



به‌شادی گیاهان زراعی و باغی

دوره ۱ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۲
صفحه‌های ۱۲۳-۱۳۰

ارزیابی تنوع سیتوژنتیک و مورفولوژیک برخی از توده‌های شنبلیل بومی ایران

عباس یداللهی*^۱، عطیه میان‌محله^۲ و عبدالعلی شجاعیان^۳

۱. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس (نویسنده مسئول مکاتبات)*
۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۳. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۲/۱۰/۷

تاریخ وصول مقاله: ۹۱/۱۱/۳

چکیده

در این پژوهش ۱۱ توده شنبلیل بومی ایران ارزیابی کاربوتیپی شده است. تجزیه ژنوم گونه‌ها شامل اندازه‌گیری طول کل کروموزوم‌ها، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه، نسبت طول بازوی بلند به کوتاه، شاخص سانترومتری، شاخص تقارن، شاخص پراکنندگی و ضریب تغییرات و طول نسبی انجام شد. گونه‌ها دیپلوئید و با عدد کروموزومی $2n=16$ بودند. تقارن کاربوتیپ‌ها براساس خصوصیات مورفولوژیک توده‌ها است. براساس روش استیمنز ژنوتیپ‌های کردستان، اردستان و زنجان در گروه ۲A و سایر ژنوتیپ‌ها در گروه ۱A قرار گرفتند. در بخش مطالعات مورفولوژیک تجزیه خوشه‌ای بر روی توده‌ها براساس میانگین نه صفت استانداردشده شامل (تعداد برگ، تعداد روز تا گلدهی، وزن خشک، طول ساقه، وزن هزاردانه، تعداد روز تا جوانه‌زنی، طول برگ، قطر برگ و طول دم‌برگ) انجام گرفت. برای تعیین فاصله بین توده‌ها از روش Dist و روش ادغام کلاسترها استفاده شد. داده‌های مورفولوژیک با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و SPSS نرمال شدند. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC انجام گرفت.

کلیدواژه‌ها: تنوع، شنبلیل، کاربوتیپ، مورفولوژیک، *Leguminosae*

مقدمه

شنبلیله قدمت کشت بسیار طولانی در ایران دارد. شنبلیله با نام علمی *Trigonella Foenum-graceum* و نام انگلیسی Fenugreek از تیره Leguminosae (Dini, 2006)^۱ است. از برگ‌ها و بذره‌های این گیاه به‌عنوان محرک جریان شیر، کاهش‌دهنده سطح قند خون و کلسترول، ضدسرطان، ضد میکروب، آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود و نیز برای استفاده در غذا، کنترل حشرات در انبار بذر و معطرکردن مواد صنعتی کاربرد دارد. از بذره‌های برداشت‌شده آن به‌جای قهوه (در آفریقا) استفاده می‌شود (۵).

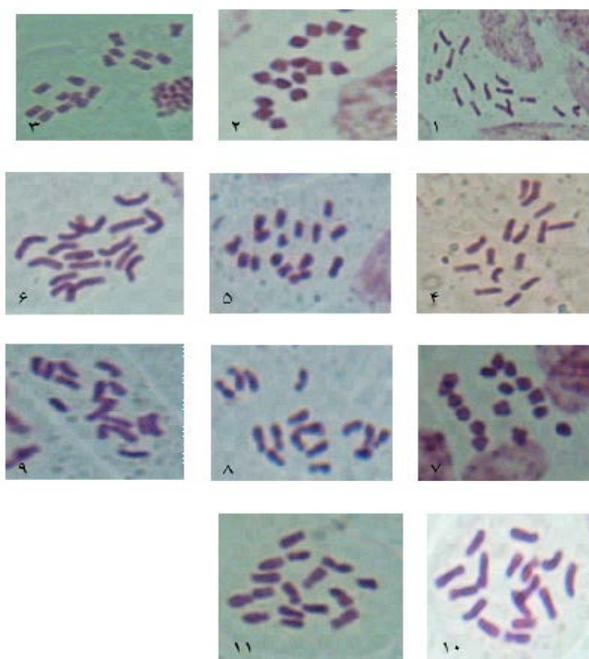
اولین مطالعات کروموزومی شنبلیله در گونه‌های *foenum-graecum* و *T. coerulea* انجام گرفت و عدد کروموزومی این دو گونه $2n=2x=16$ اعلام شد (۲). کاریوتیپ ۱۹ گونه شنبلیله در ترکیه بررسی شد. تعداد کروموزوم‌های میتوزی بررسی شده $2n=14$ و $2n=16$ بودند و دو جفت کروموزوم متافاز ماهواره‌ای در *T. cariensis* و یک جفت در *T. luntata* مشاهده شد. کوچک‌ترین طول کروموزوم $0.43 \mu\text{m}$ در *T. cephalots* و بزرگ‌ترین طول کروموزوم $6.28 \mu\text{m}$ در *T. cariensis* اندازه‌گیری شد (۶). در پژوهش حاضر، ۱۱ توده بومی ایران ارزیابی کاریوتیپی شد (شکل ۱) تا علاوه بر تعیین تعداد کروموزوم‌ها، تقارن کاریوتیپی آن‌ها بررسی و ایدیوگرام آن‌ها نیز رسم شود (شکل ۲).

