

## COMPORTAMIENTO DE MICELIOS DE LOS GÉNEROS *Agrocybe*, *Panus* Y *Psilocybe* (AGARICALES) EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO \*

Por Carmen Olmos-Fuertes y  
Teófilo Herrera \*\*

### INTRODUCCION

Los hongos del orden Agaricales han sido objeto de numerosos estudios de tipo morfológico; sin embargo, los estudios detallados de tipo fisiológico son escasos (HacsKaylo *et al.*, 1954; Leonian y Lilly, 1940; Tyler *et al.*, 1965).

El presente trabajo se realizó con la finalidad de observar el comportamiento fisiológico de algunos micelios de agaricales en diferentes medios de cultivo. Las especies estudiadas fueron: *Agrocybe pediades* (Pers. ex Fr.) Fayod, *Panus crinitus* (L. ex Fr.) Sing., *Psilocybe mexicana* Heim, y *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer & Smith.

Podemos considerar que, de las especies antes mencionadas, las dos pertenecientes al género *Psilocybe* llevan a cabo su ciclo de vida en el mismo clima: ambas crecen en praderas, aunque el substrato en que se desarrollan es diferente, pues, *P. mexicana* es terrícola y *P. cubensis* fimícola. *A. pediades* crece también en praderas y, usualmente, su substrato es el suelo o el estiércol. *P. crinitus* se desarrolla sobre madera, siendo su substrato usual los troncos de árboles muertos.

En los experimentos realizados en este trabajo, se trató de seguir un sistema semejante al empleado en la clasificación de las levaduras (Lodder y Kreger-Van Rij, 1952; Lodder, 1970), considerando que los datos fisiológicos pueden ser un complemento importante, de los morfológicos, para establecer en el futuro un sistema que tienda a representar una clasificación más natural de los hongos superiores.

\* Trabajo presentado como tesis profesional, para obtener el título de Biólogo, por el primero de los autores, en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, en 1971.

\*\* Laboratorio de Micología, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.

**MATERIAL Y METODOS:**

Las cepas utilizadas en este trabajo, fueron resiembras en malta agar, de los cultivos puros obtenidos a partir de carpóforos colectados y, en parte, identificados por Teófilo Herrera, en julio de 1969, quien los cultivó en tubos de malta-agar (Difco). Rolf Singer también colaboró en la identificación de los carpóforos de donde procedieron las cepas estudiadas, lo cual agradecen los autores.

Los carpóforos fueron colectados en Huautla de Jiménez, Oaxaca, con excepción de los correspondientes a *Panus crinitus*, los cuales fueron encontrados cerca de la Estación Biológica de los Tuxtlas, Veracruz.

Las cepas utilizadas en el presente estudio, así como los carpóforos con los mismos números de colección en relación a los utilizados para obtener dichas cepas, están depositados en las colecciones del Departamento de Botánica, del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS:**

Los medios de cultivo empleados en este trabajo son:

- I. Malta-Agar (Bacto-Malta-Agar, Difco), (Difco Manual, 1953).
- II. Sabouraud-Dextrosa-Agar (Bacto-Sabouraud-Dextrose-Agar, Difco).
- III. Fragmentos de papa.
- IV. Gelatina al 18% (Bacto-Gelatin, Difco).
- V. Leche tornasolada (Bacto-Litmus-Milk, Difco).
- VI. Medio basal nitrogenado (Bacto-Yeast-Nitrogen-Base, Difco).
- VII. Medio basal nitrogenado sin vitaminas.

