成熟期地温对烟叶主要致香物质含量的影响

王佩[1],尤磊[2],刘朝科[1],罗维[1],李学冬[1],韩东恒[3],王国锋[3],柴冠群[2],武林[2]　(1.川渝中烟工业有限责任公司,四川成都 610017;2.河南农业大学烟草学院,河南郑州 450002;3.漯河市烟草公司舞阳县公司,河南漯河 462400)

摘要　[目的]为进一步认识土壤温度与烟叶质量风格特色形成的关系提供数据支撑。[方法]在人工控制条件下,研究成熟期地温变化对烟叶色素、多酚和西柏烷类化合物含量的影响。[结果]双层遮阳降温处理使上部烟叶色素含量降低28.1%,西柏烷类化合物含量升高16.6%,使中部烟叶色素、多酚含量分别降低20.3%、27.9%;双层覆膜增温处理使上部烟叶多酚和西柏烷类化合物含量分别降低35.9%、47.9%,使中部烟叶色素和多酚含量分别降低27.1%、35.9%,西柏烷类化合物含量升高40.1%;单层遮阳处理和单层覆膜处理对烟叶上述3种致香物质的含量影响不显著。[结论]成熟期地温对烟叶致香物质含量有明显影响。

关键词　烟叶;成熟期;地温;致香物质
中图分类号　S572　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　0517 - 6611(2014)20 - 06569 - 04

Effects of Soil Temperature on Tobacco Aroma Components at Maturity Stage

WANG Pei et al　(China Tobacco Chuanyu Industrial Co., LTD, Chengdu, Sichuan 610017)

Abstract　[Objective] The aim was to provide data support for further understanding the relationship between soil temperature and the style characteristic of tobacco leaves. [Method] The effects of soil temperature on tobacco leaf pigments, polyphenol and cembranoids compounds at maturity stage were studied under the condition of artificial control. [Result] Double-layer shading cooling treatment made pigment content in upper parts of leaves decrease 28.1%, and cembranoids compounds increase 16.6%, and made the contents of pigments and polyphenol in middle parts of leaves decrease 20.3% and 27.9% respectively; Warming with double-layer film mulching made the contents of polyphenol and cembranoids compounds in upper parts of leaves decrease 35.9% and 47.9% respectively, and made the contents of pigment and polyphenol in middle parts of leaves reduce 27.1% and 35.9% respectively, however, its cembranoids compounds content increased 40.1%; Single-layer shading or single-layer film mulching treatment had no obvious effects on these three aroma components contents mentioned above. [Conclusion] Soil temperature has significant effect on the content of aroma substance at tobacco maturity stage.

Key words　Tobacco leaves; Maturity stage; Soil temperature; Aroma components

烤烟质量和风格特色的形成与生态环境和栽培技术密切相关[1],栽培技术条件一定的情况下,各种生态因子对烟叶质量有不同程度的影响[2-5]。其中,温度对烟叶质量风格特色的影响尤为重要[6-7]。郭新辉等研究认为,烟草是喜温作物,在22~28 ℃下有利于烟叶内化学物质的积累和转化,从而提高烟叶香吃味[8]。杨恕良等研究表明,在各种生态因子对烟叶质量的影响中,平均气温所占比重最大,为总数的38.7%,>20 ℃的持续日数占总数的29%,其他都不到总数的10%[9];韦成才等研究表明,5~8月平均气温逐渐提升,总糖含量和还原糖含量将下降[10]。部分研究者认为,降低地温日变化有利于调节烟叶内部化学平衡并提高烟株根系活性[7,11]。为此,笔者在人工控制条件下,研究成熟期烟株根系集中区域土壤温度变化对烟叶香气物质的影响,为进一步认识土壤温度与烟叶质量风格特色形成的关系提供数据支撑和理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料　供试烟草品种为当地主栽烤烟品种中烟100;供试土壤为黄褐土,土壤pH 5.8,有机质含量12.5 g/kg,碱解氮含量83.8 mg/kg,速效磷(P_2O_5)含量17.1 mg/kg,速效钾(K_2O)含量207.5 mg/kg。