مواد و روش‌ها

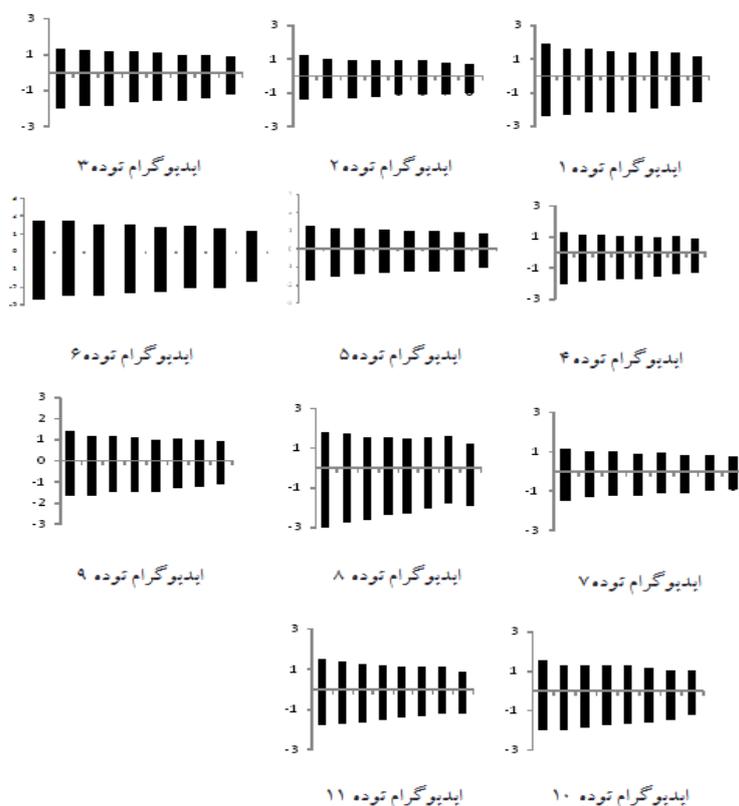
۱۱ توده شنبلیله بومی ایران، جمع‌آوری شد (جدول ۱). بذرها بعد از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم در پتری‌دیش در دمای محیط و رطوبت ۷۰ درصد ریشه‌دار شد. طول

ریشه یک تا ۱/۵ سانتی‌متر مناسب تشخیص داده شد. نوک ریشه‌ها به مدت ۱۹ ساعت در محلول اشباع آلفاگابروموفتالین قرار گرفت (۶). برای هیدرولیز، ریشه‌ها یک دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در کلریدریک‌اسید یک مولار قرار گرفت (۶)، سپس رنگ‌آمیزی آن‌ها در استوا-اورسئین دودرصد (w/v) در دمای اتاق به مدت ۲/۵ ساعت انجام گرفت. شایان ذکر است برای انتقال ریشه از هر مرحله به مرحله بعد، شست‌وشوی آن‌ها سه بار و هر بار پنج دقیقه با آب مقطر انجام شد (۷). پس از رنگ‌آمیزی منطقه مرستمی نوک ریشه جدا و در یک قطره اسیداستیک ۴۵ درصد روی لام گذاشته شد و پس از قراردادن لامل و له کردن نمونه‌ها مطالعات میکروسکوپی انجام گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها براساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با پنج تکرار (هر تکرار یک سلول) انجام شد. با احتساب ۱۱ توده در کل، ۵۵ توده اندازه‌گیری کروموزومی شدند. شایان ذکر است به‌منظور یافتن ۵۵ سلول مناسب، تعداد بسیار زیادی نمونه و سلول تحت مطالعه قرار گرفتند. در بررسی‌های مورفولوژیک هر توده در سه تکرار و در هر تکرار ۱۰۰ بذر شنبلیله به‌طور تصافی کاشته شد. در تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزارهای مختلفی مانند Minitab13, Excel, SPSS NTYSYS, MSTATC, استفاده شد. از نمونه‌ها توسط عدسی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری (BX50 Olympus) عکس گرفته شد و نمونه‌ها از بخش پژوهش‌های سبزی و صیفی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر دریافت شد.

