

رشد و شاخص‌های فیزیولوژیکی تربچه در پاسخ به اسید هیومیک غنی

شده با ترکیبات عناصر غذائی محیط کشت MS

عبدالاحمد راصد^۱، کامبیز مشایخی^{۲*}، سید جواد موسوی زاده^۳، ایوب قربانی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. abdulahmadrased@gmail.com

۲- نویسنده مسئول و دانشیار گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. kkambizmashayekhi@gmail.com

۳- استادیار گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. mousavizadeh@gau.ac.ir

۴- دانشجوی دکتری باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. aiiobghorbani@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۰

چکیده

محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS)، بسیار غنی بوده و دارای عناصر پرمصرف و کم مصرف به طور کامل است. از طرف دیگر اسید هیومیک با افزایش جذب عناصر غذایی، سبب افزایش رشد و توسعه بیشتر گیاه می‌گردد. هدف از پژوهش حاضر نیز بررسی رشد و عملکرد تربچه رقم Vikima تحت تأثیر محلول‌پاشی اسید هیومیک در ترکیب با عناصر غذایی بر پایه ترکیب محیط کشت MS در شرایط مزرعه-ای می‌باشد. برای این منظور اسید هیومیک با غلظت صفر و ۱/۵ گرم در مترمربع و کود MS در هشت غلظت (۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ درصد) به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار استفاده شد. نتایج نشان داد که با مصرف کود MS، تعداد برگ، ساکارز غده، گوگرد غده، کلروفیل کل و قند کل غده نسبت به استفاده تنها از اسید هیومیک افزایش یافت. کاربرد ۱۴ درصد کود MS میزان قطر غده را تا ۳۲/۶۶ میلی‌متر افزایش داد. در استفاده از اسید هیومیک هم‌زمان با ۱۴ درصد کود MS مقدار آنتوسیانین غده افزایش یافته و به ۰/۰۰۰۱۹ مول بر گرم بر وزن تر گیاه رسید. در اثرات متقابل اسید هیومیک و کود MS افزایش وزن تر برگ، سطح برگ، وزن تر غده و قطر غده دیده شد. اسید هیومیک غنی شده با عناصر غذایی MS (غلظت تا ۱۴ درصد) اثرات مطلوبی بر رشد گیاه تربچه دارد. کلمات کلیدی: پسته، آنتوسیانین، برگ، غده، کلروفیل، گوگرد، ساکارز

مقدمه

تربچه (*Raphanus sativus* L.) یکی از سبزی‌های ریشه‌ای متعلق به تیره شب‌بو (Brassicaceae) است. پوست غده تربچه از یک قشر نازک تشکیل شده و به علت داشتن ماده آنتوسیانین اغلب به رنگ قرمز می‌باشد. تربچه را می‌توان در تمام طول سال کشت نمود، اما در هر فصل باید از ارقام خاصی استفاده کرد (بنایان و همکاران، ۱۳۸۹). مواد تشکیل دهنده محیط‌های کشت به چند دسته عناصر پرمصرف، عناصر کم مصرف، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه، تنظیم کننده‌های رشد، هیدرات‌های کربن و مواد دیگر تقسیم می‌شود. هر یک از ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت دارای آثار فیزیولوژیکی و متابولیسمی خاصی برای گیاه است (مشایخی و اکبرپور، ۱۳۸۷). در این بین محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) (Murashige & Skoog, 1962) پرکاربردترین محیط کشت بافت گیاهی است. زیرا از نظر مواد معدنی پرمصرف، محیطی بسیار غنی بوده که با عناصر کم مصرف در غلظت کامل به کار می‌رود. از اینرو می‌تواند برای گونه‌های معینی از گیاهان مختلف مورد استفاده قرار گیرد (مشایخی و اکبرپور، ۱۳۸۷).

از طرف دیگر باروری و جذب مواد معدنی با سطح مواد آلی مرتبط است. مقادیر بسیار کم اسیدهای آلی به دلیل وجود ترکیبات هورمونی اثرات مفیدی در افزایش تولید و کیفیت محصولات کشاورزی دارند. در این بین یکی از بهترین کودهای آلی اسید هیومیک است که از تجزیه کامل بیولوژیکی و شیمیایی مواد آلی بدست می‌آید (Chamani et al., 2012). اسید هیومیک از طریق اثرات هورمونی و با تأثیر بر متابولیسم‌های سلولی گیاهان و همچنین با قدرت کلات کنندگی عناصر غذایی مختلف مانند سدیم، پتاسیم، منیزیم، روی، کلسیم، آهن، مس و افزایش جذب عناصر غذایی سبب افزایش رشد و ارتفاع گیاه می‌گردد (Salimon et al., 2012). اسید هیومیک می-

تواند به‌طور مستقیم اثرات مثبت بر رشد گیاه بگذارد. رشد قسمت هوایی و ریشه گیاه توسط اسید هیومیک تحریک می‌شود اما اثر آن روی ریشه برجسته تر است، حجم ریشه را افزایش داده و باعث اثربخشی سیستم ریشه می‌گردد. در مطالعه‌ای کاربرد ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم اسید هیومیک بر کیلوگرم خاک در ذرت، به ترتیب باعث افزایش ۲۰ و ۲۳ درصد وزن خشک ساقه و ۳۹ و ۳۲ درصد وزن خشک ریشه نسبت به تیمار شاهد شد (Sharif et al., 2002).