1.2　试验方法　试验于2012年在河南省舞阳县大棚温室内进行,5月10日移栽,株距0.5 m,行距1.2 m,施肥和田间管理措施同当地大田生产。在烟株打顶后,去除底脚叶露出垄体土,作如下温度处理:在烟株下部搭双层遮阳网,保证阳光不漏照到垄体土上,降低地温(T1);在烟株下部搭单层遮阳网,降低地温(T2);不作处理,阳光自然照射(T3,CK);垄体土覆盖单层黑色地膜增温(T4);垄体土覆盖双层黑色地膜增温(T5)。土壤成熟期各处理日均温分别为24.5、25.2、25.4、26.4、27.4 ℃。在中部叶和上部叶成熟时,取样分析各处理烟叶质体色素、多酚和西柏三烯二醇含量。每个处理3次重复,每重复20株。

土壤含水量对土壤温度影响较大,因此试验严格控制垄体水分含量,尽量保持各处理土壤含水量相同。烟株生长期间所需水分均采用人工浇水供给,在温室内设置一水池,蓄水备用,严禁用刚抽出的井水浇烟,而使垄体温度陡降。白天无雨时打开温室顶棚通风,使烟株尽可能生长在自然光照条件下。雨天和夜晚关闭温室顶棚,仅两头通风。

1.3　测定内容与方法

1.3.1　烟叶样品取样。在烟叶成熟采收当天,每个重复选6株烟,每株烟取4片叶,杀青后分析样品质体色素、多酚和西柏三烯二醇含量。

1.3.2　烟叶样品制备[12]。将新鲜烟叶样品置于105 ℃烘箱内,高温杀青15 min,80 ℃下干燥1 h,然后60 ℃下烘干至恒重。烘干的烟叶样品去主脉,粉碎过60目筛,密封于玻璃瓶内,4 ℃保存。

1.3.3　烟叶质体色素含量的测定。准确称取杀青样样品0.2 g(准确至0.000 1 g),转入25 ml试管中,用萃取剂(90%丙酮,用容量瓶取,体积准确)作为溶剂,室温下超声波萃取20 min,取适量萃取液用一次性无菌注射器经过0.45 μm微

基金项目　川渝中烟工业有限责任公司项目(120550)。
作者简介　王佩(1984 -),女,河南温县人,助理农艺师,硕士,从事烟草栽培生理工作。
收稿日期　2014-06-13

膜过滤器过滤,滤液装入 1.5 ml 棕色色谱瓶中,用液相色谱仪进行分析。

液相色谱仪系统包括 Waters515 泵、Waters2487 紫外可见光分光光度检测器、Empower 色谱工作站、Rheodyne7725i 型手动进样阀。

试剂:甲醇为 Sigma 公司生产的色谱纯试剂,异丙醇为 J. T. Baker 公司生产的色谱纯试剂;叶绿素 a、叶绿素 b 植物色素标准物由日本 WAKO 公司生产;β-胡萝卜素、β-阿朴-8'醛、BHT 等购于 Sigma 公司。

色谱柱 Waters Nova-Pak-C18(3.9 mm×150 mm,4 μm);柱温 30 ℃;检测波长 450 nm。流动相:A,异丙醇;B,乙腈+水(体积比80∶20)。梯度洗脱:100% B(0 min)→100% A(40 min)。柱流速 0.5 ml/min;平衡时间 6 min;进样量 10 μl。采用比较标样保留时间法定性,外标法定量[13]。

1.3.4 多酚化合物含量的测定。参照烟草行业标准 YC/T202-2006,采用液相色谱法对烤烟样品中绿原酸、莨菪亭和芸香苷含量进行测定。样品前处理:称取 100 mg 样品,准确至 0.1 mg,置于 50 ml 锥形瓶内,再准确加入 20 ml 50%(甲醇+水)溶液,40 kHz 频率超声提取 20 min,取约 2 ml 萃取液经 0.45 μm 水相滤膜过滤。

液相色谱仪系统包括 Waters515 泵、Waters2487 紫外可见光分光光度检测器、Empower 色谱工作站、Rheodyne7725i 型手动进样阀。

试剂:甲醇为 Sigma 公司生产;冰乙酸为天津北方公司生产;绿原酸为美国 Acros 公司生产;莨菪亭为美国 Acros 公司生产;芸香苷为德国 Augsburg 公司生产。

