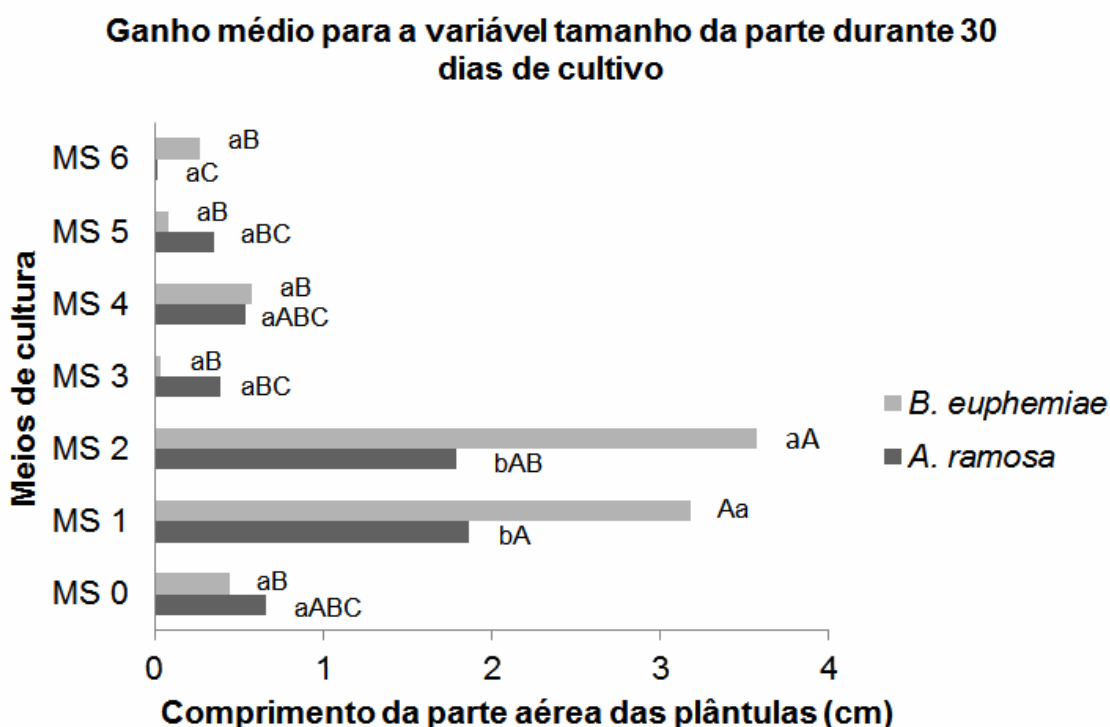


FIGURA 2. Ganho médio para o comprimento da parte aérea das plântulas de *A. ramosa* e *B. euphemiae* durante 30 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP. MS0 – sem regulado de crescimento; MS 1 - 1,5 μM ANA; MS 2 - 4,5 μM ANA; MS 3 - 5 μM BAP; MS 4 - 10 μM BAP; MS 5 - 1,5 μM ANA + 10 μM BAP; MS 6 - 4,5 μM ANA + 5 μM BAP.

* Barras seguidas pelas mesmas letras minúsculas entre as espécies (dentro de cada meio) e maiúsculas dentro de cada espécie (entre os meios) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Portanto, se comparadas as duas espécies, os meios de cultura MS 1 e MS 2, contendo apenas ANA, foram estatisticamente mais eficientes em *B. euphemiae*, promovendo um incremento mais significativo no comprimento da parte aérea das plântulas quando se compara com *A. ramosa* (Figura 2). Provavelmente isso está relacionado ao fato de que auxinas como o ANA são importantes para o crescimento e desenvolvimento vegetal (TORRES, 1999) e utilizadas para estimular o crescimento das partes aéreas, o enraizamento e a manutenção da dominância apical (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

CONCLUSÕES

A suplementação do meio de cultura com ANA e BAP ou BAP sozinho não promoveu diferenças estatísticas significativas para o alongamento *in vitro* *A. ramosa* e *B. euphemiae*;

