

赤霉素和多效唑对红花生长和脂肪酸组成的影响

胡 博, 吴 卫*, 侯 凯, 王 庆

(四川农业大学农学院, 四川 成都, 611130)

摘要: 为研究激素对红花生长及脂肪酸合成的影响, 采用赤霉素 (30、100 和 170mg/L) 及其生物合成抑制剂——多效唑 (30、90 和 150mg/L) 对伸长期红花进行喷施处理, 考察其部分农艺性状, 并采用 GC-MS 测定其花与种子脂肪酸组成和含量。结果表明, 赤霉素可显著增加红花株高和分枝长, 降低其单株总果球数和一级分枝数, 并使始花期提前 1~4d。使用赤霉素可显著提高开花后第 2d 花器官的亚油酸和亚麻酸含量。其中, 30mg/L 赤霉素使红花种子亚油酸含量达 67.83%, 显著高于对照 (62.58%)。多效唑显著降低分枝长, 使始花期延迟 1~2d, 对其农艺性状影响均不显著。150mg/L 多效唑使红花种子油酸含量达到 20.05%, 显著高于对照 (15.24%), 并显著提高种子 (花后 20d) 脂肪酸 O/L 值。说明可采用 30mg/L 赤霉素提高红花种子中亚油酸含量, 用 150mg/L 多效唑提高种子中油酸含量。

关键词: 赤霉素; 多效唑; 红花; 农艺性状; 脂肪酸

中图分类号: S565.903

文献标识码: A

文章编号: 1007-9084(2015)04-0498-06

Effects of gibberellin acid (GA) and paclobutrazol (PP₃₃₃) utilization on growth and fatty acids of safflower

HU Bo, WU Wei*, HOU Kai, WANG Qing

(Agronomy College, Chengdu Campus, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: To regulate safflower growth and seeds quality, hormone effects were investigated by using GA (30, 100, 170mg/L) and its biosynthesis inhibitor PP₃₃₃ (30, 90, 150mg/L). Hormones were sprayed at elongation stage. Several agronomic traits were measured and fatty acid in vegetative organs and seeds were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). Results showed that GA increased plant height and branch length significantly, and decreased primary branches and total capitulum per plant. Initial flowering date was delayed for 1-4 days. GA spray significantly increased flower linoleic and linolenic acid contents. GA (30mg/L) increased seed linoleic acid to 67.83%, which was significantly higher than that of water control (62.58%). PP₃₃₃ significantly decreased branch length, delayed the initial flowering date for 1-2 days with little effects on other traits. PP₃₃₃ (150mg/L) increased seed oleic acid to 20.05%, which was significantly higher than that of control (15.24%). It also remarkably increased the seed O/L at 20d after flowering. These results indicated that 30mg/L GA could be used to improve seed linoleic acid, and 150mg/L PP₃₃₃ to improve oleic acid.

Key words: Gibberellin acid (GA); Paclobutrazol (PP₃₃₃); Safflower; Agronomic traits; Fatty acid

红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 又名红蓝花, 为菊科植物^[1]。其干燥花入药, 始载《开宝本草》, 列为中品^[2], 具有活血通经、祛瘀、止痛等功能^[3]。现代研究表明, 红花是集药用、食用、工业原料、观赏于一体的经济植物^[4]。尤其红花种子油是世界公认

的具有食用、保健、美容功用的功能性食用油。红花油在国际上被作为“绿色食品”, 其亚油酸含量是所有已知植物中最高的, 达 80%, 号称“亚油酸之王”^[5]。亚油酸是功能性多不饱和脂肪酸中被最早认识的一种, 具有降低血清胆固醇, 预防和治疗高