Debido a que el medio basal nitrogenado (Difco), contiene una solución de vitaminas que pueden ser utilizadas por los micelios como fuente de carbono, aquél fue modificado, no añadiendo dicha solución de vitaminas a la fórmula que se anota a continuación:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 "
MgSO <sub>4</sub>	0.05 "
CaCl <sub>2</sub>	0.01 "
NaCl	0.01 "
Agua destilada	100.0 ml

- a) 10 ml de este medio se llevaron a 90 ml de agua destilada. Se le agregó 1.0 g de D (+) glucosa, esterilizada previamente con éter etílico q.p.
- b) Para observar el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el comportamiento de los micelios, se substituyó la glucosa por las siguientes

sustancias, utilizándolas siempre en cantidades equivalentes de carbono con respecto a la misma:

D (+) arabinosa	1.0 g
D (+) xilosa	1.0 "
D (+) fructosa	1.0 "
D (-) galactosa	1.0 "
D (+) maltosa	1.0 "
D (+) sacarosa	1.9 "
D (+) lactosa	1.0 "
Rafinosa	0.9 "
Inulina	0.9 "
Almidón soluble	0.9 "
Celulosa (como papel filtro)	0.8 "
Esculina	0.9 "
Peptona	1.0 "
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.1 "

- c) Medio basal nitrogenado sin vitaminas más una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 3% como fuente de carbono.
  - d) Medio basal nitrogenado sin vitaminas en una atmósfera a la que se le agregó KOH al 10%.
  - e) Medio basal nitrogenado sólido (sin vitaminas) más almidón como fuente de carbono (con agar purificado al 2%).
- VIII. Medio basal nitrogenado para alcoholes: etanol, glicerol y manitol al 2% (Lodder y Kreger Van Rij, 1952).
  - IX. Medio basal carbonado (Bacto-Yeast-Carbon-Base, Difco).
  - X. Medio basal carbonado sin vitaminas.

Como el medio basal carbonado (Difco), contiene una solución de vitaminas, las cuales pueden ser aprovechadas por los micelios como fuente de nitrógeno, fue modificado el medio, no añadiendo la solución de vitaminas, a la fórmula que se anota a continuación:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g
MgSO <sub>4</sub>	0.05 "
CaCl <sub>2</sub>	0.01 "
NaCl	0.01 "
Glucosa	1.0 "
Agua destilada	100.0 ml

- a) 10 ml del medio anterior se llevaron a 90 ml de agua destilada y se le agregaron 0.7 g de KNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno.

- b) Para observar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el comportamiento de los micelios, se sustituyó el  $\text{KNO}_3$  por cada una de las siguientes sustancias, utilizándolas siempre en cantidades equivalentes de nitrógeno con respecto al  $\text{KNO}_3$ :

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.8 g
Alanina	0.9 „
Glicina	0.8 „
Urea	0.9 „
Peptona	1.0 „

#### MÉTODOS:

##### Preparación del inóculo e incubación.

Para preparar el inóculo utilizado en los diferentes medios de cultivo, los micelios fueron sembrados en tubos con 10 ml de malta agar inclinada y posteriormente se incubaron a 25°C el tiempo necesario para su crecimiento (aproximadamente 15 días).

Con el objeto de obtener resultados más exactos, se procuró siempre mantener uniforme el tamaño del inóculo. En el caso de la inoculación de medios de cultivo sólidos, se colocó el inóculo, con el asa, en el centro de la superficie del medio. En el caso de la inoculación de medios de cultivo líquidos, el inóculo se sumergió en cada uno de ellos y se agitó ligeramente el asa de siembra, para desprenderlo.

Los cultivos en los diferentes medios fueron incubados a 25°C, a excepción de los cultivos de gelatina, ya que a dicha temperatura se iniciaba la licuefacción de la misma, por lo que se les mantuvo a temperatura de laboratorio (aproximadamente 20°C). El tiempo de incubación fue dado de acuerdo con el ritmo de crecimiento de los micelios en los medios de cultivo empleados; así, en malta agar, Sabouraud dextrosa agar y fragmentos de papa, dichos micelios fueron incubados durante 15 días.

En el caso de los medios de gelatina y leche tornasolada, la incubación fue variable para las diferentes especies estudiadas. En los demás medios de cultivo utilizados en este trabajo, el tiempo de incubación empleado fue de 20 días.

