

発表番号 43

マングローブのプロトプラスト培養系開発

助成研究者：笹本浜子（横浜国大 環境情報研究院）

共同研究者：中村達夫（横浜国大 環境情報研究院）

海水中にも生育しうるような強い耐塩性の性質を持つマングローブ類は、これまで、細胞培養や組織培養による個体再分化系の開発は難しかった。また、増殖細胞あるいはカルスを得ることも困難なものが多く、オヒルギの仲間やマヤブシキで一部成功しているにすぎない。特にプロトプラストからの個体再生系は今まで成功例が無い。これが確立できると、単細胞から個体に至る全過程の調節機構の解明のための基盤技術となると同時に、細胞融合や細胞選抜により、あるいは遺伝子操作による育種が可能になり、類まれな耐塩性の形質の利用により、塩類集積土壌の改善や緑化事業に用いる可能性が生まれる。本研究では、マングローブプロトプラストを用いた培養系の開発を目指す。同時に、耐塩性や高浸透圧耐性などの植物体が持っている形質は、プロトプラストにおいても発現しているので、これを利用して、特殊な形質を持つ植物に対する種々の微量の化学物質の影響を、多穴シャーレを用いて簡単に、定量的にバイオアッセイするシステムの構築も目指す。

ヒルギダマシの半胎生種子の胚軸、子葉、育成したポット苗の葉、マヤブシキの種子、無菌苗の子葉などを用い、固体培養および、工夫した透明カバー平底培養管による少量液体培養—倒立顕微鏡観察を行い、増殖細胞を得る培地条件を検討し、同様な結果を得たので、後者の液体培養手法により広範囲の要因解析が可能と判断された。ヒルギダマシ葉については、植物ホルモンのオーキシン要求性の他に、草本系材料に比べ高いサイトカイニンの必要性と、遊離細胞誘導に対し、ジベレリン酸、アブシジン酸、アスコルビン酸などの促進効果を見出した。また、培地の無機塩類の中で窒素源の種類と濃度も重要であった。

ヒルギダマシの葉から、非常に高い浸透圧と強い酵素条件によってプロトプラストを単離し、無菌培養が可能となった。96多穴シャーレを用い、オーキシンとサイトカイニンの濃度組み合わせ条件を検討し、若干の細胞肥大が得られた。マヤブシキの種子から得られたカルスおよび、無菌苗の子葉を用い、適単離酵素組み合わせ、適浸透圧条件を多穴シャーレを用いて広く探索し、プロトプラストを得た。これまで、プロトプラスト培養から個体再生に成功してきたポプラ、シラカンバなどの木本類や、増殖細胞を得たロッカクヒルギの液体培養細胞などとは異なる適条件であった。困難なマングローブの細胞培養系確立のためには、さらに多数の化学物質の広い濃度範囲の影響を簡単に探索できるシステム構築が有効と考えられる。

22

助成番号 0222

マングローブのプロトプラスト培養系開発

助成研究者：笹本浜子（横浜国大 環境情報研究院）

共同研究者：中村達夫（横浜国大 環境情報研究院）

1. 研究目的

海水中にも生育しうるような強い耐塩性の性質を持つマングローブ類は、これまで、細胞培養や組織培養による個体再分化系の開発は難しかった。また、増殖細胞あるいはカルスを得ることも困難なものが多く、オヒルギの仲間やマヤプシキで一部成功しているにすぎない。特に細胞からさらに細胞壁を除いたプロトプラストからの個体再生系は、今まで成功例が無い。これが確立できると、単細胞から個体に至る全過程の調節機構の解明のための基盤技術となると同時に、細胞融合や細胞選抜により、あるいは遺伝子操作による育種が可能になり、類まれな耐塩性の形質の利用により、塩類集積土壌の改善や、緑化事業に用いる可能性が生まれる。本研究では、マングローブプロトプラストを用いた培養系の開発を目指す。

同時に、耐塩性や高浸透圧耐性などの植物体を持っている形質は、細胞およびプロトプラストにおいても発現しているので、これを利用して、特殊な形質を持つ植物に対する、種々の微量の化学物質の影響を、多穴シャーレを用いて簡単に定量的にバイオアッセイするシステムの構築も目指す。