ارزیابی تنوع سیتوژنتیک و مورفولوژیک برخی از توده‌های شنبليله بومی ایران



شکل ۱. کاربوتیپ توده‌های شنبليله بررسی شده



شکل ۲. ایديوگرام توده‌های شنبليله‌های مطالعه شده

به ژادی گیاهان زراعی و باغی

دوره ۱ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۲

جدول ۱. مشخصات توده‌های شنبليله استفاده شده در این پژوهش

نام توده	علامت اختصاری
کرمانشاه	P1
ورامین	P2
کردستان	P3
اردستان	P4
ارومیه	P5
زنجان	P6
بوشهر	P7
نیشابور	P8
مشهد	P9
خاش	P10
همدان	P11

نتایج و بحث

کوتاه، طول بازوی بلند، طول کل کروموزوم، حجم کروموزوم، نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه، نسبت طول بازوی کوتاه به بازوی بلند، درصد شکلی کروموزوم و شاخص سانترومیری به سه دسته تقسیم شدند و تقریباً این دسته‌ها با یکدیگر همپوشانی دارند. میانگین اطلاعات کاریوتیپی نمونه‌های شنبليله مطالعه شده در جدول ۲ آورده شده است.

در مطالعات حاضر، بزرگ‌ترین کاریوتیپ مربوط به توده اردستان با دامنه میانگین طول کروموزوم ۲/۵۴۹ و کوچک‌ترین کاریوتیپ مربوط به توده بوشهر بود. براساس روش لوان فرمول کاریوتیپی شامل دو کلاس کروموزومی (۱۰ توده ۸m و ۱ توده ۱ sm + ۸m) و دوکلاس تقارنی استتینز (۸ توده ۱A و ۳ توده ۲A) بود.

افزایش عملکرد در واحد سطح متکی بر اصلاح و ایجاد ارقام پرمحصول با خصوصیات و ویژگی‌های کمی و کیفی بالا است و تنوع ژنتیکی اساس و پایه آن است، زیرا عمل انتخاب در صورتی امکان‌پذیر است که برای صفات تنوع لازم وجود داشته باشد. بررسی‌های کاریوتیپی نشان داد کلیه توده‌های شنبليله در این پژوهش، دیپلوئید ($2n=2x=16$) بودند. مقایسه میانگین بین توده‌ها به روش توکی در سطح احتمال پنج‌درصد انجام گرفته است و در هر ستون میانگین‌هایی که یک حرف مشترک دارند از نظر آماری معنادار نیستند و در یک گروه قرار می‌گیرند. مقایسه میانگین برای توده‌هایی که اختلاف بین آن‌ها در سطح احتمال پنج‌درصد معنادار بود انجام گرفت (جدول‌های ۲، ۳ و ۴). بر این اساس، پارامترهای کروموزومی طول بازوی

