

Algirdas Sliesaravičius, Liuda Žilėnaitė, Natalija Burbulis, Paweł Duchowski
Litewski Uniwersytet Rolniczy w Kownie, Katedra Uprawy Roślin i Żywienia Zwierząt

Tradycyjne i biotechnologiczne metody w hodowli rzepaku jarego (*Brassica napus* L.) na Litwie

The use of traditional and biotechnological methods for spring oilseed rape (*Brassica napus* L.) breeding in Lithuania

Słowa kluczowe: rzepak jary, hodowla, kultura izolowanych mikrospor, podwojone haploidy

Key words: spring oilseed rape, breeding, cultures of isolated microspores, doubled haploids

W 1990–2001 r. w Litewskim Uniwersytecie Rolniczym prowadzono prace hodowlane z rzepakiem jarym w celu uzyskania plennych odmian, przystosowanych do warunków agroklimatycznych Litwy. Na podstawie odwrotnych krzyżowań międzyodmianowych i selekcji otrzymano odmianę rzepaku jarego Auksiai, która w latach 1998–2001 była badana w Centrum Badania Odmian Litwy. Odmiana ta jest średnio wczesna (okres wegetacji 98 dni), zawartość tłuszczu — 39,9%, średnia zawartość glukozynolanów w nasionach — $9,9 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$; masa 1000 nasion — 3,77 g. U wytworzonych na Litwie mieszańców rzepaku jarego badano zsynchronizowanie rozwoju mikrospor, oceniono ich potencjał embriogeniczny w kulturze izolowanych mikrospor. Stosując metodę kultury izolowanych mikrospor wyprowadzono rody podwojonych haploidów (DH). Ich selekcja pozwoliła wyodrębnić pięć cennych pod względem hodowlanym genotypów, odznaczających się większą zawartością tłuszczu, sumą kwasów oleinowego i linolowego, a także mniejszą zawartością glukozynolanów. Wyselekcjonowane rekombinanty będą wykorzystane w dalszej pracy hodowlanej z rzepakiem jarym.

Paper presents the results of spring oilseed rape (*Brassica napus* L.) breeding research carried out at the Lithuanian University of Agriculture in 1990–2001. Spring oilseed rape variety Auksiai was developed by the use of intra-varietal hybridization (reciprocal crossing) and selection methods. In 1999–2001 Auksiai was evaluated in Official Trials. The vegetation period of Auksiai is in average 98 days, the main quality indices — the average content of fat is 39.9%, glucosinolates — $9.9 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, 1000 seed weight — 3.77 g. Synchronization of microspore development and embriogenic potential of spring oilseed rape hybrids have been investigated at the genetic-biotechnology laboratory. The doubled haploid (DH) lines of spring oilseed rape were obtained using the culture of isolated microspore. Valuable seed quality combinations of oil, high oleic and linoleic acids and low glucosinolate were identified in five DH lines. Valuable recombinants will be introduced into breeding programs.

Wstęp

Zwiększające się światowe zapotrzebowanie na olej roślinny pobudza do tworzenia nowych, bardziej plennych i jakościowo wartościowych odmian roślin oleistych. Obecnie na Litwie rzepak jest jedyną rośliną oleistą mającą znaczenie gospodarcze. W kraju uprawiane są przeważnie zagraniczne odmiany rzepaku, dlatego uważa się, że tworzenie odmian przystosowanych do miejscowych warunków agroklimatycznych jest ważnym zadaniem hodowli roślin. W Stacji Doświadczalnej Litewskiego Uniwersytetu Rolniczego w 1990 r. zapoczątkowano prace hodowlane nad rzepakiem jarym. Założono kolekcję odmian rzepaku jarego, która jest ciągle uzupełniana nowymi formami i badana w różnych aspektach. Wartościowe genotypy są wykorzystywane w programach hodowlanych. W hodowli rzepaku jarego selekcja prowadzona jest w różnych kierunkach obejmujących wiele cech i właściwości roślin. Do programów krzyżowań włącza się wiele odmian i form, ponieważ brak jest materiałów wyjściowych o właściwościach uniwersalnych odznaczających się szeregiem pożądanych cech. Tworząc materiał hodowlany rzepaku jarego przystosowanego do warunków klimatyczno-glebowych Litwy, do krzyżowań włączane są odmiany pochodzące z różnych regionów geograficznych.