2. 研究方法

2. 1. 増殖細胞誘導条件の検討

ヒルギダマシ(*Avicennia marina*)種子の胚軸、子葉、ポット苗の葉を材料として用いた。種子は主に西表島において採取され、水道水に保存して用いた。発根した種子をパーミキュライトを入れた1/10,000ポットに植え、水を張ったバットの中でハイポネックスを適宜与えて育成された苗を用いた。中性洗剤で予備洗浄後、1～5%次亜塩素酸Na溶液、10-50分間などの滅菌処理後、クリーンベンチ内にて、オートクレーブ滅菌した逆浸透(R.O.)水により3回洗浄し、無菌シャーレ内でメスにより細断した細断片を固体培地(ジェランガム0.4%, 3cm, 6cmシャーレなど)においた。23℃または30℃の暗所、明所においた。あるいは、10-50ml平底管ビン中の0.5-2ml液体培地に入れ、オートクレーブ滅菌した透

明なフィルムのカバーをして、28℃暗所において振とう培養を行い、倒立顕微鏡観察を行った。(透明カバー平底培養管法)

また、長期間の培養により、組織からカルス状の増殖が得られた場合、あるいは細胞遊離が、液の濁りとして観察されるほどに多くなった場合には、デジカメ写真撮影および、市販スキャナーのカバーを工夫することにより、20本程度の平底培養管の結果を瞬時にコンピューターファイル情報化する方法を工夫した。

基本培地として、多くの草本、木本材料で用いられてきた Murashige & Skoog (1962) の塩類、有機酸、アミノ酸、3%ショ糖条件を用いた。他の培地組成を用いる時は、MS との比較を行った。植物ホルモンとして、オーキシシン(2,4-ジクロロフェノキシ酢酸=2,4-D)、サイトカイニン(ベンジルアデニン=BA、N-(2-クロロ-4-ピリジル)-N'-フェニルウレア=CPPU)、アブシジン酸(ABA)、ジベレリン酸(GA₃)、生長調節物質アスコルビン酸などを用いた。浸透圧剤として、ソルビトール、マンニトールなどの糖、NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂などの塩や、グリシンベタインなどの10-500mMを加えた。

マヤプシキ(*Sonneratia alba*)の実、葉は、西表島において採取した。水道水洗浄した種子の胚および水中芽生え、寒天0.8%のみあるいは、MSの基本培地のみを含む寒天培地で育成した芽生えの子葉などを用いた。ヒルギダマシと同じように、「透明カバー平底培養管法」を用いて、不定胚形成細胞などの分化能の強い細胞を得るため、遊離細胞に注目して最適培地条件の検索を行った。固体培養および、液体培養により、植物ホルモンとして、2,4-D, BA, CPPU, GA₃, ABAなどの影響を調べた。

2. 2. プロトプラスト単離

ヒルギダマシの子葉からのプロトプラスト単離の最適条件であった、1.4M ソルビトールを含むセルラーゼRS2%、ドリセラゼ2%、の条件²⁾と、RS濃度を2倍にした条件をポット苗の葉に用いた。また、ドリセラゼの長期的入手が困難になったので、入手可能なドリセラゼ20との比較実験を行った。

マヤプシキの種子から、2,4-D 0.1μMを含む固体培地で誘導されたカルス³⁾を用いて、プロトプラスト単離を試みた。その際、セルラーゼR10、セルラーゼRS、ヘミセルラーゼ、ドリセラゼ、マセロザイムR10、ペクトリアーゼY-23を組み合わせた24種の条件を用い、倒立顕微鏡観察と、助成研究者が工夫したマイクロチューブによる簡易定量法と、フルオレセイン2酢酸の蛍光検出によるプロトプラストの生存率測定によって、単離最適条件を判断した。

計画にはなかったが、マヤプシキの種子を多数入手できたので、この無菌芽生えを得、子葉からプロトプラストを単離する条件を検討した。24種の酵素組み合わせ条件および、ソルビトール0.4Mから1.8Mの浸透圧の影響を調べた。