血压及动脉粥样硬化,冠心病等心血管疾病等作用^[6]。

赤霉素(gibberellins 或 gibberellic acid, GA)作为植物生长发育的必需激素之一,在植物整个生命过程中起着重要的调控作用^[7]。它可促进植物细胞伸长、加速生长和发育、使作物提早成熟、增加产量或改进品质、促进发芽等^[8],目前已作为植物生长调节剂广泛用于农业生产,成为广泛普及的植物生长调节剂。多效唑作为赤霉素生物合成抑制剂,阻碍植物体内赤霉素前体物的形成,产生抑制生长效应。在多数作物上应用结果表明,多效唑能使植株节间缩短、降低株高、防止倒伏、增加分枝数、增大果实和提高产量等^[9]。尽管赤霉素和多效唑的生理作用及其作用机制已得到很好的研究,且这两种生长调节物质对模式植物拟南芥^[10]、油料作物油菜^[11]和花生^[12]等的脂肪酸含量和组成的影响已有相关报道,但赤霉素和多效唑处理对红花生长和种子脂肪酸的影响目前还未见报道。

本文通过外源喷施不同浓度的赤霉素和多效唑,考察红花花期农艺性状,并采集红花的花及不同发育阶段的种子,利用气质联用(GC-MS)方法测定主要的4种脂肪酸^[13,14]含量,以期明确两种生长调节物质对红花生长和种子及花器官产量品质的影响,从而更好地指导红花生产。

1 材料和方法

1.1 材料

红花 PI 544021(油酸 14.32%,亚油酸 74.84%),由美国种质资源库(Germplasm Resources Information Network, GRIN)提供。

1.2 仪器与试剂

CP224S 电子天平(德国赛多利斯);HH-4 恒温水浴锅(国华电器有限公司);SB-3200 DTD 超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);Agilent 6890-5973N 气质联用仪;赤霉素 GA₃(成都市科龙化工试剂厂);多效唑(上海楷洋生物技术有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 试验材料的种植 于2013年10月中旬种植于四川农业大学成都校区,采用盆栽方式,每个处理5盆,每盆3株,3次重复。

1.3.2 试验材料的处理 次年3月下旬,植株处于伸长期,配制3种浓度赤霉素(30、100和170mg/L,分别记为GA1、GA2、GA3,下同)和3种浓度多效唑(30、90和150mg/L,分别记为PP1、PP2和PP3,下

同),分别进行叶面喷施处理,以溶液从叶片滴下为喷施标准,并以喷施相同量的蒸馏水为对照(CK)。

1.3.3 农艺性状考察及取样 开花后考察各处理单株总果球数、株高、一级分枝数、分枝长(植株最低一级分枝的长度)、顶花球直径等农艺性状,并分别标注各花序开花日期。于开花第0d、5d、10d、15d和20d[记为0、5、10、15和20DAF(day after flowering)]分别采集不同处理不同发育阶段种子(20DAF的红花种子已成熟),每个时间点采集16个花球,3次重复,花后第2d采集开放的花,迅速在液氮中固定,保存于-80℃超低温冰箱中以备测定脂肪酸用。

1.3.4 脂肪酸提取方法 红花各阶段种子中脂肪酸的提取采用 Garces 和 Mancha^[15]提出的一步法进行。向300mg样品中加入提取液13.2mL(甲醇:甲苯:二甲氧基丙烷:硫酸=39:20:5:2)和6.8mL的庚烷,80℃水浴1h后取出,冷却至室温。取上层脂肪甲酯用于GC/MS分析。

1.3.5 色谱条件 采用HP-5 MS石英毛细管柱(0.32mm×30m);柱前压0.5kg/cm²;柱温由120℃按8℃/min升温至184℃,再以4℃/min升温至208℃,再以1℃/min升温至210℃,最后以10℃/min升温至220℃。进样口温度为250℃;载气为氦气;进样量0.2μL。质谱条件:质量分析器为四级滤质器;EI源;离子源温度200℃;电子能量70eV;质量扫描范围20~400amu;分辨率600。数据处理采用LAB-BASE系统,使用美国国家标准局NBS谱库检索,并参考文献加以确认。