با توجه به مباحث مطرح شده به نظر می‌رسد با تغذیه گیاه تربچه بوسیله اسید هیومیک و عناصر MS بتوان به رشد حداکثری غده تا مرحله برداشت رسید و اثرات مطلوبی را بر سنتز ترکیبات مفید درونی آن داشت. بنابراین هدف از پژوهش حاضر نیز بررسی رشد و عملکرد تربچه تحت تأثیر اسید هیومیک در ترکیب با کود کامل بر پایه محیط کشت MS در شرایط مزرعه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق طی سال‌های ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان - انجام شد. عرض جغرافیایی منطقه ۵۴ درجه شرقی و ارتفاع از سطح دریا ۵۲/۵ متر بود. خاک مزرعه دارای بافت رسی لومی با pH به میزان ۷/۹، درصد کربن آلی ۰/۸۴، هدایت الکتریکی ۰/۶ دسی زیمنس بر سانتیمتر، فسفر قابل جذب ۱۱/۳ ppm، پتاسیم قابل جذب ۱۸۶ ppm، آهن ۱۴/۱ ppm و منیزیم ۴۵۷ ppm بود. کشت بذور تربچه (*Raphanus sativus* L.) رقم Vikima در اواخر اسفند ماه صورت گرفت. رقم Vikima از جمله ارقام زودرس، بازارپسند با حجم اندام هوایی کوچک می‌باشد. کود MS بر پایه نمک‌های محیط کشت MS تهیه شد. تیمارها شامل اسید هیومیک در دو غلظت (صفر و ۱/۵ گرم در مترمربع) و کود MS در هشت غلظت (۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ درصد) انجام شد. اعمال تیمارها به صورت محلول‌پاشی

کلروفیل کل و قطر غده اثر معنی‌داری نشان داد. این در حالی است که بر تعداد برگ، گوگرد غده، کارتنوئید، آنتوسیانین غده، ساکارز غده و قند کل غده تریچه اثر معنی‌داری نداشته است. همچنین اثر متقابل اسید هیومیک و کود MS بر گوگرد غده، وزن تر برگ، وزن تر غده، سطح برگ، کلروفیل کل، کارتنوئید، آنتوسیانین غده و قطر غده اثر معنی‌داری نشان داد که نشان دهنده اثر فیزیکوشیمیایی اسید هیومیک می‌باشند (جدول ۱).

بر اساس تحقیق انجام شده تیمار اسید هیومیک بر میزان فروکتوز گوشت غده، گوگرد پوست غده، گلوکز برگ، در سطح پنج درصد اثر معنی‌دار نشان داد. مضاف بر اینکه اسید هیومیک بر میزان ضخامت پوست غده، وزن خشک برگ، قندکل برگ و وزن خشک غده در سطح یک درصد معنی‌دار شد. تیمار کود MS بر ضخامت پوست غده و گلوکز گوشت غده در سطح پنج درصد و بر میزان وزن خشک برگ، قندکل برگ و وزن خشک غده در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). در حالت مصرف اسید هیومیک با عدم مصرف آن، اختلاف معنی‌داری در تعداد برگ، ساکارز غده و قندکل غده مشاهده نشد (جدول ۱) اما مقدار این صفات که مبین فراهم نمودن شرایط تغذیه‌ای می‌باشد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. بر اساس نتایج، در حالت استفاده و عدم استفاده از اسید هیومیک و کود MS، فروکتوز برگ، فروکتوز گوشت غده، گوگرد پوست غده، گوگرد برگ، آنتوسیانین برگ، کلروفیل a، کلروفیل b، گلوکز برگ، آنتوسیانین پوست غده، اثر معنی‌داری نشان ندادند. در حالت مصرف اسید هیومیک میزان فروکتوز گوشت غده با اختلاف معنی‌داری به مقدار ۰/۰۴ و میزان گوگرد پوست غده با اختلاف معنی‌داری به اندازه ۰/۱۸ برآورد شد (جدول ۲).

در دو نوبت انجام شد. نوبت اول پس از ظهور برگ اول حقیقی و نوبت دوم ۱۰ روز پس از نوبت اول انجام شد. آبیاری هر ۳ روز یکبار آبیاری صورت گرفت. روش کاشت به صورت کرتی و هر کرت به مساحت یک مترمربع بود. در هر کرت پنج ردیف به فاصله ۲۰ سانتی‌متر و فاصله بین دو بوته پنج سانتی‌متر از هم در نظر گرفته شد که در مجموع در هر کرت ۱۰۰ بذر کشت شد.

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی

تعداد برگ با شمارش کردن برگ‌ها، سطح برگ با استفاده از دستگاه سطح برگ سنج مدل DELTA T انجام شد. وزن تر غده و برگ با استفاده از ترازوی دیجیتال انجام شد. قطر غده با استفاده از کولیس دیجیتال مدل FX-300 انجام شد.

اندازه‌گیری صفات شیمیایی

اندازه‌گیری آنتوسیانین به روش (Wagner, 1979)، قندکل به روش (McCready et al., 1950)، ساکارز به روش (Handel, 1968)، گلوکز به روش (Miller, 1959)، فروکتوز به روش (Ashwell, 1957)، تعیین مقدار کلروفیل و کارتنوئید به روش (Barnes et al., 1992) و گوگرد به روش (Quin & wood, 1976) صورت گرفت.

طرح آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۴۸ پلات و ۱۶ تیمار و در سه تکرار اجرا شد. از نرم افزار SAS برای تجزیه آماری استفاده شد. مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج به دست آمده که تیمار اسید هیومیک و کود MS بر وزن تر برگ، وزن تر غده، سطح برگ،

کامیاز مشایخی و همکاران: رشد و شاخص‌های فیزیولوژیکی تربچه در پاسخ به اسید هیومیک غنی شده با ترکیبات...

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده تربچه رقم **Vikima** تحت تأثیر اسید هیومیک و کود **MS** بر اساس میانگین مربعات.

Table 1. Anova of measured traits of radish cv. Vikima under humic acid and MS fertilizer based on mean square.

