

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ ЯБЛОНИ К ЗАСУХЕ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ МНОГОЛЕТНИХ АГРОЦЕНОЗОВ

Ненько Н.И., д-р с.-х. наук, Киселева Г.К., канд.биол.наук,
Ульяновская Е.В., д-р с.-х. наук, Шестакова В.В., канд. с.-х.наук, Караваева А.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства»
(Краснодар)

Реферат. Приведены результаты физиолого-биохимических и анатомо-морфологических исследований сортов яблони различного экологического происхождения в связи с устойчивостью к засухе. Выделены сорта, устойчивые к воздействию стрессоров летнего периода (жаре и засухе), перспективные для создания многолетних агроценозов.

Ключевые слова: яблоня, высокотемпературный стресс, засуха, адаптационная устойчивость

Summary. The results of physiological-biochemical and anatomical-morphological study of apple varieties of different ecological and geographic origin in the connection with resistance to drought are presented. The varieties that are resistant to the effects of summer stressors (heat and drought), promising to create of perennial agric cenoses are selected.

Key words: apple-tree, high-temperature stress, drought, adaptive resistance

Введение. Вопросы повышения устойчивости растений к биотическим и абиотическим факторам среды стали особо актуальными в последние годы в связи с локальными изменениями погодно-климатических условий и участившимися эпифитотиями болезней. Воздействие природных стрессоров, в частности засухи, приводит к резкому снижению продуктивности и качества плодов, а нередко и к гибели деревьев. При этом интенсивные сорта могут реализовать лишь 15 - 30 % потенциальной продуктивности сорта [1, 2].

В зоне южного плодоводства степень засухоустойчивости сортов яблони имеет большое значение, так как большинство из них культивируется в неорошаемых условиях или при ограниченном орошении. В связи с этим создание сортов с высокой экологической пластичностью, устойчивых к лимитирующему факторам среды, в частности к засухе, является одним из приоритетных направлений селекции яблони [3, 4, 5]. Изучение механизмов устойчивости, определение физиолого-биохимических критериев сортов яблони расширит фундаментальные знания о формировании устойчивости плодовых культур к засухе и позволит реализовать богатый потенциал продуктивности растений яблони.

Цель работы – на основе физиолого-биохимических исследований выявить механизмы адаптационной устойчивости к засухе сортов яблони разного эколого-географического происхождения и выделить сорта, перспективные для возделывания в Краснодарском крае.

Объекты и методы исследований. Место проведения исследований – «Центральное» СКЗНИИСиВ. Объект исследований – сорта яблони различного эколого-географического происхождения: Айдаред (США), Лигол (Польша), Прикубанское (Россия, СКЗНИИСиВ), 2009 г. посадки, на подвое СК 4, при схеме посадки 0,9x4,5; сорта Рассвет (2п=2x), Фортуна (2п=2x), Союз (2п=3x), Родничок (2п=3x) (Россия, СКЗНИИСиВ), 2000 г. посадки, на подвое М 9, при схеме посадки 2x5; сорта Эрли Мак (2п=2x) (США), Дейтон (2п=2x) (США), 1998 г. посадки, на подвое М 9, при схеме посадки 2x5.

Использованы современные высокоточные физиолого-биохимические методы исследования содержания хлорофилла (а+б), каротиноидов, фенолкарбоновых, органических, абсцизовой, индолилуксусной кислот, пероксидазы, малонового диальдегида, катионов кальция методами спектроскопии, кондуктометрии, капиллярного электрофореза на оборудовании центра коллективного пользования (ЦКП) и лаборатории физиологии растений СКЗНИИСиВ [6 - 9], а также методы световой микроскопии с использованием микроскопа Olympus BX41 [10, 11]. Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью общепринятых методов вариационной статистики [12].

Обсуждение результатов. Устойчивость к температурным стрессорам летнего периода является одной из важных составляющих адаптационного потенциала сорта яблони. Стрессы летнего периода вызываются действием повышенных температур на фоне недостаточного количества осадков. При этом жара, как правило, сочетается с засухой, что усиливает негативные последствия стрессов. Такое сочетание экстремальных факторов может привести не только к потере урожая плодовых культур, но иногда и к гибели плодовых насаждений [13 - 20]. Летний период 2013 - 2015 гг. был жарким: в июле и августе 2014 г температура воздуха достигала $35 \div 37^{\circ}\text{C}$, в 2015 г. – $38 \div 39^{\circ}\text{C}$. Количество выпавших осадков в августе, по сравнению с июнем и июлем, снижалось, и в августе 2014 - 2015 гг. отмечалась засуха (осадки – 0 мм при температуре воздуха 36 и 38°C , соответственно).

Физиолого-биохимические исследования проводили в периоды наибольшей напряженности стрессовых факторов, когда наблюдается более тесная корреляция между физиолого-биохимическими показателями растений и климатическими факторами. В условиях водного дефицита отмечается увеличение биосинтеза и выделения этилена, у многих растений накапливаются ингибиторы роста фенольной природы (хлорогеновая кислота, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты).

В июле и августе 2015 года, в сравнении с июнем, у большинства изучаемых сортов яблони (кроме сорта Прикубанское) повысилось содержание аскорбиновой кислоты в листьях, а в августе – фенолкарбоновых кислот (хлорогеновая + кофейная), защищающих клеточные мембранны от разрушения (рис. 1, 2).

