دراسة تأثير الفطر الاحيائي *Metarhizium anisopliae* Sorokin في بعض الالوجات الحياتية لخنافس الصدر المنشاري *Oryzaephilus surinamensis* L.

حسام الدين عبدالله محمد عماد احمد محمود لمياء كاظم عبد
قسم وقاية النبات / كلية الزراعة قسم علوم الحياة – كلية العلوم للنبات جامعة بغداد

المستخلص

اجريت الدراسة في مختبر علوم الحياة – كلية العلوم للنبات – جامعة بغداد للعام ٢٠١٠ لمعرفة تأثير الفطر الاحيائي *Metarhizium anisopliae* في تطور بعض الادوار الحياتية لخنافس الصدر المنشاري *Oryzaephilus surinamensis*. ملئت الادوار الحشرية ، بيض بعمر ٢٤ ، ٧٢ ساعة ، يرقات طور ثاني ورابع ، عذارى بعمر ٢٤ ، ٧٢ ساعة بالتخافيف لمعلق الفطر بالتخافيف الثلاثة ٤.٨ x ١٠^{-١٠} ، ٤.٨ x ١٠^{-١٠} ، ٤.٨ x ١٠^{-١٠}. لوحظ عد فقس البيض بعمر ٢٤ ساعة عند التخفيف ٤.٨ x ١٠^{-١٠} ، وبلغت نسبة القتل للبيض ١٠٠% واقل نسبة قتل للبيض بلغت ٣٣.٣% عند التخفيف ٤.٨ x ١٠^{-١٠} ، وبلغت نسبة قتل لليرقات بالعمر اليرقي الرابع ٦٦.٦% بالتخفيف ٤.٨ x ١٠^{-١٠} وبلغت نسبة قتل للعذارى بالعمر ١٠٠% عند التخفيف ٤.٨ x ١٠^{-١٠} في حين كانت نتائج القتل بالسيطرة صفر %

المقدمة

تضم الفطريات الممرضة للحشرات انواع واجناس تتعايش مع بعض مفصليات الأرجل فقد تكون متطفلة او مترممة التطفل يعمل على قتل الحشرة بالتغلغل والتضاعف وغزو انسجتها مسببة موتها بالافرازات السامة التي تعمل على تعطيل الأنسجة وقتلها Pandal and Boucious ١٩٩٨ . الفطريات لها القدرة على الاختراق المباشر لجدار جسم الحشرة هذه الصفة جعلتها عاملاً حيوياً يستخدم في مكافحة الاحيائية للآفات الحشرية Goeftal and Lacey ١٩٩٥ . لذا تعتبر الفطريات عامل منظم طبيعي للعديد من الافات الحشرية مما ساعد على الانتشار وسط مجتمع الحشرات ولصعوبة استعمال المبيدات الكيماوية لمكافحة هذه الآفة كونها تصيب المواد الغذائية التي يتناولها الانسان وللتأثير الضار للمبيدات على البيئة ، هدفت الدراسة لاستعمال احد الفطريات الممرضة للحشرة ، يعد الفطر *Metarhizium anisopliae* من الفطريات الاحيائية ويسمى المرض الذي يسببه لعوائل الحشرية بالمسكردين الاخضر green muscardin ، واستعمل هذا الفطر تجارياً على نطاق عالمي واسع مثل الفلبين ، تايلاند ، الصين ، امريكا الشمالية ، البرازيل ، الشرق الاوسط ومصر وبعض بلدان الخليج العربي في السيطرة الجدية على الافات الحشرية لكفاءته العالية وتخصه في اصابة الافات (Shah).

مواد البحث وطرائقه

جمعت بالغات حشرة خنفساء ذات الصدر المنشاري من الاسواق المحلية في بغداد من مواد غذائية مختلفة شخصت في متحف التاريخ الطبيعي – جامعة بغداد على انها حشرة *Oryzaephilus surinamensis* . ربيت الحشرة بالمختبر على رز صنف عنبر وضع في حاويات بلاستيكية اسطوانية طول ٢٠ سم وقطر ١٠ سم ووضعت ازواج ذكور واناث من الحشرة بعد اضافة ١٠-١٥ غم من خميرة الخبز الجافة اغلقت الفوهة بقماش اوركنزا ، ربطت باحكام برباط مطاطي لعدم خروج الحشرات ووضعت $\pm$ سليزية ورطوبة نسبية $\pm$ % (Al-Jaber).

