

**KETAHANAN BEBERAPA GALUR KACANG TANAH HASIL KULTUR  
IN VITRO TERHADAP PENYAKIT LAYU CENDAWAN *Fusarium sp***

**(RESISTANCE OF PEANUT CULTIVARS RESULTED IN VITRO CULTURE  
TO *FUSARIUM sp* INFECTION)**

**Sumarjan, A. Farid Hemon**

Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Mataram  
email: faridhemon\_1963@yahoo.com

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ketahanan beberapa galur kacang tanah hasil kultur in vitro terhadap penyakit layu *Fusarium sp*. Seleksi in vitro diawali dengan menginduksi embrio somatik (ES) dan variasi somaklonal kacang tanah cv. Lokal Bima. Seleksi in vitro untuk ketahanan terhadap penyakit layu fusarium dilakukan pada populasi ES dengan media selektif yang mengandung filtrat kultur *Fusarium sp*. Setelah dilakukan seleksi in vitro, diperoleh populasi ES yang insensitif terhadap media filtrat kultur. Embrio somatik insensitif ini dikecambahkan dan menghasilkan planlet. Planlet-planlet ini ditanam untuk memproduksi tanaman generasi R1 dan R2. Tanaman generasi R2 inilah yang akan dievaluasi ketahanannya terhadap penyakit layu cendawan *Fusarium sp*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kultur in vitro telah mampu meningkatkan ketahanan tanaman kacang tanah cv Lokal Bima dari rentan menjadi agak resisten terhadap penyakit layu cendawan *Fusarium sp*. Galur GFK 10 menunjukkan agak resisten terhadap infeksi cendawan *Fusarium sp* dan menghasilkan jumlah polong kering terbanyak 13.5 polong per tanaman dan polong kering terberat 786.5 g/1.1 m<sup>2</sup>.

Kata kunci: kultur in vitro, filtrat kultur fusarium, somaklon

**ABSTRACT**

*This research aimed to investigating resistance of peanut cultivars resulted in vitro culture to fusarium infection. The experiment was inisiated with induction of somatic embryos (SE) and somaclonal variation from peanut cv. Local Bima in MS medium containing Picloram. Medium of MS that added culture filtrate 30% was used as selective agent for resistance to fusarium. After in vitro selection will be gotten insensitive SEs population on culture filtrate medium, and insensitive SEs will be germinated to produce plantlets. Experiment had been done to produced R1 and R2 plant generationt. R2 plants generation had been evaluated resistance level of fusarium infection in Glass House and in farmer field. Result of the experiment showed that in vitro culture had increased peanut cv. Local Bima resistance from susceptible become moderate resistant to Fusarium infection. Peanut line GFK 10 showed moderate resisntant to Fusarium infection with more dry pod number 13.5 pod per plant and more dry pod weight 786.5 g/1.1 m<sup>2</sup>.*

*Key words: in vitro culture, fusarium culture filtrate, somaclone*

## PENDAHULUAN

Salah satu penyakit serius pada kacang tanah adalah penyakit layu yang disebabkan oleh *Fusarium* sp. Serangan cendawan fusarium dapat menyebabkan pengurangan hasil sampai mencapai 70% (Hartman *et al.*, 1995). Cendawan ini merupakan cendawan tertular tanah (*soil borne*) dan mampu bertahan hidup cukup lama di dalam tanah dan berkolonisasi. Usaha tani kacang tanah yang biasa dilakukan di lahan kering menyebabkan sulitnya diterapkan sistem pengairan, sehingga inokulum cendawan sulit dihilangkan pada usaha tani lahan kering, sehingga inokulum selalu berada sepanjang musim tanam. Serangan patogen ini dapat menyebabkan penurunan produksi dan gagal panen.

Penggunaan varietas resisten penyakit merupakan alternatif yang praktis dan ekonomis untuk meningkatkan daya hasil kacang tanah. Di Indonesia, tetua varietas kacang tanah yang tahan terhadap penyakit layu fusarium belum ada, sehingga persilangan konvensional dengan varietas-varietas lain yang berdaya hasil tinggi tidak dapat dilakukan. Oleh karena itu, penyediaan plasma nutfah kacang tanah yang memiliki sifat resisten terhadap penyakit layu fusarium menjadi sangat penting.

