

· 研究论文 ·

# 抗戊唑醇禾谷丝核菌的渗透压敏感性 及相对渗率变化研究

夏晓明, 王开运\*, 范昆, 胡燕, 刘振龙

(山东农业大学 植物保护学院 农药科学系, 山东 泰安 271018)

**摘要:**经药剂筛选和 UV 诱导, 分别获得了抗戊唑醇的禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis* 菌株, 比较了其敏感菌株对渗透压的敏感性和经不同浓度戊唑醇处理后的相对渗率变化。在相同的渗透压环境下, 敏感菌株对渗透压较抗性菌株更为敏感。不同抗性菌株间对渗透压的敏感性在低渗和中渗环境下差异不大, 在高渗环境下有一定的差异; 而敏感菌株只对低渗透压 (1% 葡萄糖) 和高渗透压 (8% 葡萄糖) 相对较为敏感。用不同浓度的戊唑醇处理后, 与敏感菌株相比, 抗性菌株能在较短的时间里 (1 h) 渗出更多的电解质, 但最终前者的相对渗率要明显高于后者。用高浓度的戊唑醇处理抗性菌株后, 其相对渗率明显高于低浓度处理。

**关键词:** 禾谷丝核菌; 戊唑醇; 渗透压; 相对渗率

中图分类号: S481.4

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2005)02-0126-05

## Changes of Relative Leakage and Osmolarity Sensitivity to Tebuconazole-resistant Strains of *Rhizoctonia cerealis*

XIA Xiaoming, WANG Kaiyun\*, FAN Kun, HU Yan, LIU Zhen-long

(Department of Pesticide Science, College of Plant Protection,  
Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract:** The mutants in different resistance level of *Rhizoctonia cerealis* to tebuconazole were selected on PDA medium amended with the fungicide and irradiated by UV respectively. Then changes of the sensitivity to osmolarity and relative leakage at different concentrations of tebuconazole in different times were compared between resistant strains and sensitive strain respectively. In the same concentrations of dextrose, the sensitive strain was inhibited more than all resistant strains. All the resistant strains had no obvious difference on the PDA containing 1% and 4% dextrose, but have some difference on the 4% dextrose medium in mycelium growth. However, the sensitive strain was more sensitive to 1% and 8% dextrose compared with 4% dextrose medium. The results of relative leakage showed that, the resistant strains could leak more electrolyte than the sensitive strain in 1 h after treatment with different concentrations of tebuconazole. However, the relative leakage of sensitive strain was higher than that of resistant strains finally. In addition, the relative leakage of resistant strains treated with high concentrations of tebuconazole was higher than treated with low concentrations.

**Key words:** *Rhizoctonia cerealis*; tebuconazole; osmolarity; relative leakage

收稿日期: 2005-02-02; 修回日期: 2005-04-19.

作者简介: 夏晓明 (1978-), 男, 博士研究生, 主要从事农药毒理与有害生物抗药性研究; \*通讯作者: 王开运 (1954-), 男, 山东滕州人, 教授, 博士生导师, 主要从事农药毒理及有害生物抗药性研究. 联系电话: 0538-8242345; E-mail: kywang@sdau.edu.cn  
基金项目: 国家“十五”科技攻关项目 (2002BA516A12).

小麦纹枯病 *Rhizoctonia cerealis* (又称小麦尖眼斑病)是一种在世界各地小麦上广泛发生、分布的土传真菌病害<sup>[1-4]</sup>,由丝核菌属引起,早在1934年国外就有报道。在我国,小麦纹枯病的病原主要是禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis*<sup>[5-7]</sup>。1973年以来,此病在我国发生并逐年加重,近年来在鲁、豫、陕、苏、皖等小麦种植区发生较为普遍,已成为影响小麦高产稳产的重大障碍<sup>[8-13]</sup>。戊唑醇是德国拜耳公司于20世纪80年代开发的一种三唑类杀菌剂,属于麦角甾醇合成抑制剂,对小麦纹枯病具有很好的防治效果,同时也能兼治麦类黑穗病 *Ustilago kolleri*、散黑粉病 *Ustilago tritici*<sup>[14-17]</sup>。作者已经在田间发现抗戊唑醇的小麦纹枯病菌菌株,且室内研究也证明禾谷丝核菌对戊唑醇的抗性风险性较大,易产生高水平的抗性,抗性菌系对其他药剂的交互抗性范围较广<sup>[18]</sup>。

