



GERMINAÇÃO *IN VITRO* E VIABILIDADE DO PÓLEN DE *Ceiba speciosa* A. St. Hil. (MALVACEAE)

Maicon Douglas Arenas-de-Souza¹, Daniel Gomes da Costa Macedo², Márcia de Souza Almeida da Silva¹, Isane Vera Karsburg³

1. Mestrandos do Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos da Universidade do Estado de Mato Grosso
(maicondouglas_biologia@hotmail.com)
2. Engenheiro Florestal pela Universidade do Estado de Mato Grosso
3. Doutora em Genética e Melhoramento Vegetal. Professora do Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade do Estado de Mato Grosso.
78.580-000. Alta Floresta, MT – Brasil.

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

RESUMO

Ceiba speciosa tem grande importância ecológica e econômica. Objetivou-se neste trabalho, avaliar a germinação *in vitro* dos polens de *C. speciosa* e a viabilidade polínica através de métodos histoquímicos. A germinabilidade foi avaliada baseando-se na conservação dos polens e utilizando meios de cultura contendo quatro concentrações de ácido bórico, sendo elas: 0 g L⁻¹, 0,1 g L⁻¹, 0,01 g L⁻¹ e 0,001 g L⁻¹, e a viabilidade, utilizando-se quatro soluções histoquímicas: Carmim Acético 2%, Lugol 1%, Solução de Alexander e Orceína Acética 2%. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados demonstraram que o meio mais viável foi o 4, com 0,001 g L⁻¹ de H₃BO₃ em conjunto com o ambiente Freezer. Neste tratamento observou-se o maior percentual de germinação do tubo polínico (63,11%). De maneira geral, o meio com 0,001 g L⁻¹ de H₃BO₃ conjuntamente com o Ambiente Externo, Freezer e Geladeira, evidenciou as melhores condições para a germinabilidade polínica desta espécie; exceto para o ambiente Câmara Fria, que mostrou-se satisfatório com a adição de 0,1 g L⁻¹ de H₃BO₃. Quanto às soluções histoquímicas, todas apresentaram valores superiores ou iguais a 90% de viabilidade. O armazenamento dos polens de *C. speciosa* no ambiente Freezer apresentou conservação mais satisfatória. A adição de 0,001 g L⁻¹ de H₃BO₃ em meio de cultura favoreceu a germinabilidade do tubo polínico. As soluções histoquímicas foram eficientes, sendo que a Solução de Alexander é a mais indicada por apresentar maior clareza na análise.

PALAVRAS-CHAVE: Grãos de Pólen, *germinabilidade in vitro*, paineira, Soluções Histoquímicas, Viabilidade Polínica.

GERMINATION *IN VITRO* AND POLLEN VIABILITY OF *Ceiba speciosa* A. St. Hil. (MALVACEAE)

ABSTRACT

Ceiba speciosa has great ecological and economic importance. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* germination of pollen of *C. speciosa* and pollen viability by histochemical methods. The germination was evaluated based on the conservation of pollen and using culture media containing four concentrations of boric acid, as follows: 0 g L⁻¹, 0,1 g L⁻¹, 0,01 g L⁻¹ and 0,001 g L⁻¹, and viability, using four histochemical solutions: Acetic Carmim 2%, Lugol 1%, Solution Alexander and Acetic Orcein 2%. Data were subjected to analysis of variance and Tukey test at 5% probability. The results showed that the most viable medium was 4, 0,001 g L⁻¹ H₃BO₃ in conjunction with the freezer environment. In this treatment we observed the highest percentage of pollen tube germination (63,11%). In general, the medium with 0,001 g L⁻¹ H₃BO₃ together with the External Environment, Freezer and Refrigerator, showed the best conditions for pollen germination of this species; except for the environment Cold Chamber, which was satisfactory with addition of 0,1 g L⁻¹ H₃BO₃. As for histochemical solutions, all showed greater than or equal to 90% viability values. The storage of pollen of *C. speciosa* in the freezer environment presented more satisfactory preservation. The addition of 0,001 g L⁻¹ H₃BO₃ in culture medium favored the germination of the pollen tube. Histochemical solutions were efficient, and the Alexander solution is the most suitable due to its greater clarity in the analysis.