Leaf Sulphur	Leaf Fructose	Total sugar of Tuber	Tuber Sucrose	Tuber Sulphur	Tuber Diameter	Tuber Anthocyanin	Carotenoids	Total chlorophyll	Leaf area)	Tuber Fresh weight	Leaf Fresh weight	Leaf numbers	Degree of freedom	Source of variation
0.0015 *	8.26 **	0.51 **	0.0017 ^{ns}	0.0013 *	0.61 ^{ns}	3.12 ^{ns}	1054.05 ^{ns}	6809.51 ^{ns}	1.55 ^{ns}	2.49 ^{ns}	1.25 *	2.77 *	2	Block
0.000077 ^{ns}	2.12 ^{ns}	0.0050 ^{ns}	0.0013 ^{ns}	0.00042 ^{ns}	18.95 *	7.40 ^{ns}	384.89 ^{ns}	51197.45 *	387.10 **	9.33 *	2.22 *	1.33 ^{ns}	1	Humic acid (a)
0.00065 ^{ns}	3.47 ^{ns}	0.15 ^{ns}	0.0012 ^{ns}	0.00056 ^{ns}	15.17 **	3.055 ^{ns}	2457.74 ^{ns}	22842.07 *	935.34 **	14.62 **	1.48 **	0.79 ^{ns}	7	MS fertilizer (b)
0.00049 ^{ns}	4.47 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.00065 ^{ns}	0.00083 *	18.99 **	8.60 *	2628.07 *	29639.17 *	840.36 **	30.58 **	0.81 *	0.23 ^{ns}	7	a x b
0.00040	3.22	0.023	0.00070	0.00030	3.10	3.47	1101.46	9726.79	12.84	2.33	0.28	0.79	30	Error
11.28	0.49	4.59	14.42	11.14	6.17	82.97	8.43	10.06	9.46	10.64	20.52	13.27		C V

ns; Non-significant; * Significant at $P \leq 0.05$, ** Significant at $P < 0.01$

ادامه جدول ۱-

Continued Table 1.

Tuber Glucose	Skin Tuber Anthocyanin	Tuber Skin thickness	Tuber Dry weight	Leaf Total sugar	Leaf Sucrose	leaf Glucose	Chlorophyll l b	Chlorophyll a	Leaf Anthocyanin	Leaf dry weight	Tuber Skin Sulphur	Tuber Fructose	Root length	Degree of freedom	Source of variation
0.0075 *	4.58 ^{ns}	0.0023 ^{ns}	0.014 *	0.0051 *	0.0018 ^{ns}	0.0018 ^{ns}	24.54 ^{ns}	3892.57 ^{ns}	4.65 ^{ns}	0.00051 ^{ns}	0.000077 ^{ns}	0.00010 **	0.07 ^{ns}	2	Block
0.0021 ^{ns}	1.66 ^{ns}	0.081 **	0.18 **	0.15 **	0.0006 ^{ns}	0.0049 *	0.44 ^{ns}	269.59 ^{ns}	2.50 ^{ns}	0.071 **	0.0019 *	0.000043 *	1.47 ^{ns}	1	Humic acid (a)
0.0053 *	3.76 ^{ns}	0.023 *	0.021 **	0.013 **	0.0050 ^{ns}	0.0010 ^{ns}	5435.31 ^{ns}	42739.22 ^{ns}	3.57 ^{ns}	0.011 **	0.00043 ^{ns}	0.0000029 ^{ns}	0.71 ^{ns}	7	MS fertilizer (b)
0.0083 **	5.97 ^{ns}	0.027 *	0.027 **	0.0078 **	0.011 **	0.0020 ^{ns}	1115.02 ^{ns}	64181.57 ^{ns}	8.92 ^{ns}	0.013 **	0.00046 ^{ns}	0.0000057 ^{ns}	1.0028	7	a x b
0.0017	3.045	0.0089	0.0030	0.0010	0.0022	0.0010	758.50	7914.59	1.66	0.0014	0.00083	0.000006	0.54	30	Error
11.21	6.71	5.53	9.37	7.84	23.54	24.84	11.62	11.13	16.23	12.55	11.14	6.29	8.97		C V

ns; Non-significant; * Significant at $P \leq 0.05$, ** Significant at $P < 0.01$

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات اصلی صفات اندازه گیری شده تربچه رقم *Vikima* تحت تأثیر اسید هیومیک و کود MS.
Table 2. The characteristics main effect of means square of radish cv. *Vikima*, under humic acid and MS fertilizer

Leaf	Glucose (mg g ⁻¹ FW)	Tuber Skin Sulphur (mg g ⁻¹ FW)	Tuber Fructose (mg g ⁻¹ FW)	Treatments
	0.13 ^a	0.18 ^a	0.04 ^a	None humic acid
	0.11 ^a	0.17 ^b	0.03 ^b	Humic acid

Means followed by the same letter in each column do not differ significantly at 5% probability level according to Duncan test.

دسترسی مواد غذایی ریشه و آسیمیلاسیون آن‌ها می‌باشد (Mora et al., 2010). عملکرد در تربچه در مجموع حاصل بر هم کنش اجزایی هست که هر یک از آن‌ها در مراحل مختلف رشد شکل می‌گیرند. در این بین تعداد برگ و وزن غده در هر بوته می‌توانند به عنوان مهمترین اجزای عملکرد به شمار آیند. مشاهده گردید که متناسب با افزایش و یا کاهش هر یک از اجزای فوق در مواجهه با تیمارهای مختلف، میزان عملکرد هم روند افزایشی و یا کاهش می‌داشت. ترکیب نمک‌های MS نیز مسئله مهمی برای رشد تربچه است. غالب بودن یون‌های خاصی ممکن است باعث عدم تبادل در جذب یون‌ها شود. این مسئله باعث کمبود عناصر خاص و کاهش عملکرد تربچه می‌شود. دلیل افزایش وزن غده با کاربرد کود MS در حضور اسید هیومیک به این دلیل است که اسید هیومیک موجب افزایش کلروفیل و در پی آن افزایش فتوسنتز و ماده خشک می‌شود. کاربرد اسید هیومیک رشد و عملکرد ریشه را بیش از اندام هوایی تحت تأثیر قرار می‌دهد. این تأثیر ناشی از افزایش جذب عناصر غذایی توسط ریشه می‌باشد. به عبارت دیگر از آن جا که عناصر غذایی در تماس مستقیم با سطح ریشه می‌باشند، افزایش فراهمی مواد غذایی ناشی از کاربرد اسید هیومیک می‌تواند عملکرد ریشه را به طور موثری بهبود ببخشد. در تحقیقی وزن خشک برگ و ساقه