عزلة من الفطر *Metarhizium anisopliae* من الجزائر نمت في اطباق بتري على (Potato Dextrose Agar) PDA غم من الكايتين و ١٧٥ ملغم من المضاد الحيوي كلورومفينيكول ، نقلت الاطباق الى الحاضنة بدرجة حرارة $\pm$ سليزية ولمدة اسبوع الى اسبوعين قبل البدء باجراء التجارب (Lord).

طريقة تحضير تخافيف معلق الفطر: حضرت التخافيف الثلاثة لمعلق الفطر مل ماء مقطر معقم الى طبق حاوي على المزرعة الفطرية ، فصلت الابواغ بواسطة حاصدة شكل

L رشحت محتويات الطبق بقطعة من الشاش المعقم والمثبت على قمع زجاجي بعد اضافة مل معقم لضمان نزول الابواغ الفطرية بصورة كلية.
مل وبهذا تم الحصول على المحلول للعالق الفطري الاساسي Stock ، حضرت التخافيف الفطرية باستعمال ٦ انابيب اختبار معقمة ومعلمة من ١-١ وضع في كل انبوب ٩ مل ماء مقطر معقم ، سحب واحد مل من العالق البوغي الاساس المحضر مسبقاً بواسطة ماصة معقمة اضيف الى الانبوبة رقم واحد بذلك يكون التخفيف ١-١٠ وسحب واحد مل من الانبوبة رقم واحد ذات التخفيف ١-١٠ ، اضيف الى الانبوبة رقم ٢ الحاوية على ٩ مل ماء مقطر فيكون التخفيف ١-١٠ واستمر التخفيف في الانابيب الاربعة الباقية وصولاً الى التخفيف ١-١٠٠٠.

حساب عدد سبورات معلق الفطر *Metarhizum anisopliae* : حسب عدد سبورات معلق الفطري Lacey () وذلك باستعمال شريحة عد الخلايا Number Counting Chamber مل من الشريحة من المعلق الفطري الاساس Stock مع وضع غطاء الشريحة وحسب عدد السبورات في المربعات الخمسة بالمجهر الضوئي عند القوة 40 X وبحسب المعادلة التالية :

$$\text{No. of Spores} = \frac{N}{80} \times 10^6 \times 10$$

:
N = عدد السبورات التي تم عدها في المربعات الخمسة.
= مجموع المربعات الدقيقة في مربعات العدد الخمسة.
= معامل تصحيح التخفيف
= معامل التصحيح للحجم.

$$\text{و عدل التخفيف من} = \frac{\text{حجم المعلق}}{\text{حجم الماء المقطر}} \times \frac{\text{حجم الماء المقطر}}{\text{حجم المعلق}}$$

بيضة لكل مكرر وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة للعمرين البيض
مل من التخافيف ١-١٠ x ٤.٨ / بوغ / مل بواسطة مرشة يدوية
مل نقلت البيوض المعاملة الى اطاق بتري قطر
كل بيضة بمعزل عن البيضة الاخرى .
بواقع بيضة واحدة لكل طبق لمتابعة تطور

سجلت نسب القتل للبيض ومدة حضانة البيض ومتابعة اليرقات البازغة لحين وصولها للطور البالغ بصورة يومية ، اما معاملة السيطرة فقد رش البيض بواحد مل من الماء المقطر فقط ومتابعة تطورها الى حين وصولها للطور البالغ.

اخذت ١٥ يرقة لكل معاملة كررت ثلاثة مرات لكل من يرقات العمر الثاني والرابع ، رشت اليرقات بخمسة مل من التخافيف الثلاثة لمعلق الفطر وبنفس الطريقة السابقة . سجلت نسب قتل يرقات الطور الثاني مدة العمر وحسب نسبة قتل العمر الثالث طول مدة العمر الثالث نسبة قتل العمر الرابع طول ، نسبة قتل العذارى لحين بزوغ البالغات ايضاً . معاملة السيطرة بالماء المقطر . سجلت النتائج يومياً . وبالطريقة نفسها الانفة
٢٤ و ٧٢ ساعة ورشت بمعلق الفطر وبالتخافيف الثلاثة ، سجلت نسبة البزوغ ونسبة القتل والتشوهات الحاصلة للحشرة من العذراء وحتى بزوغ البالغات وسجلت النتائج يومياً ، عوملت عذارى السيطرة بالماء

