

1 株优良生防细菌的筛选及其对甘肃温室黄瓜枯萎病的防治效果

李娜, 李晶, 付麟云, 刘锦霞, 丁品, 武建荣

(甘肃省科学院生物研究所 兰州 730000)

摘要: 为了有效防控甘肃温室黄瓜枯萎病, 获得生防效果较好的高效拮抗菌株, 从甘肃武威市凉州区日光温室大棚黄瓜枯萎病根际土分离多株菌株, 通过平板拮抗试验、室内盆栽效果试验, 得到 1 株对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)有较强抑制作用的假单胞属菌株 33-1, 经鉴定 33-1 为弗雷德里克斯堡假单胞菌(*Pseudomonas frederiksbergensis*)。结果表明, 33-1 具有很好的苗期防治效果, 可达 86.95%, 对植株生长有促进作用。认为 33-1 有开发为防治温室黄瓜枯萎病生防制剂的潜力。

关键词: 温室黄瓜; 枯萎病; 生防细菌; 生防假单胞菌

中图分类号: S642.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2022)01-086-05

Screening and identification of an excellent biocontrol bacteria against cucumber *Fusarium* wilt in heliogreenhouse of Gansu and its biological effect

LI Na, LI Jing, FU Linyun, LIU Jinxia, DING Pin, WU Jianrong

(Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China)

Abstract: In order to effectively prevent and control cucumber *Fusarium* wilt in greenhouses and to obtain highly effective antagonistic strains with good biological control effect in Gansu province, several strains of *Fusarium* wilt were isolated from inter-rhizosphere soil in sunny greenhouses in Liangzhou district, Wuwei City, Gansu Province. We obtained a strain 33-1 *Pseudomonas* with strong inhibitory effect on *Fusarium oxysporum* through plate antagonism test and indoor potting effect test. 33-1 was identified as *Pseudomonas frederiksbergensis*. The results showed that 33-1 had a good seedling control effect, up to 86.95%, and it can promote plant growth. It is considered that 33-1 has the potential to be developed as a bio-control agent against *Fusarium* wilt in greenhouse.

Key words: Greenhouse cucumber; *Fusarium* wilt; Bio-control bacteria; Biocontrol *Pseudomonas aeruginosa*

黄瓜枯萎病由尖孢镰刀菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)这一类真菌侵染, 从苗期到结果期均会发病, 开花结果期发病最为严重。发病初期, 黄瓜植株上的叶片在中午高温时出现萎蔫症状, 早晚气温转凉时, 萎蔫症状又恢复正常。发病的中后期, 植株上萎蔫的枝叶会逐渐增加, 气温转凉时症状也难以恢复, 叶片出现由下向上逐步变得枯黄萎蔫, 直至茎秆成水浸状腐烂。黄瓜枯萎病主要经土壤传播的维管束病害, 露地和保护地栽培黄瓜上均可发生, 连作地区尤为严重, 现已成为世界范围内影响黄瓜生产的毁灭性土传病

害。发病率在 20%~30%, 造成黄瓜产量下降, 严重时 80%~90%, 可导致黄瓜严重减产^[1-2]。目前, 此病害已成为生产上制约黄瓜产量和品质的重要因素之一, 而黄瓜是日光温室反季节栽培的主要蔬菜种类, 栽培面积已占日光温室生产面积的 50%以上^[3]。所以, 此病害也成为制约现代农业发展的重要因素。

目前, 农业生产主要就是采取田间轮作和植株嫁接的方法, 还会使用和化学农药相结合的方法来防治黄瓜枯萎病。但这些方法效果往往不稳定, 化学农药虽然可以有效控制温室黄瓜枯萎病的发生,

收稿日期: 2021-04-12; 修回日期: 2021-09-30

基金项目: 甘肃省科学院优秀青年科技创新基金项目(2018 QN-01); 甘肃省自然科学基金项目(21JR1RA346)