2. 3. プロトプラスト培養

ヒルギダマシの葉から、セルラーゼ RS 4%とドリセラゼ 2%を含む 1.4M ソルビトール液中で、25℃暗所、一晩から 1 日処理し、得られたプロトプラストを 40 μ のナイロンメッシュによってろ過し、遠心洗浄を行った。1.3M ソルビトールを含む MS および、硝酸アンモニウムを除いた MS 基本培地に、2. 1 で用いた種々の植物ホルモンを加え、96 穴シャーレ中 50 μ l の培地に 10⁴-10⁶/ml の細胞密度のプロトプラストサスペンションを 5 μ l 分注し、28℃暗所の炭酸ガス培養器内(炭酸ガス供給無し)の温室で培養した。

3. 結果と考察

3. 1. 増殖細胞誘導

ヒルギダマシ葉について、固形培地による培養により若干の増殖を得た。(Fig.1) 23℃に比べ 30℃暗所条件において、よく反応した。MS 基本培地、BA 10 μ M と 2,4-D 1 μ M, 10 μ M の組み合わせ条件において、細胞増殖が認められた。2,4-D 1 μ M と BA 10 μ M 条件において、GA₃ 0.1, 1, 10 μ M を加えると促進がみられた(Fig.2)。ABA 0.1 μ M, 1 μ M も促進した(Fig.3)。2,4-D 10 μ M, BA 10 μ M 条件では、ABA の促進は認められず、GA 0.1 μ M において若干の促進があった(Fig.2)。また、暗培養条件において、2,4-D 1 μ M と BA 10 μ M 条件において、マンニトールの 0.15M による促進が見られたが (Fig.4)、GA₃ の促進効果と加算的ではなかった。明条件においては、GA₃ 低濃度と組み合わせると若干促進された (Fig.5)。

ヒルギダマシ葉について、液体培養において、固形培地の上記の結果と同じように、2,4-D 0.1-10 μ M、BA 10-30 μ M, ABA 0.1 μ M(Fig. 6)、GA₃ 0.1-30 μ M(Fig.7),などの植物ホルモン条件、およびアスコルビン酸 0.01-1mM(Fig. 8)によって促進効果が得られた。また、不定胚形成細胞のような分化能のある培養細胞を得るために、遊離細胞に注目しているが、液体培養においてのみ、この遊離細胞の特徴を非破壊的に観察可能である。このことにより、種々の化学物質の影響を調べるために、少量の培地を用いることのできる液体培養によって広く条件探索することが可能であると判断される。ヒルギダマシ葉材料においては、デンプン顆粒をもつ遊離細胞塊が種々のホルモン条件において得られた(Fig. 9)。

さらに、継代培養可能な増殖最適条件探索のため、次の実験を行った。NaCl や、マンニトールが促進的であったのに対し、KCl の低濃度からの阻害効果がヒルギダマシの葉の液体培養によって観察されたこと⁹⁾や、予備実験段階において、KCl を多く含むアミノ酸 (AA) 培地 (ロツカクヒルギ *Bruguiera sexangula* の液体培養細胞に用いられている) が、阻害的であったことなどから、MS 基本培地の無機塩類に注目した。カリウム塩を含む無機塩貯蔵液 A (KNO₃, NH₄NO₃, KH₂PO₄) の濃度を变化させたところ、通常の MS 培地に含まれる量に比べ、良い結果を得た (Fig.10)¹⁾。しかし硝酸アンモニウム塩を除

くと阻害的である (Fig.11)。浸透圧剤の中では、グリシンベタインが比較的高濃度においても阻害効果が見られなかった。

一方ヒルギダマシ半胎生種子の胚軸から、2,4-D 0.1 μ M, BA 10 μ Mにおいて、1週間培養後に分裂面をもつ遊離細胞が得られた (Fig.12)。胚軸、子葉は共に、バクテリアやカビ汚染が強く、現在のところ長期間の培養は難しいが、将来採取場所と近い場所で無菌処理培養実験ができると、好材料となる可能性もある。

マヤプシキ種子から、固体培地においてカルス形成した MS 2,4-D 0.1 μ M のみあるいは、CPPU0.1 μ M を加えた条件において液体培養条件においても増殖がみられた。GA₃ は、培養初期に促進した。2,4-D 0.1 μ M のみあるいは、BA0.01,0.1 μ M を加えた条件において遊離細胞が得られたが、液胞が多く継代培養できなかった。CPPU0.1 μ M と組み合わせると、組織表層にカルス形成し遊離しにくい傾向があった。また、マヤプシキの無菌の芽生えが得られるようになったので、この子葉を用いた増殖細胞誘導も検討し、上記の種子胚と同様なホルモン条件での反応がみられた。