SAS () في تحليل البيانات لدراسة تأثير المعاملات المدروسة في الصفات المختلفة وقورنت الفروق بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي L.S.D عند مستوى احتمال

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج (١) وجود فروق معنوية بين معاملات تخافيف المعلق الفطري اذ بلغ معدل البيض بعمر ١٠-١٠ x ٤.٨ بوغ / مل صفر يوم مقارنة مع التخفيف ١-١٠ x ٤.٨ بوغ / مل ومعاملة السيطرة التي بلغت معدلات حضانة البيض فيها . صفر يوم على التوالي . اظهرت النتائج في الجدول نفسه ان هناك مؤشراً واضحاً

في كفاءة الفطر *M. anisopliae* بالتخفيف 4.8×10^{-1} بوغ / مل بالتأثير الفعال في مدة حضانة البيض ومن ثم نسبة قتل البيض ، وبالتالي فشل وصول البيض الى مرحلة اليرقات بعد الفقس . ولوحظ ان اليرقات الفاقسة هلكت 100% بالتخفيفين 4.8×10^{-1} و 4.8×10^{-2} بوغ / مل وهذا دلالة على تأثير ابواغ الفطر على نمو وتطور اليرقات الفاقسة مقارنة بمعاملة السيطرة التي لم يحدث فيها أي هلاك .

() : تأثير الفطر *M. anisopliae* بالتخفيفات في بيض حشرة خنفساء الصدر الـ *O. surinamensis* ساعة وتطورها

المعاملات	% قتل البيض	معدل حضانة البيض (يوم)	% قتل الاعمار اليرقية	معدل مدة الاعمار اليرقية (يوم)	% قتل العذارى	معدل مدة العمر العذري (يوم)	% بزوغ البالغات	معدل عمر البالغات (يوم)
4.8×10^{-1}	33.3	3.3	100	-	-	-	-	-
4.8×10^{-2}	46.6	3.7	100	-	-	-	-	-
4.8×10^{-3}	100	-	-	-	-	-	-	-
معاملة السيطرة	0.0	3.0	0.0	21.0	0.0	4.5	100	45.0
L.S.D	9.4	0.07	10.5					

يتبين من الجدول () وجود فروق معنوية في مدة حضانة البيض بعمر *M. anisopliae* في بيض حشرة خنفساء الصدر الـ *O. surinamensis* ساعة وتطورها . وظهرت فروقات معنوية مع معاملة السيطرة والتي بلغت صفر يوم . وبلغت اعلى نسبة قتل للبيض 100% عند التخفيف 4.8×10^{-3} بفرق معنوي مع معاملي التخفيفين 4.8×10^{-2} و 4.8×10^{-1} . اما معاملة السيطرة فقد بلغت نسبة القتل صفر 0% . اجري Tallamy وآخرون (1998) اختباراً لمدى فاعلية الفطر *M. anisopliae* وبالتراكيز 10^0 ، 10^1 و 10^2 على بيض ويرقات خنفساء القثاء المنطقة ، وظهر ان هناك فروق معنوية لنسب قتل البيوض وتزداد نسبة القتل بزيادة تركيز المعلق وكلما تقدم عمر البيض ادى الى مقاومتها للفطر ، وبسبب تصلب كيوكل قشرة البيض وترسيب المواد السكروتينية . وقد فسر سبب تأثير الفطر *M. anisopliae* بفى نسب فقس البيض الى وجود الدهون القطبية واللاقطبية في الطبقة الخارجية لقشرة البيض التي تؤدي الى انبات ابواغ الفطر لاستعمال هذه الدهون كمصدر للطاقة لاستمرار الانبات وتكوين عضو الالتصاق appressoria الذي يساعد على تثبيت الفطر على الكيوكل ومن ثم نفاذ الهايفات الى داخل جسم الحشرة (Galina).