色谱柱 Waters Nova-Pak-C18(4.6× 250 mm,4 μm);柱温 30 ℃;检测波长 340 nm。流动相:A,水+甲醇+乙酸(体积比 88∶10∶2);B,水+甲醇+乙酸(体积比 10∶88∶2)。梯度洗脱:100% A(0 min)→20% A,80% B(30 min)。柱流速 1 ml/min;平衡时间 6 min;进样量 10 μl。采用比较标样保留时间法定性,外标法定量[14-16]。

1.3.5 西柏三烯二醇含量的测定。准确称取 100 mg 烟草样品,用 100 ml 二氯甲烷萃取剂浸提烟样 3 次,每次 2 s。3 次提取完成后,将含有提取物的溶剂过滤(滤纸内放无水硫酸钠 50 g)到平底烧瓶内,过滤漏斗、烧杯和滤纸均用二氯甲烷冲 3 次以上。然后将浸提液和洗液一起转移至旋转蒸发仪中,在 40 ℃下浓缩,最后移入 10 ml 琥珀色瓶中定容,置于 0 ℃暗处保存备测。检测时,移取提取浓缩物 2 ml,加入 1 ml 内标(含正十七烷醇和蔗糖八乙酸酯),再旋转蒸发,浓缩至 1 ml,采用气质联用分析仪并通过检索谱库(NIST08)确定成分。

GC 条件:色谱柱为 DB-5MSUI 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm i.d. ×0.25 μm d.f.);进样口温度为 250 ℃;程序升温:40 ℃保持 2 min,然后以 6 ℃/min 升温至 180 ℃保持 2 min,以 2 ℃/min 升温至 280 ℃保持 20 min;载气为高纯氦气,载气流速为恒流 0.8 ml/min;进样量为 1.0 μl,分流比为 15∶1。

MS 条件:传输线温度为 250 ℃;EI 离子源温度为 280 ℃;电离能量为 70 eV;质量数范围在 50~650 amu。通过保留时间定性物质,后积分各物质对应峰曲线与基线的面积,得出具体数值[17]。

2 结果与分析

2.1 成熟期地温对烟叶质体色素含量的影响

2.1.1 对上部叶质体色素含量的影响。由图 1 可知,成熟期地温对叶片中叶绿素和 β-胡萝卜素含量影响较大,降低地温可以减少这两种质体色素含量。双层遮阳处理(T1)显著降低了上部烟叶片中叶绿素和 β-胡萝卜素含量,与 T3(CK)相比,T1 处理叶绿素和 β-胡萝卜素含量分别降低了 19.9% 和 36.3%,而增加地温(T4 和 T5)对其影响不大。叶黄素含量受成熟期地温影响较小,各处理间差异不显著,曲线变化较为平缓。

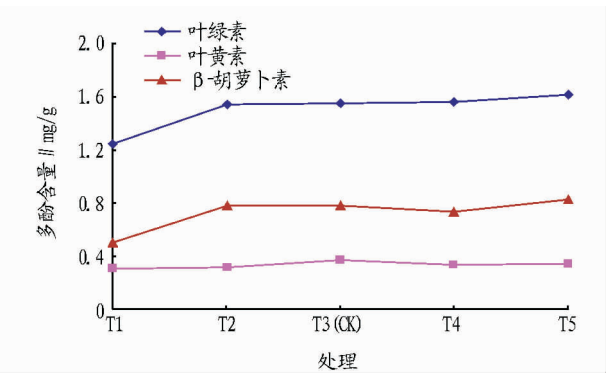

图 1 成熟期地温处理上部叶质体色素含量

2.1.2 对中部叶质体色素含量的影响。从图 2 可以看出,成熟期地温的变化对中部叶质体色素含量的影响与上部叶不同,遮阳降温处理和地膜覆盖增温处理均降低了中部烟叶片质体色素含量。与 T3(CK)相比,双层遮阳处理(T1)烟叶叶绿素、叶黄素和 β-胡萝卜素含量分别降低了 17.6%、23.0% 和 20.0%,单层遮阳处理(T2)烟叶叶绿素、叶黄素含量显著降低,其降低幅度分别为 13.1%、22.0%;双层覆膜处理(T5)烟叶叶绿素和 β-胡萝卜素含量显著降低,叶黄素含量极显著降低,其降幅分别是 20.5%、19.3%、41.5%;单层覆膜处理(T4)对中部叶质体色素含量降低幅度较小,未达到显著水平。