Kultura haploidów *in vitro* pozwala wydatnie przyspieszyć proces otrzymywania linii homozygotycznych w porównaniu z klasycznymi metodami hodowli (Charne 1990, Chen and Beversdorf 1990a). Po tym jak Lichter (Lichter 1982) po raz pierwszy zaindukował embriogenezę rzepaku w kulturze izolowanych mikrospor, metoda ta jest coraz szerzej stosowana do tworzenia linii podwojonych haploidów. Technologia Lichtera przez wiele lat była doskonała w celu zwiększenia wydajności formowania zarodków w procesie androgenezy. W licznych pracach uznano, że najważniejszymi czynnikami wpływającymi na wydajność embriogenezy są genotyp i warunki wzrostu rośliny donora mikrospor (Chuong i Beversdorf 1985, Chuong i in. 1988). Jednym z kluczowych czynników w indukcji embriogenezy *in vitro* jest stadium rozwojowe mikrospor. W kulturach izolowanych mikrospor rzepaku uważa się, że najbardziej odpowiednie jest późne jednojądrowe stadium rozwoju mikrospory przed pierwszym podziałem mitotycznym, kiedy kończy się synteza DNA (Kott i in. 1988b). Większą wydajność zarodków mikrospory obserwuje się, gdy donor charakteryzuje się synchronicznym rozwojem mikrospor (Gland i in. 1988).

Badania składu kwasów tłuszczowych wykazały, że w mieszańcach ustabilizowanie składu kwasów tłuszczowych następuje dopiero w pokoleniu F₅. Natomiast podwojone haploidy (DH) już w pierwszym pokoleniu są homozygotyczne i reprezentują wszystkie możliwe rekombinacje składu kwasów tłuszczowych (Chen i Beversdorf 1990b). W porównaniu z klasycznymi metodami hodowli, wykorzystanie linii DH pozwala skrócić proces hodowlany co najmniej o pięć okresów wegetacji (Kott 1998).

Zmiany składu kwasów tłuszczowych w nasionach rodów rzepaku często zależą od czynników środowiska. Linie DH jako genetycznie stabilne mogą być doskonałymi obiektami do badań nad różnymi czynnikami mającymi wpływ na syntezę kwasów tłuszczowych (Taylor i in. 1991). Nasiona podwojonych haploidów są homozygotyczne i gwarantują stan homozygotyczny wszystkich następnych pokoleń. Ułatwia to ocenę zmian w składzie kwasów tłuszczowych (Pomeroy i in. 1991).

Cele pracy:

1. Uzyskanie odmiany rzepaku jarego o krótkim okresie wegetacji, pełnej oraz odznaczającej się dobrą jakością nasion (zawartość kwasu erukowego do 1%, glukozynolanów do $20 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$).
2. Zbadanie stopnia zsynchronizowania rozwoju mikrospor mieszańców rzepaku jarego oraz ocena ich potencjału embriogenicznego w kulturach izolowanych mikrospor.
3. Otrzymanie podwojonych haploidów rzepaku jarego i wyselekcjonowanie linii przystosowanych do warunków glebowo-klimatycznych Litwy.

Material i metody

Hodowla rzepaku jarego metodami klasycznymi

Podstawowe metody hodowli rzepaku jarego to krzyżowania międzyodmianowe (odwrotne) i selekcja indywidualna.

Hodowlę rzepaku jarego prowadzono w latach 1990–2001 w Stacji Doświadczalnej Litewskiego Uniwersytetu Rolniczego. Gleby według klasyfikacji międzynarodowej Calcari Epihypogleyic Luvisol o odczynie pH_{KCL} 6,9–7,1 zawierały 2,9–3,2% humusu, $243\text{--}247 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dostępnego fosforu (P_2O_5) i $99\text{--}107 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ potasu K_2O .

Materiał hodowlany badano w następujących szkółkach:

- 1) kolekcja;
- 2) szkółka mieszańców;
- 3) szkółka selekcji;
- 4) początkowe badania odmian w szkółce kontrolnej;
- 5) konkursowe badania odmian;
- 6) początkowe rozmnażanie odmian.

Szkółki zakładano i materiał hodowlany badano według metodyki badań materiału hodowlanego Instytutu Uprawy Roślin im. N. Wawilowa (Sankt-Petersburg) (Mietodičeskije ukazanija po selekcii kultur 1976).