ヒルギダマシ、マヤプシキ共に、これまで扱ってきた草本木本植物の中で反応してきた、通常の植物ホルモンなどの試みた濃度範囲では、分裂活性の高い遊離細胞を誘導することはできなかった。このことから、これまで用いていない植物ホルモンや成長調節物質を試みる必要性が示唆され、検討中である。

3. 2. プロトプラスト単離

これまでわかっていたヒルギダマシの子葉のプロトプラスト単離条件⁸⁾も、ポプラやシラカンバなどの木本材料に比べ、セルラーゼ RS とドリセラーゼの濃度共に通常の2倍の濃度であり、かつ長時間の反応時間を必要としたが、ヒルギダマシの葉からのプロトプラスト単離は、これに加えてさらに高いセルラーゼ RS 濃度を必要とした。葉プロトプラストの無菌的単離に成功したので、半胎生種子の採集時期が限られる子葉のプロトプラストと異なり、ポット苗による通年の実験が可能になった。

マヤプシキの、2,4-D 0.1 μ Mを含む固体培地で誘導されたカルスから、0.4M 0.6Mマンニトールを含むセルラーゼRSとペクトリアーゼの組み合わせ条件が、最も多くのプロトプラストを単離できたが、通常と異なり液に浮く細胞ばかりであった。セルラーゼR10との組み合わせ条件が好ましくない結果は、他の木本材料で観察された現象と同じである。

マヤプシキの子葉からの、プロトプラスト単離条件は、MS 培地を含む寒天培地で育成した芽生えの場合には、マンニトールやソルビトールの 0.6M から 1.4M までの広範囲でプロトプラストは得られたが、高い濃度の方が適浸透圧であった。寒天培地で育成した場合は、生育が悪い芽生えが多かったが、1.4M ソルビトールにおいては、得られるプロトプラスト数は減り、低い浸透圧の方が適していた。最適酵素組み合わせ条件の 24 穴シャーレによる探索の結果は、セルラーゼ RS とマセロザイムか、ドリセラーゼの組み合わせ、

および、これらにヘミセルラーゼを加えた場合によく単離された。セルラーゼ R10 側は、概して単離されないが、セルラーゼ R10 のみの場合に若干単離された。

以上のように、ヒルギダマシ葉および、マヤブシキ子葉共に、プロトプラスト化には、酵素条件、浸透圧条件など、特殊な条件を要求するので、広範囲の最適条件探索が不可欠である。

3. 3. プロトプラスト培養

ヒルギダマシの子葉プロトプラストについて、1.4M ソルビトールを含む MS 基本培地、2,4D と BA の濃度組み合わせ、 10^3 - 10^5 /ml の条件を試みたが、バクテリア汚染がみられた。子葉自身の培養でもカビやバクテリアの汚染が顕著なので、長時間のプロトプラスト単離と、糖を多量に含む条件での無菌培養には困難がある。

ヒルギダマシの葉プロトプラストについては、無菌培養が可能であった。MS 基本培地および、硝酸アンモニウムを除いた MS 基本培地の各々1.3M ソルビトールを含む培地を用いて、オーキシシンとして 2,4-D、サイトカイニンとして BA の、通常より高濃度までの濃度組み合わせを試みたが、若干肥大する反応しか得られていない。硝酸アンモニウムを除いた MS 基本培地の方が、MS 基本培地側よりも長く生存していた。このような、葉プロトプラスト培養におけるアンモニウム塩の阻害的な結果は、ポプラやシラカンバ葉と共通する傾向であった。また、プロトプラスト内に、大きな顆粒状のものが観察される。この顆粒は培養によっても消失しなかった。

プロトプラスト培養では、96 穴シャーレ中の極少量の培地量での、色々な植物ホルモンなどの濃度変化の影響を調べることができるので、プロトプラスト培養の結果を参考にし、組織片からの増殖細胞誘導条件を考えることもできる。両者がまったく同じ最適条件にはならないが、効果のある生長調節物質の種類には共通性があると考えられる。