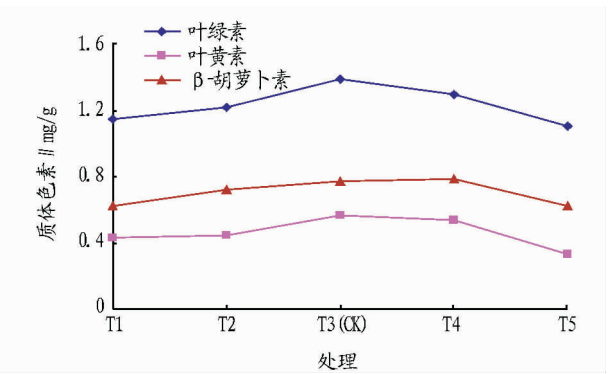

图 2 成熟期地温对中部叶质体色素含量的影响

2.2 成熟期地温对烟叶多酚化合物含量的影响

2.2.1 对上部叶多酚化合物含量的影响。从图 3 可以看出,绿原酸、芸香苷和总酚含量各处理间存在显著差异。其中,单层遮阳处理(T2)和双层覆膜处理(T5)对上部叶多酚

化合物影响最大。与 T3(CK)相比,T2 处理上部叶中绿原酸、多酚总量显著升高,其增加幅度分别为 28.7%、27.9%;而 T5 处理上部叶中绿原酸、芸香苷、多酚总量显著降低,其降低幅度分别为 33.2%、42.2%、35.9%。双层遮阳处理(T1)和单层覆膜处理(T4)对上部叶多酚化合物含量影响较小,未达到显著水平。

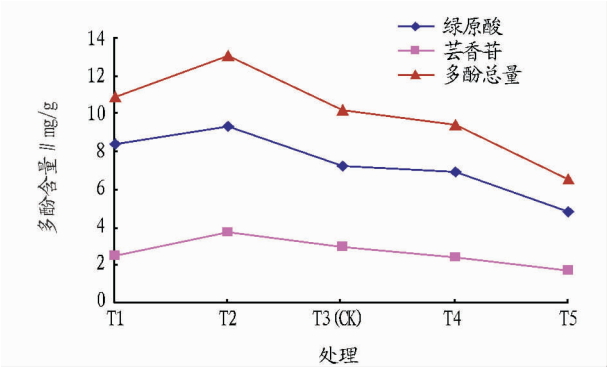

图 3　成熟期地温对上部叶多多酚物质含量的影响

2.2.2　对中部叶多酚化合物含量的影响。从图 4 可以看出,成熟期地温的变化对中部叶多酚物质含量的影响明显。与 T3(CK)相比,降低温度或升高温度均会降低叶片多酚化合物含量。其中,双层遮阳处理(T1)和双层覆膜处理(T5)对上部叶中多酚化合物影响最大其中,T1 处理上部叶中绿原酸、多酚总量显著降低,其降低幅度分别为 28.7%、27.9%;T5 处理上部叶中绿原酸、芸香苷、多酚总量也显著降低,其降低幅度分别为 33.2%、42.2%、35.9%。单层遮阳处理(T2)和单层覆膜处理(T4)对上部叶多酚化合物含量影响较小,未达到显著水平。