بر اساس نتایج بدست آمده از جدول مقایسه میانگین اثر متقابل (جدول ۳)، کاربرد ۱۴ درصد کود MS و عدم استفاده از اسید هیومیک سبب شد که وزن تر غده به بالاترین مقدار یعنی ۲۱/۹۲ گرم افزایش یابد. در شرایطی که در کود MS ۲ درصد، وزن تر غده به مقدار ۱۰/۱۶ گرم ثبت شد. به نظر می‌رسد این تأثیر ناشی از افزایش جذب عناصر غذایی توسط ریشه می‌باشد. به عبارت دیگر از آن جا که عناصر غذایی در تماس مستقیم با سطح ریشه می‌باشند، افزایش فراهمی مواد غذایی در ریشه می‌تواند پتانسیل اسمزی را تحت تأثیر قرار دهند. از اینرو ترکیبات کود MS با فشار اسمزی که ایجاد می‌کنند سبب افزایش جذب آب توسط ریشه می‌شوند و از اینرو موجب افزایش وزن تر غده می‌گردند. این در حالی است که بالاترین وزن خشک غده یعنی ۰/۸۰ گرم زمانی ثبت شد که اسید هیومیک همراه با ۱۴ درصد کود MS استفاده گردید و کمترین آن یعنی ۰/۴۴ گرم در شاهد مشاهده شد. به طور کلی بر اثر کاربرد اسید هیومیک دو مکانیسم در گیاه فعال می‌شود: یکی اثرات سیگنالی مواد معدنی به خاطر متابولیسم هورمون‌ها و دیگری افزایش فعالیت ترکیب ATP_{ase} در ریشه گیاه که در افزایش سرعت دسترسی نیترات در ریشه‌ها نقش دارد. نسبت ریشه به ساقه در گیاهان بستگی به مقدار هورمون‌های سایتوکینین و اسید آبسزیک دارد زیرا یکی از نقش‌های هورمون‌ها دخالت در

کامبیز مشایخی و همکاران: رشد و شاخص‌های فیزیولوژیکی تربچه در پاسخ به اسید هیومیک غنی شده با ترکیبات...

می تواند با افزایش میزان سایتوکنین و پلی‌آمین‌ها در ساقه و همچنین به دلیل افزایش فعالیت $ATP-H^+$ در ریشه همراه باشد که با استفاده از اسید هیومیک فعال می شود (Mora *et al.*, 2010). در پژوهشی محلول‌پاشی اسید هیومیک (بدون عناصر معدنی) روی شاخ و برگ تربچه علوفه‌ای، اثر معنی‌داری روی وزن بوته نداشت (Bandiera *et al.*, 2009). اما در تحقیق دیگر کاربرد اسید هیومیک در زمان جوانه زنی بر وزن تر برگ تربچه اثر معنی‌داری داشت (روحانی و همکاران، ۱۳۹۵). در پژوهشی که روی گیاه ریحان صورت گرفت مصرف اسید هیومیک باعث افزایش نیتروژن برگ، وزن خشک برگ، سطح برگ و کلروفیل کل برگ شده است (فاضل تهرانی و همکاران، ۱۳۹۶). در تحقیقی نشان دادند که تیمار ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک سبب گسترش بیشتر سطح برگ شد و دلیل آن را افزایش محتوای نیتروژن گیاه گزارش کردند (Albayrak *et al.*, 2005).

فلفل تحت تأثیر اسید هیومیک، افزایش یافت (Gulser *et al.*, 2010). با مصرف نکردن اسید هیومیک و مصرف کردن کود MS ۱۴ درصد، میزان سطح برگ به حد بالایی تا ۴۹/۶۵ سانتی‌مترمربع رسید و حد پائین آن در شاهد به مقدار ۲۱/۸۸ سانتی‌مترمربع بود. این درحالی است که در زمان مصرف اسید هیومیک و مصرف کود MS ۶، ۸ و ۱۰ درصد، سطح برگ بالایی ثبت شد. وزن تر برگ بالایی تا ۴/۲۷ گرم در کود MS ۱۴ درصد به دست آمد و کمترین آن در شاهد در حد ۱/۵۴ گرم ثبت شد. این درحالی است که در زمان مصرف اسید هیومیک و مصرف کود MS ۸، ۱۰ و ۱۲ درصد، وزن تر برگ بالایی تا ۳/۵۶ گرم اندازه‌گیری شد (جدول ۳). اسید هیومیک باعث حفظ احیای آهن سه ظرفیتی توسط آنزیم ردوکتاز در گیاه شده که به حفظ کلروفیل و به تبعیت از آن افزایش فتوسنتز و سپس افزایش سطح برگ کمک می‌کند. افزایش رشد ساقه و برگ

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل صفات اندازه گیری شده تربچه رقم Vikima تحت تأثیر اسید هیومیک و کود MS.

Table 3. The Interaction effects of measured characteristics of radish cv. Vikima under humic acid and MS fertilizer