作者简介: 李娜, 女, 副研究员, 主要从事生物农药研发、设施农业生物防治技术研究。E-mail: sherry0605@sohu.com

通信作者: 刘锦霞, 女, 研究员, 主要从事生物农药研发与应用。E-mail: liujinx0168@163.com

但长期使用化学农药所产生的农药残留不仅污染土壤和地下水,也危害人畜健康,而且随着内吸性杀菌剂大量使用,病菌易产生抗药性,防效会逐渐降低^[4-5]。

如今,用生物防治的方法控制温室黄瓜枯萎病越来越得到人们的关注和青睐。人们已经从土壤中筛选出多种有益微生物。其中,植物根际促生菌作为具有防病潜力和应用价值的一类生防菌受到国内外学者关注^[6-7],并用于土传病害的防治。目前,已报道对黄瓜枯萎病有生防潜力的拮抗菌包括枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、木霉属真菌、链霉菌等^[8],但有关弗雷德里克斯堡假单胞菌对黄瓜枯萎病菌的防控作用目前还未见报道。笔者从已分离鉴定的黄瓜根际微生物中检测对尖孢镰刀菌黄瓜专化型具有较好拮抗作用的菌株,开展抗病试验,为温室黄瓜枯萎病防治的生物农药开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

生防菌株:菌株 F-2、33-1、F-4、N-2、N-Z、N-6、N-8、N-9,均为该实验室分离,2018 年筛选于甘肃省武威市凉州区日光温室黄瓜根际土壤。

供试病原菌:尖孢镰刀菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)购于中国微生物菌种保藏中心。供试黄瓜:津育二号黄瓜。

供试药剂:50%多菌灵可湿性粉剂。

培养基:牛肉膏蛋白胨培养基、PDA 培养基。

仪器:苏净安泰超净工作台 SW-CJ-2 FD、上海申安立式高压蒸汽灭菌锅 LDZF-50 L、上海森信霉菌培养箱。

1.2 方法

试验于 2018 年 10 月在甘肃省科学院生物研究所实验室开展。

1.2.1 拮抗菌株对尖孢镰刀菌的抑制作用 采用牛津杯法^[9]将实验室前期筛选出对尖孢镰刀菌有一定抑制作用的菌株 F-2、33-1、F-4、N-2、N-Z、N-6、N-8、N-9 接种在牛肉膏蛋白胨斜面培养基中,28℃ 恒温活化 48 h,活化后将 8 种供试拮抗菌接在牛肉膏蛋白胨液体培养基中,28℃ 恒温培养 24 h。将尖孢镰刀菌接在 PDA 平板培养基中 26℃ 恒温活化 96 h 后,将尖孢镰刀菌孢子液均匀涂布在 9 cm 的培养皿中,在培养皿中心放置内径为 6 mm 的牛津杯,每个牛津杯中分别加入 8 种供试拮抗菌,在

26℃ 恒温培养箱中培养,设空白对照(无菌水处理),每株供试菌设 3 次重复,待对照平板菌落长满时测量抑菌圈大小,比较空白对照及各供试菌株病原菌菌落直径,筛选对尖孢镰刀菌拮抗性能良好的生防菌株^[9]。

1.2.2 拮抗菌发酵液对尖孢镰刀菌菌丝生长的抑制作用 采用菌丝生长速率法^[10],测定菌株发酵产物的抑菌活性即发酵液对病原菌菌丝生长抑制作用。将拮抗菌接入到牛肉膏蛋白胨液体培养基中,28℃ 恒温培养 48 h,制成发酵液。将尖孢镰刀菌接在 PDA 平板培养基中 26℃ 恒温活化 96 h。用 200 μL 拮抗菌株 F-2、33-1、F-4、N-2、N-Z、N-6、N-8、N-9 液体发酵液均匀涂在 PDA 平板上,在平板中心放置 5 mm 病原菌菌饼,以无菌水为对照,26℃ 下培养 7 d,每处理设 3 次重复,用十字交叉法测量病原真菌菌落直径,计算菌丝生长抑制率。

菌丝生长抑制率=(对照菌落生长直径-处理菌落生长直径)/对照菌落生长直径×100%。

1.2.3 优良拮抗菌株鉴定 拮抗菌的鉴定用常规方法结合分子鉴定方法完成。

将拮抗效果最好的菌株 33-1 进行革兰氏染色、菌体形态、菌落形状观察;菌株生理生化反应参照《常见细菌系统鉴定手册》中的方法^[11]。16 S rDNA 测定是由上海基康生物技术有限公司完成并通过 MEGA 7 软件构建系统进化树。

