

# FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Blueberry stunt phytoplasma (BBS)  
(Achaparramiento del arándano)



**SENASICA, AGRICULTURA SANA PARA EL BIENESTAR.**

"ESTE PROGRAMA ES PÚBLICO, AJENO A CUALQUIER PARTIDO POLÍTICO. QUEDA PROHIBIDO EL USO PARA FINES DISTINTOS A LOS ESTABLECIDOS EN EL PROGRAMA"



**GOBIERNO DE  
MÉXICO**

**AGRICULTURA**  
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



**SENASICA**  
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,  
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

© Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), [2021]

Impreso por SENASICA

Todos los derechos reservados.

Imagen de Portada: Síntomas de Blueberry stunt phytoplasma. Tomada de: <https://www.canr.msu.edu/uploads/files/Stunt.pdf>

# ÍNDICE

**Pág.**

GENERALIDADES .....	1
INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	2
Nombre científico.....	2
Nombres comunes.....	2
Posición taxonómica.....	2
SÍNTOMAS .....	3
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN .....	3
Toma de muestra .....	3
Técnicas moleculares.....	4
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	4
Interpretación de resultados de PCR punto final .....	7
Controles para las pruebas moleculares .....	8
Secuenciación y análisis de secuencias.....	8
Identificación mediante RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i> ).....	8
Identificación del patógeno.....	9
REFERENCIAS .....	10
AVISO.....	12



# Blueberry stunt phytoplasma (BBS) (Achaparramiento del arándano)

## GENERALIDADES

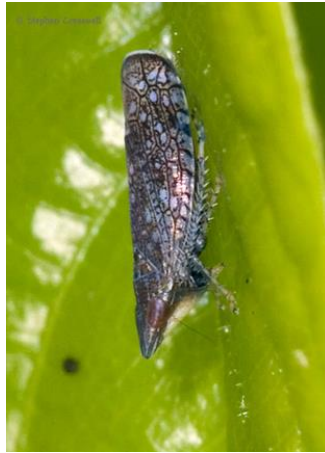
El achaparramiento del arándano (*Vaccinium* spp.) es ocasionado por fitoplasmas que se establecen en los tejidos de la albura, por debajo de la corteza de los arbustos infectados (**Figura 1**). Casi todas las variedades de arándanos son susceptibles: *V. australe*, *V. vacillans*, *V. atrocucum*, *V. stamineum* y *V. myrtilloides*, el cultivar 'Rancocas' es el único que tiene cierta resistencia (Diekmann, et al., 1994).

Los fitoplasmas asociados al BBS se han identificado como miembros del grupo 16SrI, subgrupo E en EUA. Bagadia et al., 2013, identificaron fitoplasmas del grupo 16SrIX 'Candidatus P. phoenicium' subgrupo 16SrIX- E en arándanos de Nueva Jersey; los fitoplasmas reportados en Europa en arándanos silvestres (*Vaccinium myrtilus* L.) de Lituania pertenecen al grupo 16SrIII 'Candidatus Phytoplasma pruni' y los descritos en Austria se relacionan a 'Candidatus P. trifolii' (16SrVI). (EUA) (Rosete, et al., 2015).

El fitoplasma puede transmitirse por material propagativo infectado, y en campo por chicharritas del género *Scaphytopius* spp., que se alimentan de los fluidos del floema de la planta. Los adultos son pequeños (5mm), de color café con pecas blancas y cabeza afilada (**Figura 2**). Las ninfas son amarillas con marcas rojas a cafés (**Figura 3**) (Ministry of agriculture, food and rural affairs, 2021)



**Figura 1** Planta de arándano con achaparramiento infectada por BBS. Tomada de: <https://www.canr.msu.edu/uploads/files/Stunt.pdf>



**Figura 2.** Chicharrita adulta del género *Scaphytopius* sp. Tomada de: <https://www.americaninsects.net/h/scaphytopius-sp.html>



**Figura 3.** Lado izquierdo, ninfa (sin alas) y lado derecho, adulto de *Scaphytopius* sp. Tomada de: <https://pemaruccicenter.rutgers.edu/entomology/iSharp-nosed-Leafhopper.html>