W szkółce selekcji wybierano rody hodowlane rzepaku jarego, wyróżniające się pod względem cech biologicznych i użytkowych, które następnie badano w wstępnych i konkursowych badaniach. Porównania prowadzono w stosunku do

odmiany standardowej, którą była zarejestrowana na Litwie odmiana Sponsor. Skład chemiczny ustalano za pomocą analizatora NIR w nasionach o naturalnej wilgotności. Najbardziej cenne rody rozmnażano i przekazywano do Państwowego Centrum Badania Odmian.

Kultura izolowanych mikrospor i tworzenie podwojonych haploidów

Badania prowadzono w Laboratorium Genetyki i Biotechnologii Litewskiego Uniwersytetu Rolniczego. Roślinami donorowymi mikrospor były mieszańce F_1 rzepaku jarego 268 (Star \times Bolero), 269 (Bolero \times Star), 274 (Star \times Cyclone). Rośliny donory rosły w szklarniach z dodatkowym oświetleniem.

Do analizy cytologicznej z każdej rośliny donorowej pobierano 20 pąków różnej wielkości, które na 24 godziny umieszczano w utrwalaczu (absolutny etanol : lodowaty kwas octowy w stosunku 3 : 1). Po zmierzeniu długości pąków pylniki barwiono acetokarminem i macerowano w kropli 45% kwasu octowego. Dla określenia stopnia zsynchronizowania rozwoju mikrospor w każdym pylniku identyfikowano stadium rozwoju jądra u 100 mikrospor.

Do kultury izolowanych mikrospor pąki kwiatowe rzepaku sterylizowano 2 minuty w 70% etanolu, po czym 3 razy przepłukiwano w sterylizowanej wodzie destylowanej. Sterylne pąki kwiatowe rozcierano w 13% roztworze sacharozy i sączono przez podwójny filtr Nytex. Przesącz wirowano 3 razy po 5 minut przy 1000 g. Do przygotowania zawiesiny izolowanych mikrospor wykorzystano zmodyfikowaną pożywkę NLN (Flechter i in. 1998). Zawiesinę mikrospor przenoszono do sterylnych szalek Petriego i inkubowano w warunkach 30°C w ciemności. Po upływie 14 dni kulturę mikrospor przenoszono na wstrząsarkę (60 obrotów·min⁻¹). Podziały mikrospor i formowanie się zarodków obserwowano za pomocą mikroskopu MBI-6 (10 \times 9 \times 0,2). Stadium rozwojowe zarodków (globularne, sercowate, torpedy) określano według Flechter i in. (1998). Po upływie 28 dni od momentu izolacji mikrospor morfologicznie dojrzałe zarodki przenoszono na stałą pożywkę B5 i umieszczano w komorze klimatyzacyjnej (4°C, fotoperiod 8 godzin). Po 10 dniach warunki w komorze zmieniono na ciepłe inkubowanie (27 \pm 2°C, fotoperiod 12 godzin). Po upływie następnych 30 dni oceniano wykształcone rośliny. U haploidów rzepaku jarego podwajano liczbę chromosomów za pomocą 0,34% roztworu kolchicyny. Każda roślina podwojonych haploidów była izolowana mechanicznie w fazie kwitnienia.

Ocena wartości hodowlanej linii DH rzepaku jarego

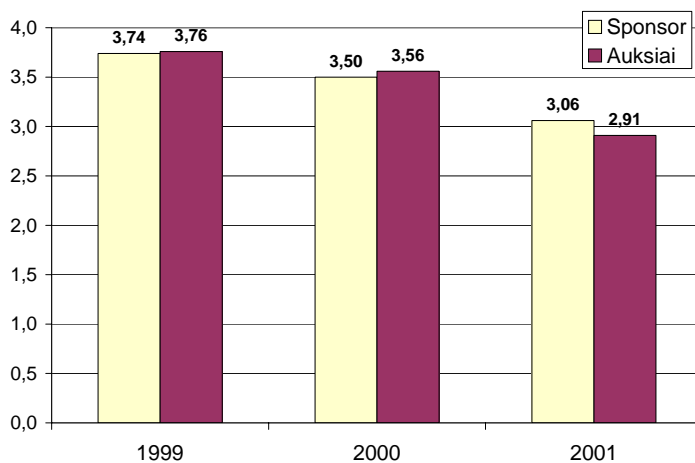
Uzyskane linie DH rzepaku jarego oceniano w szkółce selekcyjnej. Wielkość poletek doświadczalnych — 1,7 \times 1,2 = 2,04 m². Cechy linii DH porównywano z odmianami rzepaku jarego: Bolero, Star i ich mieszańcami 268 i 269. Skład chemiczny mierzono za pomocą analizatora NIR w nasionach o naturalnej wilgotności.