Para *A. ramosa* não foram observadas diferenças estatísticas aos 30 e 60 dias de cultivo, para o comprimento médio das plântulas nos tratamentos avaliados. Os melhores resultados para o incremento da parte aérea foram observados nos meios suplementados com 0; 1,5; e 4,5 μM ANA e 10 μM BAP;

Para *B. euphemiae* as variáveis comprimento médio das plântulas aos 60 dias de cultivo e ganho médio da parte aérea apresentaram valores estatisticamente significativos nos meios suplementados com 1,5 e 4,5 μM ANA.

Desse modo a suplementação do meio de cultura com ANA promoveu o alongamento *in vitro* de *A. ramosa* e *B. euphemiae*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Federal do Espírito Santo pela concessão de bolsas de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

BENCKE, M.; DROSTE, A. Otimização da micropropagação de *Vriesea gigantea* Gaudich. (Bromeliaceae), uma espécie ameaçada de extinção, nativa do Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas, Botânica**, São Leopoldo, v. 59, p. 299-306, 2008.

CARNEIRO, L. A.; ARAÚJO, R. F. G; BRITO, C. J. M. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 55:79-83, 1999.

CARNEIRO, L. A.; MANSUR, E. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, Viçosa, v. 2, n. 1, p. 12-20, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, p. 99-169.1998.

GUERRA, M.P.; VESCO, L.L.D. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads In: JAIN, S. M.; OCHATT, S. J. (eds.). **Protocols for In Vitro Propagation of**

Ornamental Plants - Methods in Molecular Biology. Springer: Humana Press, p.47-66. 2010.

HUANG, P.-L.; LIU; Z.-H; CHANG, M.-L.; LIAO, L.-J. Micropropagation of the bromeliad *Guzmania* 'Hilda' via organogenesis and the effect of α -naphthaleneacetic acid on plantlet elongation. **Scientia Horticulturae**, v. 130, n. 4, p. 894–898, 2011.

MATHEWS, V. H.; RAO, P. S. *In vitro* plant regeneration in lateral bud explants of *Cryptanthus bromelioides* var. Tricolor M. B. Foster. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 1, n. 3, p. 108-110, 1982.

MENDES, G.C.; SOARES, C.Q.G.; BRAGA, V.F.; PINTO, L.C.; SANTANA, R.; VICCINI, L.F.; PEIXOTO, P.H.P. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociência**, Porta Alegre, v. 5, supl 2, p. 972-974, 2007.

MOREIRA, M. A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G.; FRÁGUAS, C. B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1002-1006, 2003.

MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2008. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

PÁDUA, S. M.; PÁDUA, C. V. Por que salvar a natureza? In: SCHAFFER, W. B.; PROCHNOW, M. **A Mata Atlântica e você: como preservar, recuperar e se beneficiar da mais ameaçada floresta brasileira**. Brasília: APREMAVI, 2002. p.139-143.

PAIVA, P.D.O.; NAVES, V.C.; DUTRA, L.F.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. *In Vitro* Propagation Of *Nidularium fulgens* Lem. **Interciencia**, v. 34, n. 8, p. 594-596, 2009.

PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. A.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C.; FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 26, n. 1, p. 045-049, 2008

PICKENS, K. A.; AFFOLTER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y.; WOLF, J. H. D. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 38, n. 1, p. 101-104, 2003.

PIERIK, R. L. M.; STEEGMANS, H. H. M.; HENDRIKS, J. The influence of naphthaleneacetic acid on the growth of *in vitro*-cultivated seedlings of Bromeliaceae. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 24, p. 193-199, 1984.

SILVA, F.A.S.E.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: **World Congress On Computers Inagriculture**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

TORRES, C.T.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI/Embrapa – CNPH, v. 1, 1999. 509p.

ZORNIG, R. K. Micropropagação de bromélias. **Bromélia**, v. 3, p. 3-8, 1996.