علاقة طرز الهيموغلوبين في الاداء التناسلي لابقار الهولشتاين لاغراض الانتخاب

جعفر رمضان احمد [1] طلال انور عبد الكريم[1] عبد جواد كاظم[2]

قسم الانتاج الحيواني– كلية الزراعة/ جامعة بغداد (1) كلية النسور الجامعة(2)

المستخلص

تم اجراء هذا البحث بهدف دراسة علاقة طرز الهيموغلوبين في الاداء التناسلي لابقار الهولشتاين لاغراض الانتخاب. نفذت هذه الدراسة في حقل الابقار التابع لقسم الانتاج الحيواني، كلية الزراعة / جامعة بغداد فضلا عن مختبر الفسلجة، كلية الزراعة/ جامعة بغداد ومختبرات الوراثة الجزيئية الخاصة للمدة من 2013/11/1 ولغاية 2014/11/1. تم جمع عينات الدم من 40 بقرة هولشتاين وتم التعرف على طرز الهيموغلوبين الخاصة بها بطريقة الترحيل الكهربائي. تم الاعتماد على السجلات للحصول على صفات الاداء التناسلي للابقار وهلاكات المواليد لغاية الفطام. كان تأثير طراز الهيموغلوبين في عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب وفي المدة بين الولادة والتلقيح المثمر وفي نسبة عدم العودة للصراف معنويا ($P\leq0.05$)، إذ حققت الابقار ذات الطراز AB افضل اداء تناسلي. كان التباين في الفترة بين ولادتين عالي المعنوية ولصالح الابقار ذات الطراز AB (اقصر فترة بين ولادتين). من جانب اخر، كانت اعلى نسبة هلاك المواليد عند الولادة (2.95 ± 0.04%) وادناها (1.37 ± 0.04%) لدى الابقار ذات الطرازين B و A على التوالي والفروق بينهما معنوية ($P\leq0.05$). كما تأثرت نسبة هلاك المواليد بعد الولادة لغاية الفطام بأختلاف طرز الهيموغلوبين، اذ بلغت اعلاها (9.82 ± 0.07 %، $P\leq0.05$) لدى الطراز B في الوقت الذي لم يختلف فيه الطرزين A (4.69 ± 0.07 %) و AB (5.08 ± 0.04 %) معنوياً. يمكن الاستنتاج بامكانية اعتماد طرز الهيموغلوبين كأداة للانتخاب في تحسين الاداء التناسلي لابقار الهولشتاين من خلال انتخاب الابقار ذات الطراز AB لتعظيم العائد الاقتصادي من مشاريع تربيتها.

الكلمات المفتاحية: طرز الهيموغلوبين، الاداء التناسلي، ابقار الهولشتاين.

Relationship of Hemoglobin type with the reproductive performance in Holstein cows for selection

Jaafer R. Ahmed [1] Talal A. Abdullkareem [1] Abid J. Kadhum [2]

Department of Animal Production/College of Agriulture/University of Baghdad(1)

Al-Nsoor Universal College(2)

Abstract

This study was undertaken to investigate the relationship of hemoglobin type with the reproductive performance in Holstein cows for selection purposes. This study was executed at the Dairy Cattle Farm and Physiology Laboratory pertaining to the College of Agriculture, University of Baghdad, as well as in private molecular genetics laboratories during the period from 1/11/2013 to 1/11/2014. Blood samples were collected from 40 Holstein cows, and the hemoglobin types were

identified using electrophoresis technique. Records were obtained for cow's reproductive performance and their birth death data until weaning. The effect of hemoglobin type on service per conception, interval between calving and subsequent successful mating and non-return rate to estrus was significant (P≤0.05), being all better in AB type. Greater (P≤0.01) variation was noticed in calving interval trait among the cows, being shorter in AB type. On the other hand, higher and lesser (P≤0.05) calves death rates at calving (2.95 ± 0.04 and 1.37 ± 0.04% respectively) were detected in those with B and A types respectively. Moreover, death rates at calving to weaning interval were also influenced by hemoglobin types, being higher (P≤0.05) in B type (9.82 ± 0.07%), along with non-significant differences detected between A (4.69 ± 0.07%) and AB (5.08 ± 0.04%) types. In conclusion, the hemoglobin type can be adopted type of hemoglobin can adopted as selection tool to improve the reproductive performance of Holstein cows, through selecting those with AB type to maximize the economic gain of their breeding projects.