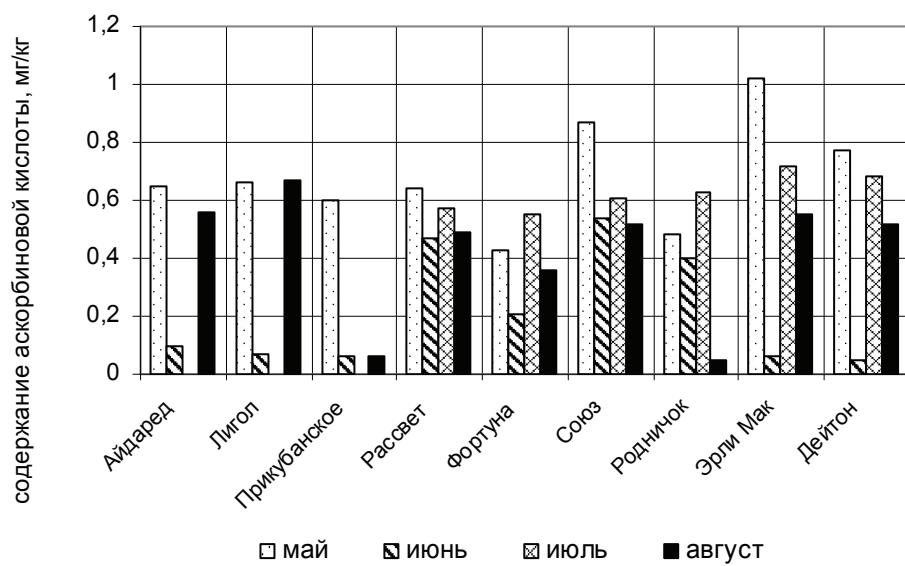


Рис. 1. Динамика содержания аскорбиновой кислоты в листьях яблони в условиях лета 2015 г.

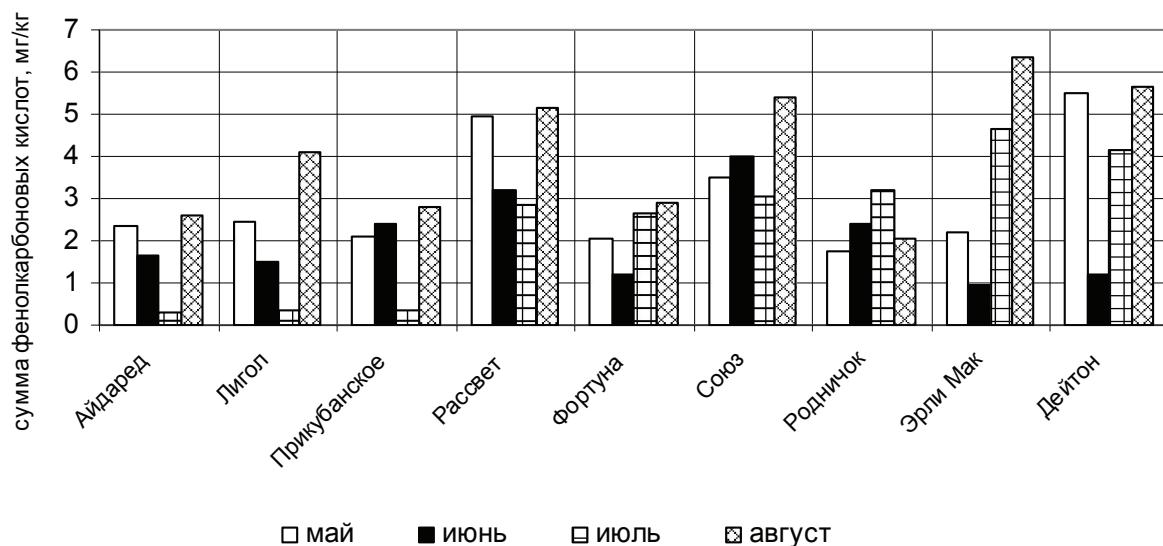


Рис. 2. Динамика содержания фенолкарбоновых кислот (хлорогеновая + кофейная кислоты) в листьях яблони в условиях лета 2015 г.

Функционирование системы антиоксидантной защиты также может быть охарактеризовано такими показателями, как активность фермента пероксидазы и содержание малонового диальдегида – продукта деградации полиненасыщенных жирных кислот в мембранных клеток под действием кислорода и характеризующего степень повреждающего действия стресс-фактора на растения (рис. 3).

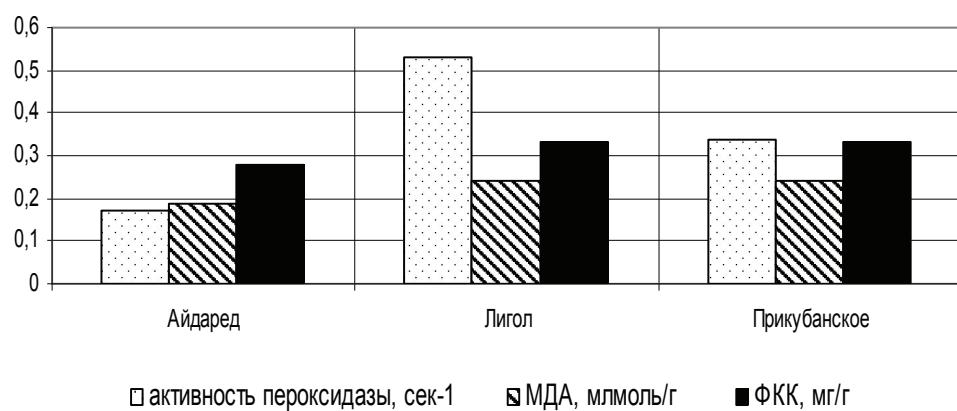


Рис. 3. Характеристика антиоксидантной защиты в листьях изучаемых сортов яблони

В июле 2015 года более низким содержанием малонового диальдегида характеризовался сорт Айдаред и более высоким – сорта Лигол и Прикубанское. Самое высокое значение активности пероксидазы было у сорта Лигол. Отмечалась высокая степень корреляции между содержанием малонового диальдегида и фенолкарбоновых кислот ($R=1,0$), защищающих мембранны от окислительного стресса. При воздействии высокотемпературного стресса в модельном опыте содержание малонового диальдегида увеличивалось у сорта Айдаред на 38,6 %, Лигол – на 13,3 % и Прикубанское – на 11,0 %.