Wyniki i dyskusja

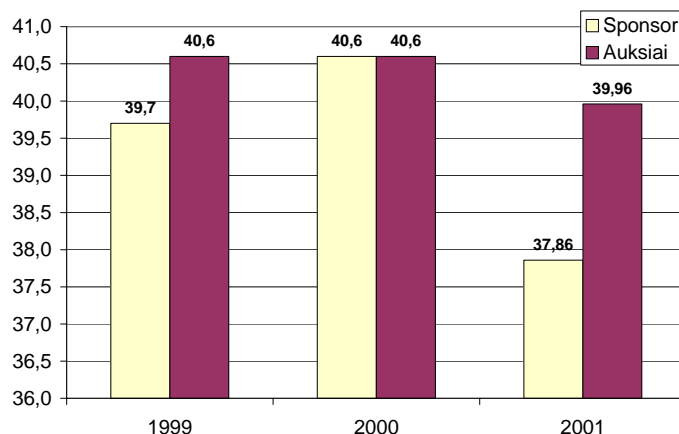
Hodowla rzepaku jarego metodami klasycznymi

W latach 1990–2001, tworząc materiał hodowlany rzepaku jarego, wykonano ponad 300 kombinacji krzyżowań. Ciągła selekcja mieszańców i rodów pozwoliła na stworzenie szeregu perspektywicznych form rzepaku jarego odznaczających się wielkim zróżnicowaniem cech jakościowych (Žilėnaitė i in. 2000). Ocena wartości cech jakościowych nasion tych form rzepaku jarego pozwoliła wyselekcjonować formę odznaczającą się dużą zawartością tłuszczu i zmniejszoną zawartością glukozyolanów. W ten sposób została wyhodowana odmiana Auksiai. Wskaźniki plenności i okresu wegetacji tej odmiany były korzystniejsze niż odmiany standardowej Sponsor. Odmiana rzepaku jarego Auksiai została w 2002 r. wpisana na „Listę najbardziej odpowiednich do uprawy na Litwie odmian roślin”.

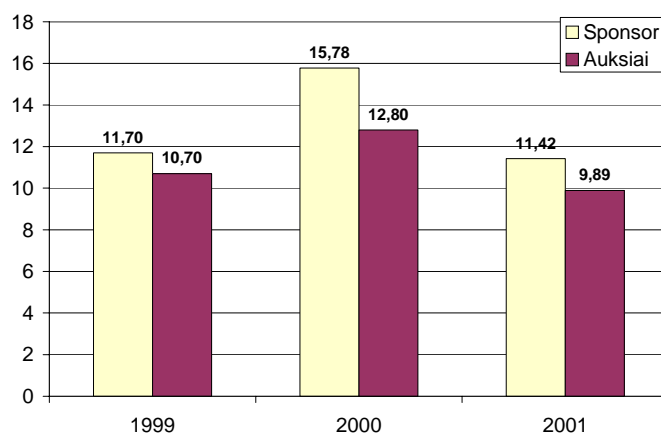
Badania wartości gospodarczej odmiany Auksiai w Centrum Badania Odmian przeprowadzono w latach 1999–2001. Średni plon nasion tej odmiany na Litwie wyniósł $1,86 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. W Kowieńskiej Stacji Centrum Badania Odmian uzyskano plon $3,7 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ (rys. 1). Nasiona odmiany Auksiai są średniej wielkości, o masie 1000 nasion — $3,77 \text{ g}$, średnia zawartość tłuszczu w nasionach wynosi $39,9\%$ (rys. 2), zawartość kwasu erukowego — $0,02\%$, glukozyolanów — $9,9 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (rys. 3), średnia wysokość roślin — 147 cm , odporność odmiany na wyleganie jest oceniana na $7,1$ stopni, a odporność na osypywanie się nasion z łuszczyń — 8 stopni według 10-stopniowej skali. Odmiana jest średnio wczesna, jej średni okres wegetacji wynosi 98 dni.