Keywords: Hemogllobin type, Reproductive performance, Holstein cows.

المقدمة

يعد الهيموغلوبين (خضاب الدم) المادة الناقلة للأوكسجين والصابغة لخلايا الدم الحمر (11)، وقد وصف(6) الهيموغلوبين بانه عبارة عن جزيئة كبيرة لبروتين معقد متكونة من اربع سلاسل ببتيدية، الفا وبيتا وجزيئة هيم واحدة، والتي تختلف بدرجة كبيرة بتسلسل الاحماض الامينية والتي تكون تحت سيطرة التوزيع الجيني غير الاليلي. ويتحدد التركيب الوراثي للهيموغلوبين وراثيا من اثنين من الاليلات السيادية المشتركة (Co-dominant) والتي تنتج ثلاثة تراكيب مظهرية والتي يمكن تميزها عن طريق الترحيل الكهربائي. يتراوح وزن الهيموغلوبين الجزيئي بين 66000-69000 دالتون. يخرج الهيموغلوبين من خلايا الدم الحمر عند موتها وينتقل الحديد من الهيموغلوبين إلى لب العظام بوساطة بروتين يسمى ترانسفيرين (Transferrin) ويستخدم مرة أخرى في إنتاج خلايا الدم الحمر، أما باقي الهيموغلوبين فيتحول إلى مادة كيميائية تسمى بيليروبين (Bilirubin) الذي يدخل في تركيب العصارة الصفراوية المساعدة على الهضم (10).

يزداد تركيز الهيموغلوبين مع تقدم العمر الى حد معين ثم يبدأ بالانخفاض في الحيوانات المسنة (5، 7)، كما وجد أن تركيزه في الحملان الذكرية يفوق معنويا ما عليه في مثيلاتها الأنثوية (3، 4)، وذكر (17) ان تركيز خضاب الدم يتأثر بكل من السلالة وصحة الحيوان، فضلا عن تأثره بطراز الهيموغلوبين. يعتمد زيادة اعداد الحيوانات في الحقول على خصوبة القطيع والتي يشترك فيها كل من الذكور والاناث (2)، فضلا عن اهمية بقية العوامل المؤثرة عليها وفي مقدمتها التغذية الجيدة وتوفير البيئة المناسبة والرعاية الصحية وغيرها. تعرف خصوبة الثيران بانها القابلية على التزاوج وانتاج سائل منوي يتمتع بكامل المواصفات الحيوية لنجاح عملية الاخصاب، اما خصوبة الابقار فيعبر عنها بقدرتها على التزاوج واتمام عملية الاخصاب والاستمرار في الحمل وانجاب مواليد سليمة قادرة على استمرارها في الحياة، اما مؤشرات الخصوبة او الاداء التناسلي

للاناث فتشمل عدة جوانب اهمها العمر عند اول ولادة (Age at first calving)، عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب(Service per consuption)، المدة من الولادة الى التلقيح المثمر او الايام المفتوحة (Days open)، الفترة بين ولادتين (Calving interval) ونسبة عدم العودة الى الصراف (Non return rate; 8، 18، 20). وهنالك علاقة واضحة بين تركيز الهيموغلوبين والحالة التناسلية للابقار، اذ لوحظ ان تركيز الهيموغلوبين في ابقار الهولشتاين– فريزيان الحوامل كان اعلى (77.18 ± 13.7 غم / لتر) مقارنةً بنظيراتها غير الحوامل (69.15 ± 11.32 غم / لتر) لاسباب تعود الى اجهاد الحمل (Pregnancy stress) وافراز السكريات القشرية (Glucocorticoids) من الغدة الكظرية (13). ولقلة الدراسات التي تعنى بالعلاقة بين طرز الهيموغلوبين وبعض معايير الكفاءة التناسلية لابقار الهولشتاين فقد اجريت الدراسة الحالية تسليط الضوء على تأثير طرز الهيموغلوبين في بعض مؤشرات الكفاءة التناسلية لابقار الهولشتاين لاغراض الانتخاب.