Upaya untuk mendapatkan plasma nutfah kacang tanah dapat dilakukan dengan meningkatkan variabilitas genetik tanaman melalui variasi somaklonal dan diikuti dengan seleksi *in vitro* (Karp, 1995 ; Matsumoto *et al.*, 1995).

Metode kultur jaringan yang efektif untuk menginduksi embrio somatik (ES) serta media selektif untuk menginduksi kondisi selektif merupakan persyaratan untuk menghasilkan variasi somaklonal. Kultur *in vitro* dan seleksi *in vitro* pada tingkat sel dan jaringan dengan agens penyeleksi diharapkan dapat diperoleh karakter yang diinginkan (Jain, 2001). Seleksi *in vitro* dapat dilakukan dengan menggunakan filtrat kultur *Fusarium* sp sebagai agens penyeleksi untuk mengidentifikasi sel atau jaringan tanaman kacang tanah yang tidak mati oleh filtrat kultur (Matsumoto *et al.*, 1995). Penelitian sebelumnya telah dilakukan untuk menyeleksi kalus embriogenik yang tahan terhadap filtrat kultur fusarium. Hasil penelitian tersebut juga telah diperoleh galur kacang tanah hasil seleksi *in vitro* dan galur-galur ini perlu diuji ketahanannya terhadap infeksi cendawan *Fusarium* sp. Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi ketahanan galur

kacang tanah hasil kultur *in vitro* terhadap penyakit layu *Fusarium* sp.

## METODELOGI PENELITIAN

### Induksi Kalus Embriogenik, Seleksi *In Vitro*, Regenerasi dan Produksi Tanaman Generasi R2

Poros embrio diisolasi dari benih kacang tanah dan digunakan sebagai sumber eksplan. Bagian leaflet dari poros embrio diisolasi dan digunakan sebagai eksplan untuk menginduksi pembentukan embrio somatik. Eksplan tersebut ditanam dalam media MS yang mengandung Pikloram. Kalus embriogenik dan embrio somatik yang didapat selanjutnya diisolasi dan ditanam kembali dalam media induksi yang masih segar selama 3-4 periode sub-kultur. Penanaman kalus embriogenik dan embrio somatik selama beberapa periode sub-kultur dilakukan untuk menginduksi variasi somaklonal diantara populasi embrio somatik.

Cendawan *Fusarium* sp diisolasi dari pertanaman kacang tanah di lapangan yang terinfeksi oleh cendawan *Fusarium* sp dan dibiakan pada media PDA. Kultur cendawan *Fusarium* sp disiapkan dengan menanam 2 potongan agar ( $\pm 1 \times 1 \text{ cm}^2$ ) dari koloni *Fusarium* sp ke dalam media MS cair. Kultur fusarium dibiarkan tumbuh pada suhu kamar selama 14 hari. Kultur fusarium selanjutnya disteril dengan menggunakan autoklaf dan selanjutnya ekstrak filtrat kultur fusarium dipisahkan dari massa meselium dengan proses penyaringan.

Media selektif yang mengandung filtrat kultur fusarium (toksin metabolit) untuk kegiatan seleksi *in vitro* disiapkan dengan mencampur filtrat kultur konsentrasi 30% dengan media MS (Murashige dan Skoog, 1962), yang telah diperkaya dengan Pikloram.

Seleksi *in vitro* dilakukan dengan meletakkan 5 eksplan kalus embriogenik, masing-masing dengan 8-10 ES/botol ditanam dalam media selektif filtrat kultur *fusarium* dan diinkubasikan dalam ruangan bersuhu 26°C dalam kondisi gelap. Total eksplan yang dievaluasi sebanyak 500 kalus embriogenik atau 4000 ES. Eksplan disub-kultur dua kali ke dalam media selektif yang masih segar selama periode tiga bulan. Kalus embriogenik dan ES yang insensitif diperbanyak dalam media MS-P16 tanpa filtrat kultur. Setelah diperbanyak, sebagian ES yang insensitif filtrat kultur dikecambahkan untuk membentuk planlet.