1.4 数据处理

试验数据处理及作图采用Microsoft Excel 2007进行,利用SPSS 19.0统计分析软件对数据进行方差分析和显著性检验。

2 结果与分析

2.1 赤霉素和多效唑处理对红花农艺性状的影响

不同浓度赤霉素红花主要农艺性状表现列于表1。随着赤霉素浓度的增加,株高相应地增加。与对照相比,3种浓度赤霉素处理对株高的影响均达到显著水平,但3个处理间差异不显著;各赤霉素处理均使红花一级分枝数减少,且100和170mg/L的处理与对照相比差异达极显著水平;30mg/L赤霉素使红花分枝长显著增加,另2个浓度赤霉素使红花分枝长变短,但与对照相比均未达到显著水平;赤霉素处理下,红花单株总果球数有所减少,且在100和170mg/L浓度处理下显著降低;无效果球数和顶花

球直径与对照间差异均未达显著水平。此外,赤霉素处理对始花期影响最大,使始花期提前 4d。素处理还可以使始花期提前,尤其以 100mg/L 赤霉

表 1 不同浓度赤霉素处理下红花主要农艺性状表现

Table 1 Effects of different GA concentrations on main agronomic traits of <i>Carthamus tinctorius</i>							
赤霉素浓度 /(mg/L) GA concentration	株高/cm Plant height	一级分枝数 Number of primary branches	分枝长/cm Branch length	单株总果球数 Total capitulum per plant	单株无效果球数 Invalid capitulum per plant	顶花球直径/cm Diameter of top capitulum	始花期/(m/d) First flowering date
CK	97.88 ± 4.91Aa	11.75 ± 3.15Bb	20.40 ± 2.45a	31.62 ± 9.32b	4.00 ± 2.07a	19.29 ± 1.79a	5/14
30	113.75 ± 7.31Bb	9.87 ± 3.18ABa	26.00 ± 9.00b	29.37 ± 9.42ab	4.63 ± 3.20a	20.24 ± 1.52a	5/13
100	114.13 ± 8.89Bb	8.50 ± 1.60Aa	18.60 ± 6.84a	27.50 ± 5.32a	3.75 ± 1.67a	19.58 ± 1.22a	5/10
170	118.75 ± 8.41Bb	8.38 ± 1.99Aa	17.86 ± 3.81a	26.87 ± 4.22a	4.25 ± 2.66a	8.28 ± 3.44a	5/13

注:多重比较采用 LSD 法,同一列不同大写字母表示差异极显著(P < 0.01),不同小写字母表示差异显著(P < 0.05)。下同
Note:Multiple comparisons were by LSD method, different capital and lowercase letters in the same row indicate significance at 0.01 and 0.05 levels respectively. Same as below

多效唑处理后,90mg/L 和 150mg/L 多效唑使红花分枝长显著降低,使始花期延迟 1~2d。3 种浓 度多效唑处理对其他所考察的红花各农艺性状均无显著影响(表 2)。

表 2 不同浓度多效唑处理下红花主要农艺性状表现

Table 2 Effects of PP ₃₃₃ on agronomic traits of <i>C. tinctorius</i>							
多效唑浓度 /(mg/L) PP ₃₃₃ concentration	株高/cm Plant height	一级分枝数 Number of primary branch	分枝长/cm Branch length	单株总果球数 Total capitulum per plant	单株无效果球数 Invalid capitulum per plant	顶花球直径/cm Diameter of top capitulum	始花期/(m/d) First flowering date
CK	97.88 ± 4.91a	11.75 ± 3.15a	20.40 ± 2.45b	31.62 ± 9.32a	4.00 ± 2.07a	19.29 ± 1.79a	5/14
30	96.88 ± 10.02a	12.25 ± 4.59a	18.60 ± 8.30b	31.75 ± 9.24a	4.13 ± 1.55a	18.36 ± 1.31a	5/15
90	91.50 ± 10.81a	12.63 ± 5.01a	11.80 ± 9.88a	33.63 ± 9.15a	4.38 ± 2.56a	18.51 ± 1.88a	5/16
150	90.88 ± 7.53a	11.13 ± 3.60a	11.20 ± 9.21a	30.88 ± 7.49a	3.87 ± 1.81a	18.59 ± 2.99a	5/16