## INFORMACIÓN TAXONÓMICA

### Nombre científico

Blueberry stunt phytoplasma

### Nombres comunes

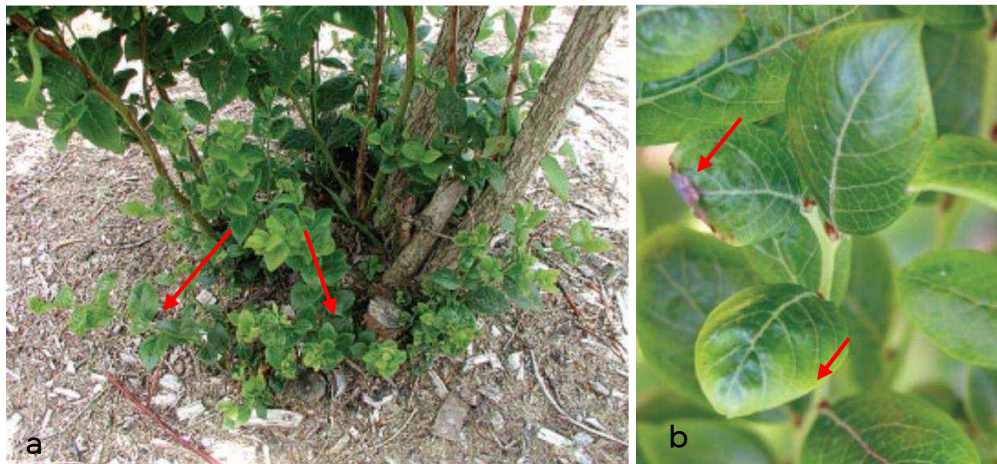
Fitoplasma del achaparramiento del arándano

### Posición taxonómica

Reino: Bacteria. Phylum: Tenericutes. Clase: Mollicutes. Orden: Acholeplasmatales. Familia: Acholeplasmataceae. Género: Phytoplasma. Especie: Blueberry stunt phytoplasma. EPPO, 2021

## SÍNTOMAS

Las plantas infectadas por BBS presentan diferentes síntomas, el más común es achaparramiento debido al acortamiento de los entrenudos en la planta (**Figura 4a**) (Perez-Lopez *et al.*, 2018). Los síntomas pueden variar en relación al progreso de la enfermedad y la variedad de arándano infectado; incluyen el síntoma de escoba de bruja, aparición de hojas pequeñas y deformes; en verano, las hojas presentan los bordes amarillos, así como clorosis intervenal y se tornan ligeramente hacia abajo (**Figura 4b**). En otoño las zonas cloróticas se tornan de color rojo brillante.



**Figura 4.** Síntomas de Blueberry stunt phytoplasma. **a)** Achaparramiento o acortamiento de los entrenudos. **b)** Hojas con bordes cloróticos y acucharamiento. Tomadas de: New Zeland, 2016. créditos: Annemiek Schilder, Michigan State University, USA.

El BBS es una enfermedad que debilita y reduce el crecimiento de las plantas, afectando la producción y calidad del fruto. Los síntomas pueden aparecer en uno a tres años, por ello es necesario monitorear regularmente el cultivo. El BBS afecta el desarrollo de los tejidos reproductivos ocasionando achaparramiento y eventualmente la muerte de la planta (Pérez-López, *et al.*, 2018).

## DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

### Toma de muestra

Los fitoplasmas pueden estar distribuidos irregularmente y en concentraciones desiguales en una planta, sobre todo en hospedantes leñosos, lo que se recomienda es utilizar tejido sintomático para su detección (Constable *et al.*, 2003; Gracia-Chapa *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2004; Necas y Krska, 2006; IPPC, 2016). Algunas plantas hospedantes pueden tener infecciones asintomáticas por lo que se deben tomar hojas

de distintas partes de la planta. Las chicharritas también pueden analizarse y detectar la presencia del BBS.

Para la extracción de DNA total deben utilizarse los peciolo y la nervadura central de las hojas, también puede utilizarse la corteza interna (IPPC, 2016).

### Técnicas moleculares

Se recomienda realizar la extracción de DNA total con alguno de los siguientes *kits* comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante.

- DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)
- Plant RNA Purification Reagent

La extracción de DNA total también puede realizarse con CTAB del 2 al 3 % (IPPC, 2016).

**Nota:** Se puede emplear algún otro protocolo de extracción de DNA total, siempre y cuando este cumpla con los parámetros de calidad e integridad (Relación  $A_{260}/_{280}$  entre 1.8 y 2.0 y relación  $A_{260}/_{230}$  entre 2.0 y 2.2).

### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se han diseñado varios pares de iniciadores universales que permiten la amplificación del gen 16S del ARNr de todos los fitoplasmas conocidos, estos iniciadores generalmente se utilizan en combinación con PCR anidada para incrementar la sensibilidad de la técnica ya que los fitoplasmas por lo regular se encuentran en baja concentración en la planta.

En primer lugar, se debe emplear el par de iniciadores generales para fitoplasmas P1 y P7 (Deng y Hiruki, 1991; Smart *et al.*, 1996) (**Cuadro 1**).

**Cuadro 1.** Secuencias de los iniciadores universales empleados para la detección de fitoplasmas

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)
Sentido	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	1800
Antisentido	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	



Se recomienda preparar la mezcla de reacción de acuerdo a lo indicado en el **Cuadro 2**, se deben realizar dos repeticiones por muestra por reacción. El programa de termociclaje para llevar a cabo la reacción se indica en el **Cuadro 3**.

**Cuadro 2.** Preparación de la mezcla de reacción para la PCR punto final

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
<i>Buffer</i> PCR	10X	1X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP	10 mM	0.16 mM	0.4
<i>Iniciador</i> sentido	10 µM	0.4 µM	1.0
<i>Iniciador</i> antisentido	10 µM	0.4 µM	1.0
<i>Taq</i> DNA Pol	5 U/µL	0.06 U/µL	0.3
DNA	20 - 50 ng/µL	4 - 10 ng/µL	5.0
Agua grado biología molecular	-	-	14.05
		<b>Volumen final</b>	<b>25</b>

**Cuadro 3.** Programa de termociclaje para los iniciadores P1 y P7

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	5 min	1
94 °C	1 min	35
54 °C	50 s	
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	1
12 °C	∞	

Una vez finalizada la PCR con los iniciadores P1 y P7, es necesario realizar una dilución del producto de PCR en agua grado biología molecular en una proporción de 2:48. Esta dilución será utilizada como templado en las siguientes reacciones de PCR para incrementar la concentración del fitoplasma y asegurar que se visualicen los amplicones.

Para la PCR anidada se deben emplear dos pares de iniciadores: fU5/rU3 (Lorenz *et al.*, 1995) y R16F2n/R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) (**Cuadro 4**).

**Cuadro 4.** Secuencias de los iniciadores empleados para la PCR anidada de fitoplasmas

Tipo	Nombre del iniciador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)
Sentido	fU5	CGGCAATGGAGGAAATC	882
Antisentido	rU3	TTCAGCTACTCTTTGTAACA	
Sentido	R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	1248
Antisentido	R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	

Se recomienda preparar la mezcla de reacción de acuerdo a lo indicado en el **Cuadro 2** se deben realizar dos repeticiones por muestra por reacción. Los programas de termociclaje para llevar a cabo las reacciones se indican en los **Cuadros 5 y 6**.

**Cuadro 5.** Programa de termociclaje para los iniciadores fU5 y rU3

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	4 min	39
94 °C	45 s	
56 °C	45 s	
72 °C	45 s	
72 °C	7 min	1
12 °C	∞	

**Cuadro 6.** Programa de termociclaje para los iniciadores R16F2n y R16R2

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	2 min	35
94 °C	1 min	
55 °C	2 min	
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	1
12 °C	∞	

Al concluir el termociclaje, correr los productos de PCR mediante electroforesis durante 60 min a 95 V en un gel de agarosa 1.0 - 2.0 %, sumergido en *buffer* TAE 1X. Finalmente, observar el gel en un transiluminador de luz UV, tomar la fotografía, anotar los datos de la muestra y guardar la imagen.