Tuber Sulphur (mg kg ⁻¹ FW)	Skin Tuber Anthocyanin (mol g ⁻¹ FW)	Total Chlorophyll (μg g ⁻¹ FW)	Leaf area (cm ²)	Carotenoids (μg g ⁻¹ FW)	Tuber Fresh weight (g per plant)	Leaf Fresh weight (g per plant)	MS (%)	Treatments
0.13 ^b	0.000068 ^{ab}	1010.26 ^{abcde}	21.88 ^g	403.16 ^{abc}	13.71 ^{bcd}	1.54 ^e	0	None humic acid
0.16 ^b	0.00013 ^{ab}	1132.52 ^{abc}	24.35 ^{fg}	399.70 ^{abc}	10.16 ^e	1.51 ^e	2	
0.17 ^{ab}	0.000028 ^b	907.38 ^{de}	42.97 ^{abc}	332.75 ^c	12.28 ^{de}	2.96 ^{bcd}	4	
0.16 ^{ab}	0.000026 ^b	907.78 ^{de}	26.60 ^{fg}	374.75 ^{bc}	13.45 ^{bcd}	1.86 ^{de}	6	
0.15 ^b	0.00014 ^{ab}	1076.91 ^{abcd}	38.47 ^{cd}	433.94 ^{ab}	12.72 ^{cde}	2.12 ^{cde}	8	
0.14 ^b	0.000046 ^b	1172.18 ^a	39.50 ^{cd}	429.27 ^{ab}	15.59 ^{bc}	2.54 ^{bcd}	10	
0.19 ^a	0.000026 ^b	978.13 ^{abcde}	30.72 ^{ef}	398.82 ^{abc}	10.88 ^{de}	2.07 ^{de}	12	
0.14 ^b	0.000030 ^b	934.89 ^{cde}	49.65 ^a	382.24 ^{bc}	21.92 ^a	4.27 ^a	14	
0.14 ^b	0.000090 ^{ab}	922.57 ^{cde}	39.31 ^{cd}	380.67 ^{bc}	20.20 ^a	2.47 ^{bcd}	0	Humic acid
0.14 ^b	0.000041 ^b	978.47 ^{abcde}	36.96 ^{cde}	365.73 ^{bc}	15.66 ^{bc}	2.16 ^{cde}	2	
0.14 ^b	0.000050 ^b	845.78 ^e	34.58 ^{de}	376.83 ^{bc}	13.07 ^{cde}	2.07 ^{de}	4	
0.14 ^b	0.000077 ^{ab}	902.09 ^{de}	40.94 ^{bcd}	379.69 ^{bc}	13.41 ^{bcd}	2.81 ^{bcd}	6	
0.17 ^{ab}	0.000062 ^b	859.002 ^e	48.32 ^{ab}	395.66 ^{abc}	13.77 ^{bcd}	2.84 ^{bcd}	8	
0.15 ^b	0.00010 ^{ab}	947.52 ^{bcd}	43.44 ^{abc}	384.89 ^{abc}	13.54 ^{bcd}	3.56 ^{ab}	10	
0.15 ^b	0.00010 ^{ab}	894.96 ^{de}	43.27 ^{abc}	363.93 ^{bc}	16.49 ^b	3.27 ^{abc}	12	
0.17 ^{ab}	0.00019 ^a	1151.80 ^{ab}	39.85 ^{cd}	454.67 ^a	12.28 ^{de}	3.27 ^{abc}	14	

Means followed by the same letter in each column do not differ significantly at 5% probability level according to Duncan test.

ادامه جدول ۳-

Continued Table 3.

Tuber Glucose (mg g ⁻¹ FW)	Tuber Skin thickness (mm)	Tuber Dry weight (g)	Leaf Total sugar (mg g ⁻¹ FW)	Leaf Sucrose (mg g ⁻¹ FW)	leaf dry weight (g)	Tuber diameter (mm)	MS (%)	Treatments
0.38 ^{abcd}	1.64 ^{abc}	0.44 ^f	0.42 ^{bc}	0.23 ^{bc}	0.23 ^{fgh}	25.58 ^{cd}	0	None humic acid
0.28 ^e	1.69 ^{ab}	0.46 ^f	0.65 ^a	0.21 ^{bcd}	0.20 ^{gh}	23.05 ^d	2	
0.29 ^e	1.78 ^a	0.49 ^{def}	0.45 ^b	0.17 ^{cd}	0.31 ^{cdef}	31.03 ^{ab}	4	
0.34 ^{cde}	1.80 ^a	0.65 ^{bc}	0.43 ^b	0.16 ^{cd}	0.22 ^{gh}	29.88 ^{ab}	6	
0.40 ^{abc}	1.65 ^{abc}	0.48 ^{ef}	0.45 ^b	0.13 ^d	0.17 ^h	28.51 ^{bc}	8	
0.45 ^a	1.52 ^{bc}	0.60 ^{cd}	0.45 ^b	0.17 ^{cd}	0.27 ^{defg}	28.91 ^{bc}	10	
0.43 ^{ab}	1.75 ^a	0.45 ^f	0.59 ^a	0.14 ^{cd}	0.24 ^{fgh}	24.41 ^d	12	
0.31 ^{de}	1.48 ^c	0.47 ^{ef}	0.45 ^b	0.36 ^a	0.44 ^{ab}	32.66 ^a	14	
0.39 ^{abcd}	1.83 ^a	0.58 ^{cde}	0.44 ^b	0.21 ^{bcd}	0.37 ^{bc}	30.06 ^{ab}	0	Humic acid
0.42 ^{abc}	1.77 ^a	0.54 ^{cdef}	0.42 ^{bc}	0.17 ^{cd}	0.31 ^{cdef}	29.28 ^{ab}	2	
0.35 ^{bcd}	1.67 ^{ab}	0.53 ^{def}	0.35 ^{cd}	0.21 ^{bcd}	0.27 ^{efg}	25.81 ^{cd}	4	
0.39 ^{abcd}	1.80 ^a	0.58 ^{cde}	0.32 ^d	0.28 ^{ab}	0.33 ^{cde}	30.41 ^{ab}	6	
0.33 ^{cde}	1.76 ^a	0.57 ^{cde}	0.33 ^d	0.22 ^{bcd}	0.35 ^c	29.50 ^{ab}	8	
0.36 ^{bcd}	1.72 ^a	0.73 ^{ab}	0.34 ^d	0.18 ^{cd}	0.46 ^a	30.77 ^{ab}	10	
0.42 ^{abc}	1.68 ^{ab}	0.78 ^a	0.35 ^{cd}	0.20 ^{bcd}	0.35 ^{cd}	29.30 ^{ab}	12	
0.39 ^{abcd}	1.75 ^a	0.80 ^a	0.33 ^d	0.17 ^{cd}	0.32 ^{cde}	29.17 ^{ab}	14	

Means followed by the same letter in each column do not differ significantly at 5% probability level according to Duncan test.

کامبیز مشایخی و همکاران: رشد و شاخص‌های فیزیولوژیکی تربچه در پاسخ به اسید هیومیک غنی شده با ترکیبات...