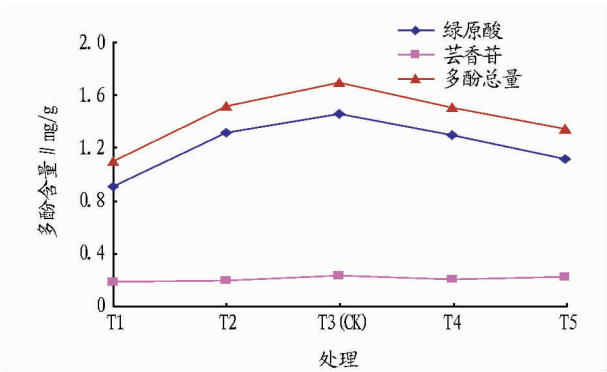

图 4　成熟期地温对中部叶多酚含量的影响

2.3　成熟期地温对烟叶西柏三烯二醇含量的影响

2.3.1　对上部叶西柏三烯二醇含量的影响。从图 5 可以看出,成熟期地温的变化对上部叶西柏三烯二醇含量影响明显,随着地温的升高,西柏三烯二醇含量呈下降趋势。与 T3(CK)相比,双层遮阳处理(T1)、单层遮阳处理(T2)和双层覆膜处理(T5)对上部叶中西柏三烯二醇含量影响较大。其中,T1 处理上部叶中 α-西柏三烯二醇含量、西柏烷类总量显著升高,其升高幅度分别为 17.9%、16.6%;T2 处理上部叶中 α-西柏三烯二醇含量显著升高,升幅为 16.3%;而 T5 处理上部叶中 α-西柏三烯二醇含量、β-西柏三烯二醇均极显著降低,其降低幅度分别为 43.4% 和 52.5%。单层覆膜处理(T4)对上部叶西柏三烯二醇含量影响较小,未达到显著水平。

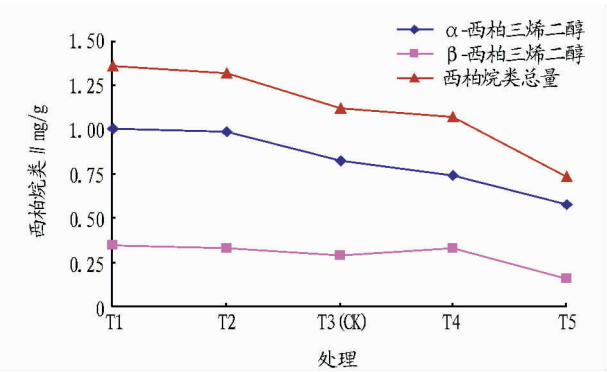

图 5　成熟期地温对上部叶西柏烷类含量的影响

2.3.2　对中部叶西柏三烯二醇含量的影响。从图 6 可以看出,成熟期地温的变化对中部叶西柏三烯二醇含量影响明显,随着地温的升高,西柏三烯二醇含量呈上升趋势。与 T3(CK)相比,单层覆膜处理(T4)和双层覆膜处理(T5)对中部叶中西柏三烯二醇含量影响较大。其中,T4 处理中部叶中 α-西柏三烯二醇含量显著升高,升幅为 17.0%;T5 处理上部叶中 α-西柏三烯二醇含量、β-西柏三烯二醇均极显著升高,其升高幅度分别为 38.7% 和 41.5%。双层遮阳处理(T1)、单层遮阳处理(T2)对中部叶西柏三烯二醇含量影响较小,未达到显著水平。

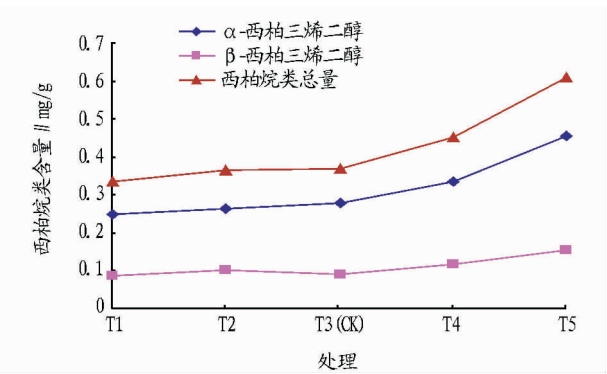

图 6　成熟期地温对中部叶西柏三烯二醇含量的影响

2.4　烟叶中性致香物质含量与地温间的关系分析

从表 1 可以看出,上部叶中色素类化合物与温度皆呈正相关,其中叶绿素含量与温度的相关性较高,中部叶中色素类化合物与温度皆呈负相关,但胡萝卜素与温度的相关性较弱。西柏三烯二醇含量与温度的相关性较强,其中上部叶中西柏三烯二醇含量与温度呈负相关,且两个指标与温度的相关性达到了显著水平,中部叶中西柏三烯二醇含量与温度呈正相关,且两个指标与温度的相关性达到了极显著水平。多酚化合物含量与温度的关系除中部叶中绿原酸含量与温度的变化呈较弱的正相关外,皆与温度的变化呈负相关,且上部叶中绿原酸含量和中部叶中莨菪亭含量与温度变化的相关性达到了显著水平。