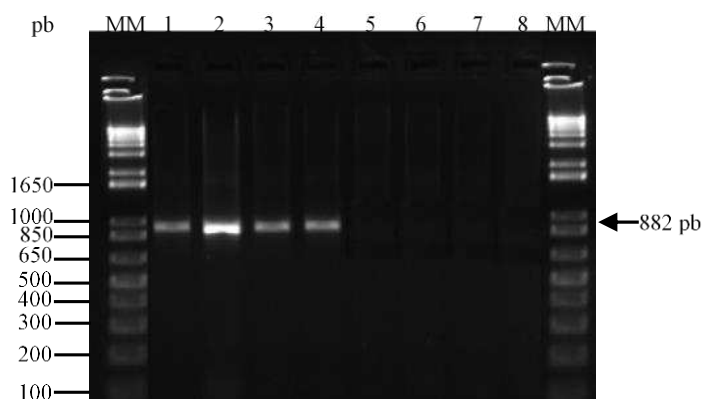
## Interpretación de resultados de PCR punto final

Los resultados serán válidos solamente bajo los siguientes criterios:

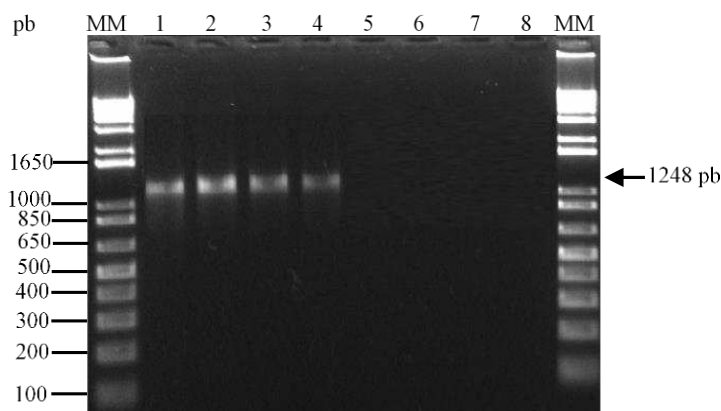
El control positivo con el par de iniciadores fU5 y rU3, debe generar un amplicón de 882 pb (Figura 5).

El control positivo con el par de iniciadores R16F2N y R16R2, debe generar un amplicón de 1248 pb (Figura 6).

Los controles negativos de reactivos y de matriz no deberán presentar amplificación en ninguno de los ensayos de PCR.



**Figura 5.** Productos de PCR con los iniciadores fU5 y rU3. Marcador Molecular (MM) 1 Kb (Invitrogen). **1 y 2)** control positivo. **3 y 4)** Muestra positiva. **5 y 6)** Control negativo de matriz. **7 y 8)** Control negativo de reactivos. Amplicón esperado de 882 pb.



**Figura 6.** Productos de PCR con los iniciadores R16F2n y R16R2. Marcador Molecular (MM) 1 Kb (Invitrogen). **1 y 2)** control positivo. **3 y 4)** Muestra positiva. **5 y 6)** Control negativo de matriz. **7 y 8)** Control negativo de reactivos. Amplicón esperado de 1248 pb.

## Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de PCR punto final es necesario incluir los siguientes controles con una repetición:

**Control positivo:** provee un patrón de referencia con el cual comparar los resultados positivos de las muestras, en caso de haberlos. El control positivo está conformado por una concentración conocida de DNA genómico de BBS o DNA plasmídico con el inserto de BBS.

**Control negativo de matriz:** corresponde a DNA extraído de tejido vegetal sin Blueberry stunt phytoplasma. Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

**Control negativo de reactivos:** material que contiene todos los componentes de la reacción, pero sin ácidos nucleicos. Permite descartar falsos positivos y contaminantes en la reacción de PCR.

## Secuenciación y análisis de secuencias

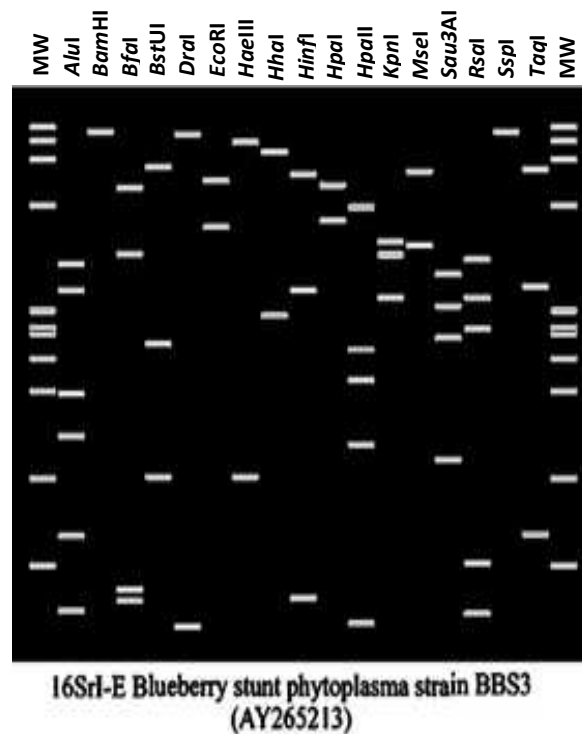
Para confirmar la identidad del Blueberry stunt phytoplasma, los productos de PCR de ambos pares de iniciadores (fU5-rU3 y R16F2n-R16R2) deberán secuenciarse. Cuando se observe amplificación con el par de iniciadores P1 y P7 el producto de PCR también debe secuenciarse. Los datos de las secuencias obtenidas se deben analizar con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponible en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## Identificación mediante RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*)

El análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) es otra técnica utilizada para la identificación de los diferentes grupos de fitoplasmas. En este caso se utilizan enzimas de restricción las cuales fragmentan el DNA en sitios específicos y conocidos, llamados “sitios de corte”. De acuerdo con Bertaccini *et al.*, 2014, existen 23 grupos de fitoplasmas que a su vez se dividen en subgrupos basados en el análisis del gen 16S rDNA.

Para la identificación de subgrupos del gen 16S rDNA, donde está incluido el BBS, se debe utilizar el siguiente listado de enzimas de restricción: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MseI*, *Sau3AI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*.

Utilizar el producto de PCR obtenido de los iniciadores R16F2n y R16R2 y digerir de acuerdo a las instrucciones del fabricante de cada enzima. Comparar el patrón resultante con el propuesto por Wei *et al.*, 2007, para asignar el subgrupo (**Figura 7**).



**Figura 7.** Patrón de RFLP utilizado para la clasificación del Blueberry stunt phytoplasma. Tomada y modificada de Wei, *et al.*, 2007.

**Nota:** Esta metodología puede aplicarse siempre y cuando se cuente con todas las enzimas de restricción, se propone solamente de manera opcional.

### Identificación del patógeno

Para reportar la identificación del Blueberry stunt phytoplasma, es necesaria la detección con los dos pares de iniciadores mencionados para la PCR anidada (**Cuadro 4**), así como la confirmación de la identidad mediante secuenciación y análisis de las secuencias de los amplicones obtenidos.

Sí se utiliza la opción de RFLP's se deberá verificar cuidadosamente que el patrón obtenido de la digestión de enzimas sea igual al presentando en la Figura 7.

Conservar las muestras de acuerdo a su Sistema de calidad, en caso de resultados positivos: contar con evidencia fotográfica de síntomas y signos, preservar el tejido vegetal y ácidos nucleicos. Registro de resultados de pruebas moleculares (fotografías de geles y secuencias de DNA).

Requerimientos para corroboración: Informe técnico, muestra problema, ácidos nucleicos con valores de calidad y concentración, fotografía de geles, secuencias

genéticas generadas por el secuenciador y su respectivo electroferograma, así como evidencia de alineamiento y/o análisis filogenético cuando aplique.

## REFERENCIAS

- Bagadia, P. G., Polashock, J., Bottner-Parker, K. D., Zhao, Y., Davis, R. E and Lee, I-M. 2013. Characterization and molecular differentiation of 16Srl-E and 16SrlX-E phytoplasmas associated with blueberry stunt disease in New Jersey. *Molecular and Cellular Probes*, 27: 90-97. DOI: [10.1016/j.mcp.2012.11.002](https://doi.org/10.1016/j.mcp.2012.11.002)
- Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., y Contaldo, N. 2014. Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences*, 05: 1763-1788. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.512191>
- Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M. and Schulz, A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17: 1175-1184. DOI: [10.1094/MPMI.2004.17.11.1175](https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.11.1175)
- Constable, F. E., Gibb, K. S. and Symons, R. H. 2003. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology*, 52: 267-276. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00849.x>
- Deng, S., and Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53-61. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90007-D](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-D)
- Diekmann, M., Frison, E.A. and Putter, T. (eds.) 1994. *FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Small Fruit Germplasm*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome. ISBN 92-9043-157-1
- EPPO, 2021 Global data base. Blueberry stunt phytoplasma (PHYP05)  
<https://gd.eppo.int/taxon/PHYP05>
- García-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M. A., Lavina, A. and Batlle, A. 2003. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology*, 52: 513- 520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00868.x>
- Gundersen, D. E., y Lee, I. M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144-151.
- IPPC. (2016). NIMF 27 Protocolos de Diagnóstico para plagas reglamentadas PD 12: Fitoplasmas. International Plant Protection Convention. [https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2017/02/DP\\_12\\_2016\\_Es\\_2017-01-11.pdf](https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2017/02/DP_12_2016_Es_2017-01-11.pdf)
- Kado, C. I. 2010. CHAPTER 3: Classification of Plant-Pathogenic Bacteria. In *Plant Bacteriology* (pp. 21-62). <https://doi.org/10.1094/9780890545034.003>
- Lorenz, K. H., Schneider, B., Ahrens, U. and Seemüller, E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and

