

转基因抗虫抗除草剂棉花对棉铃虫抗性 及对草甘膦耐受性研究^{*}

牛建群^{**} 朱家林 张青文 刘小侠^{***}

(中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100193)

摘 要 本论文研究了抗虫又抗除草剂棉花对草甘膦的耐受程度,比较了这一双抗性状的棉花与单抗虫棉的抗虫效果。结果表明,抗虫又抗除草剂棉花对草甘膦有较好的耐受性,四叶期喷施草甘膦后抗虫抗除草剂棉花可以安全生长,蕾期喷施草甘膦对棉花的开花率和结铃率有影响。抗虫又抗除草剂棉花和单抗虫棉对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 均具有较好的防治效果,苗期棉花叶片对棉铃虫防治效果最好,后期防治效果下降到 49.2% 和 46.6%,吐絮期防治效果又上升到 57.0% 和 53.1%。

关键词 抗虫抗草甘膦棉花, 棉铃虫, 草甘膦, 生物测定, 时空表达

Glyphosate tolerance and effects of cotton bollworms on transgenic herbicide and insect resistant cotton

NIU Jian-Qun^{**} ZHU Jia-Lin ZHANG Qing-Wen LIU Xiao-Xia^{***}

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The tolerance of genetically modified cotton to glyphosate herbicides and its resistance to the cotton bollworm was investigated. The cotton had good tolerance to glyphosates. Growth was normal after spraying with glyphosate during the “four leaf” stage but spraying during the budding period may reduce the flowering and boll formation. This cotton variety and a control (a transgenic insect – resistant cotton) displayed good resistance to the cotton bollworm. The top leaves of the seeding stage were the most resistant but resistance declined to 49.2% and 46.6% with the growth of the cotton. During the boll opening stage resistance improved to 57.0% and 53.1% respectively.

Key words insect and glyphosate resistance cotton, cotton bollworm, glyphosate, bioassay, tolerance

20 世纪 90 年代我国开始推广转基因抗虫棉花,鉴于转基因抗虫棉带来的可观的经济、环境和社会福利的效益,越来越多的农户不断扩大种植面积,1998 年我国的转基因抗虫棉种植不到 10 万 hm^2 ,到 2011 年已超过 390 万 hm^2 (James, 2012)。众多的研究表明,转基因抗虫棉对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 的防治起到关键的作用 (吴家和等, 1999; 张永军等, 2002; 夏兰芹等, 2005),在一定程度上缓解了棉铃虫的抗药性对棉花生产造成的巨大压力,目前,我国已经出现大量的抗虫棉品种,我国的转基因植物以较快的速度

发展。在国外,耐除草剂性状已经被成功的运用在了大豆、玉米、油菜、棉花、甜菜、苜蓿等作物中,由于我国的抗除草剂棉花的研究起步较晚,目前尚无商品化的抗除草剂棉花品种,但在国家重大专项的持续资助下已经取得阶段性成果 (陈志贤等, 1994; 祝水金等, 2003; 李儒海等, 2010)。复合性状成为转基因作物的一个日益重要的特色,占全球 1.48 亿 hm^2 的转基因作物面积的 61%,复合几种性状的转基因作物的种植面积 (3 230 万 hm^2) 已经超出单一的抗虫品种的种植面积 (2 630 万 hm^2) (James, 2012)。目前国内对复合性状棉

* 资助项目:转基因生物新品种培育科技重大专项 (2011ZX0811-002)

**E-mail: niujianqun123@163.com

***通讯作者, E-mail: liuxiaoxia611@cau.edu.cn

收稿日期: 2012-02-19, 接受日期: 2012-04-10

花的研究也已经取得阶段性进展(郭三堆等, 1999; 赵福永等, 2005; 贾云超, 2008), 如何尽快生产出可商品化的耐除草剂的棉花和具有复合性状的转基因棉花已经成为一个非常重要的课题。

为了测试中国农业科学院棉花研究所提供的转基因抗虫又抗除草剂棉花整个生育期内对棉铃虫的防治效果和对除草剂的耐受程度, 作者于 2011 年在中国农业大学上庄实验站进行了此项研究, 以便为我国尽快商品化兼抗棉铃虫和抗除草剂的棉花新品种提供帮助, 为指导抗虫抗除草剂棉田实际生产提供指导依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

