

PERDAS NA GERMINAÇÃO DE HÍBRIDOS DE MILHO: PARÂMETROS E PREDIÇÃO DE VALORES GENÉTICOS EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO

Gustavo de Freitas Mafort¹, Samuel Ferreira Ribeiro¹, Ismael Nacarati da Silva², Daniela Vasconcelos Bona², João Felipe de Brites Senra², Tafarel Victor Colodetti², Wagner Nunes Rodrigues²

¹Centro Universitário Unifacig, Campus Alfa Sul, Rua Darcy César de Oliveira Leite, 600, Alfa Sul - 36904-219 - Manhuaçu-MG, Brasil, 2210274@sempre.unifacig.edu.br, 2210064@sempre.unifacig.edu.br.

²Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Sul, Rod. João Domingo Zago, km 2,5, Pacotuba - 29323-000 - Cachoeiro de Itapemirim-ES, Brasil, ismael.silva@incaper.es.gov.br, daniela.bona@incaper.es.gov.br, joao.senra@incaper.es.gov.br, tafarel.colodetti@incaper.es.gov.br, wagner.rodrigues@incaper.es.gov.br.

Resumo

O presente estudo tem como objetivo comparar o desempenho germinativo de híbridos de milho, avaliados em dois ambientes contrastantes quanto à presença ou ausência de alumínio trocável, aplicando modelos mistos para predição de valores genéticos, buscando quantificar perdas causadas pelo efeito do alumínio e identificar genótipos superiores quanto à resiliência ao estresse por alumínio. O experimento foi conduzido com sete híbridos simples de milho sujeitos a germinação sob duas condições contrastantes de alumínio trocável (ausência e presença de Al^{3+}). Foram avaliados parâmetros germinativos de sementes e aplicados modelos mistos para estimativas de componentes de variância, parâmetros genéticos e predição de efeitos genéticos. Os resultados demonstraram que a presença de alumínio no ambiente de germinação modulou significativamente os parâmetros de germinação dos híbridos de milho, alterando a contribuição da variabilidade genética e ambiental na determinação fenotípica. Dessa forma, o desempenho germinativo dos híbridos não mantém o mesmo padrão nas duas condições avaliadas. A quantificação de perdas empregando os valores genéticos preditos permitiu identificar diferentes padrões de desempenho entre os híbridos. A presença de Al^{3+} durante a germinação causou perdas expressivas para a maioria dos híbridos, com destaque para P4285VYHR, o qual apresentou uma maior tolerância relativa ao alumínio entre o grupo avaliado. Esses resultados evidenciam a importância da interação genótipo $\times$ ambiente e fornecem informações importantes para estudos buscando a avaliação precoce da sensibilidade ou tolerância ao Al^{3+} .

Palavras-chave: Estresse abiótico. Toxicidade. *Zea mays*.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias.

Introdução

A cultura do milho (*Zea mays* L.) assume papel de destaque na produção agropecuária global. O cereal pode ser aproveitado no consumo humano *in natura* e processado, como ingrediente fundamental na base de rações animais ou matéria-prima na indústria de biocombustíveis (Miranda, 2018). No Brasil, o milho ocupa posição em destaque, devido ao seu potencial produtivo e versatilidade em seu cultivo e aproveitamento, além de possuir distribuição em diversos ambientes, com diferentes sistemas de tecnologia, atendendo de grandes produtores e indústrias a pequenos, como os de agricultura familiar (CONAB, 2024). Apesar disso, a expansão e intensificação da produção devem considerar os limites ambientais. Mesmo com sua relevância econômica e distribuição geográfica, o seu cultivo enfrenta desafios impostos pela ocorrência de condições adversas, como a ocorrência de solos ácidos e a toxidez por alumínio, que comprometem a produtividade.