La medida del crecimiento de los hongos se efectuó considerando el diámetro de sus colonias (Brancato y Goldring, 1953), pero también se hizo una apreciación subjetiva sobre el vigor y la densidad de las mismas.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

De los micelios cultivados en fragmentos de papa, malta agar y Sabouraud, se observó que el primer medio estimuló notablemente el crecimiento de *Agrocybe pediades* y *Panus crinitus*; sin embargo, en las especies del género *Psilocybe*, el crecimiento fue muy raquítico; el medio de Sabouraud estimuló

notablemente el crecimiento de los micelios y la producción de pigmento, en las cuatro especies empleadas; en grado un poco menor, también se obtuvo un resultado semejante en malta agar.

Las especies estudiadas poseen capacidad para la licuefacción de la gelatina (gelatina Difco al 18%); sin embargo, el tiempo en que llevaron a cabo este proceso, varía notablemente entre ellas; este medio también indujo la formación de pigmento en *Agrocybe pediades*, *Panus crinitus* y *Psilocybe cubensis*, lo que no ocurrió con el cultivo de *P. mexicana*; también es conveniente notar que la coloración del pigmento producido por *P. cubensis* en este medio (rojo vino), fue diferente al que produjo en otros medios de cultivo (moreno claro o naranjado).

Para observar la capacidad de acidificación, coagulación y peptonización de la leche, por las especies empleadas, los micelios fueron cultivados en leche tornasolada. *Agrocybe pediades* llevó a cabo una peptonización muy intensa y, aunque en menor proporción, *Panus crinitus* también presentó este proceso además de la formación de un pequeño coágulo, el cual al añadirle KOH se reabsorbió completamente; *Psilocybe cubensis* no presentó coagulación ni peptonización, pero al igual que las dos especies antes citadas, produjo un ligero descenso en el pH del medio, mientras que *P. mexicana* no presentó ninguna de las reacciones antes mencionadas.

En los experimentos con las diferentes fuentes de carbono, se eligió un medio de composición química sencilla, que tiene, además de compuestos minerales, una fuente de nitrógeno inorgánico:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Se probaron diferentes compuestos carbonados inorgánicos y orgánicos como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , hidratos de carbono desde los simples hasta los complejos, alcoholes y glucósidos.

Los micelios se cultivaron en medio basal nitrogenado sin ninguna fuente de carbono, en el cual el crecimiento de *Agrocybe pediades*, *Psilocybe cubensis* y *P. mexicana* fue nulo; por el contrario, *Panus crinitus* presentó crecimiento, aunque no muy vigoroso; se pensó en la posibilidad de que esta última especie, al carecer de una fuente de carbono en el medio de cultivo, pudiera utilizar el  $\text{CO}_2$  de la atmósfera, por lo que los micelios se cultivaron en medio basal nitrogenado sin fuente de carbono, pero proporcionándoles una atmósfera con  $\text{CO}_2$  al 3% (proporción mucho mayor a la existente en la atmósfera normal); entonces, el crecimiento de *P. crinitus* fue incrementado al doble del presentado en el mismo medio, pero con atmósfera normal; en las otras especies tratadas no hubo crecimiento. Posteriormente, se decidió abstraer el  $\text{CO}_2$  que existe en la atmósfera normal con una solución de KOH al 10% y cultivar los micelios en estas condiciones, de tal manera que no existiera fuente de carbono en el medio de cultivo ni en la atmósfera; sin embargo, nuevamente esta especie presentó crecimiento, aunque escaso, lo cual pudo deberse tal vez a que la solución de KOH substrajo sólo parcialmente el  $\text{CO}_2$  de la atmósfera; también es conveniente considerar la posibilidad de que la pequeña cantidad de  $\text{CO}_2$ , desprendida durante el proceso respiratorio del inóculo, sea utilizada por éste, permitiéndole un ligero crecimiento, al no disponer de fuente de carbono en el medio.

Se hace notar que, en este trabajo, únicamente se está consignando el hecho de que sólo en *Panus crinitus* se presenta crecimiento, aunque escaso, en un medio de cultivo sin fuente de carbono y que al aumentar la proporción de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, el crecimiento se incrementa notoriamente, por lo que se sugiere que existe una fijación heterotófica de CO<sub>2</sub>, fenómeno que posteriormente debería ser estudiado en forma cuantitativa, y no sólo cualitativa.

El Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> también fue empleado como fuente de carbono y, nuevamente, *Panus crinitus* fue la única especie que creció en esta fuente inorgánica de carbono; posteriormente se repitió este experimento añadiendo la solución de vitaminas descrita en el capítulo anterior, la cual incrementó ligeramente el crecimiento de *P. crinitus*, pero en las otras especies el crecimiento siguió siendo nulo; además, empleando la solución de vitaminas como única fuente de carbono, el resultado obtenido fue el mismo.

Cuando la peptona se empleó como fuente de carbono, *Agrocybe pediades* y las dos especies del género *Psilocybe* presentaron crecimiento escaso, mientras que en *Panus crinitus* esta sustancia soportó un crecimiento vigoroso; posteriormente, los micelios se cultivaron en la misma fuente de carbono, proporcionándoles una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 3% y, en *P. crinitus*, el crecimiento fue incrementado aun más, mientras que en las otras especies el resultado no varió.

Los resultados obtenidos, al emplear los diferentes hidratos de carbono, fueron muy variables para cada especie, lo que constatamos en el caso de las pentosas ya que, para *A. pediades*, resultaron ser una fuente de carbono óptima, no así para las otras especies utilizadas, en las que el crecimiento fue escaso o nulo. Podemos considerar que con la glucosa y la fructosa, *Panus crinitus* presentó un crecimiento óptimo, las especies del género *Psilocybe* no respondieron como era de esperarse y *Agrocybe pediades* presentó un crecimiento raquíptico, pese a que la glucosa es utilizada por el mayor número de hongos y es considerada como la fuente de carbono universal. No obstante, existen algunos hongos incapaces de utilizar glucosa y otros azúcares como fuente de carbono, como es el caso de *Leptomitium lacteus* y de *Ustilago striiformes* (Lilly y Barnett, 1951).

Entre las hexosas empleadas en este trabajo, la galactosa fue la que sostuvo el crecimiento más vigoroso en las especies del género *Psilocybe* y en *A. pediades*. Los resultados obtenidos con los disacáridos, trisacáridos y polisacáridos e inulina fueron muy variables. *A. pediades* y *Panus crinitus* hidrolizaron totalmente el almidón y crecieron vigorosamente en celulosa; en las dos especies del género *Psilocybe*, el crecimiento en estos polisacáridos fue de menor intensidad.

De los alcoholes empleados, el etanol inhibió el crecimiento en todas las especies utilizadas, a excepción de *P. crinitus* en el cual, sin embargo, fue muy escaso, por lo que podríamos considerar su acción como tóxica. El glicerol y manitol fueron utilizados por las cuatro especies, aunque no produjeron resultados óptimos. Las cuatro especies utilizadas llevaron a cabo la hidrólisis de la esculina, lo cual se pudo observar por el halo de color moreno que se formó en el medio (Lodder y Kreger van Rij, 1952).

Utilizando un medio basal carbonado, constituido de sustancias minerales

simples y glucosa, se probaron compuestos de nitrógeno inorgánico como son el (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, el KNO<sub>3</sub> y diferentes compuestos orgánicos con nitrógeno: aminoácidos simples como glicina y alanina y compuestos como peptona y urea. Los resultados obtenidos fueron variables, pero se pudo comprobar que las especies empleadas pueden crecer con nitrógeno de nitratos y con nitrógeno de sales de amonio.

Robbins (en Lilly y Barnett, 1951) dice que un hongo que crece en un medio con nitratos, puede también utilizar nitrógeno combinado en sales de amonio o reducir el nitrógeno de nitratos hasta formar amonio, pudiéndolo asimilar de esta manera. Ulloa y Herrera (1967) encontraron que la combinación de dos fuentes de nitrógeno inorgánico, como NaNO<sub>3</sub> y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dio magníficos resultados en el crecimiento de *Psilocybe cubensis* y *P. mexicana*.