Planlet tanaman yang mampu tumbuh diregenerasikan menjadi tanaman R0. Populasi tanaman R0 ditanam dalam pot plastik berisi 9 kg campuran tanah dan pasir dan dipelihara di rumah kaca hingga panen. Benih R0:1 yang dipanen dari masing-masing tanaman R0 dalam percobaan sebelumnya ditanam untuk menghasilkan tanaman R1. Tanaman R1 ditumbuhkan hingga panen.

### **Evaluasi Galur-galur Kacang Tanah Hasil Seleksi In Vitro Terhadap Infeksi Cendawan *Fusarium sp***

Untuk mengetahui secara riil tingkat ketahanan beberapa galur kacang tanah hasil seleksi in vitro perlu dievaluasi resistensi galur kacang tanah terhadap infeksi cendawan *Fusarium sp*. Bahan tanaman yang digunakan dalam percobaan ini adalah populasi tanaman generasi R2 turunan dari R1 hasil seleksi in vitro pada media selektif filtrat kultur *Fusarium*. Selain itu, diuji juga populasi cv. Lokal Bima sebagai tanaman kontrol.

Untuk pengujian di rumah kaca, benih ditanam dalam pot ukuran 9 kg yang berisi media tanam. Media tanah disterilkan dengan disiram larutan formalin (30%), dibungkus plastik kedap udara, dan diinkubasikan selama 14 hari. Setelah 14 hari inkubasi, media tanam disiram dengan larutan pupuk cair dengan dosis 3-5 g pupuk NPK dalam 500 mL air. Setelah berbagai perlakuan tersebut, pot dengan media tanam siap untuk ditanami dengan benih kacang tanah yang diuji.

Biakan murni *Fusarium sp* disubkultur dalam PDA. Biakan murni *Fusarium* yang berumur 14 hari disuspensikan dalam air steril. Kerapatan konidia  $10^6$  konidia per mL suspensi. Suspensi ini siap digunakan sebagai inokulum.

Tanaman dipelihara dalam rumah kaca sampai panen. Tanaman yang telah berumur 14 hari setelah tanam diinokulasi dengan suspensi *Fusarium*. Inokulasi dilakukan dengan cara pangkal batang dilukai dengan pisau steril, dan kemudian disiram dengan suspensi *Fusarium* dengan kerapatan konidia  $10^6$  sebanyak 2 mL. Tanaman tetap dijaga kelembabannya sampai umur 2 minggu setelah inokulasi. Tanaman juga dijaga dari serangan hama dengan penyemprotan insektisida Confidor (0.25 ml/l) dan Kelthane (1 ml/l).

Pengamatan dilakukan pada gejala serangan (adanya bercak atau lesio yang berwarna coklat muda pada pangkal batang), jumlah dan persen tanaman hidup, dan pertumbuhan tanaman. Perhitungan intensitas penyakit dilakukan

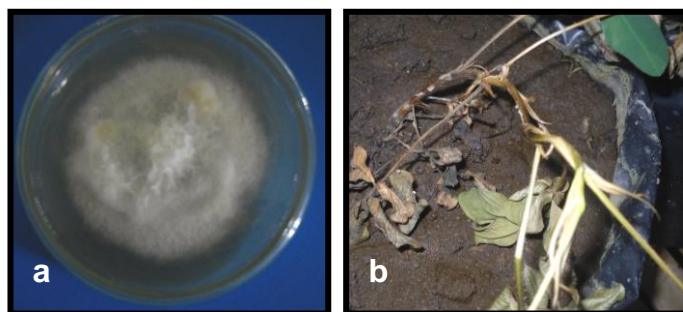
berdasarkan metode yang dikembangkan oleh Hemon & Rosario (1999).

Evaluasi lapang ketahanan populasi tanaman kacang tanah hasil seleksi in vitro terhadap infeksi *Fusarium* juga telah dilakukan. Percobaan ini bertujuan untuk menguji daya hasil beberapa galur harapan kacang tanah yang resisten terhadap *Fusarium sp*. Percobaan ini dilaksanakan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan perlakuan yaitu galur tanaman kacang tanah hasil seleksi in vitro. Masing-masing galur tanaman terdiri atas tiga ulangan. Parameter yang diamati tinggi tanaman, jumlah polong berisi, bobot polong kering, gejala penyakit *Fusarium*, dan persentase tanaman mati karena infeksi *Fusarium*.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Upaya untuk meningkatkan ketahanan tanaman kacang tanah terhadap penyakit layu *Fusarium* dapat dilakukan dengan induksi variasi simklonal dan diikuti dengan seleksi in vitro. Eksplan kalus embriogenik dan embrio somatik kacang tanah dari cv. Lokal Bima telah diseleksi dalam media selektif yang mengandung filtrat kultur *Fusarium* 30%. Hasil penelitian sebelumnya telah diperoleh ES yang resisten terhadap media selektif dan telah diregenerasikan menjadi planlet dan menghasilkan galur kacang tanah.