A toxicidade por alumínio trocável (Al^{3+}) é considerada um desafio agrônômico substancial em solos ácidos, notadamente em regiões tropicais e subtropicais, onde os solos são mais intemperizados e a disponibilidade desse metal é elevada, impactando o desenvolvimento radicular das plantas

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

(Guimarães *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2022; Richard *et al.*, 2015). A germinação de sementes é uma etapa crítica para o estabelecimento da cultura, sendo um estágio particularmente sensível à presença de Al^{3+} , que pode interferir na divisão celular do meristema e inibir a elongação da radícula, resultando em raízes curtas, espessas e deformadas e, conseqüentemente, comprometendo a absorção de nutrientes e água (Guimarães *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2022). Essa condição tem levado os programas de melhoramento a tentativas de desenvolvimento de híbridos de milho com tolerância ao alumínio tóxico, explorando mecanismos fisiológicos e genéticos envolvidos na detoxificação ou exclusão de Al^{3+} das células da raiz (Coelho *et al.*, 2019; Guimarães *et al.*, 2014; Matonyei *et al.*, 2020).

O presente estudo tem como objetivo comparar o desempenho germinativo de híbridos de milho, avaliados em dois ambientes contrastantes quanto à presença ou ausência de alumínio trocável, aplicando modelos mistos para predição de valores genéticos, buscando quantificar perdas causadas pelo efeito do alumínio e identificar genótipos superiores quanto à resiliência ao estresse por alumínio, considerando atributos relacionados ao processo de germinação de sementes.

Metodologia

O experimento foi conduzido com sete híbridos simples de milho (*Zea mays* L.), lançados por programas de melhoramento de diferentes institutos: AG8701PRO4, AS1868PRO4, BM855PRO2, ExtendaxRR2, P40537PWU, P4285VYHR e SS204EVIP3. Os híbridos foram avaliados em duas condições contrastantes: (i) ambiente controle com ausência de alumínio; (ii) ambiente com estresse pela presença de alumínio trocável.

Amostras de sementes de cada híbrido foram incubadas para germinação em folhas de papel *germitest*, umedecidas com água destilada ou com uma solução aquosa de cloreto de alumínio ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$), de concentração correspondente a $1,0 \text{ cmol}_e/\text{dm}^3$, de acordo com o tratamento.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com seis repetições e cada repetição composta por amostras de 25 sementes. As amostras foram incubadas em câmara de germinação (tipo *B.O.D.*), a temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de oito horas, ao longo de um período de sete dias.

Foram mensuradas variáveis relacionadas à germinação e ao crescimento inicial das plântulas. Determinou-se a porcentagem de germinação (PG%), pela proporção de sementes que germinaram até o final do período experimental. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo a metodologia de Maguire (1962), sendo um indicador da rapidez com que as sementes germinaram e de seu vigor (Ranal; Santana, 2006). O comprimento da plântula (CMP) foi medido do ápice da raiz ao coleóptilo. Por fim, a razão entre crescimento da radícula e do coleóptilo (R/C) foi calculada como um indicador da alocação de recursos pela plântula, sendo um parâmetro frequentemente utilizado para avaliar a tolerância ao alumínio, já que a toxicidade impacta diretamente o desenvolvimento radicular (Du *et al.*, 2020; Richard *et al.*, 2015).

As análises foram conduzidas no software R-Studio (R Core Team, 2021), utilizando o pacote *sommer* (Covarrubias-Pazaran, 2016) para estimar os valores genotípicos preditos pelo modelo linear misto descrito por $y = Xm + Zg + Wa + T(ga) + \varepsilon$, onde y é o vetor de dados; m é o vetor correspondente à média geral (assumida como fixa); g é o vetor de efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios); a é o vetor de efeitos de ambiente (assumidos como fixos); (ga) é o vetor de efeitos da interação genótipo $\times$ ambiente (assumidos como aleatórios); e ε é o vetor de resíduos (assumidos como aleatórios); X , Z , W e T representam as matrizes de incidência para esses efeitos.