المواد وطرائق العمل

نفذ البحث في الحقل الحيواني التابع لقسم الانتاج الحيواني/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد،اعتمادا على السجلات التناسلية للابقار للمدة من 2013/6/3 ولغاية 2014/11/1 على عينة مكونة من40 بقرة هولشتاين، وذلك لدراسة تأثير طرز الهيموغلوبين في الاداء التناسلي للابقار. تمت إدارة القطيع وفق برنامج يتضمن التغذية والتحضير لموسم السفاد والإعداد لمرحلتي الحمل والولادة فضلا عن الرعاية الصحية والبيطرية.تتباين كمية العلف ونوعيته باختلاف الموسم وتبعا لتوافرها، إذ قدم العلف الاخضر من الجت او البرسيم او سيقان الذرة الصفراء أو العلف الخشن المتمثل بمادة التبن على شكل بالات تم شراؤها من الاسواق المحلية على وجبتين صباحية ومسائية، كما قدم العلف المركز بمقدار 2 كغم/وجبة/ حيوان حسب توفرها وازدادت هذه الكمية قبل الموسم التناسلي وفي اثنائه لتصل الى 3 كغم لكل حيوان في الوجبة الواحدة بالنسبة للابقار الوالدة والحلوبة اثناء الحلب ولايوجد رعي لهذه الحيوانات، إذ ان القطيع يربى في الحظائر.

تم التعرف على طرز الهيموغلوبين بطريقة الترحيل الكهربائي، إذ ان الطراز HbA يكون اسرع في الترحيل الكهربائي اما الطراز HbB فيكون بطيئا في الترحيل الكهربائي في حين ان الطراز HbAB تكون حركته وسطا بين الاثنين, اما التعرف على تركيز الهيموغلوبين لكل بقرة فقد تم بطريقة تقدير تركيز هيموغلوبين الدم (Hemoglobin test, Hb) من خلال تحويل الدم الى Cyanomethmoglobin بأستعمال كاشف Drabkins reagent ، إذ استخدم 0.02 مل من الدم وخلط بـ 5 مل من الكاشف وتركه لمدة 5 دقائق وبعدها وضع المزيج في جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة وتمت قراءته بأستعمال جهاز الطيف الضوئي (Spectrophotometer) وبطول موجي 520 نانومتر وحسب الطريقة التي أشار اليها (19)

تم تحليل البيانات احصائيا باستعمال SAS (14) لدراسة تأثير طرز الهيموغلوبين في الصفات التناسلية، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan متعدد المديات (9) وذلك بتطبيق طريقة متوسط المربعات الصغرى (Least square means).

الانموذج الرياضي.

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + P_j + S_k + e_{ijkl}$$

إذ ان:

Yijkl: قيمة المشاهدة l العائدة للتركيب الوراثي i وتسلسل الدورة الانتاجية j وموسم الولادة k.

μ: المتوسط العام للصفة.

Gi: تأثير تعدد طرز الهيموغلوبين (A و AB و B).

Pj: تأثير تسلسل الدورة الانتاجية (من الثانية الى الرابعة).

Sk: تأثير موسم الولادة (الشتاء –الربيع–الصيف –الخريف).

eijkl: الخطأ العشوائي الذي يتوزع طبيعيا بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره $\sigma^2 e$.

النتائج والمناقشة

عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب والمدة من الولادة الى التلقيح المثمر

يتضح من الجدول (1) أن لطراز الهيموغلوبين تأثيرا معنويا ($P\leq0.05$) في عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب، إذ حققت الابقار ذات الطراز AB إدنى عدد من التقيحات اللازمة للاخصاب وبمعدل 1.82 ± 0.07 تلقيحة وهو افضل مما عليه في الابقار ذات الطرازين A و B والتي احتاجت 2.66 ± 0.19 و 2.49 ± 0.16 تلقيحة على التوالي لغرض الاخصاب. وهذا العدد من التلقيحات اللازمة للاخصاب للابقار ذات الطراز AB هو افضل من العدد الذي وجده (1) وعلى ابقار هولشتاين فريزيان في محطة ابقار النصر.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن التباين في المدة من الولادة الى التلقيح المثمر يختلف معنويا بأختلاف طرز الهيموغلوبين لدى أبقار الهولشتاين وكان التميّز للابقار ذات الطراز AB، اذ بلغت المدة 133.58 ± 7.04 و93.92 ± 5.17 و126.85 ± 7.39 يوم للابقار ذات طرز الهيموغلوبين A وAB وB بالتتابع (الجدول 1).