nonribosomal DNA. In *Phytopathology* 85: 771-776. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-771>

National Center for Biotechnology Information. 1988. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Necas, T. and Krska, B. 2006. Selection of woody indicators and the optimum plant material and sampling time for phytoplasma ESFY detection. *Acta Horticulturae*, 717: 101-105.

New Zealand Government. 2016. *Vaccinium* (Blueberry and Cranberry) Post-Entry Quarantine testing Manual. Ministry for Primary Industries. <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/13666/direct>

Michigan State University. 2021. Insects. MSU Extension Blueberries. <https://www.canr.msu.edu/uploads/files/Sharpnosed%20leafhopper.pdf>

Ministry of Agriculture, food and rural affairs. 2021. Notes on Blueberry Diseases: Blueberry stunt. <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/pub360/notes/bluestunt.htm>

Pérez-López, E., Vincent, C. and Moreau, D. 2018. A novel '*Candidatus* Phytoplasma asteris' subgroup 16SrI-(E/AI) AI associated with blueberry stunt disease in eastern Canada. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69:322-332. DOI:10.1099/ijsem.0.003100

Ramsdell, D. C. and Stretch, A. W. 1987. Blueberry stunt. In: USDA Handbook No. 31, pp. 106-108. R H Converse, United States Government Printing Office, Washington DC, USA.

Rosete, Y., Schilder, A., Lambert, L. and Scott, K. 2015. Identification and molecular characterization of the blueberry stunt phytoplasma in Canada. *Phytopathogenic Mollicutes*. 5: 17-18. doi: 10.5958/2249-4677.2015.00006.7

Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, Ç. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz E Seemüller, K. H., and Kirkpatrick, B. C. (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2988-2993. <https://doi.org/10.1128/aem.62.8.2988-2993.1996>

Wei, W., Davis, R. E., Lee, I. M. and Zhao, Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: Identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1855-1867. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65000-0>

### Referencias electrónicas de consulta

<https://www.canr.msu.edu/uploads/files/Stunt.pdf>

<https://www.americaninsects.net/h/scaphytopius-sp.html>

<https://pemaruccicenter.rutgers.edu/entomology/iSharp-nosed-Leafhopper.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

## AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para la detección de Blueberry stunt phytoplasma (BBS), tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el procedimiento de forma correcta.

### Forma recomendada de citar

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2021. Ficha técnica para el diagnóstico de: Blueberry stunt phytoplasma. Tecámac, México: Autor.

Esta ficha técnica fue elaborada, revisada y validada por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.

Dr. Ángel Ramírez Suárez <b>Subdirector Técnico</b>	Validó
M. en C. María del Rocío Hernández Hernández <b>Jefa del Departamento de Fitopatología</b>	Revisó
Biol. Bárbara Hernández Macías <b>Coordinador del Laboratorio de Bacteriología</b> M. en C. Sandra Lourdes Moya Hernández <b>Técnico del Laboratorio de Bacteriología</b>	Elaboraron

### CONTACTO

lab.bacteriologia@senasica.gob.mx  
Teléfono y extensión (55) 59051000 ext. 51314, 51333



Dudas sobre:

- Campañas Fito o Zoonosanitarias
- Movilización de Productos Agroalimentarios y Mascotas

**800 987 9879**

Quejas • Denuncias  
Órgano Interno de Control  
en el Senasica

**55 5905.1000**

**Ext. 51648**

[gob.mx/agricultura](http://gob.mx/agricultura)

[gob.mx/senasica](http://gob.mx/senasica)



“Este programa es público, ajeno a cualquier partido político.  
Queda prohibido el uso para fines distintos a los establecidos en el programa”