杨谦<sup>[19]</sup>认为,病原菌细胞膜透性的改变,导致杀菌剂不能进入病原菌或者病原菌能高速排泄杀菌剂,从而表现为抗药能力的增强。石志琦等<sup>[20]</sup>曾测定并比较了对菌核净敏感和产生抗性的核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 菌丝体浸出液的电导率及其对渗透压的敏感性,用菌丝体细胞内电解质的渗漏情况来描述其抗性机制。丁中等<sup>[21]</sup>认为可以运用电导率法来鉴定抗性和敏感菌株。张永杰等<sup>[22]</sup>研究发现,抗腐霉利的灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 菌株的细胞膜透性和对渗透压的敏感性要明显高于敏感菌株。而戊唑醇本身就能够引起小麦纹枯病菌细胞膜透性发生变化,使细胞内物质向外渗漏、沉积,从而导致细胞壁加厚,最终导致菌丝细胞解体死亡<sup>[23,24]</sup>。

作者通过药剂筛选和UV诱导,分别获得了抗戊唑醇的禾谷丝核菌菌株,并与敏感菌株的电导率和对渗透压的敏感性进行了比较,用以检验抗性和敏感菌株之间细胞膜透性是否发生变化,以分析其可能的抗性生理机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

WW为供试敏感菌株,采自山东泰山中天门狗尾草上,从未使用过化学药剂,敏感度较高,经分离鉴定确定为禾谷丝核菌 *R. cerealis*,小麦接种后其发病症状与田间一致;WWL为药剂连续选择获得的高抗菌株;WX1、WX2为UV诱导获得的中抗菌株。

### 1.2 药剂和主要仪器

97%戊唑醇 (tebuconazole)原药 (山东华阳科技股份有限公司生产),用丙酮溶解,配成1000 μg/mL的戊唑醇母液,然后用重蒸水稀释至各所需浓度。

DDS-11A型电导仪 (上海雷磁仪器厂)。

### 1.3 禾谷丝核菌抗药突变体诱导方法

1.3.1 药剂连续选择 将WW菌株稳定培养后,测定其毒力基线。然后每代以抑制菌丝生长50%以上的药剂浓度在含药的PDA培养基上诱导选择培养4d,连续选择35代,获得稳定的WWL高抗菌株。试验重复4次,每个重复1皿。

1.3.2 紫外诱变 WW菌株经25℃培养4d后,制成直径5mm的菌碟 (以下简称菌碟),接入含0.05 μg/mL戊唑醇的PDA平板上,培养24h后,置于已预热15min的紫外灯 (25W, 250nm)下20cm距离处照射8min,然后于25℃下黑暗培养7d。将PDA平板上长出的扇形角突变体转移到WA平板上,菌丝生长稀疏。显微镜下切取单细胞菌丝片段进行菌株纯化。试验重复3次,每个重复16皿,共48皿,以不照射处理为对照。

### 1.4 抗药突变体对渗透压的敏感性测定

将禾谷丝核菌对戊唑醇的敏感菌株和抗性菌株在PDA平板上、25℃培养4d后,制成5mm菌碟,分别接入到含有质量分数为1%、2%、4%、8%葡萄糖的PDA培养基上,25℃培养4d后,测量菌落直径。以2%葡萄糖PDA平板上生长的菌落直径为对照,计算不同质量分数葡萄糖培养基上菌丝的生长抑制率。试验重复4次,每个重复1皿。

生长抑制率 (%)

$$= \left[ 1 - \frac{\text{处理菌落直径} - \text{菌饼直径}}{\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}} \right] \times 100$$