A significância dos efeitos aleatórios foi determinada por meio do teste de razão de verossimilhanças (LRT), comparando o ajuste de pares de modelos estatísticos aninhados, sendo um modelo completo (incluindo o efeito aleatório a ser testado) e um modelo reduzido (sem o efeito aleatório testado) (Luke, 2017; Mathias *et al.*, 2003).

Foi realizada a análise de *deviance* para medir a qualidade do ajuste do modelo estatístico aos dados observados, sendo uma estratégia comumente utilizada em modelos lineares generalizados e modelos mistos (Williams, 1987). A significância dos efeitos foi testada pelo teste de qui-quadrado, com graus de liberdade iguais a um (diferença de parâmetros entre modelos). Subsequentemente, os componentes de variância foram empregados para estimar parâmetros genéticos.

O desempenho genotípico foi estimado usando os melhores preditores lineares não enviesados (BLUP), ajustados dos efeitos fixos e aleatórios incluídos no modelo, levando a uma predição mais

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

precisa do desempenho genotípico. As médias preditas foram usadas para análise de ganhos e perdas em função do contraste entre as condições de Al^{3+} .

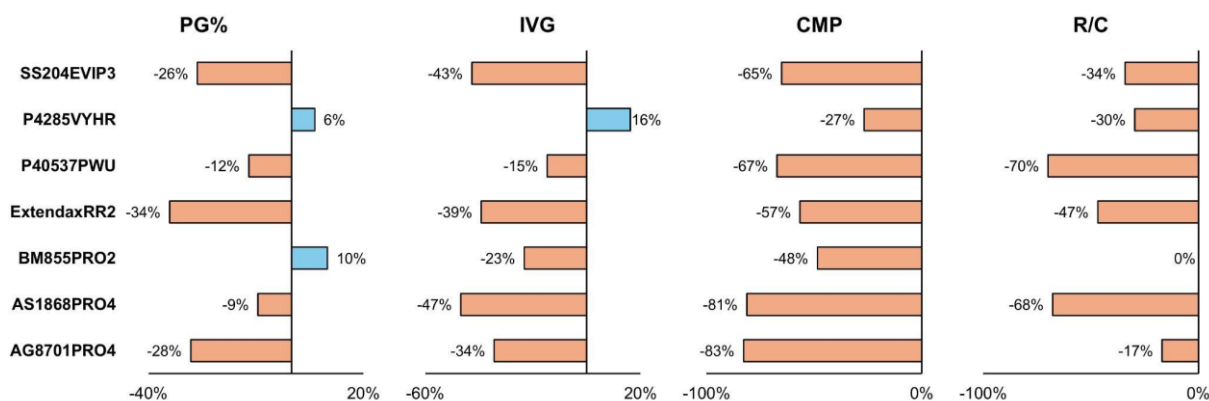
Resultados

Através da análise de *deviance*, observou-se a significância dos efeitos genotípicos para todas as variáveis, assim como para o efeito da interação do genótipo com o ambiente. Houve comportamento diferenciado para os parâmetros genéticos em função da modulação do ambiente pela presença ou ausência de Al^{3+} . Na condição de ausência desse elemento, notou-se maior predominância da variação genotípica (CV_g) sobre a variação ambiental (CV_e) para PG%, CMP e R/C, o que resultou em coeficiente de variação relativo (CV_r) maior do que um para as referidas variáveis. Tal comportamento indica a superioridade da variância genética (V_g) na definição da expressão do fenótipo, sobretudo para o CMP e R/C, com valores de CV_r de 1,88 e 1,36, respectivamente. A herdabilidade em sentido amplo (H^2) seguiu o mesmo comportamento, indicando a maior proporção da expressão do fenótipo pelo efeito genotípico para o CMP (0,78), enquanto o menor H^2 foi observado para o IVG (0,46).