De los aminoácidos empleados: alanina y glicina, la primera indujo un crecimiento muy vigoroso en *P. crinitus*, bueno en las dos especies de *Psilocybe* y moderado en *A. pediades*; la glicina estimuló bien o moderadamente el crecimiento, excepto en *P. mexicana*, que se desarrolló muy poco con este aminoácido. Ulloa y Herrera (1967) encontraron que, de los aminoácidos, aquéllos que contienen azufre como metionina y cistina, estimulan más el crecimiento de *Psilocybe cubensis* y *P. mexicana*.

De las fuentes de nitrógeno empleadas, fue la peptona la que sostuvo el crecimiento más vigoroso, lo cual no es extraño, ya que esta sustancia, además de tener varios aminoácidos, contiene la mayoría de las vitaminas solubles en agua (Lilly y Barnett, 1951).

La urea estimuló notablemente el crecimiento de las dos especies del género *Psilocybe*, lo que no es extraño si consideramos que estas especies crecen normalmente en praderas con estiércol de ganado vacuno; en *Panus crinitus* y *Agrocybe pediades* se observó una franca inhibición del crecimiento por esta sustancia.

También se cultivaron los micelios en medio basal carbonado y, como fuente de nitrógeno, se añadió la solución de vitaminas anotada en el capítulo anterior; el crecimiento fue escaso en las especies utilizadas. Robbins (1950) informó que unas veinte especies de basidiomicetos crecen pobremente en un medio suplementado únicamente con vitaminas como fuente de nitrógeno y que el crecimiento se incrementa al añadir en el medio basal, caseína hidrolizada.

#### CONCLUSIONES:

Existe una capacidad proteolítica sobre la gelatina en los micelios de las especies estudiadas.

Las especies utilizadas poseen pigmentos, los cuales fueron producidos en varios medios de cultivo.

Se comprobó la diferente capacidad, que tienen las especies empleadas, para utilizar las distintas fuentes de carbono probadas. *Panus crinitus* crece sin fuente de carbono en el medio de cultivo, si dispone de una atmósfera con CO<sub>2</sub> y también utiliza el Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como fuente de carbono; las otras especies sólo crecieron con fuentes orgánicas de carbono. Las especies estudiadas hidrolizan al-

midón, celulosa y esculina. El etanol tiene acción tóxica sobre las especies citadas, excepción hecha de *P. crinitus*.

Los hongos estudiados crecen con nitrógeno de nitratos y con nitrógeno de sales de amonio; por otra parte, se desarrollan poco cuando el medio de cultivo es suplementado sólo con vitaminas como fuente de nitrógeno, o bien, como única fuente de carbono.

Entre las fuentes orgánicas con nitrógeno que se utilizaron, resultó ser la peptona, la que, en general, soportó el crecimiento más vigoroso; la urea sólo fue una buena fuente de nitrógeno para las especies del género *Psilocybe*, en particular para *P. cubensis*.

La formación de película en todos los medios líquidos, por el micelio de *Panus crinitus*, es un carácter muy constante en esta especie.

Una observación general, es la de recomendar estudios más amplios y detallados sobre las reacciones y caracteres fisiológicos y bioquímicos de los micelios de los hongos superiores, ya que éstos podrían ser un auxiliar valioso en las investigaciones morfológicas, fisiológicas y taxonómicas.