В августе 2015 года содержание малонового диальдегида в листьях яблони увеличилось у сорта Айдаред на 245,4 %, у сорта Лигол – на 259,8 % и у сорта Прикубанское – на 178,7 %, что характеризует последний как более жароустойчивый.

Одним из показателей устойчивости к засухе служит содержание пигментов в листьях. В августе у сортов Айдаред и Лигол отмечается увеличение количества пигментов (хлорофилла а+б и каротиноидов), а у сортов Фортуна, Родничок, Прикубанское – незначительное их снижение в сравнении с июлем, что характеризует эти сорта как более засухоустойчивые (рис. 4, 5), при этом каротиноиды выполняют стресспротекторную функцию, защищая хлорофилл от разрушения.

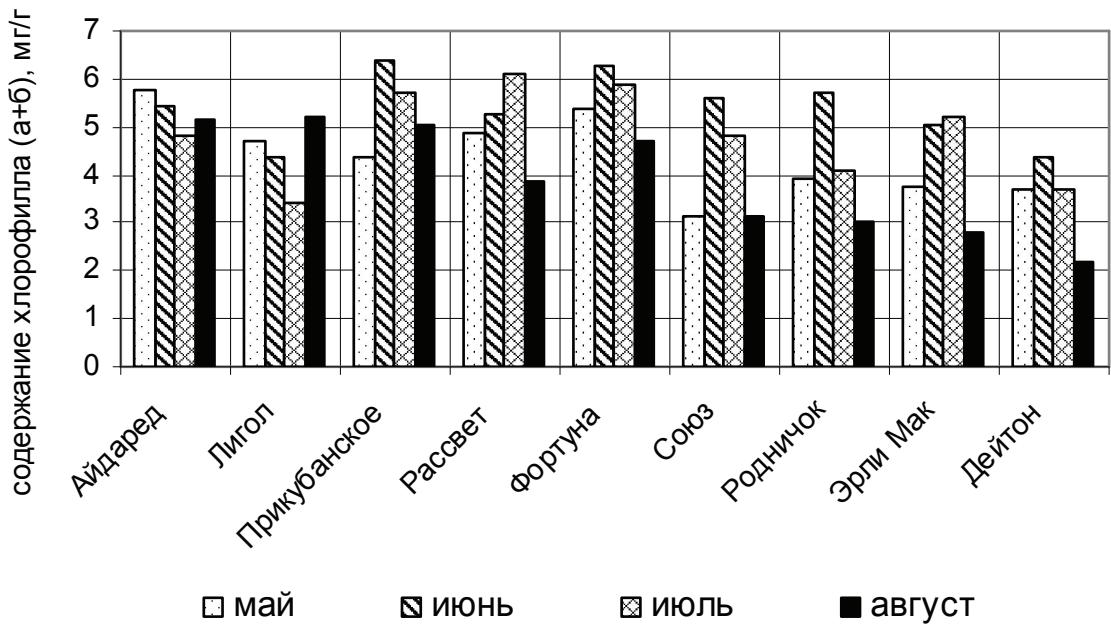


Рис. 4. Динамика содержания хлорофилла (а+б) в листьях яблони в условиях лета 2015г.

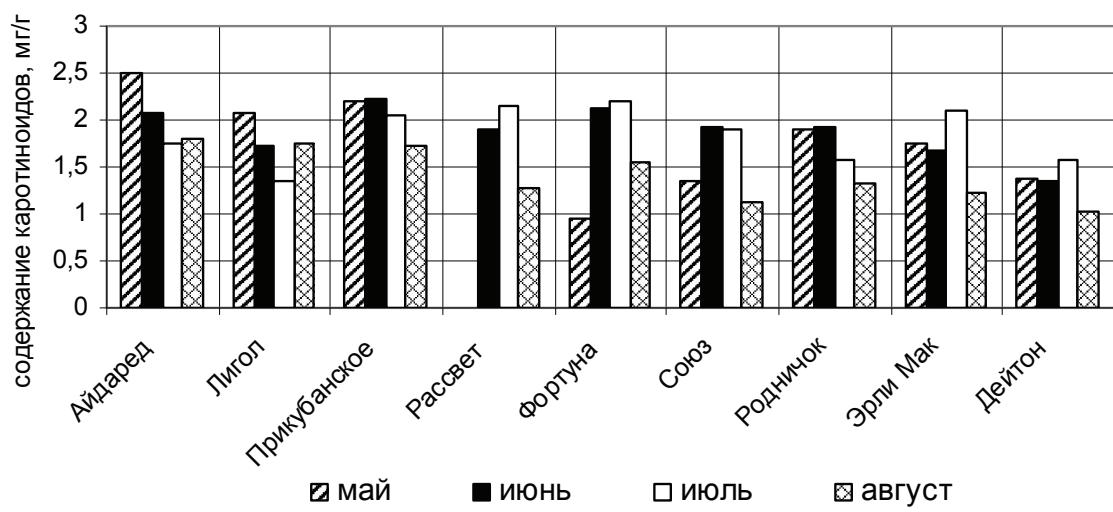
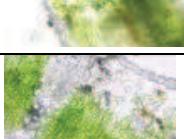


Рис. 5. Динамика содержания каротиноидов в листьях яблони в условиях лета 2015г.

Анатомо-морфологические исследования, проведенные в июне (24.06.15), показали, что изучаемые сорта яблони отличаются по параметрам листовой пластинки. Общая толщина листовой пластиинки варьировала от 183 мк у сорта Дейтон до 208 мк у сорта Прикубанское (табл. 1).

Таблица 1- Биометрические параметры листовой пластинки сортов яблони различной плюидности и различного эколого-географического происхождения, июнь 2015 г.