Quando o ambiente foi modulado pela presença de Al^{3+} , o maior CV_r também foi observado para o CMP (1,82), porém, houve modificação do comportamento para o IVG, com maior predominância da CV_g sobre a CV_e , com CV_r de 1,55. Esse resultado indica que a V_g dos híbridos de milho estudados foi fundamental para a expressão do fenótipo em ambientes com restrições causadas pela presença desse elemento tóxico, sobretudo para o IVG. Já para a R/C, foi observado menor CV_r com a presença (0,93) do que na ausência (1,36) de alumínio, o que indica maior efeito do ambiente restritivo causado pelo Al^{3+} sobre a R/C. Além disso, a PG% exibiu uma H^2 18,7% menor no ambiente com alumínio (0,41) em relação à ausência (0,50). Esse mesmo comportamento pôde ser observado para o R/C, com diminuição ainda mais expressiva, com uma H^2 28,5% menor. A acurácia seletiva, por sua vez, manteve-se consistentemente elevada, variando de 0,91 a 0,98 na ausência e de 0,90 a 0,98 com a presença de alumínio.

Os valores preditos de PG% dos genótipos ExtendaxRR2, AG8701PRO4, SS204EVIP3, P40537PWU e AS1868PRO4 apresentaram perdas relativas de 34%, 28%, 26%, 12% e 9%, respectivamente em função da presença de Al^{3+} no meio de germinação. Em contrapartida, os genótipos BM855PRO2 e P4285VYHR apresentaram ganhos na PG% de 10% e 6%, respectivamente, com a presença de alumínio (Figura 1).

Figura 1 - Estimativas de perdas e ganhos para valores preditos de porcentagem de germinação (PG%), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da plântula (CMP) e razão entre crescimento da radícula e do coleóptilo (R/C) de sete híbridos de milho, pelo efeito da presença de Al^{3+} .



Fonte: os autores.

Para o IVG, os valores preditos dos genótipos AS1868PRO4, SS204EVIP3, ExtendaxRR2, AG8701PRO4, BM855PRO2 e P40537PWU, quando havia alumínio no ambiente, apresentaram perdas de 47%, 43%, 39%, 34%, 23% e 15%, respectivamente. Apenas para o genótipo P4285VYHR houve ganho no IVG com a presença de alumínio (16%). Todos os genótipos apresentaram perdas no CMP em função da presença de alumínio, com destaque para o AG8701PRO4 e AS1868PRO4 com

as perdas mais expressivas (83% e 81%) e para o P4285VYHR com a menor perda (27%). A presença de alumínio também ocasionou perdas na R/C de quase a totalidade dos genótipos, com as maiores perdas chegando a 70% e 68% (P40537PWU e AS1868PRO4). No entanto, o genótipo BM855PRO2 foi indiferente para a R/C em função da modulação do ambiente pelo alumínio (Figura 1).

Discussão

Os resultados de significância dos efeitos genotípicos para todas as variáveis, assim como para o efeito da interação do genótipo com o ambiente, demonstram a existência de variabilidade genética entre os híbridos de milho em relação à resposta ao alumínio já durante a germinação, um pré-requisito fundamental para a identificação e seleção de genótipos com maior nível de tolerância (Supraja *et al.*, 2019; Badu-Apraku *et al.*, 2021). A significância da interação indica que o desempenho dos genótipos variou consideravelmente entre os dois ambientes, o que demonstra que a presença do Al^{3+} criou um padrão de resposta diferente daquele observado na condição sem esse estresse. Dessa forma, ressalta-se a possibilidade de seleção precoce de genótipos com possível tolerância, o que pode beneficiar a recomendação de cultivares para regiões com solos ácidos (Conceição; Doerr; Neto, 2010).

Os resultados de H^2 da PG% sendo 18,7% menor no ambiente com alumínio em relação à ausência evidenciam que a germinação sob estresse pode se tornar mais suscetível a fatores ambientais não controlados ou que a expressão genética para essa característica pode ser mais complexa sob estresse (Gumze *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015). O conhecimento sobre a expressão dos parâmetros genéticos de genótipos em função das condições do ambiente (*e.g.*, presença e ausência de alumínio) é fundamental para os programas de melhoramento genético do milho, principalmente ao visar a tolerância a estresses abióticos (Conceição; Doerr; Neto, 2010). A existência de variabilidade genética entre genótipos de milho em resposta à toxicidade por alumínio é amplamente reconhecida (Mariano; Keltjens, 2004; Richard *et al.*, 2015).