الجدول (1) تاثير طرز الهيموغلوبين في عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب والمدة من الولادة الى التلقيح المثمر

طراز الهيوغلوبين	العدد	متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي	
		عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب	المدة من الولادة الى التلقيح المثمر (يوم)
A	22	b 0.19 ± 2.66	b 7.04 ± 133.58
AB	13	a 0.07 ± 1.82	a 5.17 ± 93.92
B	5	b 0.16 ± 2.49	b 7.39 ± 126.85
مستوى المعنوية		*	*

* ($P\leq 0.05$).

ومن الجدير بالذكر ان المدة من الولادة الى التلقيح المثمر تعتمد على عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب، فكلما قل عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب قلت المدة من الولادة الى التلقيح المثمر والعكس صحيح وهذا ما ظهر واضحا عند الابقار ذات الطراز AB اذ سجلت اقل مدة من الولادة الى التلقيح المثمر مقارنة بالابقار ذات

الطرز الاخرى، بمعنى احتياجها لاقل عدد من التلقيحات اللازمة للاخصاب، وهو دليلاً واضحاً على زيادة خصوبتها (12). وقد وجد ان زيادة عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب تؤدي الى زيادة معدل الاستبدال للعجلات من القطيع نتيجة لزيادة عدد مرات التلقيح مما تضيف كلفة اقتصادية اكثر على انتاج الحليب لدى القطيع (8).

نسب عدم العودة للصراف والفترة بين ولادتين

يتبين من الجدول (2) أن نسبة عدم العودة للصراف والتي تعكس القابلية التناسلية للبقرة وللقطيع قد تأثرت معنويا ($P\leq0.05$) بأختلاف طراز الهيموغلوبين وكان اتجاه النتائج لهذه الصفة بذات الاتجاه لصفتي عدد التلقيحات اللازمة للاخصاب والمدة بين الولادة والتلقيح المثمر المشار اليها انفا. وقد حققت الابقار ذات طراز الهيموغلوبين AB أفضل نسبة لعدم العودة للصراف (93.04 ± 6.22 %)، في الوقت الذي بلغت فيه النسبة لدى الابقار ذات الطرازين A و B هي 81.66 ± 3.79 و 83.63 ± 5.72 % على التوالي. ان زيادة نسبة عدم العودة للصراف يعني بقاء الجسم الاصفر قادراً على افراز هرمون البروجستيرون بشكل كفوء وحدوث حالة الحمل (16) وبالتالي زيادة معدلات الحمل لدى الطرز AB مقارنة بالطرازين A وB، مما ينعكس ايجابياً في زيادة معدل الولادات والعائد الاقتصادي لمربي الابقار.

كما يتضح من الجدول (2) ان الفترة بين ولادتين تتأثر بصورة عالية المعنوية ($P\leq0.01$) بأختلاف طراز الهيموغلوبين، اذ بلغت معدلاتها 424.92 ± 17.06 و 372.37 ± 15.85 و 413.77 ± 15.97 يوم للابقار ذات الطرز A و AB و B بالتتابع، وبذلك نجد ان الفارق اكثر من شهر بين الابقار التي ذات الطراز AB مقارنة بمثيلاتها ذات الطرازين الاخرين. وكانت افضلية الفترة بين الولادتين للابقار ذات الطرازAB وهي مقاربة للفترة التي سجلتها كل من (17) اذ بلغ معدلها 395.41 و(1) اذ بلغت 323.27 ± 1.08 يوم. ان انخفاض الفترة بين ولادتين لدى الطراز AB يعني في الوقت نفسه زيادة طول الحياة الانتاجية للابقار (Longitivity)، وبالتالي زيادة انتاجها الكلي من الحليب فضلاً عن زيادة عدد العجول المولودة خلال فترة حياتها وزيادة العائد الاقتصادي للمربين.