### 1.5 药剂对抗药突变体细胞膜透性的影响测定

将上述供试菌株于PDA平板上、25℃培养4d后,制成5mm菌碟分别接入PD培养液中,振荡 (120 r/min)培养4d后取菌丝备用。新鲜菌丝用重蒸水冲洗,真空抽滤后称取菌丝鲜重2g放入锥形瓶中,分别加入由25mL重蒸水稀释的戊唑醇药液 (浓度分别为0、0.5、1.0、5.0、10.0、25.0 μg/mL)。25℃恒温水浴中振荡 (120 r/min)不同时间后,用电导仪测定电导率。以菌丝加重蒸水为对照。同时测定各浓度药剂分别在0、5、10、15、30、60、90、120、180、240、300、360、420、540 min时的电导率,最后煮沸 (死处理),测定电

导率。据此计算每次测定的相对渗率,然后根据渗漏情况比较细胞膜的透性。每个处理重复 3 次。

$$\text{相对渗率}(\%) = \frac{C_t - C_0}{C_{\text{死处理}}} \times 100$$

$C_t$ ——某一时刻的电导率值;  $C_0$ ——最初(0 min)的电导率值;  $C_{\text{死处理}}$ ——死处理后的电导率值。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗性菌株的获得

将敏感菌株在含药培养基上连续培养至第 35 代,其对戊唑醇的  $EC_{50}$  值由 0.012 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  增加到 0.400 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,抗性达 33.4 倍,形成了较高水平的抗性菌系。敏感菌株经 UV 诱变后,在第 7 d 时共获得 3 株扇形角突变体,在 PDA 上转移培养 8 代后,共获得 2 株能在 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  戊唑醇浓度下生长的稳定的抗药突变体,菌落突变频率为 4.2%,获得的抗药突变体分别编号为 WX1 和 WX2,其  $EC_{50}$  值分别为 0.122 6 和 0.377 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 2.2 抗性菌株对渗透压的敏感性

由表 1 可以看出,禾谷丝核菌对戊唑醇的敏感和抗性菌株在低渗透压(1%葡萄糖)下,其生长抑制率分别为 22.76% 和 11.12%、13.37%、13.69%,敏感和抗性菌株间差异显著,说明在低渗透压环境下敏感菌株比抗性菌株更敏感。在中等渗透压(4%葡萄糖)环境中,敏感菌株和抗性菌株的生长抑制率差别不大。而在高渗透压(8%葡萄糖)下,抗性菌株与敏感菌株的生长抑制率都高于其在低等和中等渗透压环境下的抑制率,且相互间差异较大:敏感菌株的生长受抑制最明显,生长抑制率达 44.72%;其次为 WX2 菌株,其生长抑制率为 32.14%;WWL 和 WX1 的生长抑制率分别为 27.02% 和 18.02%。所有抗性菌株对高渗透压均较为敏感,但对低渗透压和中等渗透压敏感性相对较低;而敏感菌株对低渗透压和高渗透压都较为敏感。

Table 1 Inhibition of all isolates in culture medium with different concentrations of dextrose (%)

Isolates	Concentrations of dextrose			
	1%	2%	4%	8%
WW	22.76 a	0	19.90 a	44.72 a
WX1	11.12 c	0	11.12 b	18.02 d
WX2	13.37 b	0	17.33 a	32.14 b
WWL	13.69 b	0	17.04 a	27.02 c

Note: Data in the table were tested by Duncan's test, data in the same row followed by different letters show significant difference at 0.05 level. The same as below.