جدول ۲. فرمول تقارن کاریوتیپی توده‌های شنبلیله مطالعه شده

توده	فرمول کاریوتیپی به روش (Levan)	تقارن کاریوتیپ به روش (Stebbins)	تقارن کاریوتیپی برحسب (Romero-Zarco)				DI	TF%	S%	DRL%	CV%
			A2	A1							
۱	Λm	۱A	۰/۸	۰/۱	۰/۰۲	۴۳/۶	۵۱/۱	۱۳/۷	۱۶/۹		
۲	Λm	۱A	۰/۶	۰/۱	۰/۰۳	۳۶/۵	۵۹/۶	۱۲/۸	۱۳/۸		
۳	Λm	۲A	۰/۳۳	۰/۱۳	۰/۰۲	۳۵/۴	۶۰/۷	۱۲/۹	۱۳/۴		
۴	$\Lambda m + 1 sm$	۲A	۰/۳	۰/۱۸	۰/۰۲	۳۶/۲	۵۴/۳	۱۱/۶	۱۸/۵		
۵	Λm	۱A	۰/۲	۰/۱۰	۰/۰۳	۳۸/۰	۶۲/۵	۱۳/۶	۱۰/۸		
۶	Λm	۲A	۰/۳	۰/۲۰	۰/۰۱	۳۴/۴	۴۵/۵	۱۲/۶	۲۰/۲		
۷	Λm	۱A	۰/۲	۰/۱۳	۰/۰	۳۷/۸	۶۰/۲	۱۳/۰	۱۳/۶		
۸	Λm	۱A	۰/۳	۰/۱۱	۰/۰۳	۳۷/۲	۶۳/۹	۱۲/۳	۱۱/۰		
۹	Λm	۱A	۰/۳	۰/۱۳	۰/۰۲	۳۵/۴	۶۰/۷	۱۳/۵	۱۶/۹		
۱۰	Λm	۱A	۰/۲	۰/۰۹	۰/۰۴	۳۸/۳	۶۴/۷	۱۲/۸	۹/۷		
۱۱	Λm	۱A	۰/۲	۰/۱۳	۰/۰۳	۳۷/۱	۵۸/۴	۱۳/۶	۱۳/۱		

کلی کاریوتیپ در این پژوهش اکثر توده‌های مطالعه شده متقارن بودند، با وجود این، توده یک با داشتن بالاترین مقدار (۴۳/۶۶ درصد) متقارن‌ترین و توده شش با داشتن کمترین مقدار (۳۴/۴۴ درصد) نامتقارن‌ترین در میان ۱۱ توده بودند.

برای برنامه‌ریزی در برنامه‌های گزینش لزوم توجه به همبستگی صفات مورد توجه قرار گرفته است. جدول ۴ همبستگی ساده بین نه صفت مورفولوژیک را نشان می‌دهد. داده‌های این جدول نشان می‌دهد که طول ساقه با تعداد برگ (**۰/۵۴۵) و تعداد روز تا گلدهی (**۰/۵۲۰) بیشترین همبستگی در جهت مثبت را داشتند. تعداد برگ با تعداد روز تا گلدهی (**۰/۴۸۵)، تعداد روز تا جوانه‌زنی با تعداد برگ (*۰/۳۳۳)، قطر برگ با وزن هزاردانه (*۰/۳۴۸) و طول دم‌برگ با قطر برگ (**۰/۴۵۶) همبستگی نشان دادند.

شاخص پراکندگی = ضریب تغییرات / شاخص سانترومری

$$Dispersion = DI$$

درصد شکل کلی کاریوتیپ

$$\text{karyotype of percentage form Total} = TF\%$$

شاخص تقارن $S\% = \text{index Symmetry}$

اختلاف دامنه طول نسبی کروموزوم

$$DRL = \text{Difference range of relative length of chromosome}$$

ضریب تغییرات $CV\% = \text{variation of Coefficient}$

درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF%) مشخصه دیگر برای بیان وضعیت تقارن کاریوتیپ کروموزوم‌ها است. هنگامی که ارزش عددی آن به حداکثر مقدار آن ۵۰ درصد برسد، نشان‌دهنده تقارن کامل و متاسانتریک بودن کروموزوم‌های کاریوتیپ است (۸). از نظر درصد شکل