抗虫抗除草剂棉花(简称双抗棉, 来源于中国农业科学院棉花研究所); 石远 321(常规棉, 来源于中国农业大学 IPM 实验室) 和 SGK321(转 Bt + *CpTI* 双价基因抗虫棉, 简称双价棉)。3 种棉花 2011 年 5 月 1 日种植于中国农业大学上庄实验站, 整个生育期不使用农药, 不打顶。供试棉铃虫的饲养条件为温度 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度 $70\% \pm 10\%$, 光周期 L:D = 14:8。草甘膦测试浓度为 41% 的农达稀释 400 倍、200 倍和 100 倍。

1.2 草甘膦的耐受性测定方法

棉田内采用五点取样法统计棉田杂草数, 用 41% 农达稀释 400 倍、200 倍、100 倍和清水处理杂草, 14 d 后统计田间杂草死亡数。棉花四叶期用 41% 农达稀释 400 倍、200 倍、100 倍和清水处理双抗棉和石远 321, 每 7 d 统计 1 次棉株高度。待初蕾期每株随机选取 10 个蕾(直径 0.5 ~ 1 cm) 做好标记, 统计后期选取蕾的开花率、结铃率以及棉株的果枝数。

初蕾期每株双抗棉花随机选择 10 个蕾(直径 0.5 ~ 1 cm) 做好标记, 用 41% 农达稀释 400 倍、200 倍、100 倍和清水处理, 每 7 d 统计 1 次棉株高度。统计后期选取蕾的开花率、结铃率以及棉株的果枝数。

1.3 杀虫活性时间动态测定方法

田间摘取不同时期转基因棉花的棉株顶端叶片、花瓣、蕾(直径 0.5 ~ 0.7 cm)、铃(直径小于 1.2 cm), 以受体常规棉作对照, 接室内人工饲养的棉铃虫幼虫。根据叶片的新鲜程度更换棉花组

织器官, 观察记载其存活情况, 计算 72 h 后校正死亡率。田间摘取棉株顶端叶片, 以受体常规棉作对照, 用于饲养 1 ~ 5 龄的棉铃虫。记录接虫前和接入 6 d 后幼虫体重及存活情况, 计算校正死亡率。

1.4 数据分析

数据采用 EXCEL 2003 和 SPSS17.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 转基因棉对草甘膦的耐受程度

2.1.1 草甘膦除草效果 棉田杂草用 41% 农达稀释 400 倍、200 倍、100 倍, 14 d 后杂草死亡率分别为 74.1%、97.1%、97.3%, 其中稀释 400 倍 41% 农达除草效果与稀释 200 倍和 100 倍农达的除草效果间差异显著, 喷施稀释 200 倍和 100 倍农达除草效果无显著差异。

2.1.2 苗期棉花对不同浓度草甘膦耐受程度

苗期双抗棉对不同浓度草甘膦均具有较强的耐受性, 棉花植株生长正常, 后期开花率、结铃率及果枝数均未受到影响(表 1)。苗期石远 321 对草甘膦耐受性较差, 喷施稀释 400 倍 41% 农达时部分棉株死亡, 存活植株生长明显受到抑制, 整个生育期内开花率、结铃率和果枝数都较低, 受到影响较为明显, 喷施稀释 200 倍和 100 倍 41% 农达的植株全部死亡(表 2)。

2.1.3 蕾期双抗棉对不同浓度草甘膦耐受程度

初蕾期用不同浓度草甘膦处理双抗棉, 棉株生长和果枝数未受到明显的抑制, 但开花率和结铃率随着喷施草甘膦浓度的升高而降低, 明显影响棉株的产量(表 3)。

2.2 转基因棉对棉铃虫的毒杀效果

2.2.1 杀虫活性时间动态测定结果 双抗棉和双价棉苗期、花蕾期、铃期和吐絮期叶片对棉铃虫有较好的防治效果, 校正死亡率分别为 85.5%、67.5%、49.2%、57.0% 和 88.2%、71.4%、46.6%、53.1%。苗期叶片具有最好的防治效果, 铃期的防治效果最差。经 Duncan 多重比较发现 2 种抗虫棉在不同生育期的杀虫效果均存在显著性差异($P < 0.05$), 使用独立样本 *t*-test 检验发现在相同生育时期 2 个棉花品种之间的杀虫效果无显著差异($P < 0.05$)(图 1)。

表 1 草甘膦对苗期双抗棉花品种的影响

Table 1 Effects of glyphosate on transgenic insect-and glyphosate-resistant cotton of seedling stage