3　讨论与结论

彭新辉等研究表明,温度的变化对烤烟质体色素的含量

有显著影响[8]。而温度的提升会使烟叶成熟期提前[17]。该研究发现,通过双层遮阳降低地温的处理降低了上部和中部叶中质体色素含量,通过降低地温导致烟株成熟度与对照组不同可能是导致质体色素的积累降低的原因,这与孟祥东等[18]的研究结果一致。而通过覆盖地膜处理使地温增加对上部叶中质体色素含量影响不大,但显著降低中部叶中色素含量。地温的增加可能导致了中部叶过分成熟,使得色素类化合物的合成能力降低。而由于地温增加的幅度对上部叶成熟度影响不大,导致上部叶中色素含量并没有下降的趋势。

表 1 烟叶中性致香物质含量与地温间的相关关系分析

叶位	叶黄素	叶绿素	胡萝卜素	a-西柏三烯二醇	β-西柏三烯二醇	绿原酸	莨菪亭	芸香苷
上部叶	0.46	0.67	0.6	-0.83*	-0.82*	-0.89*	-0.42	-0.66
中部叶	-0.23	-0.41	-0.04	0.96**	0.92**	0.33	-0.86*	-0.40

注:*、**分别表示相关性显著、极显著($P<0.05$、$P<0.01$)。

双层遮阳降低地温和覆盖地膜增温处理均会降低烟叶中绿原酸、芸香苷等酚类化合物含量,这与易娇[19]等的研究结果相反。成熟期单层遮阳,适度降低耕层土温度,有利于提高上部烟叶中酚类物质含量,这与 Koeppe 等[20]的研究结果一致。中部叶中酚类物质含量以对照为最高,其原因可能是改变了烟株温度对烟叶成熟度造成了影响[12],继而影响到了多酚类物质的积累。

成熟度对烟叶致香物质的积累有明显的影响[21]。唐远驹等试验表明,不同部位烟叶在不同成熟度香气物质的积累量不同[22]。该试验结果表明,通过增加地温,提高成熟期烟叶成熟度可以提高中部叶西柏三烯二醇含量,这与赵铭钦[23]等的研究结果一致。而上部叶西柏三烯二醇含量因为地温的升高而下降的原因还需要进一步进行研究。

参考文献

[1] 唐远驹,张建平. 上海主要烤烟生产基地质量生态类型的初步划分[J]. 中国烟草科学,2006(3):1-5.
[2] 戴冕. 我国主产烟区若干气象要素与烟叶化学成分关系初探[C]//广东省农科院. 戴冕烟草科技论文选集. 广州:广东科技出版社,1997:46-55.
[3] 温永琴,徐丽芬,陈宗瑜. 云南烤烟石油醚提取物和多酚类与气候要素的关系[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2002,28(2):103-105.
[4] 肖金香,刘正和,王燕. 气候生态因素对烤烟产量与品质的影响及植烟措施研究[J]. 中国生态农业学报,2003,11(4):158-160.
[5] 秦松,刘洪斌,王正银. 贵州植烟区气象因素对烤烟评吸质量的影响[J]. 中国农学通报,2006,22(6):375-378.
[6] 贾志红,易建华,孙在军. 不同覆盖物对烤烟根温及生长和生理特性的影响[J]. 应用生态学报,2006,17(11):2075-2078.
[7] 孙在军,易建华,刘建福,等. 双转光地膜对烟草生长与生理特性及地温的影响[J]. 中国生态农业学报,2008,16(1):155-159.
[8] 彭新辉,易建华,周清明. 气候对烤烟内在质量的影响研究进展[J]. 中国烟草科学,2009,30(1):68-72.
[9] 杨怒良,黄维玉,唐远驹,等. 贵州烤烟品质与气候关系的研究[J]. 农业气象,1987(2):7-10.
[10] 韦成才,马英明,艾绥龙,等. 陕南烤烟质量与气候关系研究[J]. 中国烟草科学,2004(3):38-41.
[11] 胡小曼,李佛琳,杨焕文,等. 覆盖对烟田土壤水热状况和烤烟生长及品质的影响[J]. 中国烟草科学,2011,32(5):34-38.
[12] 韩富根. 烟草化学[M]. 北京:中国农业出版社,2010.
[13] 田海英,韦凤杰,张东豫,等. RP-HPLC 法测定烟草中的质体色素[J]. 烟草科技,2009(4):32-36.
[14] 谢复炜,李木东,王瘁,等. YC/T202-2006. 烟草及烟草制品 多酚类化合物 绿原酸、莨菪亭和芸香苷的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2006.
[15] 张甜,董学畅,吴方评,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定烟草样品中 10 种多酚[J]. 分析化学,2005,33(3):359-362.
[16] 吴云平,潘文杰,李章海,等. 不同品种烤烟鲜叶表面提取物主要成分比较[J]. 中国农学通报,2011,27(2):353-359.
[17] 刘国顺. 烟草栽培[M]. 北京:中国农业出版社,2003:205-206.
[18] 孟祥东,赵铭钦,李元实,等. 耕作方式对成熟期烤烟质体色素及其降解产物含量的影响[J]. 西北植物学报,2010,30(8):1660-1666.
[19] KOEPPE D E,ROHRBAUGH L M,RICE E L,et al. Effects of age and chilling temperatures on the concentration of scopolin and affeoylquinic acids on tabacco[J]. Physiologia Plantarum,1970,23(2):258-266.
[20] 易娇. 烟草中有机酸和多酚的 HPLC 测定及烟草专用转光膜的应用研究[D]. 长沙:湖南师范大学,2006.
[21] 李广永. 提高白肋烟香气质和香气量的研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(13):3887-3888.
[22] 唐远驹,关经国. 烤烟不同叶龄叶片品质特性的研究:II 烤烟不同叶龄叶片香吃味的变化[J]. 中国烟草,1993(2):7-13.