جدول ۳. مقایسه میانگین‌ها و (\pm Se) پارامترهای کروموزومی توده‌های شبلیله

توده	S	L	TL	r-value	AR	CI
۱	۱/۴۰۱±۰/۰۴۵	۲/۰۰۶±۰/۰۸۷	۳/۴۰۷±۰/۱۲۴	۰/۷۱۹±۰/۰۱۹	۱/۴۳۵±۰/۰۴۳	۰/۴۱۵±۰/۰۰۶
۲	۰/۸۹۸±۰/۰۳۱	۱/۲۳۸±۰/۰۲۹	۲/۱۳۷±۰/۰۵۲	۰/۷۳۱±۰/۰۲۲	۱/۴۲۵±۰/۰۵۰	۰/۴۱۸±۰/۰۰۷
۳	۱/۰۸۶±۰/۰۳۶	۱/۶۷۵±۰/۰۴۷	۲/۷۶۲±۰/۰۶۸	۰/۶۶۰±۰/۰۲۲ ^{de}	۱/۵۸۹±۰/۰۵۷	۰/۳۹۳±۰/۰۰۸
۴	۱/۷۳۱±۰/۲۴۵	۲/۵۴۹±۰/۲۹۰	۴/۲۸۱±۰/۵۲۰	۰/۶۶۳±۰/۰۲۶	۱/۶۱۳±۰/۰۷۳	۰/۳۹۳±۰/۰۰۹
۵	۱/۰۲۰±۰/۰۲۹	۱/۳۸۰±۰/۰۳۹	۲/۴۰۱±۰/۰۶۳	۰/۷۴۳±۰/۰۱۳	۱/۳۶۳±۰/۰۲۸	۰/۴۲۵±۰/۰۰۴
۶	۱/۴۵۸±۰/۰۷۵	۲/۳۲۲±۰/۱۲۱	۳/۷۸۰±۰/۱۸۵	۰/۶۴۵±۰/۰۲۱	۱/۶۲۳±۰/۰۵۸	۰/۳۸±۰/۰۰۸
۷	۰/۸۸۵±۰/۰۲۶	۱/۱۹۳±۰/۰۳۲	۲/۰۷±۰/۰۵۳	۰/۷۴±۰/۰۱۷	۱/۳۶۸±۰/۰۳۵	۰/۴۲۵±۰/۰۰۶
۸	۰/۵۴۸±۰/۰۴۰	۲/۲۷±۰/۰۶۸	۳/۸۲۷±۰/۰۸۸	۰/۶۹±۰/۰۲۲	۱/۴۹۹±۰/۰۵۲	۰/۴۰۶±۰/۰۰۸
۹	۱/۰۸۳±۰/۰۳۳	۱/۴۳۷±۰/۰۴۵	۲/۵۲۰±۰/۰۷۲	۰/۷۶۳±۰/۰۱۷	۱/۳۴۰±۰/۰۳۳	۰/۴۳۸±۰/۰۰۵
۱۰	۱/۱۶۵±۰/۰۴۳	۱/۵۵۴±۰/۰۵۷	۲/۷۱۹±۰/۰۹۴	۰/۷۵۸±۰/۰۱۸	۱/۳۵±۰/۰۳۹	۰/۴۲۸±۰/۰۰۶
۱۱	۱/۱۹۸±۰/۰۳۱	۱/۷۱۱±۰/۰۵۴	۲/۹۰۲±۰/۰۷	۰/۷۱±۰/۰۲۰	۱/۴۴۸±۰/۰۴۹	۰/۴۱±۰/۰۰۷

خطای استاندارد error SE=Standard

خطای سانترومتری = میانگین طول کروموزوم‌ها / میانگین طول بازوی کوتاه CI= Centrometric index

طول نسبی کروموزوم = Relative RL% of length chromosome

نسبت طول بازوی کوتاه به بلند r-value = (S/L)