جدول () : تأثير الفطر *M. anisopliae* بالتخفيفات في بيض حشرة خنفساء الصدر المنشاري *O. surinamensis* ساعة وتطورها

%	البيض	%	البيض (يوم)	%	اليرقية (يوم)	%
4.8×10^{-1}	-	.	.	.	-	-
4.8×10^{-2}	-	.	.	.	-	-
4.8×10^{-3}	-	.	.	.	-	-
معاملة السيطرة	.	.	.	.	.	.
L.S.D	.	.	.	.	.	.

نح نتائج الجدول (3) وجود فروق معنوية بين معدل مدة طول طور اليرقي الثاني لتخفيف 4.8×10^{-1} ي اذ بلغت 11.0 يوم عند التخفيف 4.8×10^{-2} وهي اطول فترة تصلها مقارنة مع التخفيف 4.8×10^{-3} اذ وصلت المدة 5.1 و 9.8 يوم على التوالي ، اما معاملة السيطرة فقد بلغت يوم وهي اختلفت معنويًا مع كل المعاملات . يلاحظ كلما زاد تركيز المعلق البوغي قلت مدة العمر اليرقي لسرعة نفاذ كونيديات الفطر من خلال جدار الجسم . لنسبة قتل يرقات العمر الثاني فقد اختلفت النتائج معنويًا وبين معاملة السيطرة اذ بلغت اعلاها 100% في التخفيف 4.8×10^{-3} وادناها 0% في التخفيف 4.8×10^{-1} .

السيطرة والتي بلغت نسبة قتل اليرقات صفر 0% . في دراسة اجريت لمعرفة تأثير الفطر *M. anisopliae* على حشرتين تابعتين لرتبة غمدية الاجنحة هما *Asynonychus cervinus* و *Otiorynchus sulcotus* وجد ان افضل تركيز في التأثير على تغذيتهما ومن ثم معدلات قتل اليرقات لهما تجاوزت 100% في التركيز 4.8×10^{-3} (Gerding).

وفي تجربة اجراها James Ligttan () عندما عرض يرقات العمر الاول لحشرة *Hippodamia convergens* من رتبة غمدية الاجنحة اذ بلغت نسبة القتل لليرقات % في التركيز *M. anisopliae*.

جدول () : تأثير الفطر *M. anisopliae* في اليرقي الثاني لحشرة خنفساء الصدر المنشاري *O. surinamensis* وتطورها

المعاملات	% قتل يرقات العمر الثاني	معدل مدة العمر اليرقي الثاني (يوم)	% قتل يرقات العمر الثالث	% قتل يرقات العمر الرابع	معدل مدة تطور العذارى (يوم)	% بزوغ البالغات
$10^{-1} \times 4.8$	20.0	11.0	0.0	26.6	9.8	13.3
$10^{-1} \times 4.8$	26.6	9.8	0.0	0.0	10.7	33.3
$10^{-1} \times 4.8$	53.3	5.1	26.6	13.3	8.3	0.0
معاملة السيطرة	0.0	12.4	0.0	0.0	11.4	100
L.S.D	4.9	1.6	3.2	4.7	2.0	7.6

اظهرت نتائج الجدول (4) ان نسبة القتل ليرقات العمر الرابع بلغت 66.6% عند التخفيف $10^{-1} \times 4.8$ واقلها 33.3% عند التخفيف $10^{-1} \times 4.8$ ، اما معاملة السيطرة فقد بلغت صفر % . اما معدل مدة الطور اليرقي الرابع لحشرة الخنفساء الصدري وبمعلق الفطر بالتخفيف $10^{-1} \times 4.8$ و $10^{-1} \times 4.8$ و $10^{-1} \times 4.8$ فقد بلغت 9.3 ، 8.8 و 9.9 و 11.4 يوم على التوالي ، اما المقارنة فقد بلغت صفر يوم . تقاربت هذه النسب وتوافقت مع نتائج الدراسة التي اجراها Bruck (2009) لاحظ زيادة نسبة قتل يرقات خنفساء العنب السوداء Black vine weevils الى 90% عند تغذيتها على وسط غذائي حاوي على ابواغ الفطر *M. anisopliae* خلال ثلاثة اسابيع من التعرض لهذا الفطر . وذكر Samuels (1998) ان للفطر تأثير واضح على الحشرات ووجد ان تأثير سموم الفطر *M. anisopliae* مثل A,B , destmxin في يرقات الطور المتأخر لحشرة *Manduca sexta* من حيث تأثيره في Ca^{++} خارج الخلايا والمؤثرة على عمل فضلات الحشرة وكذلك عملها في تثبيط الانزيم ATP-ase الذي يؤدي الى الخلخل في ضربات قلب الحشرة بالتأثير في pH الخلايا العضلية للقلب.