A comparação direta entre os dois cenários sugere que a presença do alumínio impacta negativamente a herdabilidade da PG% e R/C, mas eleva ou mantém estáveis os valores de IVG e CMP. Esse padrão pode estar associado a alterações no controle genético e na magnitude das interações genótipo-ambiente ($G \times A$), influenciando a expressão fenotípica dos caracteres (Coelho *et al.*, 2019).

A estimativa dos valores genotípicos preditos, utilizando o método BLUP, é uma ferramenta eficaz em programas de melhoramento para a predição acurada de valores genéticos em diversas características, especialmente em análises multiambientais e na presença de variabilidade entre genótipos, inclusive em trabalhos com milho (Oliveira *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021).

A avaliação da performance de híbridos de milho através de BLUPs permite identificar genótipos superiores, auxiliando na seleção de materiais em condições diversas (Oliveira *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021). A modificação do ambiente foi capaz de alterar a expressão fenotípica das características avaliadas e a posição dos genótipos, o que é esperado em condições de estresse devido aos efeitos da interação genótipo $\times$ ambiente (Ertiro *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2019).

De modo geral e com base nos valores preditos para as variáveis analisadas, destaca-se a superioridade do genótipo ExtendaxRR2 no ambiente com ausência de alumínio e o genótipo P4285VYHR na presença de alumínio.

Conclusão

A presença de alumínio no ambiente de germinação modulou significativamente os parâmetros de germinação dos híbridos de milho, alterando a contribuição da variabilidade genética e ambiental na determinação fenotípica. Dessa forma, o desempenho germinativo dos híbridos não mantém o mesmo padrão nas duas condições avaliadas.

A quantificação de perdas empregando os valores genéticos preditos permitiu identificar diferentes padrões de desempenho entre os híbridos. A presença de Al^{3+} durante a germinação causou perdas expressivas para a maioria dos híbridos, com destaque para P4285VYHR, o qual apresentou uma maior tolerância relativa ao alumínio entre o grupo avaliado.

Esses resultados evidenciam a importância da interação genótipo × ambiente e fornecem informações importantes para estudos buscando a avaliação precoce da sensibilidade ou tolerância ao Al³⁺.

Referências

- BADU-APRAKU, B. *et al.* Genetic diversity and population structure of early and extra-early maturing maize germplasm adapted to sub-Saharan Africa. **BMC Plant Biology**, Londres, v. 21, n. 96, p. 1-15, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02829-6>. Acesso em: 21 ago. 2025.
- COELHO, C. J. *et al.* Genetic control of aluminum tolerance in tropical maize germplasm. **Bragantia**, Campinas, v. 78, n. 1, p. 71-81, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017396>. Acesso em: 21 ago. 2025.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Safra 2023/24 – Décimo levantamento**. Brasília, DF: Conab, 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>. Acesso em: 21 ago. 2025.
- CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; DOERR, L. M. W.; NETO, J. F. B. Seleção para tolerância ao alumínio em milho com base em parâmetros genéticos e análise multivariada. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 807-814, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0006-87052010000400005>. Acesso em: 21 ago. 2025.
- COVARRUBIAS-PAZARAN, G. Genome-assisted prediction of quantitative traits using the R package Sommer. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. e0156744, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156744>. Acesso em: 21 ago. 2025.
- DU, H. *et al.* A Maize ZmAT6 gene confers aluminum tolerance via reactive oxygen species scavenging. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 11, p. 1-12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01016>. Acesso em: 21 ago. 2025.
- ERTIRO, B. T. *et al.* Genetic dissection of grain yield and agronomic traits in maize under optimum and low-nitrogen stressed environments. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 2, p. 543, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21020543>. Acesso em: 21 ago. 2025.
- GUIMARÃES, C. T. *et al.* Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. **BMC Genomics**, Londres, v. 15, n. 153, p. 1-14, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-153>. Acesso em: 21 ago. 2025.
- GUMZE, A. *et al.* Aluminium toxicity in maize hybrids during germination. **Cereal Research Communications**, Budapeste, v. 35, n. 2, p. 421-422, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1556/crc.35.2007.2.64>. Acesso em: 21 ago. 2025.
- LIU, H. *et al.* Aluminum stress signaling, response, and adaptive mechanisms in plants. **Plant Signaling & Behavior**, Oxfordshire, v. 17, n. 1, p. e2057060, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2057060>. Acesso em: 21 ago. 2025.
- LUKE, S. G. Evaluating significance in linear mixed-effects models in R. **Behavior Research Methods**, Califórnia, v. 49, n. 4, p. 1494-1502, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3758/s13428-016-0809-y>. Acesso em: 21 ago. 2025.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962. Disponível em: <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183x000200020033x>. Acesso em: 21 ago. 2025.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