KEYWORDS: Paineira, Pollen Grains, Histochemical Solutions, Pollen Viability, Germinability *in vitro*.

INTRODUÇÃO

Ceiba speciosa ocorre em uma ampla área, abrangendo principalmente as florestas mesófilas semidecíduas (LORENZI, 1992), conhecida vulgarmente como paineira. Segundo CARVALHO (2003), a espécie tem grande importância ecológica, sendo que atraem diversas espécies de aves; além de suas folhas fazerem parte da dieta do macaco bugio (*Aloatta fusca*). Tal espécie também é recomendada nos plantios para reconstituição florestal e recuperação de mata ciliar, em locais que não ocorre inundação. Além da importância ecológica e ornamental, a madeira proveniente da paineira, pode ser utilizada na construção de canoas, cochos, caixotaria, forros de móveis e no fabrico de pasta celulósica (LORENZI, 1992).

Segundo SOUSA et al. (2005), o material de suma importância utilizado nas hibridações é o pólen. O sucesso dos cruzamentos, com o intuito de aumentar a variabilidade genética, é obtido através do desenvolvimento satisfatório dos grãos de pólen, que podem ser utilizados tanto nos estudos de biologia reprodutiva, quanto nos programas de melhoramento (NUNES et al., 2001). Dessa maneira, diversos estudos vêm sendo realizados, como em romanzeiro (PRAKASH et al., 2010), bacurizeiro (SINIMBÚ NETO et al., 2011), espinheira (SHARAFI et al., 2010), pinhão-manso (LYRA et al., 2011), entre outras espécies.

As estimativas de viabilidade polínica são um dos instrumentos de grande significância na avaliação qualitativa dos materiais a serem utilizados nos cruzamentos (CUSTÓDIO, 2009). Existem diferentes metodologias empregadas para a identificação da viabilidade dos grãos de pólen, como por exemplo, o uso de soluções histoquímicas, germinação *in vitro*, germinação *in vivo* e média percentual

de frutificação efetiva, obtida com a utilização do pólen em teste (EINHARDT et al., 2006).

Na germinação *in vitro*, usam-se meios de cultura para determinar a capacidade dos grãos de pólen desenvolverem o tubo polínico (STANLEY & LINSKENS, 1974). Nesse procedimento, existem diversos fatores decisivos para obter êxito na germinação, no que se refere à presença de micro e macro nutrientes, temperatura e pH (RAMOS et al., 2008; CHAGAS et al., 2010), como também ajustes particulares da composição do meio para cada espécie (DAFINI, 1992).

Outro ponto bastante importante é o armazenamento dos grãos de pólen. O procedimento consiste em conservar o material para futura utilização, sendo que este precisa manter seu potencial germinativo e variabilidade genética original (WANG, 1975). Diversos estudos têm sido realizados a respeito de técnicas de armazenamento que preservem ao máximo essa viabilidade polínica (HONDA et al., 2002).

Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar a germinação *in vitro* dos grãos de pólen de *C. speciosa* armazenados em diferentes ambientes e concentrações de ácido bórico, bem como avaliar a viabilidade polínica através de métodos histoquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Alta Floresta, em julho de 2011.

1. Teste germinativo *in vitro*

Para o estudo da germinabilidade polínica, foram utilizados 20 botões florais provenientes de um indivíduo de *C. speciosa*, localizado no perímetro urbano do município de Alta Floresta - MT. Depois de coletados, utilizou-se um estilete para retirar as anteras e posteriormente, separá-las. Em seguida, com o auxílio de um pincel, os grãos de pólen foram aspergidos sobre as placas de Petri, contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura. Após 8 horas, foi realizada a contagem aleatória dos grãos de pólen germinados e não germinados, através de microscópio óptico com aumento de 40x. Foram considerados germinados os que apresentaram o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen (PASQUAL et al., 1982).