1.2.4 优良菌株 33-1 对黄瓜枯萎病的防治及其促生效果 采用蘸根接种法测定优良菌株 33-1 对黄瓜枯萎病的防治及其促生效果^[12]。将拮抗菌 33-1 接入牛肉膏蛋白胨液体培养基 28℃ 培养 2 d 备用,将病原菌尖孢镰刀菌接种在 PDA 液体培养基中 26℃ 培养 7 d,制成尖孢镰刀菌菌悬液备用。将购买的津育二号黄瓜种子在 45℃ 水中泡种 1 h,之后经过 70%酒精消毒 1 min, HgCl₂ 消毒 1 min,无菌水冲洗多次后放入培养皿中 25℃ 催芽 3 d,之后将芽根部划伤,将划伤的芽根部在之前培养好的尖孢镰刀菌菌悬液中浸泡 5 s,后接入育苗盘中,并将尖孢镰刀菌菌悬液每穴 6 mL 灌在距茎部 1 cm 周围,24 h 后灌根接入拮抗菌 33-1 液体悬浮液 6 mL,拮抗菌菌液处理分 B(原液)、A(10⁻¹)、C(10⁻²)、D(10⁻³)、E(10⁻⁴)5 个浓度。每个处理 30 个重复,并设有 CK 空白对照(不接病原菌)、CK(病原菌+清水)、CK 培对照(病原菌+培养基)、CK 药剂对照(病原菌+50%多菌灵可湿性粉剂稀释 1000 倍)。温度 24~28℃,相对湿度 50%~70%。30 d 后调查发病情况,统计

病情指数^[13]、计算防治效果并测量植株株高、根长、总质量。黄瓜枯萎病分级标准见表1

表1 黄瓜枯萎病分级标准

症状	级别
无症状	0级
真叶、子叶黄化或萎蔫面积不超过总叶面积的50%	1级
真叶、子叶黄化或萎蔫面积超过总叶面积的50%	2级
叶片萎蔫或枯死,仅生长点存活	3级
病株枯死	4级

植株发病程度及病情分级标准计算病情指数按公式(1)(2)进行计算。

病情指数/%=Σ(病情级值×该病情级株数)/(病情最高级值×总株数)×100; (1)

相对防治效果/%=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数×100。 (2)

1.3 数据分析

试验数据用 Excel 2007 和 SPSS 23.0 统计分析软件进行方差分析和显著性水平检验。

2 结果与分析

2.1 高拮抗菌株筛选

牛津杯法筛选结果(表2)显示,33-1对尖孢镰刀菌有较好的抑制作用,病原菌菌落直径最小,F-2、N-Z次之,N-6、F-4对病原菌也有一定的抑制作用,N-8的抑菌效果最差。

表2 拮抗菌株对尖孢镰刀菌的抑制效果

菌株	病原菌菌落直径/cm
33-1	3.11 eD
F-2	4.05 dC
N-Z	4.28 dBC
N-6	4.45 cB
F-4	4.45 cB
N-2	6.23 bA
N-8	6.48 aA
N-9	6.40 bA
CK	

注:不同菌株数据后相同小写字母者表示同列在0.05水平无显著差异。不同菌株数据后相同大写字母者表示同列在0.01水平无显著差异。下同。

菌丝生长速率法对比结果(表3)显示,与对照比,8种拮抗菌发酵液对病原菌菌丝生长均有极显著抑制作用。其中,N-Z、N-6和F-4对病原菌菌丝生长有一定抑制作用,3种拮抗菌没有显著性差异,抑菌效果相当。33-1和F-2和CK相比较有极显著差异,并且33-1对病原菌菌丝生长抑制率可达64.65%,F-2对病原菌菌丝生长抑制率可达

55.81%,N-2、N-8和N-9对菌丝生长抑制率较低,均不超过30%,但三者间差异极显著。由图1也可明显看出8种拮抗菌对病原菌菌丝生长抑制的差异。

表3 拮抗菌发酵液对尖孢镰刀菌菌丝生长的抑制作用

菌株	菌落直径/cm	菌丝生长抑制率/%
33-1	3.10 gG	64.65
F-2	3.88 fF	55.81
N-Z	4.35 eE	50.40
N-6	4.45 eE	49.26
F-4	4.40 eE	49.83
N-2	6.38 dD	27.30
N-8	6.78 cC	22.75
N-9	7.15 bB	18.47
CK	8.77 aA	