MARIANO, E. D.; KELTJENS, W. G. Variation for aluminum resistance among maize genotypes evaluated with three screening methods. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Oxfordshire, v. 35, p. 2617-2637, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1081/lcss-200030412>. Acesso em: 21 ago. 2025.

MATHIAS, R. A. *et al.* Model comparison and the likelihood ratio test in segregation analysis. **Genetic Epidemiology**, Hoboken, v. 25, p. 382-383, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/gepi.10273>. Acesso em: 21 ago. 2025.

MATONYEI, T. *et al.* Aluminum tolerance mechanisms in Kenyan maize germplasm are independent from the citrate transporter ZmMATE1. **Scientific Reports**, Londres, v. 10, n. 1-10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64107-z>. Acesso em: 21 ago. 2025.

MIRANDA, R. A. Uma história de sucesso da civilização. **A Granja**, Porta Alegre, v. 74, n. 829, p. 24-27, 2018.

OLIVEIRA, G. H. F. *et al.* An accurate prediction of maize crosses using diallel analysis and best linear unbiased predictor (BLUP). **Chilean journal of agricultural research**, Santiago, v. 76, n. 3, p. 294-299, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4067/s0718-58392016000300005>. Acesso em: 21 ago. 2025.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 21 ago. 2025.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-84042006000100002>. Acesso em: 21 ago. 2025.

RICHARD, C. *et al.* Genotypic variation in seedling tolerance to aluminum toxicity in historical maize inbred lines of Zambia. **Agronomy**, Basel, v. 5, n. 2, p. 200-219, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy5020200>. Acesso em: 21 ago. 2025.

SUPRAJA, V. *et al.* Genetic variability and character association studies in maize (*Zea mays* L.) inbred lines. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Hyderabad, v. 8, n. 10, p. 646-656, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.810.073>. Acesso em: 21 ago. 2025.

WANG, L. *et al.* Physiological characterization of maize tolerance to low dose of aluminum, highlighted by promoted leaf growth. **Planta**, Heidelberg, v. 242, n. 6, p. 1391-1403, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2376-3>. Acesso em: 21 ago. 2025.

WILLIAMS, D. A. Generalized linear model diagnostics using the deviance and single case deletions. **Journal of the Royal Statistical Society Series C (Applied Statistics)**, Londres, v. 36, n. 2, p. 181-191, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/2347550>. Acesso em: 21 ago. 2025.

YUAN, Y. *et al.* Genome-wide association mapping and genomic prediction analyses reveal the genetic architecture of grain yield and flowering time under drought and heat stress conditions in maize. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 9, p. n. 1919, 1-15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01919>. Acesso em: 21 ago. 2025.

ZHANG, A. *et al.* Genomic prediction of the performance of hybrids and the combining abilities for line by tester trials in maize. **The Crop Journal**, Beijing, v. 10, n. 1, p. 109-116, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.04.007>. Acesso em: 21 ago. 2025.