2.2 赤霉素和多效唑处理对红花花器官脂肪酸组成和含量的影响

不同浓度赤霉素和多效唑对红花花器官脂肪酸含量的影响见图 1。从图 1A 可以看出,各赤霉素处理下,开花后第 2d 的红花花器官中的棕榈酸和硬脂酸含量与对照间差异均不显著,但对亚油酸有显著

提高作用,且 100mg/L 的 GA 极显著提高花后 2d 的花器官亚油酸含量。100 和 170mg/L GA 显著提高其亚麻酸含量。从图 B 中可以看出,不同浓度多效唑处理对红花花器官脂肪酸的影响与对照相比均无显著差异。

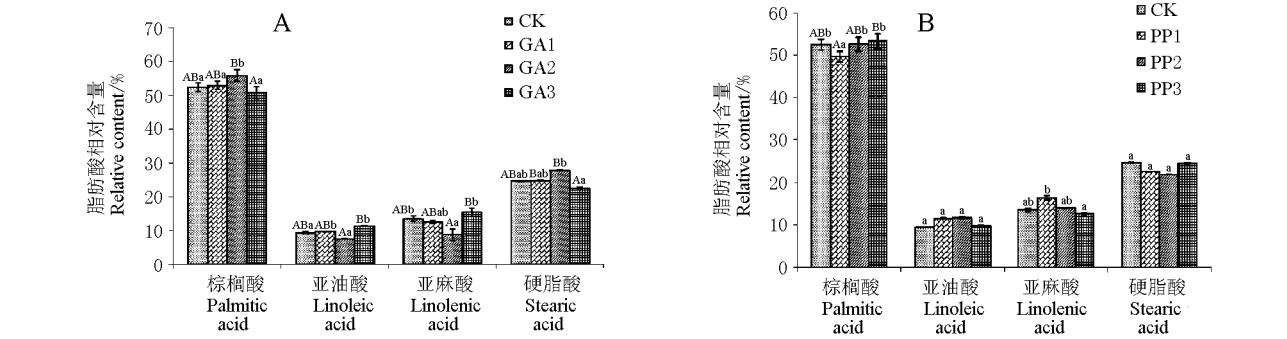


图 1 赤霉素(A)和多效唑(B)处理下红花花器官脂肪酸含量变化

Fig.1 Variation of fatty acid contents in safflower flowers after spraying GA (A) and PP₃₃₃ (B)

2.3 赤霉素和多效唑处理对不同发育阶段种子脂肪酸含量的影响

除开花时的子房外(0d),红花种子中主要含有 4 种脂肪酸,即棕榈酸、亚油酸、油酸和硬脂酸。而 0d 子房的脂肪酸组成与其他营养器官相似,不含油酸,而含亚麻酸。

正常情况下(CK),红花种子不同发育时期各脂

肪酸组成和变化情况见图 2。从图中可以看出,总体上,红花种子中棕榈酸和硬脂酸含量在 0~10d 变化较小,但随着种子的发育其含量逐渐减少,20d 时均降至 20% 以下。在开花时的子房中没有检测到油酸,但其含量在 0~15d 开始不断增加,15d 后开始降低。而亚油酸含量在 0~10d 稍有降低,在 10~20d 时开始增加,10~15d 迅速由 25.54% 增加至

60.36% ,之后缓慢增加。

如图 2 所示,经赤霉素处理后,各浓度处理下红花种子棕榈酸含量显著低于对照,且 30mg/L 赤霉素处理后使红花种子棕榈酸含量在 0 ~ 15d 迅速下降;与 170mg/L 赤霉素处理相比,30mg/L 赤霉素使硬脂酸显著降低,但与其他处理和对照间差异不显著。随着赤霉素浓度的增加,促进了红花种子油酸的积累,使其油酸含量在 10 ~ 15d 仍在缓慢增加,170mg/L 处理下油酸含量显著高于 30mg/L 赤霉素