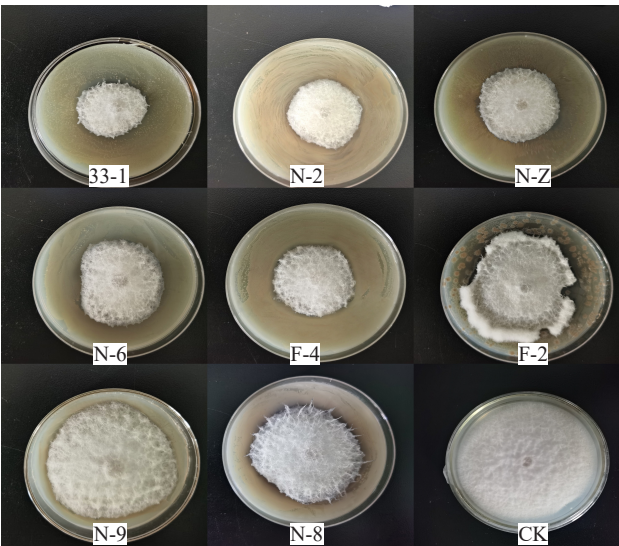


图1 拮抗菌发酵液对尖孢镰刀菌菌丝生长的抑制作用

2.2 形态观察、生理生化测定

挑选出对病原菌生长抑制率最高的拮抗菌株33-1,确定拮抗菌株33-1是革兰氏阴性,杆状,运动,不产芽胞,菌落圆形隆起,边缘整齐,湿润,其生理生化特性与假单胞属性状吻合(表4)。菌株33-1为弗雷德里克斯堡假单胞菌 *Pseudomonas frederiksbergensis*。

表4 菌株33-1的部分生理生化特性

测试项目	特性	测试项目	特性
革兰氏	-	明胶水解	+
甲基红	-	4℃生长	+
淀粉水解	-	产H ₂ S	-
过氧化氢酶	+	氧化酶	+
硝酸盐还原	+	5% NaCl	-
V.P. 试验	+	7% NaCl	-

注:“+”“-”分别代表阳性和阴性反应。

2.3 拮抗菌防病能力

由图表5可知,在室内条件下,5种处理较CK都降低了病情指数。其中,C处理和D处理病情指数最低,分别是5.36%和12.50%,D处理与药剂对照组效果相当,而C处理植株发病程度明显低于药剂对照组14.28%,在防效上,C处理和D处理的效果也尤为突出,分别是86.95%和69.56%,C处理更是明显高于药剂对照组65.23%的防治效果。在对株高的影响上,A处理、C处理、D处理的株高高于CK。其中,C处理的株高显著高于CK,而C处理与药剂对照组没有显著差异,说明C浓度可以促进植株生长,这个浓度在对促进植株生长与已经商品化的农药效果相当。在对植株根长的影响上,A处理、B处理、C处理、D处理、E处理均与CK、药剂对照组无显著差异,与空白对照组有极显著差异,说明虽然各浓度菌剂没有改善病原菌对植株根长生长的影响,但也没有加剧病原菌对根长生长的抑制作用。从各浓度药剂对植株总质量影响上来看,A处理、B处理、C处理、D处理和E处理的植株总质量都显著高于CK,C处理的植株总质量高于CK和药剂对照组,且差异极显著,D处理与药剂对照组效果相当,说明5种浓度药剂对植株都有一定的增重效果,C处理、D处理效果尤为明显。

表5 菌株33-1室内盆栽防效试验结果

处理	病情指数/%	相对防治效果/%	株高/cm	根长/cm	总质量/g
A	32.14	21.74	10.20 bcB	2.07 bB	0.39 eE
B	33.04	19.56	9.67 cB	2.23 bB	0.46 dD
C	5.36	86.95	12.79 abAB	2.34 bB	0.57 bB
D	12.50	69.56	11.92 abcAB	2.20 bB	0.53 cC
E	25.01	39.10	9.67 cB	2.23 bB	0.46 dD
CK	41.07	0.00	9.66 cB	2.31 bB	0.33 fF
CK 培	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CK 药剂	14.28	65.23	11.12 bcAB	2.82 bB	0.53 cC
CK 空白	0.00	0.00	14.54 aA	4.14 aA	0.63 aA