Galur kacang tanah generasi R2 hasil seleksi in vitro pada media selektif yang mengandung filtrat kultur *Fusarium* dievaluasi ketahanannya pada infeksi cendawan *Fusarium sp* di rumah kaca. Ketahanan galur kacang tanah terhadap *Fusarium sp* dihitung berdasarkan persentase tanaman layu (mati) setelah diinokulasi dengan biakan murni *Fusarium* (Gambar 1). Kacang tanah dapat diserang pada setiap stadium pertumbuhan, mulai dari benih, kecambah sampai tanaman dewasa. Serangan pada fase kecambah menyebabkan tanaman rebah kecambah karena pada pangkal batang terjadi pembusukan. Serangan pada tanaman dewasa menyebabkan lesio berwarna coklat pada batang, daun mulai gugur, terjadi pembusukan pada pangkal batang, satu dua cabang menjadi layu, dan akhirnya tanaman mati. Infeksi juga terjadi pada ginofor dan pembusukan pada polong (Agrios 1988 ; Backman & Brenneman 1997). Pertumbuhan dan ketahanan galur kacang tanah terhadap infeksi *Fusarium* dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 1. Biakan murni *Fusarium* sp dan tanaman layu (mati) karena infeksi *Fusarium*

Tabel 1. Pertumbuhan kacang tanah dan persentase tanaman layu (mati) setelah diinokulasi dengan biakan *Fusarium* sp. (pengamatan pada umur tanaman 60 hari setelah tanam di rumah kaca)

| Galur Tanaman | Tinggi Tanaman (cm) | Jumlah Daun | % Tanaman layu (mati) | Fenotipe Tanaman |
|---------------|---------------------|-------------|-----------------------|------------------|
| Lokal Bima    | 43.5 a              | 35.5 b      | 90                    | Rentan           |
| GFK1          | 61.3 c              | 40.4 bc     | 80                    | Rentan           |
| GFK2          | 53.6 b              | 46.8 c      | 90                    | Rentan           |
| GFK3          | 47.5 a              | 37.4 b      | 70                    | Agak Rentan      |
| GFK4          | 48.5 a              | 27.8 a      | 80.5                  | Rentan           |
| GFK5          | 62.4 c              | 45.4 c      | 30.5                  | Agak Resisten    |
| GFK6          | 66.4 d              | 40.4 bc     | 35                    | Agak Resisten    |
| GFK7          | 54.3 b              | 38.5 b      | 90                    | Rentan           |
| GFK8          | 60.4 c              | 40.8 bc     | 65.5                  | Agak Rentan      |
| GFK9          | 43.8 a              | 45.8 c      | 85.5                  | Rentan           |
| GFK10         | 65.5 d              | 50.4 d      | 45.5                  | Agak Resisten    |
| GFK11         | 56.8 b              | 45.8 c      | 90.5                  | Rentan           |
| GFK12         | 66.5 d              | 55.4 d      | 65.5                  | Agak Rentan      |
| GFK13         | 54.6 b              | 56.8 d      | 50.5                  | Agak Resisten    |
| GFK14         | 54.5 b              | 40.5 bc     | 85.5                  | Rentan           |
| GFK15         | 55.2 b              | 50.6 d      | 70.5                  | Agak Rentan      |

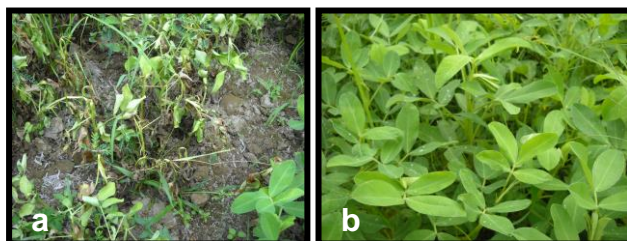
Keterangan : Angka pada kolom yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada  $\alpha = 5\%$ .