Сорт	Параметры листовой пластинки, мк				Индекс палисадности	Микрофото поперечного среза листовой пластинки
	толщина листовой пластинки	толщина палисадного слоя	толщина губчатого слоя	толщина верхнего эпидермиса		
диплоиды ($2n=2x$)						
Айдаред	191,2	89,6	87,5	14,1	1,02	
Лигол	195,8	87,1	95,2	13,5	0,92	
Прикубанское	208,3	95,4	99,1	13,8	0,96	
Рассвет	190,1	48,9	45,9	10,0	1,06	
Фортуна	197,6	49,6	45,3	10,0	1,09	
Эрли Мак	186,0	52,1	42,5	10,0	1,22	
Дейтон	183,3	50,7	46,6	10,0	1,08	
триплоиды ($2n=3x$)						
Союз	201,7	54,1	40,3	11,2	1,34	
Родничок	207,3	54,4	40,2	11,2	1,35	

Большой толщиной эпидермиса характеризовались сорта Айдаред и Прикубанское (13,8 - 14,1 мк). Среди диплоидов меньший индекс палисадности (отношение толщины па-

лисадного слоя к губчатому слою) был у польского сорта Лигол (ИП= 0,92), больший – у американского сорта Дейтон (ИП= 1,22). Триплоиды Союз и Рассвет характеризовались более высоким значением индекса палисадности (ИП = 1,34 - 1,35) и превосходили по этому показателю диплоидные сорта. Это свидетельствует о более активной фотосинтетической деятельности триплоидных сортов, по сравнению с изучаемыми диплоидами отечественной селекции. Биометрические параметры устьичного аппарата приведены в табл.2.

Таблица 2 – Биометрические показатели устьичного аппарата сортов яблони различной пloidности и различного эколого-географического происхождения, июнь 2015 г.

Сорт	Длина устьиц, мк	Ширина устьиц, мк	Количество устьиц, шт/мм ²
диплоиды (2n=2x)			
Айдаред	60	35	179
Лигол	58	33	196
Прикубанское	59	33	196
Рассвет	54	31	217
Фортуна	56	33	234
Эрли Мак	55	32	218
Дейтон	54	32	259
триплоиды (2n=3x)			
Союз	53	30	295
Родничок	53	28	290
НСР 0,95	1,55	1,61	18,23

Большее количество устьиц, приходящихся на единицу площади, отмечалось у триплоидных сортов и сорта Дейтон, меньшее – у остальных диплоидов. При этом для большинства изучаемых сортов (кроме сорта Фортуна) наблюдается обратная зависимость между этим показателем и размерами замыкающих клеток устьиц. Уменьшение размеров замыкающих клеток устьиц свидетельствует о большей засухоустойчивости сорта вследствие меньшей потери воды через устьица.

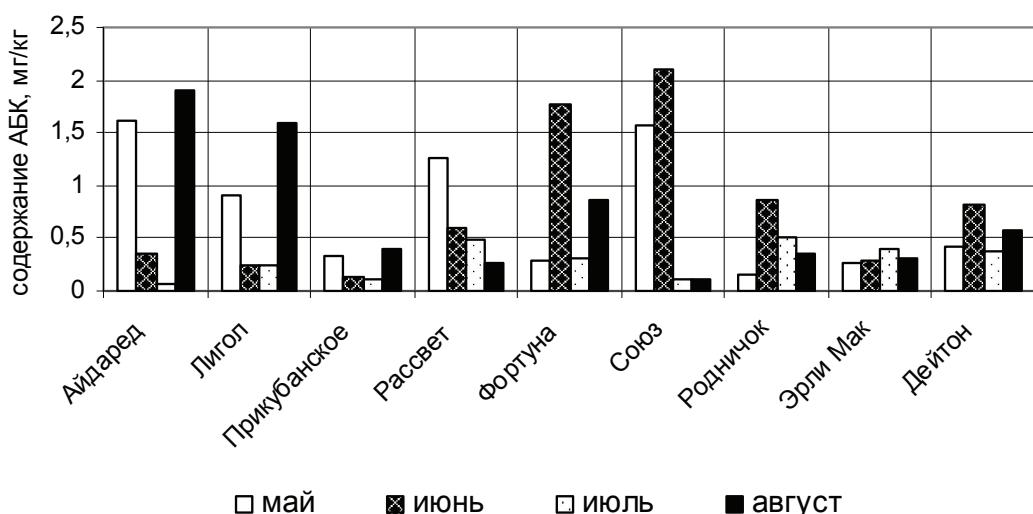


Рис. 6. Динамика содержания суммы органических кислот в листьях яблони в условиях лета 2015 г.

В августе 2015 года у сортов Союз, Рассвет, Родничок увеличивалось содержание суммы органических кислот цикла Кребса, что свидетельствует о повышении интенсивности дыхания, снижалось содержание АБК вследствие активации обменных процессов, связанных с адаптацией этих сортов к засухе и жаре (рис. 6, 7).