増殖細胞を得る目的のためには、多数の条件での探索が必要である。このため、データ解析のための写真画像を、さらに多数迅速に処理システムを工夫する必要がある。

無菌のプロトプラストが得られたことにより、非常に簡単な精製により、微量の内生植物ホルモン、アミノ酸⁷⁾、糖などや、DNA 分析を行うことが可能になった。

一般に、木本植物は草本植物と比べて細胞培養系の確立が困難な傾向があるが、その原因として、内生ホルモン量の特徴が考えられる。助成研究者等は、ポプラやシラカンバのプロトプラストからの個体再生系の確立をするとともに、その増殖分化条件の特徴が、ポプラサスペンションカルチャーでは、内生のジベレリン量が高い時に、培地に適量のアブジジン酸を与えることにより、増殖能が回復すること、また、シラカンバ葉においては、内生アブジジン酸が非常に高く、これに対しては、強いサイトカイニンである CPPU を要求することを明らかにした²⁾。このように、難しかったシラカンバプロトプラストの培養系確立成功例のように、マングローブにおいても内生量の情報を得ることができれば、プ

ロトプラストの培養系確立に寄与すると考えられる。マングローブの中ではロツカクヒルギ液体培養細胞から得たプロトプラストからの増殖に成功しており、NaCl や KCl, MgCl₂, CaCl₂ などの塩の分裂に対する影響をポブラプロトプラストと比較して発表した⁵⁾。このプロトプラストおよび、ヒルギダマシ子葉プロトプラスト中のアブシジン酸とジベレリン類の内生量についても調べた¹⁰⁾。

このように、無菌的に単離されたプロトプラストは、微量化学物質の影響を調べる、簡易アッセイシステムにもなりうる。現在のところ、既知の植物ホルモン類の種々の濃度の影響を検討しているが、同じような手法で、作用が未知の物質の検定にも、用いることができると考えられる。

4. 今後の課題

4. 1. 基本培地の無機塩濃度を低下させた培地を用い、これまで用いてこなかった生長調節物質を用いて、透明カバー平底サンプル管液体培養—倒立顕微鏡観察法により、遊離細胞の形態に注目して不定胚形成細胞などの分化能の高い細胞を得るための最適培地条件の探索を行う。

4. 2. ヒルギダマシ葉およびマヤブシキ子葉プロトプラストを用いて無菌的に増殖細胞を得る培地条件を検索する。96穴多穴シャーレを用い、少量液体培養により、植物ホルモン、生長調節物質（阻害剤を含む）、アミノ酸、糖、無機塩類などの条件について調べる。細胞の初期変化を、倒立顕微鏡により観察する際、顕微鏡ステージを簡易に改良し、多数の条件を検索する手法を改良する。その際、倒立顕微鏡観察データを多数のデータ処理が可能ないように、さらに工夫が必要と考えられる。

4. 3. ヒルギダマシ、マヤブシキ以外に入手可能なマングローブ材料について、メヒルギ、ヤエヤマヒルギ、その他について、ポット苗育成と、プロトプラスト単離、細胞増殖条件の探索を試み、通年新鮮な材料を用いての実験が考えられる。プロトプラスト単離のための細胞壁分解酵素条件を検索する。その際、96穴多穴シャーレを用いて、今回用いた24穴シャーレより少量の材料と酵素による効率的単離法を開発する。

4. 4. 上記の種の、プロトプラストから増殖細胞が得られたものについて、細胞融合処理を試みる。これまで、バイオマス生産樹であるが耐塩性は弱いポブラやシラカンバのプロトプラストからの個体再生系の確立を行い、電気細胞融合により、細胞のマイクロマニピュレーション選抜と、個体再生の研究を行ってきた^{4,6)}。また、異種間、異属間林木の細胞融合後の細胞からの個体再生にも成功してきたので、このような技術を活用して、細胞自身の能力を最大限に引き出す手法を追求したい。

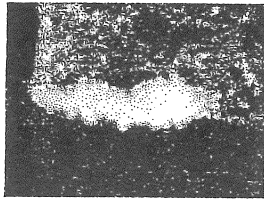


Fig. 1 Callus formation from leaf culture of *Avicennia marina* on solid medium

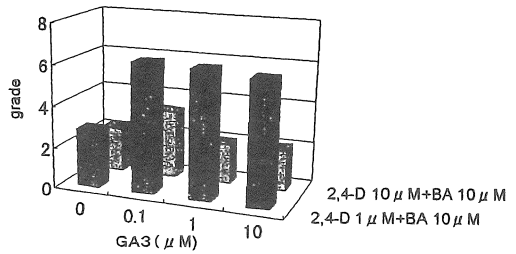


Fig. 2 Effect of GA3 on callus induction from leaf culture of *Avicennia marina* in solid condition.