稀释倍数 Dilution ratio	棉花株高 Height of cotton (cm)				开花率 Abloom rate (%)	结铃率 Bell rate (%)	果枝数 Branch number
	0 d	7 d	14 d	28 d			
CK	26. 6 ± 0. 42a	36. 1 ± 0. 52a	44. 1 ± 0. 54a	58. 5 ± 0. 44a	72. 0 ± 2. 20a	62. 0 ± 1. 70a	13. 8 ± 0. 44a
400	26. 8 ± 0. 38a	35. 9 ± 0. 49a	43. 4 ± 1. 10a	56. 5 ± 1. 80a	74. 0 ± 2. 70a	61. 3 ± 1. 90a	13. 3 ± 0. 43a
200	26. 3 ± 0. 48a	35. 3 ± 0. 91a	43. 1 ± 1. 50a	59. 0 ± 0. 49a	72. 0 ± 2. 40a	61. 3 ± 1. 90a	13. 5 ± 0. 39a
100	26. 7 ± 0. 22a	34. 5 ± 0. 88a	42. 6 ± 1. 70a	54. 5 ± 2. 80a	70. 6 ± 2. 50a	61. 3 ± 2. 70a	13. 4 ± 0. 38a
P	0. 646	0. 482	0. 877	0. 217	0. 819	0. 995	0. 946
f	0. 556	0. 832	0. 228	1. 530	0. 309	0. 025	0. 123
df	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56

注:同一列数据后标有不同字母表示经 Tukey 比较存在显著性差异 ($P < 0. 05$)。下表同。

Data followed by different letters in the same column indicate significantly different at 0. 05 level by Tukey test. The same below.

表 2 草甘膦对苗期石远 321 棉花的影响

Table 2 Effects of glyphosate on Shiyuang321 cotton of seedling stage

稀释倍数 Dilution ratio	棉花株高 Height of cotton (cm)				开花率 Abloom rate (%)	结铃率 Bell rate (%)	果枝数 Branch number
	0 d	7 d	14 d	28 d			
CK	26. 7 ± 0. 47a	36. 8 ± 0. 49a	44. 4 ± 0. 58a	58. 4 ± 0. 58a	69. 3 ± 2. 70a	62. 7 ± 2. 10a	14. 0 ± 12. 80a
400	26. 8 ± 0. 39a	28. 7 ± 0. 42b	31. 8 ± 0. 43b	36. 0 ± 0. 53b	30. 0 ± 1. 90b	10. 0 ± 2. 20b	4. 8 ± 1. 70b
200	26. 2 ± 0. 48a	28. 2 ± 0. 42c	26. 3 ± 0. 30c	26. 1 ± 0. 34c	0c	0c	0c
100	26. 6 ± 0. 50a	27. 8 ± 0. 40c	25. 9 ± 0. 30c	25. 0 ± 0. 28c	0c	0c	0c
P	0. 774	0	0	0	0	0	0
f	0. 372	279. 7	1113. 3	3597. 6	395. 6	400. 3	803. 9
df	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56

表 3 草甘膦对出蕾期抗草甘膦棉花的影响

Table 3 Effects of glyphosate on glyphosate-resistant cotton of early-bolling stage

稀释倍数 Dilution ratio	棉花株高 Height of cotton (cm)				开花率 Abloom rate (%)	结铃率 Bell rate (%)	果枝数 Branch number
	0 d	7 d	14 d	28 d			
CK	58. 4 ± 0. 45a	77. 6 ± 1. 10a	96. 3 ± 0. 83a	127. 2 ± 0. 60a	69. 3 ± 2. 70a	62. 7 ± 2. 10a	13. 7 ± 0. 37a
400	57. 6 ± 0. 82a	75. 3 ± 2. 40a	94. 1 ± 2. 70a	122. 9 ± 4. 30a	48. 7 ± 1. 70b	44. 7 ± 1. 30b	13. 4 ± 0. 35a
200	56. 9 ± 1. 20a	74. 9 ± 2. 60a	93. 1 ± 3. 80a	122. 1 ± 5. 10a	32. 6 ± 1. 20c	28. 7 ± 1. 90c	13. 5 ± 0. 37a
100	56. 8 ± 1. 60a	74. 0 ± 3. 40a	93. 0 ± 3. 70a	122. 2 ± 5. 80a	30. 0 ± 1. 90c	27. 3 ± 2. 00c	13. 4 ± 0. 32a
P	0. 726	0. 779	0. 854	0. 789	0	0	0,719
f	0. 439	0365	0. 260	0. 351	87. 060	78. 430	0. 450
df	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56