### 2.3 药剂对抗性菌株细胞膜透性的影响

由图 1 可以看出,用不同浓度的戊唑醇处理后,各菌株在 1 h 内相对渗率上升迅速,且抗性菌株的相对渗率明显高于敏感菌株。表明不同菌株的菌丝细胞在药剂处理 1 h 内电解质迅速渗漏,且抗性菌株较敏感菌株渗出的电解质更多。

用不同浓度的戊唑醇处理 1 h 后,所有抗性菌株的相对渗率都呈下降趋势,而敏感菌株的相对渗率变化趋势有一定的差异:用相对低浓度(0.5、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和较高浓度戊唑醇(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理敏感菌株 1 h 后,其相对渗率呈下降趋势;而用高浓度的戊唑醇(10、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理 1 h 后,其相对渗率呈先下降后上升的变化规律。6 h 后,各处理抗性菌株的相对渗率明显低于敏感菌株,说明最终敏感菌株要比抗性菌株渗出更多的电解质。

从图 1 中还可看出,用不同浓度的戊唑醇处理抗性菌株 9 h 后,相对渗率有明显的差异。不用(0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )及用低浓度的戊唑醇(0.5、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理,所有抗性菌株的相对渗率都小于零;用较高浓度的戊唑醇(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理 9 h,只有 WX1 的相对渗率小于零,WX2 和 WWL 的相对渗率都大于零;但当用高浓度的戊唑醇(10、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理 9 h 后,所有抗性菌株的相对渗率都明显大于零。抗性菌株的相对渗率表现出随戊唑醇处理浓度的提高而增大的规律。

## 3 讨论

通过药剂连续选择和 UV 诱导,获得了 3 株对戊唑醇具有不同抗性水平的禾谷丝核菌突变体,证明在一定的选择压力下,禾谷丝核菌极易对戊唑醇产生抗性。且在药剂连续选择过程中发现,其抗性水平可以随着药剂选择压的提高而不断提高,抗性具有累加效应。证明禾谷丝核菌对戊唑醇的抗性风险性较大,应及早重视其合理使用和抗性治理问题,以延长该药剂的使用寿命。

微生物在高渗透压环境的胁迫下,大多都可以合成或从环境中吸收一些低分子质量的物质来调节自身的渗透压以平衡外界渗透压的增高<sup>[25]</sup>。而 Ellis 等<sup>[26]</sup>认为,菌体在高渗透压环境中需要不断合成甘油来维持细胞膨压而消耗大量能量,故生长受到抑制甚至不能生长,渗透压突变和抗性突变可能是同源的。张永杰等<sup>[22]</sup>研究并比较了灰霉病菌高抗腐霉利菌株和敏感菌株对渗透压的敏感性,发现抗性菌株对渗透压更敏感。石志琦