处理及对照;30mg/L 赤霉素处理促进了红花种子亚油酸的积累,使其亚油酸的含量在 0 ~ 20d 一直处于增加状态,尤其在 20d 时亚油酸含量达到 67.83% ,显著高于对照(62.58%),而 100 和 170mg/L 赤霉素处理虽也提高了红花种子亚油酸积累速率,但与 30mg/L 赤霉素处理相比积累速度偏低。由此,赤霉素处理总体上会提高红花种子中不饱和脂肪酸含量,降低其饱和脂肪酸含量。

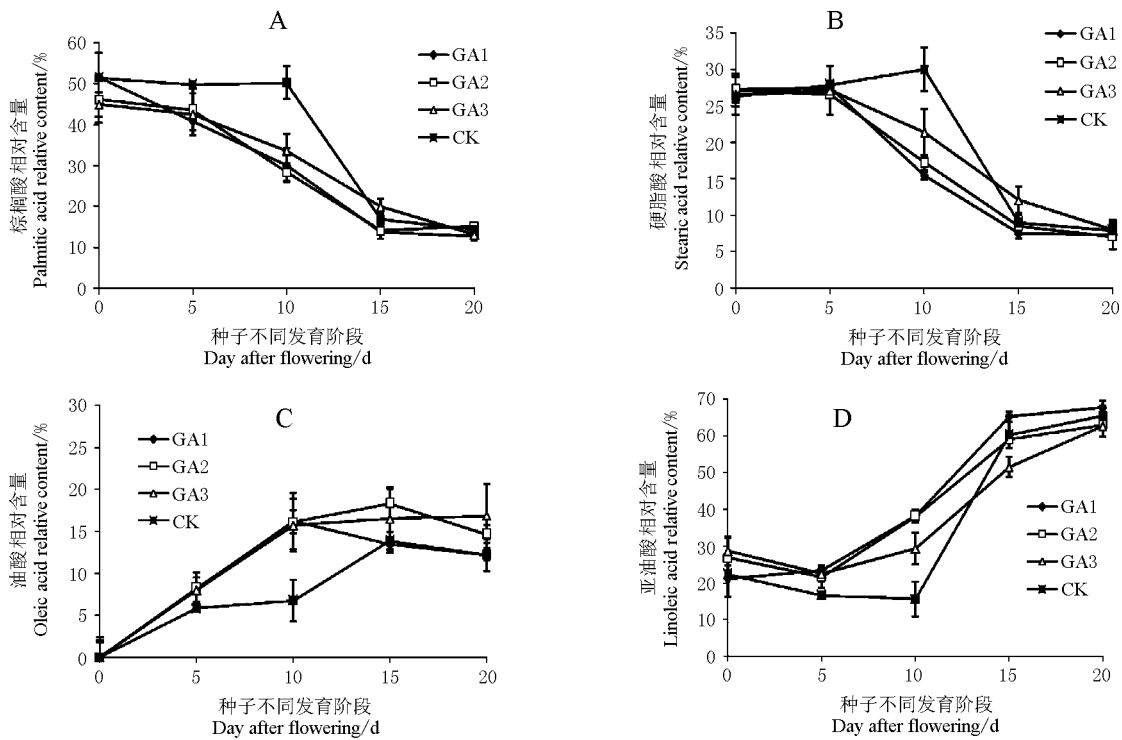


图 2 赤霉素处理下红花种子发育过程中脂肪酸含量变化
Fig.2 Variation of fatty acids contents in developing seeds after GA spray

如图 3 所示,经多效唑处理后,30 和 150mg/L 使 5 ~ 15d 红花种子棕榈酸含量迅速下降,但只有 150mg/L 多效唑处理显著降低了棕榈酸含量;三种浓度多效唑处理均使红花种子硬脂酸含量从 0d 便开始下降,除 90mg/L 多效唑使 5 ~ 10d 硬脂酸含量稍有增加外,另两种浓度处理与对照硬脂酸含量变化相似。与其他浓度处理及对照相比,150mg/L 多效唑处理促进了 0 ~ 15d 红花种子油酸含量的快速积累,且 90 和 150mg/L 多效唑处理均极显著提高了油酸含量,在 20d 时油酸含量分别达到了 18.98% 和 20.05% ,比对照分别提高了 3.74% 和 4.81% 。随着多效唑浓度的增加,红花种子亚油酸含量增加速率减缓,尤其在 90 和 150mg/L 两个浓度处理下,使 0 ~ 10d 亚油酸含量不断降低,而 10 ~ 15d 亚油酸含量的增加亦偏缓,但各处理间及与对照间亚油酸