() : تأثير الفطر *M. anisopliae* في العمر اليرقي الرابع لحشرة خنفساء الصدر المنشاري *O. surinamensis* وتطورها

% قتل يرقات	اليرقي (يوم)	%	%
.	.	.	.
x	.	.	.
x	.	.	.
x	.	.	.
سيطرة	.	.	.
L.S.D	.	.	.

() عدم وجود فروق معنوية بين جميع المعاملات المستعملة في الرش على عذارى خنفساء الصدر المنشاري *O. surinameasis* بعمر 24 ساعة ولم يلاحظ أي تأثير لتخفيف الفطر *M. anisopliae* في مدة الطور العذري اذ بلغت 5.5 ، 4.1 و 5 يوم للتخفيف $10^{-1} \times 4.8$ و $10^{-1} \times 4.8$ و $10^{-1} \times 4.8$ على التوالي . اما في معاملة السيطرة فقد بلغت 6.5 يوم . اما نسبة قتل العذارى في معاملة السيطرة فقد بلغت صفر % ، اما لتخفيف الفطر فقد بلغت 6 و 40 و 46.4% للتخفيف $10^{-1} \times 4.8$ و $10^{-1} \times 4.8$ و $10^{-1} \times 4.8$.

اما نسب بزوغ البالغات الناتجة من عذارى المعاملة فقد بلغت 0.0% و 3.3% للتخفيفين $10^{-1} \times 4.8$ و $10^{-1} \times 4.8$ بينما في معاملة السيطرة بلغت صفر % . نستنتج ان تخفيف الفطر اعطت نسب قتل متفاوتة بينها مقارنة مع معاملة السيطرة . ان الفطر يسبب اصابة موضعية للعذارى ويخترق الكيوتكل عن طريق انزيمات محللة للكيتين ثم يبدأ بالتضاعف داخل جسم العذراء مسبباً موتها ويستطيع الفطر اختراق الثغور التنفسية لليرقات والعذارى مما يؤدي الى غلقها مسببة اختناق العذارى (Pendland وآخرون ،).

جدول (٤): تأثير الفطر *M. anisopliae* في العمر العذري لحشرة خنفساء الصدر المنشاري *O. surinamensis* وتطورها

(يوم)	%	%	
.	.	.	× .
.	.	.	× .
.	.	.	× .
.	.	.	معاملة السيطرة
.	.	.	L.S.D

تظهر نتائج الجدول (٦) عدم وجود فروق معنوية لمدة العمر العذري وبعمر ٧٢ ساعة بتخافيف الفطر اذ بلغت ٤.٢ و ٤ يوم بالتخفيفين ٤.٨ × ١٠^{-٦} و ٤.٨ × ١٠^{-٤} بينما كانت معنوية مع التخفيف الفطري ٤.٨ × ١٠^{-٦} والتي بلغت ٤.٧ يوم والتخافيف الثلاث اظهرت فروقات معنوية مقارنة مع معاملة السيطرة التي بلغت ٧ يوم. وصلت اعلى نسبة قتل للعذارى بالمعلق الفطري ٧٣.٣% بالتخفيف ٤.٨ × ١٠^{-٦} وهي اختلفت معنويًا مع التخفيفين الاخرين اذ بلغت ٥٣.٣ و ٣٣.٣% في ٤.٨ × ١٠^{-٦} و ٤.٨ × ١٠^{-٤}. وذكر Jayanth و Baily (١٩٩٤) حدوث نسب قتل لحشرة *Parthenium beetle* في مرحلة العذاراء عند معاملتها بالفطر *M. anisopliae*.