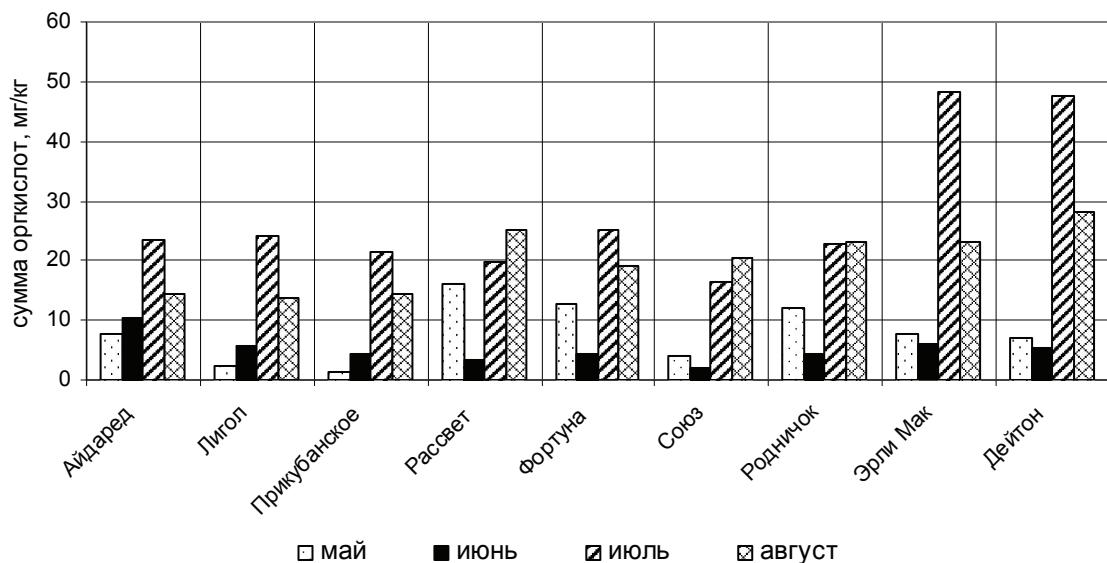


Рис. 7. Динамика содержания абсизовой кислоты в листьях яблони в условиях лета 2015 г.

У остальных изучаемых сортов яблони увеличение содержания АБК характеризует проявление защитной реакции, связанной с адаптацией к стрессорам летнего периода. Уменьшение содержания ИУК у ряда сортов (Фортуна, Союз, Дейтон) в августе свидетельствует о замедлении ростовых процессов (рис. 8).

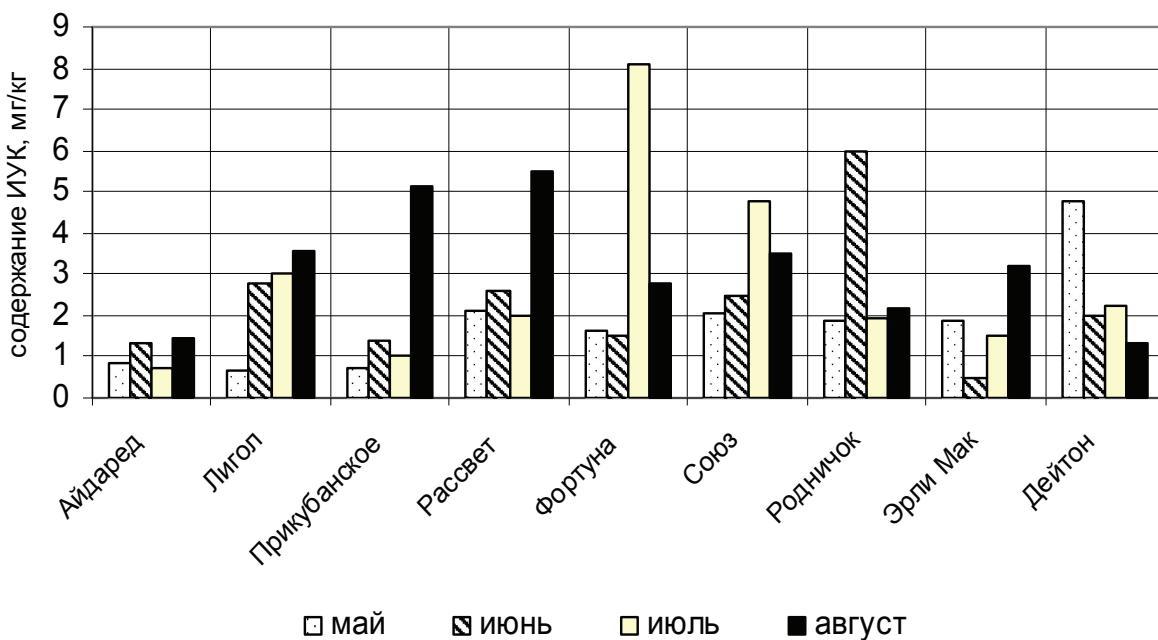


Рис. 8. Динамика содержания индолилуксусной кислоты в листьях яблони в условиях лета 2015 г.

Изучение влияния высокотемпературного стресса на коэффициент повреждения мембран в листьях яблони позволило установить, что в августе 2015 г. у сортов Айдаред, Рассвет и Дейтон коэффициент повреждения мембран (КП) увеличивается, а жаростойкость снижается, что может быть связано с активацией репарационных процессов; у остальных изучаемых сортов КП снижается (Родничок, Фортуна, Прикубанское, Лигол), либо изменяется незначительно (Союз, Эрли Мак), что свидетельствует об их адаптации к высокотемпературному стрессу (рис. 9).

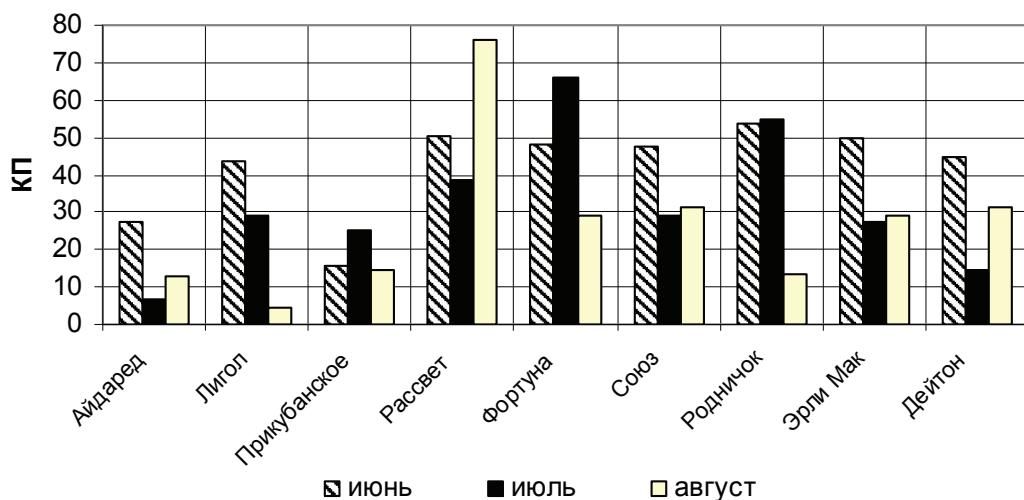


Рис. 9. Динамика жаростойкости сортов яблони в условиях летнего периода 2015 г.