含量均未达显著差异水平。由此,总体上喷施多效唑有助于提高红花种子油酸含量,以 150mg/L 多效唑处理效果最明显。

2.4 赤霉素和多效唑处理对红花 20d 种子油酸/亚油酸比值(O/L)的影响

油酸和亚油酸是红花种子中两种主要的不饱和脂肪酸。O/L 比值是影响红花油耐贮性的重要因素,O/L 比值提高使油脂的稳定性增强,可延长红花籽油的货架寿命。不同浓度赤霉素和多效唑处理下 20d 的红花种子油 O/L 值变化列于表 3。从表中可以看出,随着赤霉素处理浓度的上升,开花后 20d 的红花种子油的 O/L 值上升,但与对照比均无显著差异。从表 3 中还可以看出,三种浓度多效唑处理均不同程度提高了 O/L 比值,尤其 150mg/L 多效唑处理下红花籽油 O/L 比值显著上升。

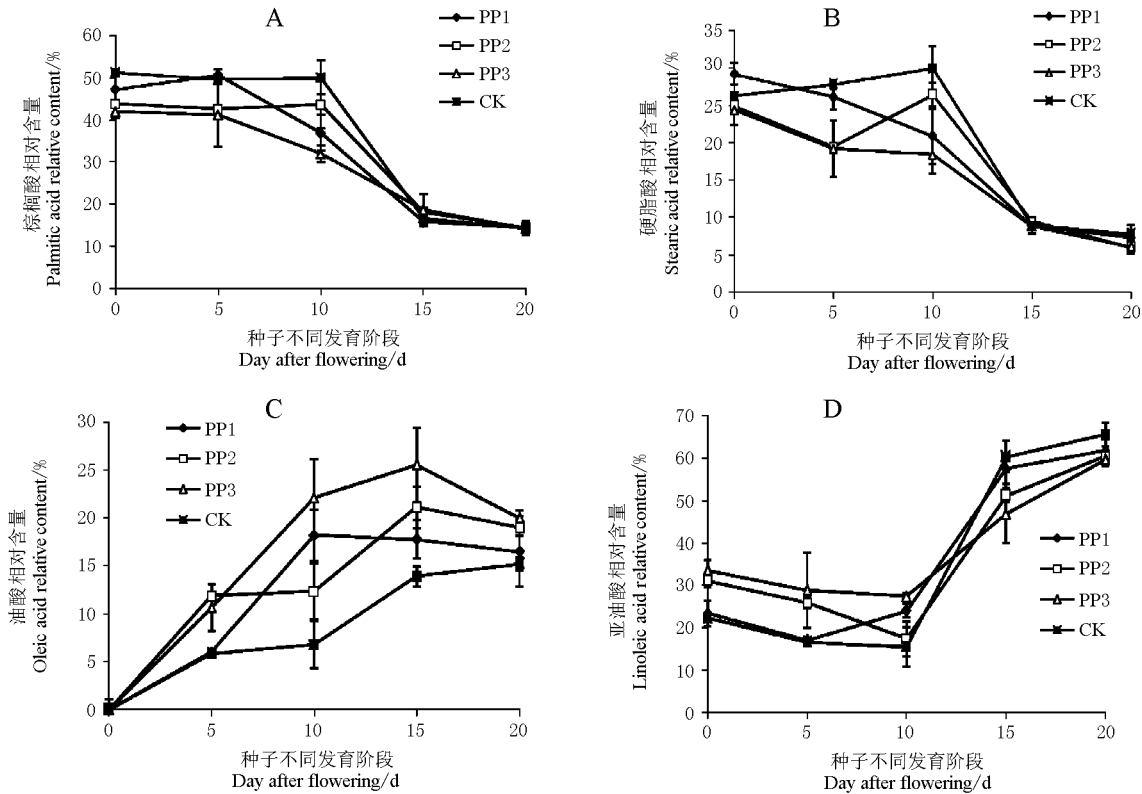


图3 多效唑处理下红花种子发育过程中脂肪酸含量变化
Fig.3 Variations of fatty acids contents in developing seeds after PP₃₃₃ spray