3 讨论与结论

在黄瓜生物防治的应用中,应用最多的有木霉属、芽孢杆菌属、链霉菌属和假单胞菌属等^[14],谷祖敏等^[15]研究发现采用拌土法接种长枝木霉 *Trichoderma longibrachiatum* THLJ 对黄瓜枯萎病的防治效果达67.05%。孙燕霞等^[16]使用解淀粉芽孢杆菌 SYX-1 菌悬液对黄瓜枯萎病的防治效果为43.3%。圆圆等^[17]使用链霉菌 S-101 发酵液对黄瓜枯萎病防效达到57.11%。假单胞菌属是植物根系、根际最丰

富的细菌类群^[18-19],具有多样的生物活性,假单胞菌广泛存在于植物根际中。其中,许多菌株可以有效抑制多种真菌和细菌引起的根部病害,对植物的生长有促进作用,具有作为生防菌的有利条件,并能很好地发挥生防作用^[20-22]。关于假单胞菌在植物病害防治中,研究主要集中在荧光假单胞菌。荧光假单胞菌是植物根部和土壤中常见的一种有益细菌,是目前研究最为广泛的生防菌之一^[23-24],但关于弗雷德里克斯堡假单胞菌的研究目前尚未见报道。

结合拮抗菌株和病原菌的平板对峙试验、生防菌株发酵液抑菌活性的试验,本试验筛选出拮抗菌株弗雷德里克斯堡假单胞菌33-1,该菌能较好地抑制病原菌生长,对黄瓜枯萎病原菌尖孢镰刀菌黄瓜专化型菌株有较好的抑制作用,其发酵产物也能很好地抑制尖孢镰刀菌菌丝生长,抑制率可达64.65%。33-1的室内盆栽防病效果试验结果表明,33-1在C(10^{-2})拮抗菌发酵液浓度处理下植株发病程度明显低于药剂对照组14.28%和CK对照组的41.07%,病情指数最低,为5.36%;在防效上,33-1在C(10^{-2})拮抗菌发酵液浓度处理下效果也尤为突出,防治效果为86.95%,更是明显高于药剂对照组65.23%的防治效果,说明C(10^{-2})拮抗菌发酵液浓度为33-1室内盆栽防病效果最佳的拮抗菌发酵液浓度。拮抗菌33-1在C(10^{-2})拮抗菌发酵液浓度处理下及D(10^{-3})拮抗菌发酵液浓度处理下,相对防治效果高于A(10^{-1})拮抗菌发酵液浓度处理及B(原液)处理,可能是因为高浓度的拮抗菌发酵液在土壤中对植株本身会产生一定影响,使得植株根系细胞受损,从而抵抗力降低,植株生长缓慢,株高、根长、总质量均低于空白对照组。培养基对照组处理下,植株全部死亡,可能是由于培养基养分充足,加快了病原菌尖孢镰刀菌的生长。D(10^{-3})拮抗菌发酵液浓度处理下,相对防治效果和药剂对照组相对防治效果相当。在与已经商品化的多菌灵比较,33-1在C(10^{-2})拮抗菌发酵液浓度时,有效降低了黄瓜枯萎病的发病率,相对防治效果也高于已商品化的多菌灵;高于大部分假单胞菌对黄瓜枯萎病的67.5%的防治效果^[25];更是高于目前研究较多的荧光假单胞菌的生防效率50%~60%^[26]。研究还表明这株弗雷德里克斯堡假单胞菌不仅具有抑菌活性作用,并在黄瓜苗期有显著促生作用,其适宜浓度发酵液对苗期黄瓜植株有显著促生作用。

综上所述,弗雷德里克斯堡假单胞菌33-1是1株综合性状优良的高效拮抗菌株,在防治土传植物

病害方面具有极大的潜力,可以为黄瓜枯萎病的防治及假单胞菌的高效利用提供菌株资源。下一步可以比较高效拮抗菌株 33-1 活菌和代谢产物的抑菌能力,确定有效抑菌物质及其抑菌机制,为黄瓜枯萎病的防治及假单胞菌的高效利用奠定理论基础,为黄瓜枯萎病的绿色防控提供重要的技术支撑。