من خلال نتائج الاداء التناسلي المتميزة للابقار ذات الطراز AB في الدراسة الحالية يمكن اعتمادها مستقبلاً من قبل مربي الابقار في عمليات الانتخاب والتحسين الوراثي مقارنةً بالطرازين A وB.

الجدول (2) تأثير طرز الهيموغلوبين في نسب عدم العودة للصراف والفترة بين ولادتين.

طراز الهيوغلوبين	العدد	متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي	
		نسب عدم العودة للصراف (%)	الفترة بين ولادتين(يوم)
A	22	b 3.79 ± 81.66	b 17.06 ± 424.92
AB	13	a 6.22 ± 93.04	a 15.85 ± 372.37
B	5	b 5.72 ± 83.63	b 15.97 ± 413.77
مستوى المعنوية	---	*	**

* ($P\leq 0.05$) ; ** ($P\leq 0.01$).

نسبة هلاك المولود عند الولادة ونسبة الهلاك لغاية الفطام

يتبين من الجدول (3) تأثير طرز الهيموغلوبين لدى ابقار الهولشتاين على نسبة الهلاك في مواليدها، اذ تأثرت نسبة هلاك المولود عند الولادة (تم احتساب هلاك المواليد عند الولادة من ولادتها لغاية اليوم الثاني بعد الولادة) أو نسبة الهلاك لغاية الفطام وفي كلا الحالتين بشكل معنوي ($P\leq0.05$). اما فيما يتعلق بنسبة الهلاك لغاية اول يومين بعد الولادة كانت لدى العجول الناتجة من الابقار ذات الطرازين A و AB بواقع 1.37 ± 0.04 و 1.62 ± 0.02 % في حين كانت اعلى من ذلك بين مثيلاتها الناتجة من ابقار ذات طراز نوع B. أما نسبة الهلاك بعد يومين من الولادة ولغاية الفطام فقد بلغت 4.69 ± 0.07 و 5.08 ± 0.04 و 9.82 ± 0.07 % للعجول الناتجة من ابقار ذات طرز هيموغلوبين A و AB و B بالتتابع. ان تحسين الحالة التغذوية للابقار خلال الشهرين الاخيرين من الحمل ينعكس ايجابياً في زيادة وزن المواليد عند الولادة وانخفاض نسبة هلاكها، كما ان زيادة انتاجها من الحليب تنعكس في زيادة اوزان العجول عند الفطام مما يقلل من نسبة هلاكها عند الفطام (15). ان انخفاض نسبة هلاكات المواليد للطرازين A وAB قد يعود الى الادارة التغذوية الجيدة لها خلال مدة ماقبل الولادة والذي انعكس ايجابياً في تحسين صحة المواليد بعد الولادة ولحين الفطام وانخفاض نسب هلاكاتها من الولادة الى الفطام.

الجدول(3) تاثير طرز الهيموغلوبين في نسبة هلاك المولود عند الولادة ونسبة الهلاك لغاية الفطام.

طرز الهيموغلوبين	العدد	متوسط المربعات الصغرى ± الخطأ القياسي (%)	
		نسبة هلاك المولود عند الولادة	ونسبة الهلاك لغاية الفطام
A	22	a 0.04 ± 1.37	a 0.07 ± 4.69
AB	13	a 0.02 ± 1.62	a 0.04 ± 5.08
B	5	b 0.04 ± 2.95	b 0.07 ± 9.82
مستوى المعنوية	---	*	*

* ($P\leq 0.05$).

المصادر

1- التميمي، علي نصر عباس. 2003. التقويم الوراثي لثيران الهولشتاين-فريزيان في مركز التلقيح الاصطناعي / ابو غريب. رسالة ماجستير/ كلية الزراعة-جامعة بغداد.