A germinação do pólen *in vitro* foi avaliada baseando-se na conservação dos polens, que ficaram acondicionados em quatro ambientes distintos, sendo eles: Ambiente Externo com temperatura de 20°C a 25°C (AE), Câmara Fria em temperatura de 8°C (CF), Freezer a -11°C (F) e Geladeira a 4°C (G), e também analisando o uso do meio de cultura contendo quatro diferentes concentrações de ácido bórico (H₃BO₃) (Tabela 1).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4 (ambientes x meios de cultura) com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. Em cada placa foram contados aproximadamente 300 grãos de pólen. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade pelo Programa Estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 2011).

TABELA 1. Composição dos meios de cultura utilizados no experimento.

MEIO DE CULTURA	SACAROSE	AGAR	ÁCIDO BÓRICO (H ₃ BO ₃)	pH
1	10 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹	0 g L ⁻¹	6,0
2	10 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹	0,1 g L ⁻¹	6,0
3	10 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹	0,01 g L ⁻¹	6,0
4	10 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹	0,001 g L ⁻¹	6,0

2. Análise histoquímica

Para a análise histoquímica, foram coletados 10 botões florais de *C. speciosa*, fixados em solução carnoy (3:1 álcool etílico/ácido acético) e, posteriormente, conservados em álcool 70%. Os grãos de pólen foram extraídos com o auxílio de uma pinça, sendo dispostos em lâmina e analisados pelo método de varredura sob microscópio óptico com lente objetiva de 40x. A viabilidade polínica foi avaliada utilizando-se quatro soluções histoquímicas: Carmim Acético 2%, Lugol 1%, Solução de Alexander e Orceína Acética 2%. Foram contabilizados um total de 200 polens por lâmina, com cinco repetições, perfazendo um total de 1.000 polens para cada solução. Na avaliação, os polens foram classificados como normais/ viáveis (N/V) e anormais/ inviáveis (A/I) de acordo com a reação de coloração. A partir dos dados obtidos em cada solução, calculou-se a porcentagem de polens viáveis pela fórmula:

$$\text{Viabilidade do pólen (\%)} = \text{N}^{\circ} \text{ de grãos corados} / \text{N}^{\circ} \text{ de grãos contados} * 100$$

O delineamento experimental foi de 5 x 5, sendo cinco soluções histoquímicas, e confeccionadas cinco lâminas para cada solução. Os dados foram submetidos a análise de variância, e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo Programa Estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados sumariados na Tabela 2, percebe-se que não houve diferença estatística significativa na germinação polínica de *C. speciosa* quanto ao armazenamento nos ambientes testados, evidenciando que os mesmos foram capazes de conservar a viabilidade dos polens de maneira satisfatória. Em estudo realizado por CUCHIARA et al. (2012), trabalhando com dois cultivares de mamoneira, avaliaram quanto ao armazenamento dos polens; sendo que os tratamentos com temperaturas mais inferiores, possibilitaram a melhor conservação dos mesmos, resultando em percentagens consideráveis de germinação polínica.

TABELA 2. Valores médios percentuais da germinação *in vitro* do pólen de *Ceiba speciosa* em diferentes ambientes e meios de cultura.

MEIO DE CULTURA (H ₃ BO ₃)	AMBIENTES			
	AMBIENTE EXTERNO	CÂMARA FRIA	FREEZER	GELADEIRA
0 g L ⁻¹	26,22 AB ab	27,22 A ab	52,44 A ab	25,66 A ab
0,1 g L ⁻¹	22,53 C c	33,22 A ab	58,66 A ab	23,99 A c
0,01 g L ⁻¹	34,11 AB ab	25,55 A ab	44,88 A ab	29,44 A ab
0,001 g L ⁻¹	38,89 A ab	25,78 A ab	63,11 A a	34,55 A ab

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Analisando o ambiente externo, caracterizado pela temperatura ambiente, observam-se grandes diferenças nessa germinabilidade, principalmente quando combinado ao meio de cultura 2, com $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de H_3BO_3 (Tabela 1). Percebe-se que neste tratamento, se obteve o resultado mais baixo de germinação (22,53%) quando comparado aos demais. Nesse sentido, deve-se salientar que no Ambiente Externo existem diversos fatores, tanto bióticos quanto abióticos, como: temperatura, pH, polinizadores, pressão, umidade, entre outros, interagindo e que podem causar uma baixa na viabilidade desses polens.