2. 2. 2 转基因棉株不同部位对棉铃虫防治效果

双抗棉和双价棉的叶、蕾、花及铃对棉铃虫都有

较好的防治效果,尤其是苗期叶片对棉铃虫的防治效果最好,防治效果达到 88.2% 和 85.5%。随着棉花的生长,棉花生长后期防治效果下降,尤其是铃期下降比较明显,铃期蕾的防治效果 2 种棉

花分别为 43.2% 和 40.2%。但在吐絮期防治效果有所回升。花期以顶叶防治效果最好,其次依次为花瓣和蕾。相同生育期相同器官棉花的防治效果在 2 棉花品种之间无显著差异(表 4)。

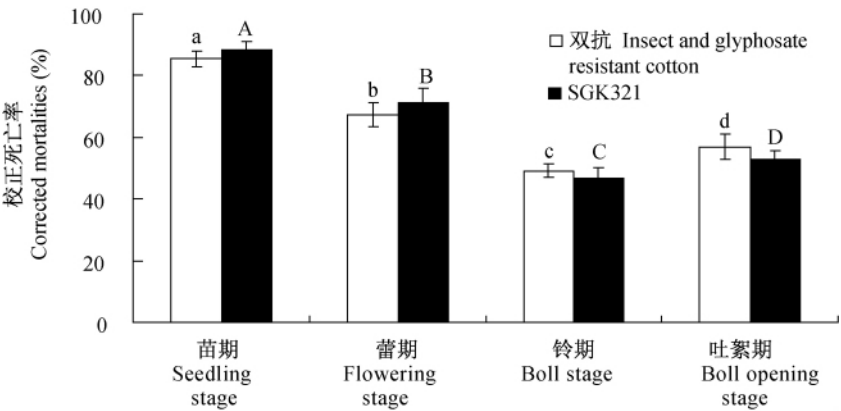


图 1 转基因棉花杀虫活性的时间动态

Fig. 1 Temporal dynamic of transgenic cottons on cotton bollworm larvae

注:同一品种不同字母表示经 Tukey 比较存在差异显著 ($P < 0.05$)。

Histograms in the same variety marked by different letters indicate significantly different at 0.05 level by Tukey test.

表 4 棉铃虫幼虫取食不同生长时期转基因棉花组织的校正死亡率

Table 4 Corrected mortalities of cotton bollworm larvae feeding on different transgenic cotton organs in different stage (%)

生长期及部位 Stage and organs	双抗棉 Insect and glyphosate resistance cotton	SGK321
苗期顶叶 Top leaves of seedling stage	85.5 ± 2.6 a	88.2 ± 2.9 a
花期顶叶 Top leaves of flowering stage	67.5 ± 3.9 a	71.4 ± 4.5 a
花期花瓣 Petals of flowering stage	57.5 ± 2.9 a	53.8 ± 3.8 a
花期蕾 Square of flowering stage	54.4 ± 2.6 a	51.8 ± 3.7 a
铃期顶叶 Top leaves of boll stage	49.2 ± 2.2 a	46.6 ± 3.5 a
铃期花瓣 Petals of boll stage	47.9 ± 3.2 a	49.2 ± 3.5 a
铃期蕾 Square of boll stage	43.2 ± 2.6 a	40.2 ± 3.2 a
铃期棉铃 Bolls of boll stage	44.1 ± 3.1 a	48.7 ± 2.9 a
吐絮期叶片 Top leaves of boll opening stage	57.0 ± 4.0 a	53.1 ± 2.7 a
吐絮期棉铃 Bolls of boll opening stage	50.6 ± 3.6 a	53.1 ± 3.2 a

2.2.3 转基因棉花对不同龄期棉铃虫的防治效果 2 种转基因棉花对不同龄期的棉铃虫幼虫都有较好的防治效果,棉铃虫被杀死或生长受到明显抑制,1~4 龄棉铃虫连续取食转基因棉花叶片后均不能正常生长和化蛹;5 龄幼虫取食后校正死亡率较低且部分可正常化蛹(表 5,6)。