ذخیره‌سازی عناصر کلسیم، سدیم، پتاسیم در دیواره سلولی دارند. از اینرو اسید هیومیک با بالا بردن فعالیت آنتی اکسیدان‌ها در پوست، می‌تواند ترکیبات دیواره سلولی را تغییر داده و باعث افزایش ضخامت پوست گردد. در سایر سبزی‌ها نیز گزارش شده است که قطر ساقه و ریشه با کاربرد اسید هیومیک در گیاهچه‌های فلفل و بادمجان افزایش یافت (Padem et al., 1999). عدم کاربرد اسید هیومیک و کاربرد ۱۴ درصد کود MS میزان قطر غده را به بیشترین حد آن ۳۲/۶۶ میلی‌متر سوق داد. موقع استفاده از ۲ درصد کود MS مقدار قطر غده به ۲۳/۰۵ میلی‌متر کاهش پیدا کرد (جدول ۳).

استفاده از اسید هیومیک همزمان با ۱۴ درصد کود MS، مقدار آنتوسیانین غده افزایش یافت و به بیشترین حد آن یعنی ۰/۰۰۰۱۹ مول بر گرم بر وزن تر گیاه رسید و در سایر مواقع چه با اسید هیومیک و چه بدون آن مقدار آنتوسیانین کاهش یافت. پژوهشی که روی گیاه تربچه صورت گرفت کاربرد اسید هیومیک روی آنتوسیانین ریشه اثر معنی‌داری داشت (سادات روحانی و همکاران، ۱۳۹۶). اسید هیومیک موجب کاهش نشت آنتوسیانین از غشاء سلولی و در نتیجه حفظ آن می‌گردد (Mora et al., 2010). مصرف ۱۲ درصد کود MS بدون استفاده از اسید هیومیک موجب افزایش مقدار گوگرد پوست غده به بالاترین مقدار یعنی ۰/۱۹ میلی‌گرم در کیلوگرم شد در سایر موارد مقدار گوگرد کاهش معنی‌داری در غده داشت (جدول ۳). احتمال می‌رود که دوره رشدی کوتاه گیاه تربچه و روش اعمال اسید هیومیک باعث عدم جذب کافی گوگرد در و همچنین آنتوسیانین غده شده است.

بر اساس نتایج بدست آمده از جدول مقایسه میانگین اثر متقابل، در زمان مصرف اسید هیومیک و مصرف کود

طبق نتایج تحقیق حاضر، زمانی که ۱۰ درصد کود MS بدون اسید هیومیک اعمال گردید مقدار کلروفیل کل به بیشترین حد خود یعنی ۱۱۷۲/۱۸ میکروگرم در گرم بر وزن تر گیاه رسید و کمترین مقدار آن در زمان مصرف اسید هیومیک همراه با ۴ و ۸ درصد کود MS تا ۸۴۵/۷۸ میکروگرم در گرم بر وزن تر گیاه اندازه‌گیری شد. افزایش در میزان کلروفیل احتمالاً به دلیل افزایش در جذب عناصر کم مصرف و پرمصرف مانند گوگرد و منیزیم می‌باشد که جزء ترکیبات محیط کشت MS است. در تحقیقی مصرف اسید هیومیک سبب افزایش میزان کلروفیل برگ گیاه ذرت گردیده است (Yang et al., 2004). اثر اسید هیومیک بر افزایش مقدار رنگیزه‌های کلروفیل تأیید شده است. به طوری که اسید هیومیک با قرار دادن آب و مواد غذایی بیشتر و مناسب‌تر در اختیار گیاه، می‌تواند کلروفیل را افزایش دهد (Jing-min et al., 2010). کاربرد اسید هیومیک همراه با ۱۴ درصد کود MS سبب افزایش کارتنوئید تا ۴۵۴/۶۷ میکروگرم در گرم بر وزن تر گیاه شد. در شرایط عدم استفاده از اسید هیومیک و اعمال ۴ درصد کود MS، کاهش کارتنوئید تا ۳۳۲/۷۵ میکروگرم در گرم بر وزن تر گیاه مشاهده گردید. در پژوهشی کاربرد اسید هیومیک سبب افزایش محتوای کارتنوئید در گیاه چای ترش گزارش شده است (Sanjari et al., 2015).

ضخامت پوست غده زمانی به بالاترین حد یعنی ۱/۸۳ میلی‌متر رسید که اسید هیومیک بدون کود MS مصرف شد. ولی کمترین ضخامت پوست غده یعنی ۱/۴۸ میلی‌متر زمانی ثبت شد که کود MS ۱۴ درصد بدون اسید هیومیک استفاده شد. اسید هیومیک موجب افزایش فعالیت آنتی اکسیدان‌ها در گیاه می‌شود (سادات روحانی و همکاران، ۱۳۹۶). از طرف دیگر آنتی اکسیدان‌ها نیز نقش مهمی در

شد (جدول ۳). گزارش شده است که اسید هیومیک روی افزایش قند محلول تربچه اثر معنی‌داری داشته است (سادات روحانی و همکاران، ۱۳۹۶).

نتیجه گیری

در این تحقیق کود کامل شامل عناصر پرمصرف و کم-مصرف بر پایه محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) در ترکیب با اسید هیومیک در سبزی تربچه از ابتدای رشد تا زمان برداشت استفاده شد. اسید هیومیک به تنهایی سبب افزایش معنی دار فروکتوز گوشت غده و گوگرد پوست غده شد. کود MS نیز به تنهایی سبب افزایش طول ریشه، ساکارز و قند کل غده گردید. کود MS و اسید هیومیک روی تعداد برگ، فروکتوز برگ، آنتوسیانین غده، کلروفیل a و b برگ اثر معنی‌داری نداشتند. با کاربرد ترکیبی اسید هیومیک با کود MS اثرات مطلوبی در رشد تربچه دیده شد. بدین صورت که بالاترین مقدار وزن خشک غده یعنی ۰/۸۰ گرم و بیشترین مقدار آنتوسیانین غده یعنی ۰/۰۰۱۹ مول بر گرم بر وزن تر گیاه زمانی ثبت شد که اسید هیومیک همراه با ۱۴ درصد کود MS استفاده گردید. در زمان مصرف اسید هیومیک و مصرف کود MS ۱۰ درصد، وزن خشک برگ به بالاترین حد یعنی ۰/۴۶ گرم رسید. در یک جمع بندی کلی می‌توان گفت که اسید هیومیک تأثیر مطلوبی به عنوان مکمل در کنار استفاده از کود کامل بر پایه محیط کشت MS بر رشد گیاه تربچه داشت. همچنین به نظر می‌رسد ارقام مختلف تربچه می‌توانند پاسخ‌های متفاوتی به این ترکیب تغذیه ای داشته باشند که نیاز است در تحقیقات آینده مورد بررسی بیشتر قرار گیرد