Rys. 1. Plon nasion [$\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$] odmian rzepaku jarego w latach 1999–2001 (Kowieńska Stacja Centrum Badania Odmian) — *Seed yield of spring oilseed rape varieties*



Rys. 2. Zawartość tłuszczu [%] w nasionach odmian rzepaku jarego — *Fat content in seeds of spring oilseed rape varieties*

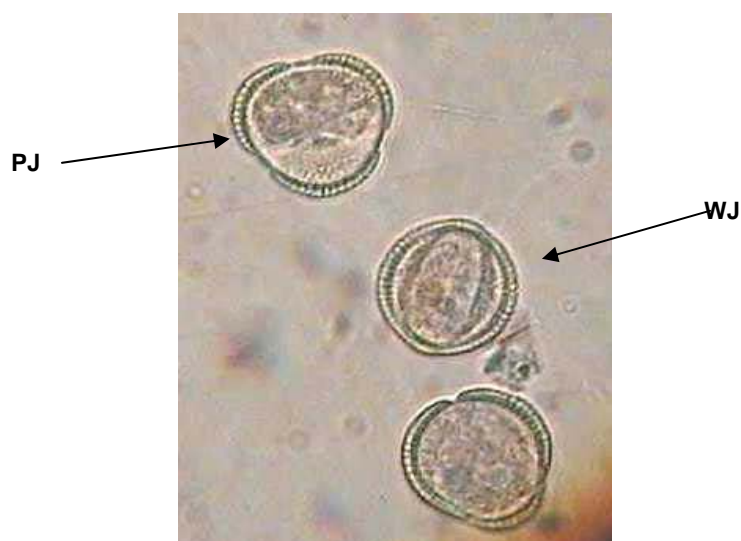


Rys. 3. Zawartość glikozynolanów [μmol g⁻¹] w nasionach odmian rzepaku jarego — *Glucosinolate content in spring oilseed rape varieties*

Uzyskiwanie haploidów i podwojonych haploidów

W uzyskiwaniu haploidów rzepaku metodą kultur izolowanych mikrospor ważne jest ustalenie markerów morfometrycznych odpowiadających różnym stadiom rozwoju mikrospor. Długość pąków kwiatowych jest dogodnym i dostatecznie pewnym markerem, odpowiednio charakteryzującym fazę mikrospor, dlatego w naszych badaniach wykorzystywaliśmy ten parametr.

Analiza cytologiczna roślin donorowych wykazała, że charakter rozwoju mikrospor jest swoisty dla każdego genotypu. U mieszańców 268 i 269 mikrospory w pylnikach rozwijały się synchronicznie — w tym samym pylniku obserwowano tylko mikrospory będące w dwóch stadiach. Dlatego łatwo było dobrać pąki kwiatowe, w których większość mikrospor jest w późnym jednojądrowym stadium rozwoju. Do izolowania mikrospor najbardziej odpowiednie były pąki kwiatowe o długości 3,8 mm (u mieszańca 268) i 3,6 mm (u mieszańca 269). Natomiast mieszaniec 274 charakteryzował się asynchronicznym rozwojem mikrospor — w tym samym pylniku obserwowano mikrospory w trzech, a nawet w czterech stadiach (rys. 4). Utrudniało to wybór pąków kwiatowych zawierających potencjalnie embriogeniczne mikrospory — do izolowania mikrospor pobierano pąki o długości 3,6–4,0 mm.



WJ — stadium wczesne jednojądrowe — *early uninucleate stage*

PJ — stadium późne jednojądrowe — *late uninucleate stage*

Rys. 4. Asynchroniczny rozwój mikrospor w pylniku u mieszańca 274 — *Hybrids 274 microspores asynchronous development*

Obserwując embriogenezę w kulturach izolowanych mikrospor u badanych genotypów stwierdzono, że do piątego dnia u wszystkich mieszańców proces przebiegał analogicznie: embriogeniczne mikrospory dzieliły się i zaczęły formować się globularne zarodki. Proces embriogenezy u mieszańca 274 na tym etapie był zahamowany, być może na skutek asynchronicznego rozwoju mikrospor. W mieszaninie mikrospor znajdujących się w różnych fazach rozwojowych, mikrospory nieembriogenne wydzielają inhibitory hamujące proces embriogenezy mikrospor embriogennych (Kott i in. 1988a).