طول کل کروموزوم TL=Total chromosome of length

طول بازوی بلند L = Long arm length

طول بازوی کوتاه S= lenth arm Short

نسبت بازوها AR= L/S Ratio; Arm

جدول ۴. ضریب همبستگی بین صفات مورفولوژیک توده‌های شبلیله مطالعه‌شده

ویژگی	تعداد برگ	تعداد روز	وزن خشک	طول ساقه	وزن هزاردانه	تعداد روز تا جوانه‌زنی	طول برگ	قطر برگ	طول دم‌برگ
تعداد برگ	۱								
روز تا گلدهی	۰/۴۸۵**	۱							
وزن خشک	۰/۰۷۴ ^{ns}	-۰/۰۲۳ ^{ns}	۱						
طول ساقه	۰/۵۴۵**	۰/۵۲**	-۰/۰۸۸ ^{ns}	۱					
وزن هزاردانه	-۰/۰۱۶ ^{ns}	-۰/۱۰۸ ^{ns}	۰/۰۳۳ ^{ns}	۰/۱۴۲ ^{ns}	۱				
روز جوانه‌زنی	-۰/۳۳۳*	۰/۰۰۹ ^{ns}	-۰/۱۰۸ ^{ns}	۰/۰۰۹ ^{ns}	۰/۳۱۵ ^{ns}	۱			
طول برگ	۰/۱۵۳ ^{ns}	-۰/۰۳۹ ^{ns}	۰/۳۰۱ ^{ns}	۰/۰۱۲ ^{ns}	۰/۲۵۵ ^{ns}	-۰/۰۴۴ ^{ns}	۱		
قطر برگ	-۰/۲۴ ^{ns}	-۰/۰۸۷ ^{ns}	۰/۱۳۶ ^{ns}	۰/۲۳۹ ^{ns}	۰/۳۴۸*	۰/۰۸۳ ^{ns}	-۰/۰۲۱ ^{ns}	۱	
طول دم‌برگ	-۰/۲۷ ^{ns}	۰/۰۷۶ ^{ns}	۰/۰۰۵ ^{ns}	۰/۰۳۳ ^{ns}	۰/۲۳۶ ^{ns}	۰/۰۸۴ ^{ns}	-۰/۲۴۵ ^{ns}	۰/۴۵۶*	۱

ns - اختلاف غیرمعنادار در سطح پنج درصد

* و ** - اختلاف معنادار به ترتیب در سطوح احتمال پنج درصد و یک درصد

به‌شادی گیاهان زراعی و باغی

دوره ۱ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۲

ارزیابی تنوع سیتوژنتیک و مورفولوژیک برخی از توده‌های شنبلیله بومی ایران

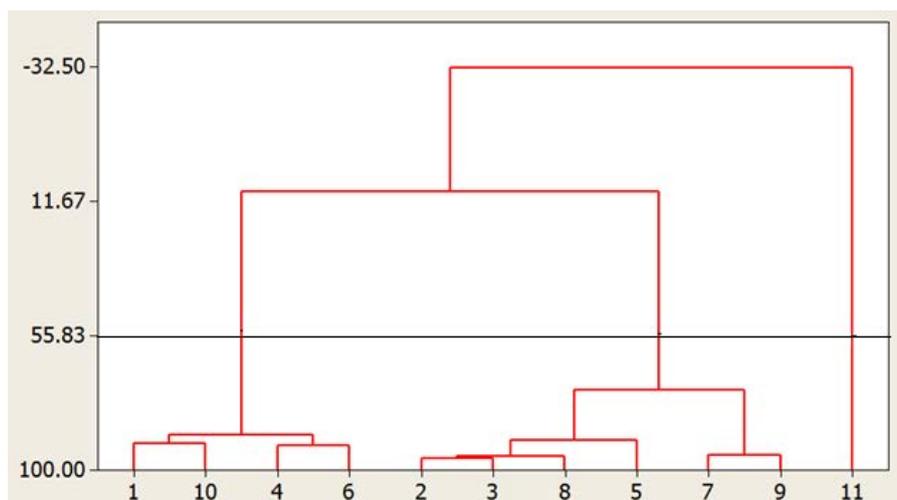
جدول ۵. تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک توده‌های شنبلیله مطالعه‌شده (میانگین مربعات)

منبع تغییرات	DF	تعداد برگ	تعداد روز تا گلدهی	وزن خشک G	طول ساقه (سانتی متر)	وزن هزاردانه G	تعداد روز تا جوانه زنی	طول برگ (سانتی متر)	قطر برگ (سانتی متر)	طول دم‌برگ (سانتی متر)
تیمار	۱۰	۶/۳۳**	۱۲۰/۶۳**	۰/۰۱**	۳۱/۴۱**	۰/۲۶**	۱/۳۸*	۰/۱۵**	۰/۰۵**	۰/۵۶**
خطا	۲۲	۰/۶۳	۳۱/۴۲	۰/۰۰۹	۱۲/۳۷	۰/۰۰۰۳	۰/۰۹	۰/۰۴	۰/۰۰۱	۰/۰۶
CV%		۵/۹۸	۱۳/۳۰	۱۲/۵۹	۱۳/۷۸	۱/۶۴	۸/۳۶	۱۵/۲۱	۶/۳۳	۲۰/۹۳