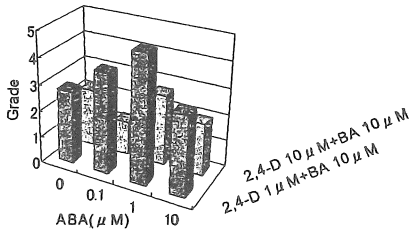


Fig. 3 Effect of ABA on callus induction from leaf culture of *Avicennia marina* in solid condition

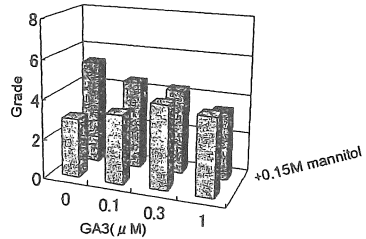


Fig. 4 Effects of GA3 and mannitol on callus induction of from leaf culture of *Avicennia marina* in solid condition cultured in the dark.

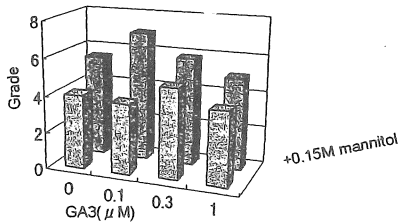


Fig. 5 Effects of GA3 and mannitol on callus induction from leaf culture of *Avicennia marina* in solid condition cultured in the light.

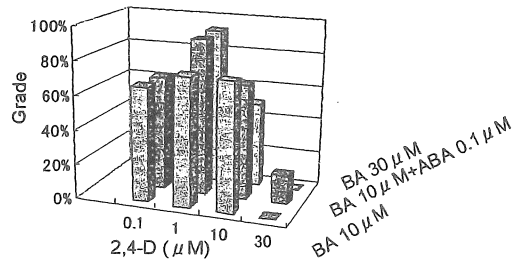


Fig. 6 Effects of 2,4-D, BA and ABA on induction of cells from leaf culture of *Avicennia marina* in liquid condition.

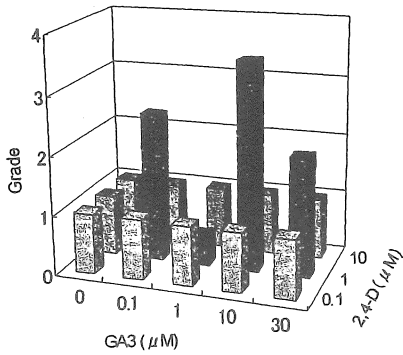


Fig. 7 Effect of GA3 on induction of free cells(black column) from leaf culture of *A. marina* in liquid condition.

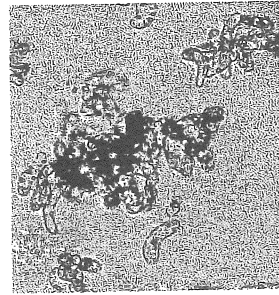


Fig. 9 Starch containing free cells in leaf culture of *Avicennia marina*.

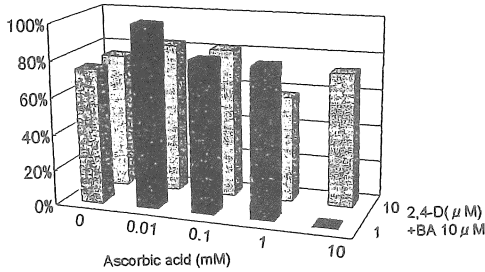


Fig.8 Effect of ascorbic acid on induction of free cells(black column) from leaf culture of *A. marina* in liquid condition.

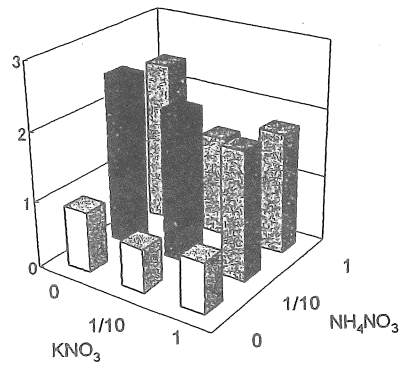


Fig.11 Effect of concentrations of KNO_3 and NH_4NO_3 in MS medium on induction of free cells(black column) from leaf culture of *A. marina* in liquid condition.