С ростом температуры воздуха увеличивается выход свободных катионов, в том числе катионов Ca^{2+} , активирующего защитные механизмы в растениях при воздействии стресс-фактора (рис.10).

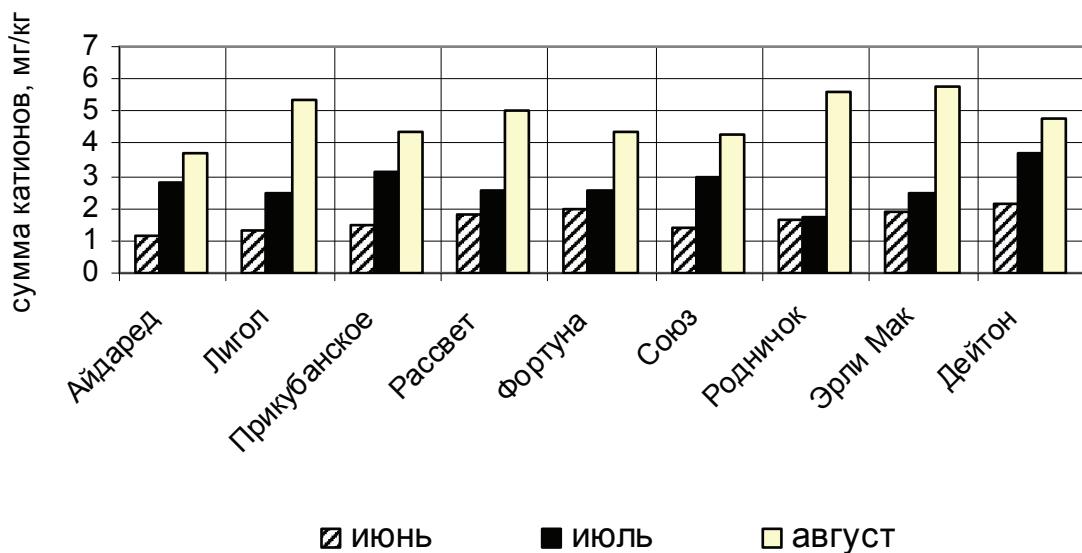


Рис. 10. Динамика содержания суммы катионов в листьях сортов яблони в условиях летнего периода 2015 г.

В августе в 2013-2015 гг. (в онтогенезе) у всех изучаемых сортов (кроме сорта Рассвет) с увеличением экстремальной температуры воздуха коэффициент повреждения мембран снижается (Ккоррел.= $-0,19 \div -0,97$), а жаростойкость увеличивается, при этом у диплоидов Фортуна, Эрли Мак и триплоидов Союз, Родничок увеличивается выход катионов Ca^{2+} (Ккоррел.= 0,87) из мембран, что характеризует активное протекание адаптационных процессов (рис. 11).

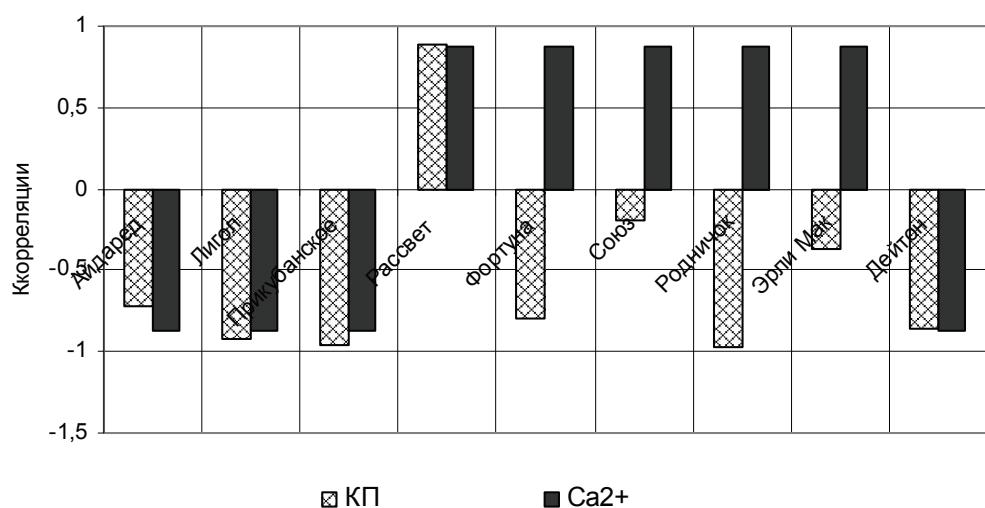


Рис. 11. Зависимость коэффициента повреждения мембран и содержания катиона Ca^{2+} в листьях яблони от высокотемпературного стресса в августе 2013 – 2015 гг.

У сортов Айдаред, Фортуна, Союз, Родничок и Дейтон устойчивость мембран к разрушению преимущественно коррелировала с активностью пероксидазы, разрушающей перекисные соединения, и с содержанием аскорбиновой и фенолкарбоновых кислот, защищающих липиды от разрушения; у сорта Эрли Мак – с содержанием аскорбиновой и фенолкарбоновых кислот и у сортов Лигол и Прикубанское – с активностью пероксидазы (рис. 12).