Ainda nesse mesmo meio de cultura, no ambiente Geladeira, observa-se um valor, também baixo (23,99%) do percentual de germinação; levando-se a salientar que a concentração de H_3BO_3 desse meio, aliada ao ambiente Geladeira, não apresentou uma das mais viáveis para sua conservação e germinação. Todavia, para os ambientes CF e F, foi obtido um valor considerável, de 33,22% e 58,66%, respectivamente (Tabela 2).

Por outro lado, entre estes meios de cultura testados, o mais viável foi o 4, com $0,001 \text{ g L}^{-1}$ de H_3BO_3 (Tabela 1), em conjunto com o ambiente Freezer. Neste tratamento observou-se o maior percentual de germinação do tubo polínico de *C. speciosa* (63,11%), consistindo no mais indicado na obtenção de êxito para esta espécie (Tabela 2). CHAGAS et al. (2010), trabalhando com cultivares de pera, também avaliaram concentrações de ácido bórico e concluíram que as melhores condições de germinabilidade polínica foram obtidas com 795 e 838 mg L^{-1} de H_3BO_3 , em seu estudo. Em outro estudo, realizado por DANNER et al. (2011), o meio de cultura que tinha a adição de H_3BO_3 foi superior, com 43% de germinação, em relação ao que não incluiu este elemento, bem como, SOUSA et al. (2010) trabalhando com 200 mg L^{-1} de H_3BO_3 para a espécie *Syagrus romanzoffiana*.

Analisando de maneira geral, o meio de cultura 4, com $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de H_3BO_3 conjuntamente com o Ambiente Externo, Freezer e Geladeira, evidenciou as melhores condições para a germinabilidade polínica desta espécie; exceto para o ambiente Câmara Fria, que mostrou-se satisfatório com o meio 2 ($0,1 \text{ g L}^{-1}$ de H_3BO_3) (Tabela 2).

Quanto à utilização das quatro soluções histoquímicas, estas foram capazes de distinguir os polens viáveis dos inviáveis. Entre a visualização da distinção entre os polens, a melhor solução foi a de Alexander, que apresenta uma reação de coloração bastante distinta. De acordo com ALEXANDER (1980), pelos testes com esta solução, é possível diferenciar os grãos de pólen abortados dos não abortados. Os abortados não possuem núcleo, e a coloração se apresentará apenas na celulose contida na parede.

Analisando os testes, os resultados demonstraram que não houve diferença estatística na percentagem de viabilidade entre eles. Com o uso de Carmim Acético 2%, obteve-se 90% de viabilidade, com o Lugol 1% foi de 95,40%, com a Solução de Alexander, 95,20%, e com Orceína Acética 2%, foi de 96,30% (Tabela 3). MARTINS et al. (2010) estudando acessos de duas espécies de *Capsicum*, utilizaram a solução de Alexander para avaliar a viabilidade dos polens, o que também estimou uma alta viabilidade polínica.

GOMES et al. (2013), utilizando Carmim Acético, Lugol e Alexander, estudando duas populações de *Mauritia flexuosa*, também encontraram alta viabilidade polínica, com estimativas superiores a 90%. Comparando-se os quatro testes histoquímicos, verificou-se que o maior valor médio foi obtido com Orceína

Acética 2%, e o menor, com Carmim Acético 2% (Tabela 3). Entretanto, todas as soluções apresentaram valores maiores ou iguais a 90% de viabilidade, e de acordo com SOUZA et al. (2002), valores acima de 70% são considerados como de alta viabilidade.

A viabilidade do pólen é considerada uma medida de fertilidade masculina, onde a citogenética emprega como instrumento no monitoramento do pólen. De acordo com os percentuais encontrados, pode perceber qual o melhor tratamento para que não ocorram prejuízos se esta espécie for utilizada em trabalhos de melhoramento, no que diz respeito ao cruzamento entre genótipos de interesse econômico (SOUZA et al., 2002).

TABELA 3. Valores médios percentuais de viabilidade do pólen com as soluções histoquímicas.