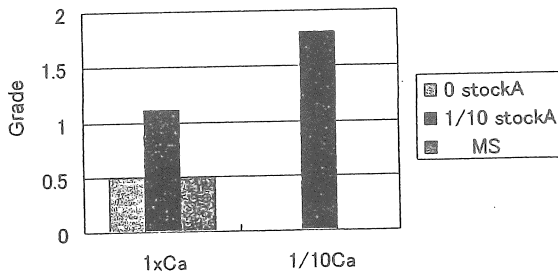


Fig.10 Effects of macro elements in MS medium on induction of cells in liquid culture of *A. marina* leaves.

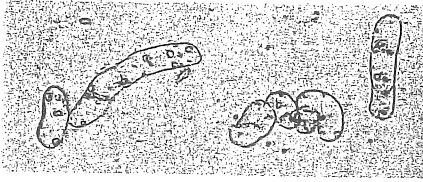


Fig.12 Dividing free cells in epicotyl culture of *A. marina*.

5. 文献等

- 1) 笹本浜子, 日本マングローブ学会 '02年次大会講演要旨集 p2, 2002
- 2) H. Sasamoto, S. Ogita, Y. Wakita, M. Fukui, *Plant Growth Regulation* 38, 195-201, 2002.
- 3) 荻田信二郎, 中川麗美, 久保隆文, 112回日本林学会大会学術講演集 p271, 2001
- 4) H.Sasamoto, Y.Wakita, S.Yokota, N.Yoshizawa: *J.For.Res.* 5(4)265-270, 2000.
- 5) 笹本浜子, 荻田信二郎, 三村徹郎, 18回日本植物細胞分子生物学会大会講演要旨集 p89, 2000.
- 6) 笹本浜子, 荻田信二郎, 三村徹郎, 111回日本林学会大会学術講演集 p603, 2000
- 7) 荻田信二郎, 笹本浜子, 加藤厚, 芦原坦, 馬場繁幸, 111回日本林学会大会学術講演集 p604, 2000.
- 8) H.Sasamoto, Y.Wakita, S.Baba, *Plant Biotechnology* 14(2)101-104, 1997.
- 9) 笹本浜子, 59回日本植物学会大会研究発表記録 p317, 1995.
- 10) 笹本浜子, 福元健志, 川名祥史, 福井充枝, 三村徹郎, 荻田信二郎, 馬場繁幸, 67回日本植物学会大会研究発表記録 p226, 2003.

Development of Protoplast Culture System of Recalcitrant Mangrove Trees

Hamako Sasamoto and Tatsuo Nakamura

Faculty of Environment and Information Sciences, Yokohama National University

Summary

Mangrove trees are very salt tolerant and can grow even in seawater. They have been recalcitrant for cell and tissue culture except for a few species. No report has been published on protoplast cultures in which cell walls are removed under osmotic conditions and plants regenerated. Establishment of protoplast culture system of mangrove cells will be valuable, not only for basic research of the whole process from single cell to plant regeneration, but also for genetic engineering of unique characteristics of mangrove trees through cell fusion and cell selection, and their utilization for reforestation and improvement of salt-rich soil areas.

The main theme of this study is establishing protoplast culture system from recalcitrant mangrove trees. Another important aspect is to develop unique bioassay system of cell cultures to study the effects of variant chemicals quantitatively in comparison to their effects on whole plants, which takes long period for analysis.

We have developed an efficient surveying method for determination of optimum enzyme combinations and osmotic conditions of leaves of *Avicennia marina* and cotyledons of *Sonneratia alba* for protoplast isolation using multi-well plastic plates. We also investigated the effects of several plant hormones and plant growth regulators, and macro elements in the MS medium on the cell proliferation from *A. marina* and *S. alba* with small scale liquid culture using a flat-bottomed tube and observation of free cells and callus formation using an inverted microscope. Not unexpectedly, major differences in optimum conditions were found among the above mangrove materials, suspension cells of *Bruguiera sexangula* and previously established protoplast cultures of tree species, namely *Populus* and *Betula*.