参考文献

- [1] 赵帅,杜春梅,田长彦. 黄瓜枯萎病综合防治研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(7): 254-259.
- [2] 张光明,王冰. 黄瓜抗枯萎病筛选及有关问题研究初报[J]. 中国蔬菜, 1989(2): 19-22.
- [3] 郭玉蕊. 涇川县日光温室黄瓜栽培技术[J]. 现代农业科技, 2012(1): 133-134.
- [4] 刘琴,徐健,刘怀阿,等. 黄瓜内生放线菌 SR-1102 分离及对枯萎病菌拮抗活性[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2015, 36(2): 83-88.
- [5] 张武岗,冯俊涛,方香玲,等. 放线菌 19G-317 菌株的鉴定及其抑菌活性研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2009, 35(3): 243-248.
- [6] 胡江春,薛德林,马成新,等. 植物根际促生菌(PGPR)的研究与应用前景[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1963-1966.
- [7] 杨云. 甜菜根腐病拮抗菌的筛选、鉴定与抑病效果研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2013.
- [8] 唐蕊,张雪辉,殷世群,等. 黄瓜枯萎病拮抗菌 HM-7 的鉴定[J]. 中国瓜菜, 2016, 29(8): 13-16.
- [9] 王彪,崔文艳,何朋杰,等. 解淀粉芽孢杆菌 ASR-12 粗蛋白对多种植物病菌的抑制作用[J]. 安徽农业大学学报, 2019, 46(5): 865-869.
- [10] 李晶. 黄瓜枯萎病高效拮抗枯草芽孢杆菌的筛选及生防机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2010.
- [11] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [12] 詹发强,侯敏,杨蓉,等. 一株番茄枯萎病生防菌的鉴定、定殖与盆栽防效研究[J]. 新疆农业科学, 2013, 50(7): 1277-1287.
- [13] 刘卹洲,陈志谊,梁雪杰,等. 番茄枯萎病和青枯病拮抗细菌的筛选、评价与鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(1): 101-108.
- [14] 牛红杰. 黄瓜枯萎病生防放线菌的分离筛选及其发酵工艺研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- [15] 谷祖敏,毕卉. 长枝木霉 THLJ 菌株防治黄瓜枯萎病影响因素分析[J]. 农药, 2016, 55(1): 58-60.
- [16] 孙燕霞,张瑞清,刘保友,等. 白地霉和解淀粉芽孢杆菌对黄瓜枯萎病的防治效果[J]. 山东农业科学, 2010, 42(12): 55-57.
- [17] 圆圆,张虹,苏道拉呼,等. 抑制黄瓜枯萎病的链霉菌 S-101 及其生防作用研究[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(5): 813-820.
- [18] 郭达伟. 甲壳质(GA-1)防治黄瓜枯萎病的药效试验[J]. 武夷科学, 2006, 22: 78-81.
- [19] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [20] MANTER D K, DELGADO J A, HLM D G, et al. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots[J]. Microbial Ecology, 2010, 60(1): 157-166.
- [21] BULGARELLI D, ROTT M, SCHLAPPI K, et al. Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota[J]. Nature, 2012, 488(7409): 91-95.
- [22] SIDDIQUI A I, SHAUKAT S S. Effects of pseudomonas aeruginosa on the diversity of culturable microfungi and nematodes associated with tomato: impact on root-knot disease and plant growth[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(10): 1359-1368.
- [23] SHEN X M, HU H B, PENG H S, et al. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in Pseudomonas[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 271.
- [24] 韦巧婕. 黄瓜土传枯萎病拮抗菌的筛选鉴定及其生物学效应研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [25] 徐彦刚,贺振,李瑞,等. 黄瓜枯萎病研究进展[J]. 中国瓜菜, 2018, 31(6): 1-6.
- [26] 高芸. 生防芽孢杆菌及假单胞菌拮抗植物微生物病害研究进展[J]. 北方园艺, 2021(2): 131-136.