SOLUÇÕES HISTOQUÍMICAS			
CARMIM ACÉTICO 2%	LUGOL 1%	SOLUÇÃO DE ALEXANDER	ORCEÍNA ACÉTICA 2%
90,00 A	95,40 A	95,20 A	96,30 A

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

O armazenamento dos polens de *C. speciosa* no ambiente Freezer apresentou conservação mais satisfatória. A adição de 0,001 g L⁻¹ de ácido bórico em meio de cultura foi a mais adequada para a germinabilidade polínica da espécie. As soluções histoquímicas foram eficientes na distinção dos polens viáveis dos inviáveis, sendo que a Solução de Alexander é a mais indicada por apresentar maior clareza na análise, todavia, deve-se salientar que estes métodos podem superestimar a viabilidade polínica.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, v. 55, p. 13-18, 1980.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.1, p. 1039, 2003.

CHAGAS, E. A.; PIO, R.; CHAGAS, P. C.; PASQUAL, M.; BETTIOL NETO, J. E. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, v. 40, p. 261-266, 2010.

CUCHIARA, C. C.; SILVA, S. D. A.; BOBROWSKI, V. L. Conservação de grãos de pólen de mamoneira a baixas temperaturas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 1, p. 82-87, 2012.

CUSTÓDIO, A. R. **Relações de cruzabilidade entre espécies e acessos de germoplasma do gênero *Arachis* associados ao genoma B do amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. 2009. 137 p. Tese de doutoramento, Universidade Federal

de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach (the practical approach series)**. New York, Oxford: University press, p. 250, 1992.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; SACHET, M. R.; MALAGI, G. Modo de reprodução e viabilidade de pólen de três espécies de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 345-352, 2011.

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GOMES, A. D.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; SILVA, B. M.; SILVA, I. V. Razão sexual e viabilidade polínica de *Mauritia flexuosa* L. (Arecaceae). **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 2864-2870, 2013.

HONDA, K.; WATANABE, H.; TSUTSUI, K. Cryopreservation of *Delfinium* pollen at – 30 °C. **Euphytica**, v. 126, p. 315-320, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, p. 368, 1992.

LYRA, D. H.; SAMPAIO, L. S.; PEREIRA, D. A.; SILVA, A. P.; AMARAL, C. L. F. Pollen viability and germination in *Jatropha ribifolia* and *Jatropha molíssima* (Euphorbiaceae): Species with potential for biofuel production. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 3, p. 368-374, 2011.

MARTINS, J. R. et al. Teores de pigmentos fotossintéticos e estrutura de cloroplastos de Alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 64-69, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n1/a412cr1385.pdf>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2014.

NUNES, J.C.O. et al. Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 35-9, 2001.

PASQUAL, M.; PETRI, J. L.; MATTOS, C. S. Polinização da macieira III: cultivares BR-1 e Mollies Delicious. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, p. 1477-1481, 1982.

PRAKASH, A.; CHAUHAN, S.; RANA, A.; CHAUDHARY, V. Study of *In vitro* Pollen Germination and Pollen Viability in *Punica granatum* L. (Punicaceae). **Research Journal of Agricultural Sciences**, Awantipora, v. 1, n. 3, p. 224-226, 2010.

RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; SALLES, L. A.; CHAGAS, E. A.; PIO, R. Receptividade do estigma e ajuste de protocolo para germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Interciência**, v. 33, p. 51-55, 2008.

SHARAFI, Y. Suitable in vitromedium for studying pollen viability in some of the Iranian hawthorn genotypes. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nusska, v. 4, n. 19, p. 1.967-1.970, 2010.

SINIMBÚ NETO, F. A.; MARTINS, A. B. G; BARBOSA, J. C. Viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de bacurizeiro - Clusiaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 93-600, 2011.

SOUSA, S.A. **Cultura da Pinheira: caracterização de frutos, germinação e atributos de qualidade requeridos pelo sistema de comercialização**. 2005. 70p. Dissertação (Mestrado - Curso de Pós-graduação em Ciências Agrárias) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA.

SOUSA, V. A.; SCHEMBERG, E. A.; AGUAR, A. V. Germinação *in vivo* do pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, p. 147-151, 2010.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa degener*). **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.6, p.1209-17, 2002.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. Berlin: Springer- Verlag, p. 307, 1974.

WANG, B. S. P. **Metodología de la conservación de los recursos genéticos forestales**. Roma, FAO, p. 93-103, 1975.