(上接第 6559 页)

4 结论

苗龄、激素与遗传转化之间存在密切的联系。在农杆菌介导的油菜下胚轴预培养最佳条件是:4 d 苗龄的外植体在农杆菌侵染前进行 5 d 的预培养,预培养基:MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L。

参考文献

[1] 林良斌,官春云,李恂,等. Bt 毒蛋白基因导入甘蓝型油菜获得转基因植株[J]. 湖南农业大学学报,1999,25(5):357-360.
[2] TONY W,PETRL S,LIDLA T,et al. *Agrobacterium*-mediated transformation and stable expression of the green fluorescent protein in *Brassica* rape[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2003,41:773-778.
[3] 林呐,刘列钊,殷家明,等. 甘蓝型黄籽油菜自交系转化体系的建立[J]. 作物学报,2012,38(12):2185-2191.
[4] DOYLE J J,DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull,1987,19:11-15.
[5] 石淑稳,周永明,王新发. 影响油菜子叶外植体不定芽高频率再生的因素[J]. 西北植物学报,1998,18(4):477-482.
[6] 王艳,贺宾,曾幼玲,等. 甘蓝型油菜带柄子叶高频率再生植株的研究[J]. 油料作物学报,2004,26(4):86-90.
[7] 邹高治,葛扣麟,扬金水,等. 八倍体胜利油菜下胚轴和花粉愈伤组织的植株再生[J]. 遗传学报,1985,12(1):46-50.
[8] 蓝海燕,王长海,陈正华,等. 农杆菌介导法将 8-1,3-葡聚糖酶基因导入油菜的研究初报[J]. 中国油料作物学报,2000,22(1):6-10.
[9] 石淑稳,周永明,孙学成,等. 甘蓝型油菜遗传转化体系的研究[J]. 华中农业大学学报,1998,17(3):205-210.
[10] 陆万香,李名扬,裴炎,等. 玉米几丁质酶基因导入甘蓝型油菜的研究[J]. 西南农业大学学报,2001,23(2):130-133.
[11] 赵云,王海燕,王茂林,等. 基因型对油菜子叶外植体再生植株的影响[J]. 中国油料,1997,19(4):1-4.
[12] 许本波,张学昆,殷家明,等. 培养条件对甘蓝型黄籽油菜下胚轴的再生影响[J]. 中国油料作物学报,2003,25(4):23-26.
[13] 王艳,曾幼玲,张富春,等. 新疆甘蓝型油菜下胚轴的组织培养和植株再生研究[J]. 新疆农业科学,2005,42(1):24-28.
[14] 石淑稳,周永明. 甘蓝型油菜下胚轴培养和高频率芽再生技术的研究[J]. 中国油料作物学报,1998,20(2):1-6.