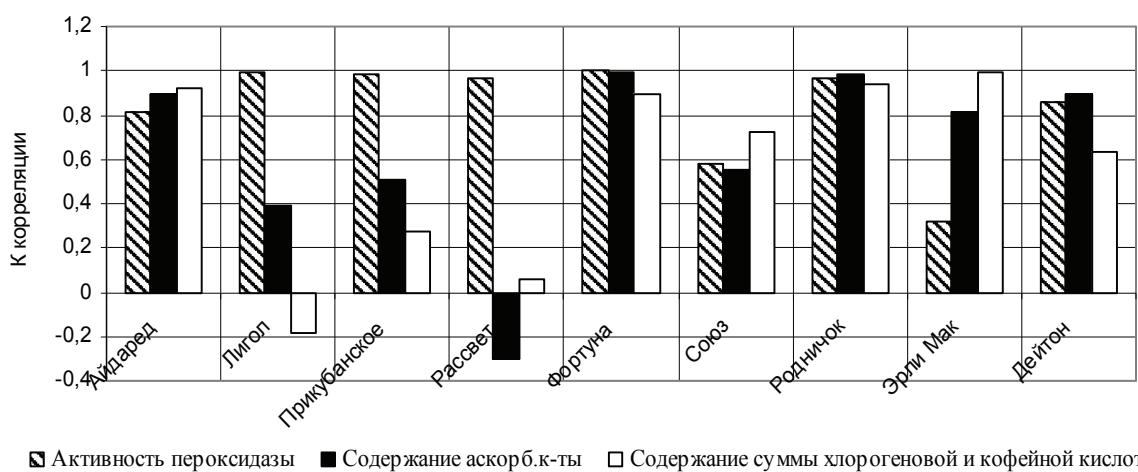


Рис. 12. Биохимическая характеристика окислительных процессов в листьях сортов яблони 2013-2015 гг.

Таким образом, у диплоидов яблони селекции Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства, наследующих признак жаростойкости по отцовской форме, он определяется генами, контролирующими синтез пероксидазы, у триплоидов – пероксидазы, аскорбиновой и фенолкарбоновых кислот и у сорта Эрли Мак (США) – аскорбиновой и фенолкарбоновых кислот.

Установлено, что сорт яблони Айдаред (США) более устойчив к засухе и менее устойчив к жаре, и это позволяет использовать его в селекционном процессе в качестве источника признака засухоустойчивости.

Сорта яблони Прикубанское, Фортуна, Родничок, Союз селекции СКЗНИИСиВ и сорт Эрли Мак обладают комплексом признаков засухоустойчивости и жаростойкости и могут быть использованы в селекции как источники комплекса этих признаков.

Для сортов яблони различного эколого-географического происхождения (селекции СКЗНИИСиВ, американской и польской селекции) установлены оптимальные физиологобиохимические параметры устойчивости к стрессорам летнего периода 2013-2015 гг. (Краснодар) (табл. 3).

Таблица 3 – Параметры наиболее значимых физиологобиохимических показателей адаптации сортов яблони к стрессорам летнего периода 2013 -2015 гг.

Биохимический показатель	Происхождение сорта		
	СКЗНИИСиВ	США	Польша
Коэффиц. поврежд.мембран, %	1,1-76,56	3,35-86,66	28,1-60,4
Содержание ИУК, мг/кг	1,01-13,4	0,48-8,10	1,9-6,7
Содержание АБК, мг/кг	0,11-5,4	0,07-5,4	0,25-3,5
Содержание МДА, ммоль/г	0,19-0,64	0,24-0,63	0,24-0,66
Активность пероксидазы, сек ⁻¹	0,1-70,69	0,04-58,85	0,14-52,54
Сумма фенолкарб. кислот, мг/г	0,01-5,38	0,06-6,35	0,02-4,1
Содержание хлорофилла а+б, мг/г	3,02-8,69	2,18-8,35	3,43-7,03
Содержание каротина, мг/г	1,13-4,27	1,03-3,66	1,36-2,99
Индекс палисадности	0,85-1,59	0,96-1,3	0,84-1,32

Таким образом, при изучении в 2013-2015 гг. устойчивости к абиотическим стрессорам летнего периода у изучаемых сортов яблони различного эколого-географического происхождения наблюдалась активация различных сигнальных систем, что подтверждалось изменением содержания хлорофилла (а+б), каротиноидов, фенолкарбоновых, органических, абсцизовой, индолилуксусной кислот, пероксидазы, малонового диальдегида, катионов кальция.

Это позволило выявить различные механизмы адаптации сортов яблони к засухе и высокотемпературному стрессу в связи с их происхождением, а также выделить сорта, обладающие хозяйственными ценными свойствами, перспективные для селекции и возделывания в условиях юга России.

Выходы. Обобщены данные изучения адаптационной устойчивости сортов яблони различного эколого-географического происхождения к стрессорам летнего периода по физиолого-биохимическим и анатомо-морфологическим параметрам: проанализировано содержание хлорофилла (а+б), каротиноидов, фенолкарбоновых, органических, абсцизовой, индолилуксусной кислот, пероксидазы, малонового диальдегида, катионов кальция.

Установлено, что у диплоидов селекции СКЗНИИСиВ, наследующих признак жаростойкости по отцовской форме, он определяется генами, контролирующими синтез пероксидазы, у триплоидов – пероксидазы, аскорбиновой и фенолкарбоновых кислот и у сорта Эрли Мак (США) – аскорбиновой и фенолкарбоновых кислот.

Сорт Айдаред (США) более устойчив к засухе и менее устойчив к жаре, что позволяет использовать его в селекционном процессе как источник признака засухоустойчивости. Сорта Прикубанское, Фортuna, Родничок, Союз селекции СКЗНИИСиВ и сорт Эрли Мак (США) обладают комплексом признаков засухоустойчивости и жаростойкости и могут быть использованы в селекции, как источники комплекса этих признаков. Анатомо-морфологическая адаптация сортов яблони отечественной селекции к абиотическим факторам летнего периода достигается за счет проявлением ксероморфных признаков листовой пластиинки.