Można twierdzić, że proces embriogenezy zależy nie tylko od stopnia zsynchronizowania rozwoju mikrospor, ale i zdolności genotypu donora do zmiany kierunku rozwoju gametofitowego na sporofitowy. Chociaż do krzyżowań przy tworzeniu mieszańców 268 i 269 były wykorzystywane te same odmiany (Star × Bolero i Bolero × Star), reakcje tych donorów odnośnie izolacji mikrospor były różne. To jeszcze raz potwierdza fakt, że proces embriogenezy w kulturze izolowanych mikrospor zależy głównie od genotypu konkretnej rośliny donorowej. Podwojone haploidy otrzymano na drodze kolchicynowania roślin haploidalnych.

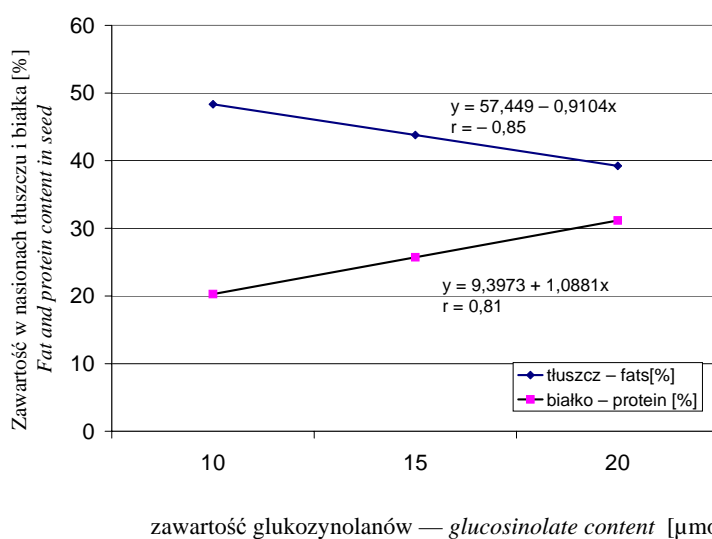
Ocena wartości hodowlanej linii DH rzepaku jarego

Każda linia DH reprezentuje unikalne rekombinacje genetyczne form rodzicielskich. Dlatego linie DH rzepaku jarego uzyskane metodą kultur izolowanych mikrospor odznaczały się wielkim zróżnicowaniem badanych cech jakościowych. Zmienność cech jakościowych nasion i masy 1000 nasion u linii DH odzwierciedlają powiązania korelacyjne różnego kierunku: zawartości białka i tłuszczu — silna ujemna korelacja, masy 1000 nasion i zawartości tłuszczu — silna ujemna korelacja, masy 1000 nasion i zawartości białka — silna dodatnia korelacja (Burbulis i in. 2001).

Badano skład kwasów tłuszczowych nasion DH i oceniono powiązania między różnymi wskaźnikami jakościowymi. Tak więc zawartość tłuszczu u DH była dodatnio skorelowana z kwasem oleinowym i ujemnie z kwasem linolowym, stwierdzono również ujemną korelację między sumą kwasów nasyconych a sumą kwasu oleinowego i linolowego. Przy zwiększeniu zawartości w nasionach sumy kwasów oleinowego i linolowego o 1%, suma kwasów nasyconych zmniejsza się o 0,27% (Burbulis i in. 2001).

W nasionach wszystkich linii DH stwierdzono mniejszą zawartość glukozyolanów ($13,75\text{--}17,45\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) aniżeli u odmian rodzicielskich ($19,45\text{--}19,51\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) i roślin donorowych ($20,13\text{--}20,85\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$). Między zawartością glukozyolanów, tłuszczu i białka odnotowano silne powiązania korelacyjne (rys. 5). Przy zwiększeniu zawartości glukozyolanów w nasionach linii DH rzepaku jarego o $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, zawartość tłuszczu zmniejsza się o 0,91%, a białka zwiększa się o 1,09%.