MS ۱۰ درصد، میزان وزن خشک برگ به بالاترین حد یعنی ۰/۴۶ گرم رسید و کمترین آن یعنی ۰/۱۷ گرم در زمان عدم مصرف اسید هیومیک و مصرف کود MS ۸ درصد مشاهده شد. گزارش شده است که وزن تر و خشک ساقه و ریشه با کاربرد اسید هیومیک در گیاهچه‌های فلفل و بادمجان افزایش یافت (Padem et al., 1999). در تحقیقی دیگر، وزن خشک قسمت هوایی گیاه به طور قابل ملاحظه‌ای در محیط رشد حاوی اسید هیومیک افزایش نشان داد (Norman et al., 2003). در پژوهش دیگر کاربرد اسید هیومیک موجب افزایش قطر ساقه، طول ساقه و وزن خشک گوجه‌فرنگی گردید (Turkmen et al., 2004). همچنین اسید هیومیک روی صفاتی چون وزن خشک برگ و وزن خشک اندام هوایی نعنای فلفلی افزایش معنی‌داری داشته است (Askari et al., 2012). اسید هیومیک از طریق افزایش جذب و در اختیارگذاری عناصر غذایی و بهبود وضعیت فتوسنتزی در گیاه، باعث افزایش وزن تر و خشک می‌گردد (Astarai et al., 2008).

در شرایط مصرف ۱۴ درصد کود MS بدون مصرف اسید هیومیک، مقدار ساکارز برگ به بیشترین مقدار یعنی ۰/۳۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر رسید در حالی که کمترین آن به مقدار ۰/۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در زمان عدم مصرف اسید هیومیک و کاربرد کود MS به اندازه ۸ درصد به ثبت رسید. کاربرد ۱۰ درصد کود MS و عدم استفاده از اسید هیومیک، سبب افزایش گلوکز گوشت غده تا ۰/۴۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر شد و کمترین آن به میزان ۰/۲۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در زمان عدم مصرف اسید هیومیک و مصرف کود MS ۲ درصد ثبت شد. موقع که اسید هیومیک مصرف نشد ولی کود MS ۲ درصد مصرف

منابع

- بنایان، م.، رحمتی، م.، غنی، ع.، و قویدل، ه.، ۱۳۸۹. آنالیز کمی رشد و تولید دو رقم محلی و تجاری تربچه در واکنش به تراکم کاشت. پژوهش‌های زراعی ایران، ۸: ۶. ص ۱۰۱۱-۱۰۰۲.
- روحانی، ن.، نعمتی، س.، و محمد، م.، ۱۳۹۵. اثر اسید هیومیک بر ویژگیهای جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های سه رقم تربچه در شرایط تنش شوری. علوم و تحقیقات بذر ایران، ۳، ۴. ص ۴۱-۲۹.
- سادات روحانی، ن.، نعمتی، س.، مقدم، م.، و اردکانیان، و.، ۱۳۹۶. نقش اسید هیومیک بر بهبود خصوصیات بیوشیمیایی، میزان رنجدانه‌های آنتوسیانین و کلروفیل در ارقام تربچه تحت شرایط تنش شوری. فرآیند و کارکرد گیاهی، ۶، ۲۱. ص ۳۸۷-۳۷۸.
- فاضل تهرانی، ح.، ایلکائی، م.، و مصطفوی، خ.، ۱۳۹۶. مطالعه تأثیر اسید هیومیک و کمپوست چای بر خصوصیات برگ ریحان (*Ocimum basilicum* L.). مجله علمی-پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، ۱۳، ۴: ص ۷۳-۶۵.
- مشایخی، ک.، و اکبرپور، و.، ۱۳۸۷. مواد معدنی و آلی مورد استفاده در کشت بافت گیاهی. انتشارات: مختومقلی فراقی (سارلی). ص ۲۲۰-۲۲۱.
- Albayrak, S., & N. Camas. (2005). Effects of different levels and application times of humic acid on root and leaf yield and yield components of forage turnip (*Brassica rapa* L.). *Journal of Agronomy*. 4:130133.
- Ashwell, G. (1957). In *Method in Enzymology*, vol. 3, p. 85. Ed. by Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. New York: Academic press Inc.
- Askari, M., Habibi, D. & Naderi Brujerdi, G. (2012). Effect of vermicompost, plant growth, porpmiting rhizobacteria and humic acid on growth factor of *Mentha piperata* L. in central provience. *Journal of Agriculture and Plant Breeding*. 4:41-54.
- Astaraei, A.R. & R. Ivani. (2008). Effect of organic sources as foliar spray and root media on nutrition if cowpea plant. Am.-Euras. *Journal Agriculture Environmen. Science*. 3: 352-356.
- Bandiera, M., Mosca, G., & Vameralli, T. (2009). Humic acids affect root characteristics of fodder radish (*Raphanus sativus* L). var. *oleiformis* Pers.) in metal- polluted wastes. *Journal Desalination*. 246: 78-91.
- Barnes, J. D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S., A. A. (1992). A reappraisal of the use of DMSO for extraction and determination of chlorophyll a and b in lichens and higher plants. *Journal Environmental and Experimental Botany*. 32: 85-100.
- Chamani, F., Khodabandeh, N., Habibi, D., Asgharzadeh, & Davoudi F. (2012). Effect of salinity stress on yield and yield components in wheat, inoculated with growth promoting bacteria (*Azotobacter chroocum*, *Azospirillio lipophorum*, *Pseudomonas putida*) and humic acid. *Journal Agronomy and Plant Breeding*. 8: 37-25.
- Gulser, F., Sonmez, F., & Boysan, S. (2010). Effects of calcium nitrate and humic acid on pepper seedlinggrowth under saline condition. *Journal of Environmental Biology*. 31: 873-876.
- Handel, E.V. (1968). Direct micro detemination of sucrose. *journal Analytic biochemistry*. 22: 280-283.
- Jing-min, Z., Shang-jun, X., Mao-peng, S., Bingyao, M., Xiu-mei, C., & Chunsheng, L. (2010). Effect of Humic acid on poplar physiology and biochemistry properties and growth under different water level. *Journal Soil Water Conserv*.