جدول (٥): تأثير الفطر *M. anisopliae* في ا العذري لحشرة خنفساء الصدر المنشاري *O. surinamensis* ساعة وتطورها

(يوم)	%	%	
.	.	.	× .
.	.	.	× .
.	.	.	× .
.	.	.	معاملة السيطرة
.	.	.	L.S.D

A STUDY OF BIOFUNGUS *Metarhizum anisopliae* IN SOME BIOLOGICAL ASPECTS OF SAW TOO THE GRAIN BEETLE *Oryzaephilus surinamensis* L. ON RICE

H. A. Mohammed I. A. Mahmood L. K. Abed
Dept. of Plant protection, College of Agric., Univ. of Baghdad, Iraq

ABSTRACT

This study was conducted in Biology Dept., College of Science for women , Baghdad University in year 2010 to identify the effect of Biofungus *Metarhizum anisopliae* in some different stages of saw toothed grain beetle *Oryzaephilus surinamensis* . The eggs in age of 24 and 72 hours, Larvae in second fourth instar and pupae in age 24 and 72 were treated with fungal dilution 4.8×10^{-6} , 4.8×10^{-4} and 4.8×10^{-2} . Results of the study showed the following : Non – hatching eggs at the age at 24 hours with fungal suspension 4.8×10^{-2} , while 100% the highest mortality rate for egg , but lowest rate mortality was 23.3% of dilution 4.8×10^{-4} . The highest mortality of four larvae stage 66.6% in dilution 4.8×10^{-4} . The highest mortality of pupa 73.3% in 72 hours.

المصادر

Al-Jaber , A.M., 2006. Toxicity and repellency of seven plant Essential Oils to *Oryzaephilus surinamensis* and *Tribolium castaneum* , Scientific Journal of King Feisal University , vol. 7 , No. 11.

- Boucias and D.G. Pendl and J.C.1998. Principle of insect pathology. Klumar Academic Publisher, London.pp537.
- Bruck , D.J. 2005. Ecology of *Metarhizium anisopilae* in soilless potting media and the rhizosphere implications for pest management. Biol. Control. 32 : 155-163.
- Gerding , M. ; Rodriguez , M. ; France , A. and Gerding – Gonzalez. 2009. Selection of *Metarhizium anisopilae* and *Oliorhynchus sulcatus* attacking raspberries in Chile international Rubus and Ribes symposium 37 , 877-890.
- Ghanbary , M.A. ; Asgharzadeh , H.A. ; Hadizadeh , A.R. and Mohammadi Sharifi , M. 2009. A Quick method for *Metarhizium anisopilae*. Isolation from cultural soils. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 4 (2) : 152-155.
- Jayanth , K.P. and Balii , G. 1994. Life table of the parthenium beetle *Zygogramma bicolorata* in Bangalore , India , Insect Science and its Application . vol. 15 , No. 1 , 19-23.
- Lacey, L.A. , Goettel , M. 1995. Current development in Microbial control of insects pests and pops. etc. for early 21 century , Entomophaga 40: 3-27.
- Lacey , L.A. 1999. Manual of techniques in insect pathology (Biological techniques) Academic press sandiego. London . Boston , 408 pp.
- Lord , J.C. 2007. Decimation increase the efficacy *Beauveria bassiana* on stored grain beetle. J. Eco. Entomol. 94 : 367-372.
- Pendland, J.C. ; Hung , S.Y. and Boucias , D.G. 1998. Evaluation of host defense by in vivo produced protoplast – like cells of insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. J. Bacteriol. 175 : 596-599.
- Samuels , R.I. 1998. a sensitive bioassay for destruxins cyclodeposipeptids from the culture filtrates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopilae* Anais da sociedade Entomologica do Brasil , Print version. An. Soc. Entomol. Vol. 27 , No. 2
- SAS. 2004. SAS / STAT Users Guide for personal computers. Release . 612 SAS Institute Inc. Cary. N.C. USA.
- Shah , F.A. ; Ansari , M.A., Prasad , M. and Butt , T.M. 2007. Evaluation of black vine weevil *Otiorynchus sulcatus* control strategies using *Metarhizium anisopilae* with sublethal doses of insecticides in disparate horticultural growing media. Biol. In control. 40 : 246-252.
- Tallamy , D.W. ; Whitting , D.P. ; Gorski , P.M. and Gothro, P.W. 1998. Sequestered cucurbitacins and pathogenicity of *Metarhizium anisopilae* on spotted cucumber beetle eggs and larvae. Environmental Entomology. 27 : 366-372.