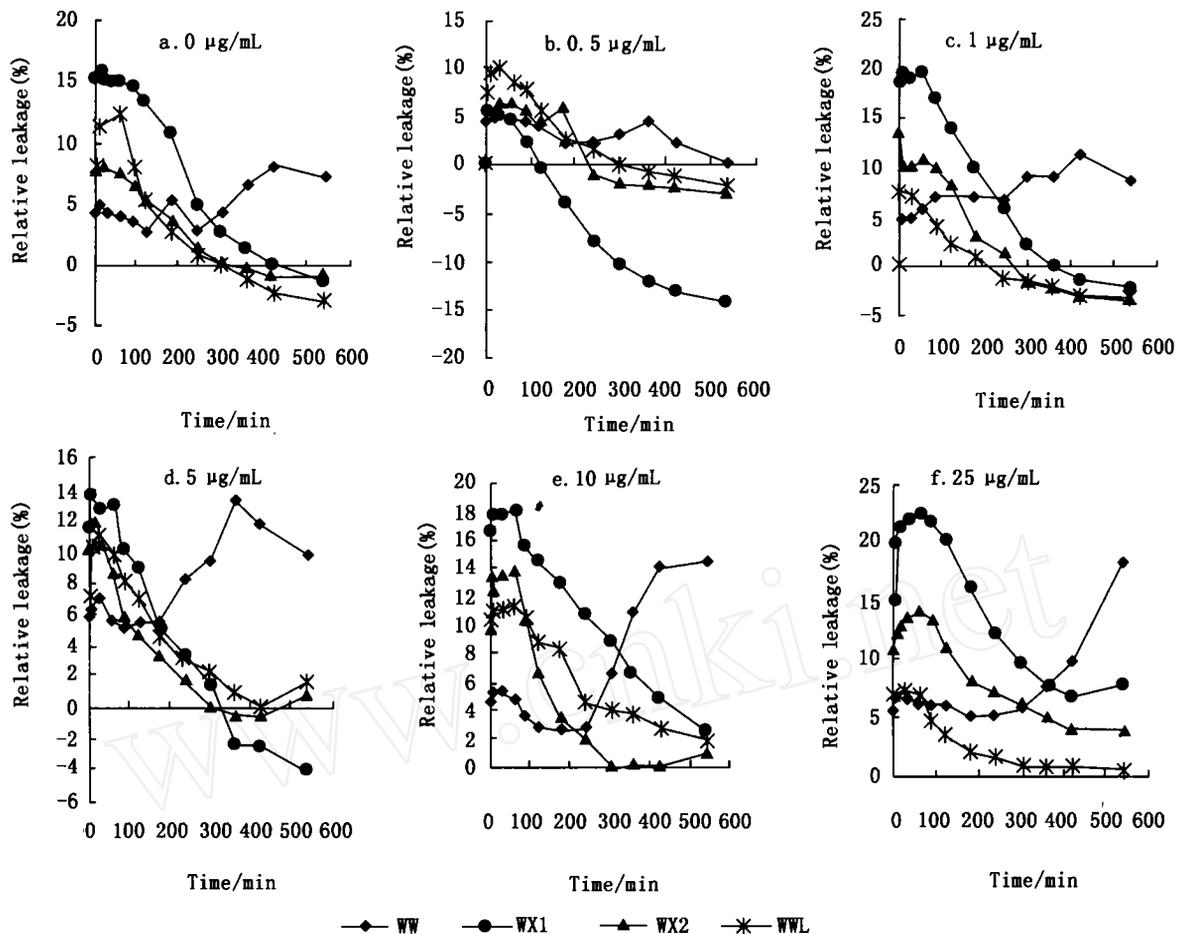


Fig 1 The change of relative leakage in different concentrations of tebuconazole between resistant strains and sensitive strains in different times

等<sup>[20]</sup>在研究核盘菌抗菌核净突变菌株性质时,也发现抗性菌株在较低和较高渗透压下其生长抑制率均大于敏感菌株。本研究结果与文献报道的不同,作者发现在相同的渗透压环境下,敏感菌株对渗透压更为敏感,说明抗性菌株的渗透调节能力要大于敏感菌株。但所有抗性菌株之间对渗透压的敏感性在低渗和中渗环境下差异不大,在高渗环境下有一定的差异,说明抗性菌株之间的抗逆性也有一定的差异。对抗性菌株的生长抑制率随渗透压提高而逐渐增大,即抗性菌株对渗透压的敏感性随渗透压提高而增大;而敏感菌株只对低渗透压(1%葡萄糖)和高渗透压(8%葡萄糖)相对较为敏感。

石志琦等<sup>[20]</sup>和张永杰等<sup>[22]</sup>分别测定了核盘菌抗菌核净突变菌株及灰霉病菌高抗腐霉剂菌株的电导率,并将其与敏感菌株进行了比较,他们都发现抗性菌株能够在较短的时间里渗出更多的电解质。已有的研究表明,戊唑醇本身就能够引起

小麦纹枯病菌细胞膜透性发生变化,使细胞内物质向外渗漏、沉积,从而导致细胞壁加厚,最终导致细胞死亡<sup>[6,23]</sup>。本研究发现:当用不同浓度的戊唑醇处理后,与敏感菌株相比,抗性菌株能在较短的时间里(1 h)渗出更多的电解质;但进一步的测定结果表明,最终(6 h后)敏感菌株的相对渗率要明显高于抗性菌株,敏感菌株要比抗性菌株渗出更多的电解质;并且高浓度的戊唑醇处理抗性菌株后,其相对渗率要明显高于低浓度处理。