表 5 转基因棉花对棉铃虫不同龄期幼虫体重的影响
Table 5 Effects of transgenic cottons on larvae weight of cotton bollworm

龄期 Instar	品种 Cultivars	初始平均体重 Initial average weight (mg)	6 d 后平均体重 Average weight of the sixth day (mg)	6 d 后体重/初始体重 Average weight of the sixth day/ Initial average weight
2	石远 321Shiyuan 321	3.19 ± 0.15a	43.7 ± 0.30a	13.7
	SGK321	3.05 ± 0.12a	16.1 ± 0.95b	5.3
	双抗棉 Insect and glyphosate resistance cotton	3.06 ± 0.12a	15.4 ± 0.82b	4.3
3	石远 321Shiyuan 321	25.3 ± 0.18a	116.8 ± 5.48a	4.6
	SGK321	25.3 ± 0.86a	50.6 ± 2.57b	2.0
	双抗棉 Insect and glyphosate resistance cotton	25.4 ± 0.13a	48.7 ± 2.27b	1.9
4	石远 321Shiyuan 321	88.2 ± 0.34a	145.9 ± 1.04a	1.7
	SGK321	87.0 ± 0.30a	89.2 ± 0.81b	1.0
	双抗棉 Insect and glyphosate resistance cotton	86.9 ± 0.34a	92.4 ± 1.18b	1.0
5	石远 321Shiyuan 321	105.1 ± 0.42a	220.3 ± 2.51* a	2.1
	SGK321	104.7 ± 0.54a	159.6 ± 2.37* b	1.5
	双抗棉 Insect and glyphosate resistance cotton	105.1 ± 0.43a	162.2 ± 3.06* b	1.5

注:* 表示蛹重。
Data followed by * indicate the weight of pupa.

表 6 转基因棉花对不同龄期幼虫的杀虫活性
Table 6 Insecticidal activities of transgenic cotton against different instar cotton bollworm

龄期 Instar	6 d 后校正死亡率(%) Corrected mortality of the sixth day (%)	
	SGK321	双抗棉 Insect and glyphosate resistance cotton
1	80.0 ± 2.2a	84.0 ± 1.9a
2	81.4 ± 3.3a	74.1 ± 6.1a
3	75.0 ± 3.3a	82.1 ± 3.3a
4	66.0 ± 4.4b	59.5 ± 3.3b
5	28.5 ± 6.6c	32.1 ± 6.1c

3 讨论

对草甘膦的耐受实验表明,中国农业科学院棉花研究所提供棉花品种对草甘膦具有较强的耐受性,尤其是四叶期喷施草甘膦对棉花的后期生

长无不良影响。蕾期喷施草甘膦以后抗草甘膦棉花的生长并没受到影响,但是开花率和结铃率受到一定的影响,进而影响了棉花的产量。
抗草甘膦棉花对草甘膦的抗性也存在时空变化特点,这与国内外的研究基本一致,草甘膦对转基因抗草甘膦棉花营养生长的影响甚小(Pline

et al., 2002), 但对生殖器官存在一定的影响, 尤其是现蕾后喷施草甘膦, 会影响花粉的活性, 造成棉铃的脱落或者棉铃的干瘪而影响棉花的减产 (Feng and Chiu, 2005; 董合忠和代建龙, 2007; 王秀丽, 2010)。

黄河流域棉区, 杂草发生高峰一般在 5 月上旬到 7 月上旬, 在棉花封顶前危害严重 (张玉聚等, 2000; 马小艳等, 2010)。喷施一定浓度的草甘膦可以较好的防治杂草的发生, 但草甘膦施入土壤后交容易分解, 对棉田后期杂草的防治效果较差 (张改英和徐恒玉, 2002; 李水清和叶森林, 2006)。结合田间草甘膦除草效果, 我们认为可在抗草甘膦棉花四叶期时用 41% 农达稀释 100~200 倍来防治田间杂草。四叶期后, 由于直接喷施草甘膦会使棉花的开花率和结铃率下降, 进而导致棉花产量的降低, 所以四叶期后喷施草甘膦的过程中应尽量采用定向喷施的方法避免草甘膦的漂移。

杀虫活性实验表明, 双抗棉和 SGK321 均具有较强的杀虫效果, 幼虫取食后发育迟缓、体重减轻、存活率下降。这一结果和国内外的研究基本一致 (孙长贵等, 2003; 熊格生等, 2006; 徐遥等, 2008)。双抗棉和 SGK321 对于防治棉田 2 代棉铃虫的发生具有较好的效果, 但生长后期杀虫效果下降, 在棉田生产中需要时刻监视田间动态。