Intensitas penyakit = 0 – 29 % (resisten), 30 – 59% (agak resisten), 60 – 79% (agak rentan), dan 80 – 100% (rentan) (Hemon & Rosario 1999).

Dari Tabel 1 terlihat bahwa semua galur kacang tanah yang dihasilkan dari seleksi in vitro tidak ditemukan yang tahan terhadap infeksi cendawan *Fusarium*. Kisaran ketahanan berkisar dari rentan sampai agak tahan. Beberapa galur kacang tanah hasil seleksi in vitro yang sama rentan dengan tanaman standar adalah galur GFK 1, GFK 2, GFK 4, GFK 7, GFK 9, GFK 11, dan GFK 14. Galur kacang tanah hasil seleksi in vitro yang mempunyai tingkat ketahanan agak tahan yaitu GFK5, GFK6, GFK10, dan GFK13, dan galur-galur ini menghasilkan jumlah daun yang lebih banyak dibanding tanaman yang rentan.

Percobaan lain telah dilakukan untuk mengevaluasi ketahanan beberapa galur kacang

tanah hasil seleksi in vitro terhadap infeksi cendawan *Fusarium* di lapangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa populasi tanaman somaklon telah diserang pula oleh layu *Fusarium* (Gambar 2).



Gambar 2. Sebagian individu tanaman layu dan mati (a) dan tanaman sehat (b) pada penanaman di lapangan

Tabel 2. Pertumbuhan, hasil kacang tanah dan persentase tanaman layu (mati) pada percobaan di lapangan

| Galur Tanaman | TT (cm) | Jumlah polong per tanaman | Berat kering polong berisi per plot (g/1.1 m <sup>2</sup> ) | % Tanaman layu (mati) | Fenotipe tanaman |
|---------------|---------|---------------------------|---|-----------------------|------------------|
| Lokal Bima    | 78.5 *  | 7.4 a**                   | 455.5 ***   | 88,0                  | Rentan           |
| GFK1          | 83.5    | 7.0 a                     | 445.7   | 85,5                  | Rentan           |
| GFK2          | 85.3    | 8.5 b                     | 435.6   | 87,0                  | Rentan           |
| GFK3          | 80.4    | 9.0 b                     | 576.6   | 65,8                  | Agak Rentan      |
| GFK4          | 80.5    | 7.0 a                     | 534.5   | 70,5                  | Agak Rentan      |
| GFK5          | 79.5    | 11.5 c                    | 687.6   | 45,6                  | Agak Resisten    |
| GFK6          | 80.5    | 9.5 bc                    | 723.5   | 50,0                  | Agak Resisten    |
| GFK7          | 84.0    | 10.6 c                    | 657.8   | 40,5                  | Agak Resisten    |
| GFK8          | 75.5    | 8.5 b                     | 465.6   | 60,5                  | Agak Rentan      |
| GFK9          | 78.8    | 8.0 ab                    | 356.8   | 85,5                  | Rentan           |
| GFK10         | 80.3    | 13.5 d                    | 786.5   | 40,5                  | Agak Resisten    |
| GFK11         | 80.5    | 8.5 b                     | 565.0   | 70,5                  | Agak Rentan      |
| GFK12         | 85.9    | 8.5 b                     | 458.5   | 68,5                  | Agak Rentan      |
| GFK13         | 78.2    | 12.5 cd                   | 687.5   | 40,5                  | Agak Resisten    |
| GFK14         | 75.5    | 7.3 a                     | 725.0   | 50,5                  | Agak Resisten    |
| GFK15         | 75.3    | 8.3 b                     | 512.0   | 50,0                  | Agak Resisten    |

Keterangan: Angka pada kolom yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada  $\alpha = 5\%$ .

Keparahan penyakit = 0 – 29 % (resisten), 30 – 59% (agak resisten), 60 – 79% (agak rentan), dan 80 – 100% (rentan) (Hemon & Rosario 1999).