表3 不同浓度赤霉素和多效唑处理下20d的红花种子油的O/L值变化(多重比较采用LSD法)
Table 3 Variation of O/L ratio of 20 DAF seeds oil in *C. tinctorius* sprayed with GA and PP₃₃₃ (multiple comparison with LSD method)

赤霉素农度 (mg/L) GA concentration	O/L 值 O/L ratio	多效唑浓度/(mg/L) PP ₃₃₃ concentration	O/L 值 O/L ratio
CK	0.24 ± 0.02ab	CK	0.24 ± 0.02a
30	0.18 ± 0.03a	30	0.27 ± 0.08ab
100	0.23 ± 0.02ab	90	0.31 ± 0.02ab
170	0.27 ± 0.07b	150	0.34 ± 0.01b

注:同一行不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)
Note: Different lowercase letters in the same row show significance at 0.05 level

3 讨论

植物激素是植物自身合成的微量生长调节分子,是植物整个生命活动过程中不可缺少的。本试验分别采用3种不同浓度赤霉素和多效唑处理伸长期红花。结果表明,3种浓度赤霉素处理均可显著增加株高,30mg/L赤霉素使分枝长显著增加,但高浓度赤霉素反而缩短分枝长,表现出一定的高浓度抑制作用。多效唑处理使红花株高降低,高浓度多效唑显著降低了红花分枝长。红花植株高度降低可使重心降低,可提高红花植株抗倒伏能力^[16]。本试验还发现,100mg/L赤霉素可以使红花始花期提前4d,而90和150mg/L多效唑处理使红花始花期延迟2d,因此,通过赤霉素和多效唑处理可适当调控红花花期。

本研究发现,随着红花种子的发育,棕榈酸和硬脂酸含量不断减少;油酸含量在0~10d不断积累,而后逐渐减少至很低的水平;亚油酸含量在0~5d有所下降,在5~10d缓慢积累,而10~15d是亚油酸的快速积累期,之后稍有增加。这与官玲亮等对红花发育中种子脂肪酸变化规律的研究结果相一致^[17]。蒋驰宇利用外源赤霉素喷施拟南芥,结果发现赤霉素可以显著提高拟南芥种子的含油量,喷施50mmol/L浓度的赤霉素,可显著提高种子中亚油酸和亚麻酸的含量^[10]。本文研究结果也发现,30mg/L赤霉素处理使红花种子(20d)亚油酸含量显著高于对照。由于激素是痕量生长调节分子,而本试验中低浓度的赤霉素即产生了较好的处理效果,因此接下来将采用更低浓度的赤霉素处理,以进一步探讨更适的处理浓度。陈玉珍研究发现,多效唑对花

生烯酸、花生酸含量影响不显著;使亚油酸、山嵛酸含量降低;而油酸含量升高,达极显著水平^[12]。本研究也发现,150mg/L 多效唑处理使红花种子(20d)油酸含量显著高于对照,而对亚油酸的积累起一定的抑制作用。红花种子中油酸含量的提高有很多积极作用,如减少体内胆固醇的形成,预防心血管疾病;增加种子油的耐储性,延长货架期;使种子油能有效的甲酯化,促进生物柴油的生产,降低生产成本等。

种子油作为油料作物主要产品之一,提高油料作物种子油的含量和品质是作物育种目标之一。在红花伸长期喷施 30mg/L 赤霉素可提高亚油酸含量,喷施 150mg/L 多效唑可提高油酸含量,因此通过赤霉素和多效唑喷施处理可调整红花种子脂肪酸含量和组成,提高红花种子油的品质,提高红花种子油的经济价值。