参考文献 (References)

- Feng PC, Chiu T, 2005. Distribution of ^{14}C -glyphosate in mature glyphosate-resistant cotton from application to a single leaf or over-the-top spray. *Pest. Biochem. Physiol.*, 82:36—45.
- Pline WA, Wilcut JW, Edmisten KL, 2002. Reproductive abnormalities in glyphosate-resistant cotton caused by lower CP4 — EPSPS levels in the male reproductive tissue. *Weed. Sci.*, 50:438—447.
- 陈志贤, Danny JU, 范云六, 李淑君, 郭三堆, 焦改丽, 赵俊侠, 1994. 利用农杆菌介导法转移 *gfp* 基因获得可遗传的抗 2,4-D 棉株. *中国农业科学*, 27(2):31—37.
- 董合忠, 代建龙, 2007. 转基因抗草甘膦棉花及其对草甘膦抗性的时空表达. *中国农学通报*, 23(2):355—362.
- 郭三堆, 张秀梅, 崔洪志, 徐琼芳, 倪万潮, 张震林, 张保龙, 许英俊, 1999. 抗蚜虫兼抗除草剂的转基因棉花研究. *云南农业大学学报*, 21:127—128.
- James C, 2012. 2011 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势. *中国生物工程杂志*, 32(1):1—14.
- 贾云超, 2008. 转抗虫、抗除草剂烟草和棉花的研究. 硕士学位论文. 新疆:新疆农业大学.
- 李儒海, 武怀恒, 褚世海, 万鹏, 黄民松, 吴金萍, 2010. 转基因抗草甘膦棉花与常规棉花对草甘膦耐受性的比较研究. *中国棉花*, 37(12):9—11.
- 李水清, 叶森林, 2006. 草甘膦在土壤中的残留动态研究. *长江大学学报 (自然科学版)*, 2:123—125.
- 马小艳, 马艳, 彭军, 2010. 我国棉田杂草研究现状与发展趋势. *棉花学报*, 22(4):372—380.
- 孙长贵, 张青文, 徐静, 王因霞, 刘俊丽, 2003. 转基因棉田和转双价基因棉对棉田主要害虫及其天敌种群动态的影响. *昆虫学报*, 46(6):705—712.
- 王秀丽, 王留明, 王家宝, 杨静, 陈莹, 高明伟, 赵军胜, 2010. 除草剂造成转基因抗除草剂棉花雄性不育的初步探讨. *中国棉花*, 37(7):18—19.
- 吴家和, 陈志贤, 李淑君, 李燕娥, 焦改丽, 罗晓莉, 1999. 转基因棉花各组织器官对棉铃虫抗性的研究. *棉花学报*, 11(4):222—223.
- 夏兰芹, 徐琼芳, 郭三堆, 2005. 抗虫棉生长发育过程中杀虫基因及其表达的变化. *作物学报*, 31(2):197—202.
- 熊格生, 唐海明, 陈金湘, 2006. 中国转基因抗虫棉的研究利用现状及发展对策. *中国农学通报*, 22(5):192—196.
- 徐遥, 丁瑞丰, 李号宾, 刘建, 吴孔明, 陈学新, 2008. 转 Bt 基因棉花国抗 62 对棉铃虫生长发育的影响及田间抗虫效果. *昆虫学报*, 51(2):222—226.
- 张改英, 徐恒玉, 2002. 棉田化学除草剂的应用. *河南农业科学*, 4:25.
- 张永军, 吴孔明, 彭于发, 郭予元, 2002. 转基因植物的生态风险. *生态学报*, 22(11):1953—1959.
- 张玉聚, 孙化田, 王春生, 2000. 除草剂及其混用与农田杂草化学防治. 北京:中国农业科技出版社. 336—339.
- 赵福永, 谢龙旭, 田颖川, 徐培林, 2005. 抗草甘膦基因 *aroAM12* 及抗虫基因 *Bt1m* 的转基因棉株. *作物学报*, 31(1):108—113.
- 祝水金, 汪静儿, 俞志华, 季道藩, 2003. 棉花抗草甘膦突变体筛选及其在杂种优势利用中的应用. *棉花学报*, 15(4):227—230.