- Mayhew, L. (2004). Humic acid substances in biological agriculture. *Eco-Agriculture* .Vol,34.nos.182.
- McCready, R.M., Guggolz, J., Silvera, V., & Owens, H.S. (1950). Determination of starch and amylase in vegetable. *Journal Analytical chemistry*. 22: 1156-1158.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Journal Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
- Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarren, A.M., Aguirre, O.E., Garnica, M., Fuentes, M., & Garcìa- Mina, J.M. (2010). Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *Journal of Plant Physiology*. 167: 633-642.
- Muhammad, J., & Ahmed, B. (2012). Effect of crude extract of (*Raphanus sativus* L)roots on isolated trachea of albino rat. *Journal Pakistan Physiology*. 8: 23-26.
- Muscolo, A., Cutrupi, S., & Nardi, S. (1997). IAA detection in Humic Substances. *Journal of Soil Biology Biochemistry*. 30: 1199-1201.
- Norman, Q., Stephen, L., Clive, A., & Rola, A. (2003). Effects of humic acids derived from cattle, food and paperwaste vermicomposts on growth of greenhouse plants. *Journal of Pedobiol*. 47: 741-744.
- Padem, H., Ocal, A., & Alan, R. (1999). Effect of humic acid added foliar fertilizer on quality and nutrient content of eggplant and pepper seedlings. *Journal Acta Horticulture*. 491.
- Salimon, J., Salih, N., & Yousif, E. (2012). Biolubricant basestocks from chemically modified ricinoleic acid. *Journal of King Saudi University*. 24: 11-17.
- Sanjari, M., Siroosmehr, A., & Fakheri, B. (2015). The effects of drought stress and humic acid on some physiological characteristics of roselle. *Journal of Crops Improvement*. 17: 403-414.
- Sharif, M., Khattak, R.A., & Sarir, M.S. (2002). Effect of different levels of lignitic coal drived humic acid on growth of maize plants. *Journal of Communication in Soil Science and Plant Analysis*. 33: 3567-3580.
- Turkmen, N., Dursan, A., Turan, M., & Erdinc, C. (2004). Calcium and humic acid affect seed germination, growth and nutrient content of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings under salin soil conditions. *Journal Acta Agriculture Scandinavica Section B-Soil & Plant Science*. 54: 168-174.
- Wagner, G.J. (1979). Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acid, and antocyanins in protoplast. *Journal Plant physiology*. 64: 88-93.
- Yang, C. M., M. C. Wang., Y. F. Lu., F. Chang., & C. H. Chou. (2004). Humic substances affect the activity of chlorophylls. *Journal of Chemical Ecology*. 30: 1057-1065.

Growth and physiological characters of radish in response to humic acid enriched with MS medium

Abdolahmad Rased¹, Kambiz Mashayekhi^{*2}, Seyyed Javad Mousavizadeh³, Ayoub Ghorbani⁴

1-MSc Student, Department of Horticultural Sciences, Gorgan University of agricultural sciences and natural resources, Gorgan, Iran. abdolahmadrased@gmail.com

2- Corresponding author and Associated Professor Department of Horticultural Sciences, Gorgan University of agricultural sciences and natural resources, Gorgan, Iran. kkambizmashayekhi@gmail.com

3-Assistance Professor Department of Horticultural Sciences, Gorgan University of agricultural sciences and natural resources, Gorgan, Iran. mousavizadeh@gau.ac.ir

4-PhD Student, Department of Horticultural Sciences, Gorgan University of agricultural sciences and natural resources, Gorgan, Iran. aiiobghorbani@yahoo.com

Received Date: 2019/07/01

Accepted Date: 2019/12/03

ABSTRACT

Introduction: The Murashig and Skoog (MS) culture medium is highly nutritious and has complete macro and microelements. Humic acid contributes to nutrients absorption and causes the growth and development of the plant. In this research, the growth and yield of radish (cv. Vikima) in the field was investigated using humic acid in combination with MS medium.

Materials and Methods: Humic acid in two levels (0 and 1.5 g/m²) and MS fertilizer in eight levels (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14%) were used as factorial experiment based on randomized complete block design with three replications.

Results and Discussion: The results showed that with the use of MS fertilizer, the number of leaves, tuber sucrose, tuber sulfur, total chlorophyll and tuber total sugar increased compared to the humic acid. Application of 14% MS fertilizer increased the diameter of the tuber to 32.66 mm. Using humic acid in combination with 14% MS fertilizer, the amount of anthocyanin in the tuber increased to 0.00019 mol/g on fresh weight. In the interaction effects of humic acid and MS fertilizer, increasing the fresh weight of the leaf, the leaf area, the fresh weight of the tuber and the diameter of the tuber was recorded. By applying humic acid and 10% complete fertilizer, leaf dry weight reached to the highest level (0.46 g).

Conclusion: Humic acid as a supplement to MS fertilizer had a good effect on radish growth. Humic acid supplemented with MS medium (up to 14% concentration) has proper effects on radish growth.

Keywords: Anthocyanin, Leaf, Tuber, Chlorophyll, Sulfur.