\* = Non signifikan, \*\*) signifikan, (\*\*\*) = Data tidak dianalisis, pengamatan dilakukan dengan cara ubinan

Pada Tabel 2 terlihat bahwa tinggi tanaman hasil seleksi in vitro tidak berbeda dengan tanaman standar (tanaman tanpa melalui seleksi in vitro). Sementara jumlah polong per tanaman berbeda antar galur dan cenderung lebih banyak dibanding tanaman standar. Tanaman kacang tanah hasil seleksi in vitro dalam media selektif yang mengandung filtrat kultur fusarium cenderung lebih tahan terhadap serangan fusarium dibanding tanaman standar. Namun demikian ada beberapa galur yang mendapat serangan dari fusarium sama dengan tanaman standar dan rentan pada infeksi fusarium. Akibat dari serangan fusarium, tanaman kacang tanah tidak mampu memberikan hasil yang maksimal, dan ada kecenderungan bahwa tingkat serangan yang lebih rendah memberikan berat polong kering yang lebih berat dibandingkan tanaman yang mengalamai serangan berat.

Tanaman tahan mampu untuk melawan serangan cendawan melalui mekanisme pertahanan yang sudah dimiliki oleh tanaman atau diinduksi ketika ada patogen yang menyerang tanaman (Hammond-Kosack dan Jones 1996). Walaupun tanaman dari seleksi in vitro ada yang mati karena infeksi *Fusarium*, namun umur tanaman dari awal

inokulasi sampai tanaman mati lebih panjang dibanding tanaman seleksi in vitro yang lain dan tanaman standar (Data tidak diperlihatkan). Mekanisme penundaan umur tanaman mati ada kaitannya dengan penghambatan infeksi atau invasi hifa ke sel yang lebih dalam, walaupun akhirnya tanaman akan mati. Menurut Dixon *et al.* (1994) mekanisme resistensi yang penting adalah dengan membentuk hambatan infeksi.

Pada pengamatan di lapangan ternyata tingkat serangan patogen yang lebih tinggi menyebabkan jumlah polong dan berat kering polong menjadi rendah. Tanaman standar serta galur rentan diduga tidak mempunyai mekanisme untuk melawan infeksi cendawan. Efektifitas patogenisitas *Fusarium* sangat tergantung dari sekresi asam fusarik pada jaringan tanaman (Godoy *et al.* 1990). Dengan demikian tanaman yang tahan adalah yang mampu untuk mengubah asam fusarik menjadi tidak toksik terhadap tanaman atau menahan invasi asam fusarik ke sel jaringan yang lain. Tanaman yang agak tahan terhadap infeksi *Fusarium* yang dihasilkan dari seleksi ES diduga mampu untuk mendetoksifikasi atau menahan invasi asam fusarik ke jaringan sel yang lain.

## KESIMPULAN

Kultur in vitro telah mampu meningkatkan ketahanan kacang tanah cv Lokal Bima dari rentan menjadi agak resisten terhadap infeksi cendawan *Fusarium* sp. Galur GFK 10 menunjukkan agak resisten terhadap infeksi cendawan *Fusarium* sp dan menghasilkan jumlah polong kering terbanyak 13.5 polong per tanaman dan polong kering terberat 786.5 g/1.1 m<sup>2</sup>.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agrios GN. 1988. Plant pathology. 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press Inc., New York.
- Backman PA, Breneman TB. 1997. Stem-rot. In : Burelle NK, Porter DM, Kabana RR, Smith DH, Subrahmanyam P, (Ed.). Compedium of peanut disease. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ. 1994. Early events in the activation of plant defence responses. Annu. Rev. Phytopathol. 32:479-501.
- Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R. 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. Physiol. Mol. Plant Pathol 37:179-191.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG. 1996. Resistance gene-dependent plant defence responses. Plant Cell 8:1773 - 1791.
- Hartman GL., Noel GR., Gray LE. 1995. Occurance of soybean sudden death syndrome in east-central Illinois and associated yield losses. Plant Dis. 79:314-318
- Hemon AF, Rosario TL. 1999. Evaluation of tomato F1 hybrids and parentals for resistance to fusarium wilt and bacterial wilt. The Philippine Agricultural Scientist. 82 : 372 - 378.
- Jain SM. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118 :153-156.
- Karp A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. Kluwer Acad. Publ. The Netherlands.
- Matsumoto K, Barbosa ML, Souza LAC, Teixeira JB. 1995. Race I fusarium wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. Euphytica 84:67-71.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised media for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473-493.