Литература

1. Ненько, Н.И. Особенности водного режима сортов яблони различной пloidности в связи с адаптацией к засухе [Электронный ресурс] / Н.И. Ненько, Г.К. Киселева, А.В. Караваева, Е.В. Ульяновская // Плодоводство и виноградарство юга России. - 2015.- № 31(1).- Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/01/11>.
2. Nenko, N.I. The mechanisms of the adaptation of the types of the apple tree of different origin to the abiotic factors of the summer period / N.I. Nenko, G.K. Kiseleva, H.V. Ulyanovskaya // Agriculture & Food. – 2015. - Volume 3. - P. 202-208.
3. Ненько, Н.И. Физиолого-биохимическая оценка сопряженной устойчивости сортов яблони различного эколого-географического происхождения к абиотическим стрессорам летнего периода в южном регионе России / Н.И. Ненько, Г.К. Киселева, Е.В. Ульяновская // Садоводство и виноградарство.- 2015.- №1. – С.27-32.
4. Ненько, Н.И. Водный режим яблони в условиях комплексного воздействия высокотемпературного и водного стрессов / Н.И. Ненько, Г.К. Киселева, А.В. Караваева, Е.В. Ульяновская // Materiały XI Międzynarodowej naukowi-praktycznej konferencji «Naukowa przestrzeń Europy - 2015», 07-15 kwietnia 2015. -Volume 22. - Nauk biologicznych Weterynaria : Przemyśl. Nauka i studia, 2015. – P. 15-19.
5. Киселева, Г.К. Функционально-структурные изменения фотосинтетического аппарата сортов яблони различного эколого-географического происхождения в условиях высокотемпературного стресса / Г.К. Киселева, Н.И. Ненько, Е.В. Ульяновская, А.В. Караваева // Материалы VIII Съезда ОФР России и Всероссийской научной конференции «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (21-26 сентября 2015, г. Петрозаводск). – С.253.
6. Ненько, Н.И. Физиологические методы в адаптивной селекции плодовых культур / Н.И. Ненько, Т.Н. Дорошенко, Т.А. Гасанова // Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. – Краснодар, СКЗНИИСиВ, 2012.– С. 189-198.

7. Ненько, Н.И. Физиолого-биохимические методы изучения исходного и селекционного материала / Н.И. Ненько, И.А. Ильина, В.С. Петров, М.А. Сундырева // Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2012.- С. 530-540.
8. Ненько, Н.И., Ильина, И.А., Воробьева, Т.Н. [и др.] Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда / Под общей редакцией Н.И. Ненько.- Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015.- 115 с.
9. Якуба, Ю.Ф. Методика определения массовой концентрации катионов аммония, калия, натрия, магния, кальция в побегах и листьях плодовых культур и винограда с применением капиллярного электрофореза/ Ю.Ф. Якуба, И.А. Киселева, М.В. Захарова, Г.В. Лифарь // Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда / Под общей редакцией Н.И. Ненько.- Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015.- С. 62-67.
10. Киселева, Г.К. Оценка степени засухоустойчивости яблони и винограда по ксероморфным признакам листовой пластиинки / Г.К. Киселева, Н.И.Ненько // Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда / Под общей редакцией Н.И. Ненько.- Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015.- С. 36-39.
11. Киселева, Г.К. Анатомо-морфологическая оценка адаптивного потенциала сортов плодовых культур и винограда. – Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. - Краснодар, СКЗНИИСиВ, 2012.- С.199-205.
12. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований).- М., 1979. - 463 с.
13. Henfrey, J. Physiological stress responses in apple under replant conditions / Joana Lúia Henfrey, Gerhard Baab, Michaela Schmitz // Scientia Horticulturae. – 2015. – V. 194. – P. 111-117.
14. Гончарова, Э. А. Водный статус культурных растений и его диагностика: монография / СПб: ВИР, РИО.- 2005. - 125 с.
15. Кошкин, Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур: учебник. - М.: Дрофа, 2010. – 638 с.
16. Skriver, K. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress / Skriver K, Mundy J. // Plant Cell.- 1990. - № 2. - P. 503–512.
17. Ненько, Н.И. Фотосинтетическая активность листового аппарата яблони в условиях засухи / Н.И. Ненько, Г.К. Киселева, Е.В. Ульяновская // Вестник АПК Ставрополья. - 2015.- №2(18).- С. 208-211.
18. Ненько, Н.И. Параметрическая оценка устойчивости растений *Malus domestica* Borkh. разного эколого-географического происхождения к стрессорам летнего периода / Н.И. Ненько, Г.К. Киселева, Е.В. Ульяновская // Вестник АПК Ставрополья. - 2015.-№ 4(20). - С. 237-241.
19. Ненько, Н.И. Механизмы адаптации сортов яблони различного происхождения к абиотическим факторам летнего периода / Н.И. Ненько, Г.К. Киселева, А. В. Караваева, Е.В. Ульяновская, Ю.Ф. Якуба // Механизмы и инструменты управления устойчивостью аграрных систем плодовых культур и винограда по критериям биологизации и экологизации интенсификационных процессов // научные труды СКЗНИИСиВ, Краснодар, 2015.- Том 7.- С. 94 – 100.
20. Ненько Н.И., Киселева Г.К., Караваева А.В., Ульяновская Е.В. Оценка адаптационного потенциала яблони по физиолого-биохимическим параметрам для формирования устойчивых плодовых агроценозов // Повышение эффективности инновационных процессов в садоводстве и виноградарстве: научные труды СКЗНИИСиВ, Краснодар, 2015.- Том 8.- С. 25 – 35.