本研究结果说明,当用戊唑醇处理敏感和抗性菌株后,所有菌株细胞膜的透性都发生了变化,使得细胞内物质向外渗漏。最终敏感菌株的相对渗率要明显高于抗性菌株,说明抗性菌株适应戊唑醇的能力明显高于敏感菌株,其细胞膜受损伤的程度相对较小,使其细胞膜的透性相对低于敏感菌株,且这种适应能力随着戊唑醇处理浓度的增大而降低。对渗透压的研究结果也证实了这一点。但与敏感菌株相比,抗性菌株能在较短的时

间里(1 h)渗出更多的电解质,说明在较短的时间里,抗性菌株能够更快速地将杀菌剂排出体外。所以,禾谷丝核菌细胞膜透性的改变和短时间内高速排泄杀菌剂的机制可能是其对戊唑醇产生抗性的主要生理机制,但是否与亲和性降低有关尚有待进一步研究。

在以前的研究中,电导率的测定时间相对较短,大都在2 h之内,在本研究中笔者将测定时间延长到9 h,结果发现,在2 h之内电导率的变化规律与前人的研究结果相符,但这并不能反映其完整的变化规律,适当延长测定时间更能体现电导率的发展变化趋势,6 h后其变化基本趋于稳定,因此建议今后在进行敏感菌株和抗性菌株电导率比较研究中,测定时间应延长至6 h。