#### LITERATURA CITADA

- Brancato, F. P., y N. S. Golding, 1953. The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. *Mycologia* 45: 848-864.
- Difco Manual, 1953. Difco Laboratories. 9ª Ed. Detroit, Mich., 280 pp.
- Hackaylo, J., G. V. Lilly, y H. L. Barnett, 1954. Growth of Fungi on Three Sources of Nitrogen. *Mycologia* 46: 691-700.
- Leonian, H. L., y G. V. Lilly, 1940. Studies on the nutrition of fungi. IV. Factors influencing the growth of some thiamin requiring fungi. *Am. J. Bot.* 27: 18-26.
- Lilly, G. V., y L. H. Barnett, 1951. *Physiology of the Fungi*. McGraw Hill Book Company, Inc. New York, p. 8-44.
- Lodder, J., y N. J. W., Kreger-van Rij, 1952. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Interscience Publishers, Inc. New York, p. 19-35.
- , 1970. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. North Holland Publ. Co., Amsterdam-London, pp. 1-113.
- Robbins, J. W., 1950. A survey of the growth requirements of some Basidiomycetes. *Mycologia* 42: 470-475.
- Tyler, V. E. Jr., R. G. Benedict., y D. E. Stuntz, 1965. Chemotaxonomic significance of urea in the higher fungi (Ascomycetes, Basidiomycetes). (Coll. Pharm., Univ. Wash., Seattle, Wash., U.S.A.). *Lloydia* 48: 342-356.
- Ulloa, S. M., y T. Herrera, 1967. Factores que influyen en el crecimiento de los micelios de *Psilocybe mexicana* Heim y *Psilocybe cubensis* (Earle) Sing. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México. Ser. Bot.* 38: 165-192.

#### RESUMEN

Se cultivaron cuatro especies de *Basidiomycetes* (*Agrocybe pediades*, *Panus crinitus*, *Psilocybe cubensis* y *P. mexicana*) en diferentes medios de cultivo, con el objeto de observar caracteres fisiológicos y algunos morfológicos como: crecimiento, formación de película, producción de pigmento, color del pigmento, acidificación, coagulación, peptonización y capacidad hidrolítica. Se emplearon medios de cultivo sintéticos y no sintéticos. El medio de Sabouraud fue el que

sostuvo el crecimiento más vigoroso. Se comprobó que las especies utilizadas poseen actividad proteolítica sobre la gelatina. Se probaron fuentes de carbono inorgánicas y orgánicas; carbohidratos simples y complejos, alcoholes y glucósidos, encontrándose que una de las especies, *P. crinitus*, crece teniendo como única fuente de carbono el CO<sub>2</sub> de la atmósfera, o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en el medio de cultivo; las otras especies sólo crecen con fuentes de carbono orgánico. Se comprobó la hidrólisis de almidón, celulosa y esculina por las especies utilizadas. También se probaron fuentes de nitrógeno inorgánicas y orgánicas, encontrando que las especies estudiadas crecen con nitrógeno de nitratos y con nitrógeno de sales de amonio. Varias fuentes orgánicas de nitrógeno fueron empleadas, de las cuales, la peptona estimuló notablemente el crecimiento de los micelios de las cuatro especies y la urea incrementó el crecimiento en las especies del género *Psilocybe* pero no en las otras especies. Algunos aminoácidos también estimularon el crecimiento de los micelios de todas las especies estudiadas, en mayor o menor grado.

#### SUMMARY

Four species of Basidiomycetes (*Agrocybe pediades*, *Panus crinitus*, *Psilocybe cubensis* and *P. mexicana*) were grown in different culture media with the purpose to observe physiologic and some morphologic characters: growth, pellicle formation, pigment production, color of pigment, acidification, coagulation, peptonization and hydrolytic capacity. Synthetic and nonsynthetic media were used; Sabouraud medium was the best to get a good growth. It was shown that the species used in this research have proteolytic action on gelatin. Carbon sources, both inorganic and organic, were tested: simple and complex carbohydrates, alcohols and glucosides; one of the species, *P. crinitus*, grows with atmospheric CO<sub>2</sub> as the only source of carbon or with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in the culture medium; the other species only grow if a source of organic carbon is present in the medium. The hydrolysis of starch, cellulose and esculin was observed. Both inorganic and organic nitrogen sources were tested; all the species grow with nitrate or ammonium salts in the medium. Several organic nitrogen sources were used; from them, peptone stimulated a vigorous growth of all the mycelia and urea held the growth of the species of the genus *Psilocybe* but not the growth of the other two species. Some aminoacids also stimulated the growth of the mycelia of the four species, in different degree.