亚油酸是红花种子中另一种主要的饱和脂肪酸,由于亚油酸稳定性较差,油酸和亚油酸之比(O/L)是影响红花油耐储藏性的重要指标。如不考虑亚油酸的特殊功能,从油稳定性角度讲,生产上更希望提高籽油的油酸含量。本研究发现 150mg/L 多效唑处理,能显著提高红花种子中的 O/L 比值,得到的结果与前人研究一致^[12]。表明多效唑在伸长期使用多效唑能提高种子中油酸的比例,将有效提高红花油的耐贮性。

关于红花药材,通常开花后 2~3d 是盛花期,花色由黄转红时采摘。本文初步研究了激素对花中脂肪酸的影响,为花的进一步开发利用提供了数据。

4 结论

红花伸长期喷施不同浓度的赤霉素和多效唑对部分农艺性状及种子脂肪酸含量有显著影响,其中各浓度赤霉素均可显著增加红花株高,使始花期提前;30mg/L 赤霉素显著增加分枝长;100 和 170mg/L 赤霉素降低其单株总果球数和一级分枝数。90 和 150mg/L 多效唑显著降低红花分枝长,各浓度多效唑均能延迟始花期。总体上,赤霉素和多效唑对红花花器官的脂肪酸组成及含量影响相对较小,喷施赤霉素提高红花种子中油酸和亚油酸含量,喷施多效唑则主要提高红花种子油酸含量,还可显著提高红花种子(20d)脂肪酸 O/L 值,有利于提高红花籽油耐贮性能。生产上可在红花的伸长期采用喷施 30mg/L 赤霉素提高种子亚油酸含量,采用 150mg/L 多效唑来提高种子油酸含量,以调控红花种子中不

饱和脂肪酸含量和组成。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.《中国药典 2010》第一部 [M]. 中国医药科技出版社,2010.
- [2] 郭美丽,张汉明,张美玉.红花本草考证[J].中药材,1996,19(4):202-203.
- [3] 万春平,包照日格图,却 翎,等.红花的研究进展[J].时珍国医国药,2007,18(11):2 854-2 855.
- [4] 张教洪,孙洪春,朱彦威,等.中草药红花的综合利用及研究进展[J].山东农业科学,2008(5):56-58.
- [5] 张 敏,杨丽华,马 春,等.红花的现代研究进展[J].中国老年学杂志,2007,27:1 429-1 430.
- [6] 张春娥,张 惠,刘楚怡,等.亚油酸的研究进展[J].粮油加工,2010(5):18-21.
- [7] 黄先忠,蒋才富,廖立力,等.赤霉素作用机理的分子基础与调控模式研究进展[J].植物学通报,2006,23(5):499-510.
- [8] 李保珠,赵 翔,安国勇.赤霉素的研究进展[J].中国农学通报,2011,27(1):1-5.
- [9] 李孟良,陈长友,陈世龙.多效唑在油料作物上的应用研究现状[J].安徽农业技术师范学院学报,1996,10(2):61-64.
- [10] 蒋驰宇,金永生.外源赤霉素对拟南芥种子含油量和脂肪酸组分的影响及分子机制初探[J].绿色科技,2010(7):177-178.
- [11] 唐启才,魏付涟,赵讲芬,等.赤霉素对油菜种子产量含油量及其脂肪酸组分影响的研究[J].种子,1985(4):23-25.
- [12] 陈玉珍,张高英.多效唑对花生脂肪酸含量的影响[J].中国油料,1993(4):65.
- [13] Gecgel U, Demirci M. Fatty acid composition of the oil from developing seeds of different varieties of safflower [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2007,84(1):47-54.
- [14] Sabzalian M R. Oil content and fatty acid composition in seeds of three safflower species[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2008,85(8):717-721.
- [15] Garces R. One step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues[J]. Analytical Biochemistry, 1993,211(1):139-143.
- [16] Potter T I. Gibberellin physiology of safflower endogenous gibberellins and response to gibberellic acid[J]. Plant Growth Regulation, 1993(12):133-140.
- [17] 官玲亮.红花不同组织多不饱和脂肪酸积累模式及调控机制[D].雅安:四川农业大学,2011.