2- الدوري، ظافر شاكر عبد الله .2002. تأثير الإجهاد الحراري ولون الفروة الأسود والأحمر على بعض مظاهر أداء أبقار الهولشتاين فريزيان في العراق. أطروحة دكتوراه/ كلية الزراعة– جامعة بغداد.

3- الحلو، مرتضى فرج عبدالحسين.2005. استخدام بعض المعايير الدمية والكيمياحيوية دليلا للنمو ودراسة البلوغ الجنسي وصفات الصوف في حملان الاغنام العراقية. اطروحة دكتوراه/ كلية الزراعة–جامعة البصرة.

4- غضبان، رشاد فاضل .2002. وراثة الهيموغلوبين ودراسة مستوى بعض العناصر المعدنية في مصل الاغنام العرابية والمعز المحلي الاسود. رسالة ماجستير/كلية الزراعة–جامعة البصرة.

5- قاسم، وليد يوسف .2001. تأثير فيتامين (C) وأنظمة مختلفة من الفطام في أداء الحملان العرابية. رسالة ماجستير/ كلية الزراعة – جامعة البصرة.

6- Ahmed,W.M., Zaabal, M.M. and Abd El Hameed, A.R.2010. Relationship between ovarian activity and blood lead concentration in cows and buffaloes with emphases on gene frequencies of hemoglobin.Global Journal of Biotechnology & Biochemistry, 5(1):1-5.

7- Baranowski, P., Stanislaw, B.B. and Wieslawa, K. 2000. Some heamatological and biochemical serum and bone tissue indices of lambs derived from ewes fed on vitamin and mineral-vitamin supplements during pregnant. Bull. Vet. Palawy. 44: 207-214.

8- Bayram, B., Yanar, M., Akbulut, O., 2009. The effect of average daily gain and age at first calving on reproductive and milk production traits of Brown Swiss and Holstein Friesina cattle, Bulgarian journal of agricultural science, 15, 5 453-462 12.

9- Duncan, D.B. 1955. Multiple Range and Multiple F-test. Biometrics. 11: 4-42.

10- Manca, L., Di Luccia, A., Pieragostini, E., Naitana, S. and Masala, B. 2001. Haemoglobin.A new beta-globin chain variant found in sheep of Italian breeds. *Anim. Genet*, *24*, 203-204.

11- Maton, A., Jean, H., Charles,W. M., Susan, J., Maryanna, Q.W., David, L. and Jill, D.W.1993. Human Biology and Health . Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall.

12- Pal, S. K. and Mummed, Y. Y. 2014. Investigation of haemoglobin polymorphism in Ogaden cattle. Vet. Wld., 7: 229-233.

13- Nazifi, S., Ahmadi, M. R. and Gheisari, H. R. 2008. Hematological changes of dairy cows in postpartum period and early pregnancy. Comp. Clin. Pathol., 17: 157-163.

14- SAS. 2012. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.

15- Sanh, M. V. 2009. Effect of supplementation with cassava leaf meal before and after calving on birth weight, growth rate of calves and body weight change of buffalo cows in smallholder farms. Livest. Res. Rural Dev., 21: 98.

16- Senger, P.L. 2003. Regulation of reproduction: nerves, hormones and target tissues. In: Pathways to Pregnancy and Parturition. Chapter 5. 2nd revised edn. Current Conceptions Inc., Washington, USA. pp. 102-127.

17- Templeton , J.W., Donald, P. and Ralph, B. 2010. Frequency of Hemoglobin type in five breeds of sheep.*www.diaglab.vet.cornell.edu/clipath/modules/coags.*

18- Ulutaş, Z., Sezer, M. 2009. Genetic study of milk production and reproduction traits of local born Simmental cattle in Turkey, Ziraat Fakültesi Dergisi, 2009, 26, 1, 53-59.

19- Varley, H., Gowenlock, A.H. and Bell, M. 1980. Partial Biochemistry. 5th ed. William Heinemann Medical Books. Ltd. London.

20- Zuzana, R. and Juraj, C. 2011. Analysis of Relationship between Production and Reproduction Traits of Holstein Cattle Population in the Slovak Republic Slovak Agricultural University in Nitra, 949 76, Tr. A. Hlinku 2, Slovak Republic.