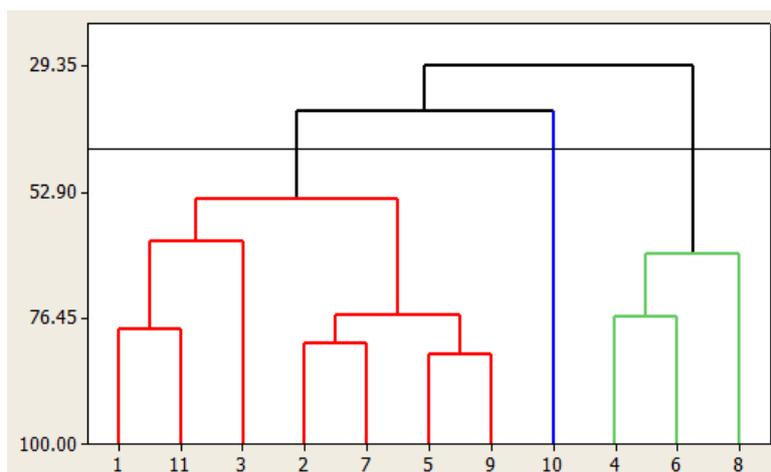
* و ** اختلاف معنادار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

نتایج حاصل از تجزیه کلاستر بر روی کلیه صفات کروموزومی به صورت دندروگرام در شکل ۴ آمده است. با توجه به نتایج حاصل از دندروگرام توده‌ها به سه دسته تقسیم می‌شوند. خوشه‌های اول، دوم و سوم به ترتیب هفت، یک و سه توده را شامل شدند. دسته اول خود به دو زیرگروه تفکیک شد. زیرگروه اول شامل کرمانشاه، همدان و کردستان بود و زیرگروه دوم توده‌های ارومیه، مشهد، ورامین و بوشهر را شامل شد. گروه دوم شامل خاش؛ و دسته سوم شامل اردستان، زنجان و نیشابور بود.

با توجه به نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای نتایج گروه‌بندی توده‌ها بر اساس ۱۲ صفت مورفولوژیکی سه گروه نشان داد (شکل ۳). گروه اول خود به دو زیرگروه تفکیک شد. زیرگروه اول شامل توده‌های کرمانشاه و خاش و زیرگروه دوم شامل توده‌های اردستان و زنجان بود. گروه دوم خود به سه زیرگروه تفکیک شد. زیرگروه اول شامل توده‌های ورامین، کردستان و نیشابور و زیرگروه دوم شامل توده‌های ارومیه و بوشهر و سوم شامل بوشهر و مشهد بود. گروه سوم شامل توده‌های همدان بود.



شکل ۳. دندروگرام مربوط به کلیه صفات مورفولوژیکی توده‌های شنبلیله



شکل ۴: دندروگرام مربوط به کلیه صفات کروموزومی توده‌های شنبلیله

منابع

- Dini M (2006) Scientific name of medicinal plants used in traditional medicine, Forest and Rangeland, Institute Publication, Iran. Pp: 299–300.
- Darlington CD and Wylie AP (1955) Chromosome Atlas of Flowering Plant. George Allen and Unwin LTD, 519 p.
- Goldblatt P (1955) Index to Plant to Chromosome Numbers, Missouri Botanical Garden.
- Romesburge HC (1990) Cluster Analysis for Researchers. R.E. Krieger Pub.Co., Malabar, Florida. U.S.A.
- Mehrafarin A, Rezazadeh Sh, Naghdi Badi H Gh, Noormohammadi Zand E and Qaderi A (2011) A Review on Biology, Cultivation and Biotechnology of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a Valuable Medicinal Plant and Multipurpose. Department of Cultivation and Development, Institute of Medicinal Plants. ACECR. Karaj. Iran. Vol. 10. No. 37.
- Martin E, Akan H, Eki ci M and Aytac Z (2011) Karyotype analyses of ten section of *Trigonella* (Fabaceae). Comp cytogenetic 5(2): 105-121.
- Pedro MR and Alfonso DS (2000) Cytogenetic studies in *Phaesolus* L. (Fabaceae). Genetic and Molecular Bio. 23(4): 985-987.
- Palmer RG and Heer h (1973) Root tip squash technique for Soy bean Chromosomes. Crop Science. 13: 389-391.
- Sharma AK and Sharma A (1990) Chromosome Techniques: Theory and Practice. Butterworth & Co., London. University Park Press. 575 p.