## 参考文献:

- [1] HU Guang-gan(胡广鉴). 江苏省小麦纹枯病的研究现状[J]. *Plant Protection* (植物保护), 1990, 16(1): 41-42.
- [2] Stem R E. Sharp eyespot of wheat in A Kansas caused by *Rhizoctonia solani*[J]. *Plant Dis Rep*, 1978, 62: 56-60.
- [3] Wachowska U. Susceptibility of cereals and other crops to *Rhizoctonia cerealis* [J]. *Phytopathologia-Polonica*, 2000, (20): 59-66.
- [4] WU Xun-chi(吴洵耻). 我国小麦纹枯病发生及防治研究现状[J]. *Shandong Agricultural Science* (山东农业科学), 1992, (2): 29-47.
- [5] CHEN Yan-xi(陈延熙), TANG Wen-hua(唐文华), ZHANG Dun-hua(张敦华), et al 我国小麦纹枯病病原学的初步研究[J]. *Acta Phytophylacica Sinica* (植物保护学报), 1986, 13(1): 39-43.
- [6] SHI Jian-rong(史建荣), WANG Yu-zhong(王裕中), CHEN Huai-gu(陈怀谷), et al 小麦纹枯病的菌丝融合群及其致病力测定[J]. *Jiangsu Agric Science—Special Edition of Rhizoctonia cerealis* (江苏农业科学——麦纹枯病专辑), 1993: 25-29.
- [7] XIA Zheng-jun(夏正俊), LI Qing-xian(李清铤). 江苏省大、小麦纹枯病病原学的初步研究[J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 1989, 19(3): 135-138.
- [8] LIU Guang-fa(刘光法), LIU Guo-qing(刘国清). 枣庄市1998年小麦纹枯病大发生特点及原因分析[J]. *Hubei Plant Protection* (湖北植保), 1998, (6): 12-13.
- [9] WANG Yu-zheng(王玉正), YUAN Yong-lan(原永兰), ZHAO Bai-ling(赵百灵), et al 山东省小麦纹枯病为害损失及防治指标的研究[J]. *Acta Phytophylacica Sinica* (植物保护学报), 1997, 24(1): 44-47.
- [10] WANG Yu-zhong(王裕中), WU Zhi-feng(吴志凤), SHI Jian-rong(史建荣), et al 江苏省小麦纹枯病发生规律与病害消长因素分析[J]. *Acta Phytophylacica Sinica* (植物保护学报), 1994, 21(2): 109-114.
- [11] WU Xue-hong(吴学宏), LIU Xi-li(刘西莉). 含戊唑醇种衣剂防治小麦苗期纹枯病的研究[J]. *J Laiyang Agric College* (Natural Science Edition) (莱阳农学院学报, 自然科学版), 2000, 17(2): 93-97.
- [12] ZHANG Sui(张穗), LIU Qing-yuan(刘庆元), ZHENG Wen-ming(郑文明). 井冈霉素和粉锈宁春季防治小麦纹枯病的比较试验[J]. *J Henan Agric Sci* (河南农业科学), 1994, (1): 19-21.
- [13] ZHANG Sui(张穗), SONG Wan-chang(宋万昌), FU Wei(傅伟), et al 河南省小麦纹枯病发生动态、关键因素的研究[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), 1995, 10(Supp): 104-109.
- [14] Aggawal R. Raxil-a, Potent fungicide to control loose smut of wheat[J]. *Indian Phytopathology*, 1993, 46(2): 172-173.
- [15] Baloch R I, Mercer E I, Wiggins T E, et al Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Ustilago maydis* by tridemoph, fenpropimorph and fenpropidin [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(10): 2219-2276.
- [16] Cotterill P J. Evaluation of in furrow fungicide treatments to control rhizoctonia root rot of wheat[J]. *Crop Prot*, 1991, 10(12): 473-478.
- [17] WANG Huai-xun(王怀训), WANG Kai-yun(王开运), JIANG Xing-yin(姜兴印), et al 立克秀防治小麦纹枯病的药效评价[A]. In: *Plant Diseases and Their Control in China—The Second Volume* [中国植物病害化学防治(第二卷)] [M]. Beijing(北京): China Agricultural Science Press(中国农业科技出版社), 2000. 139-141.
- [18] LIU Ying-hua(刘英华), WANG Kai-yun(王开运), JIANG Xing-yin(姜兴印), et al 禾谷丝核菌对戊唑醇的抗性及其抗性菌系生物学特性[J]. *Acta Phytophylacica Sinica* (植物保护学报), 2003, 30(4): 423-428.
- [19] YANG Qian(杨谦). The Molecular Biology of the Resistance of Plant Pathogen to Fungicides(植物病原菌抗药性分子生物学) [M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2003.
- [20] SHI Zhi-qi(石志琦), ZHOU Ming-guo(周明国), YE Zhong-yin(叶钟音). 核盘菌对菌核净的抗药性机制初探[J]. *Chin J Pestic Sci*(农药学学报), 2000, 2(2): 47-51.
- [21] DING Zhong(丁中), LIU Feng(刘峰), MU Li-yi(慕立义). 应用电导仪测定番茄灰霉病菌对多菌灵抗药性的初步研究[J]. *Chin J Pestic Sci*(农药学学报), 2003, 5(3): 94-96.
- [22] ZHANG Yong-jie(张永杰), GAO Jun-ming(高俊明), HAN Ju-cai(韩巨才), et al 抗速克灵灰霉病菌菌株电导率变化及对渗透压的敏感性[J]. *J Shanxi Agric* (Natural Science Edition) (山西农业大学学报, 自然科学版), 2004, 24(1): 34-36.
- [23] CHEN Ru-mei(陈茹梅), LI Jin-yu(李金玉), KANG Zhen-sheng(康振生), et al 戊唑醇对小麦纹枯菌超微结构的影响[J]. *Mycosystema* (菌物系统), 2000, 19(3): 389-395.
- [24] SHI Jian-rong(史建荣), WANG Yu-zhong(王裕中), FANG Zhong-da(方中达). 三唑酮、三唑醇对小麦纹枯病菌形态和生理的影响[J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 1992, 22(3): 205-209.
- [25] ZHANG Xiao-qing(张小青), CAO Jun-wei(曹军卫), ZHAI Chao(翟超), et al 枯草芽孢杆菌渗透压调节基因 *proB* 的克隆和表达[J]. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 42(2): 163-168.
- [26] Ellis S W, Grindle M. Effect of osmotic stress on yield and polyolcontent of dicarboximide-sensitive and resistant strains of *Neurospora crassa*[J]. *Mycol Res*, 1981, 95: 457-464.

(Ed TANG J)