Na podstawie wyników oceny jakości nasion linii DH rzepaku jarego wyselekcjonowano 5 podwojonych haploidów, których nasiona zawierają więcej tłuszczu, mniej glukozyolanów i odznaczają się większą sumą kwasów oleinowego i linolowego.



Rys. 5. Korelacje pomiędzy zawartością glukozynolanów a tłuszczu i białka w nasionach linii DH rzepaku jarego –Correlation between glucosinolates and fat and protein content in seeds of DH lines

Wnioski

1. Odwrotne krzyżowania międzyodmianowe są efektywną metodą w hodowli rzepaku jarego. Zastosowanie tej metody umożliwiło wyhodowanie plennej, odznaczającej się dobrą jakością nasion odmiany rzepaku jarego Auksiai.
2. Stopień synchronizacji rozwoju mikrospor w pylnikach jest zdeterminowany genetycznie i zależy od genotypu.
3. Wydajność embriogenezy w kulturze izolowanych mikrospor rzepaku jarego zależy od zsynchronizowania rozwoju mikrospor i zdolności genotypu donora do zmiany kierunku rozwoju z gametofitowego na sporofitowy.
4. Tworzenie podwojonych haploidów rzepaku jarego jest wydajną metodą zwiększenia różnorodności genetycznej materiału wyjściowego w hodowli.

Conclusion

1. Intervarietal reciprocal crossings is an effective method in spring oilseed rape breeding. The application of this method allowed for the breeding of high yielding spring oilseed rape variety Auksiai characterized by good seed quality.

2. The degree of synchronization of microspore development is genetically determined and depends on a genotype.
3. The efficacy of embryogenesis in the culture of isolated microspores of spring oilseed rape depends on the synchronization of microspore development and the ability of donor genotype to change from gametophytic to sporophytic developmental course.
4. Creation of doubled haploids of spring oilseed rape is an efficient method of increasing the genetic variability of initial materials in breeding.

Literatura

- Burbulis N., Žilėnaitė L., Sliesaravičius A. 2001. Seed quality of spring rape double haploid lines and selection of valuable recombinants. *Agricultural Sciences*, 3: 37-41.
- Charne D.G. 1990. Comparative analyses of microspore-derived and conventional inbred populations of spring oilseed rape (*Brassica napus* L.). Ph. D. Thesis, Department of Crop Science, University of Guelph, Ontario, Canada, 68 p.
- Chen J.L., Beversdorf W.D. 1990a. A comparison of traditional and haploid-derived breeding population of oilseed rape (*Brassica napus* L.) for fatty acid composition of seed oil. *Euphytica*, 51: 59-65.
- Chen J.L., Beversdorf W.D. 1990b. Fatty acid inheritance in a microspore-derived population of spring rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 80: 465-469.
- Chuong P.V., Beversdorf W.D. 1985. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. *Plant Science*, 39: 219-226.
- Chuong P.V., Deslauriers C., Kott L.S., Beversdorf W.D. 1988. Effects of donor genotype and bud sampling in microspore culture of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Botany*, 66: 1653-1657.
- Flechter R., Coventry J., Kott L.S. 1998. Doubled haploid technology for spring/winter *Brassica napus*. OAC Publication, University of Guelph, Ontario, Canada, 48 p.
- Gland A., Lichter R., Schweiger H-G. 1988. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore culture of *Brassica napus* L. *Journal of Plant Physiology*, 132: 613-617.
- Kott L.S. 1998. Application of doubled haploid technology in breeding of oilseed *Brassica napus*. *Ag. Biotech. News and Information*, 10, N 3: 69-74.
- Kott L.S., Polsoni L., Ellis B., Beversdorf W.D. 1988a. Autotoxicity in isolated microspore cultures of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Botany*, 66: 1665-1670.
- Kott L.S., Polsoni L., Beversdorf W.D. 1988b. Cytological aspects of isolated microspore culture of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Botany*, 66: 1658-1664.
- Lichter R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift Pflanzenphysiologie*, 105: 427-434.
- Taylor D.C., Weber N., Barton D.L. i in. 1991. Triacylglycerol bioassembly in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. cv. Reston. *Plant Physiology*, 97: 65-79.
- Žilėnaitė L., Zakarauskaitė D. 2000. Produktivity and quality of new spring rape varieties. *Horticulture and vegetable growing*, 19(3): 135-140.
- Методические указания по селекции культур. 1976. Ленинград, 26 с.