

УДК 635.713
ББК 38.32
И-35

Ильченко Галина Николаевна, заведующая токсикологической лабораторией ФГБУ «Кристалл», Московская область, e-mail: Galla2810@yandex.ru, тел.: 8(495)5931101;

Тлехас Зара Ромазановна, заведующая кафедрой землеустройства факультета аграрных технологий ФГБОУ ВПО «Майкопский государственный технологический университет», кандидат биологических наук, тел.: 8(903)4651855;

Берёзкин Николай Григорьевич, доцент кафедры землеустройства факультета аграрных технологий ФГБОУ ВПО «Майкопский государственный технологический университет», кандидат сельскохозяйственных наук, тел.: 8(903)4388306;

Татлок Руслан Кимович, доцент кафедры землеустройства факультета аграрных технологий ФГБОУ ВПО «Майкопский государственный технологический университет», кандидат биологических наук, тел.: 8(961)8187835.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ЭВГЕНОЛ СОДЕРЖАЩИХ ВИДОВ OCIMUM L. (рецензирована)

Представлены результаты изучения коллекции базилика, с целью выявления источников и доноров хозяйственно-ценных признаков для селекции базилика эвгенольного. Выделены эвгенол содержащие виды. Большинство признаков имеет высокую и очень высокую степень изменчивости, что предполагает гибридогенное происхождение большинства изучаемых коллекционных образцов рода *Ocimum* L. Коэффициенты вариации показателей отдельных морфологических и биохимических признаков (в пределах от 24,3 до 59,8), говорят о потенциальных возможностях для целей селекции.

Ключевые слова: эвгенол, содержание, качество эфирного масла, амплитуда изменчивости признаков.

Ichenko Galina Nicholaevna, head of the Laboratory of Toxicology of FSBI "Crystal", Moscow region, e-mail: Galla2810@yandex.ru, tel.: 8 (495) 5931101;

Tlekhas Zara Romazanovna, Candidate of Biology, head of the Department of Land Management of the Faculty of Agricultural Technologies of FSBEI HPE "Maikop State Technological University", tel.: 8 (903) 4651855;

Berezkin Nikolai Grigorievich, Candidate of Agricultural Sciences, associate professor of the Department of Land Management of the Faculty of Agricultural Technologies of FSBEI HPE "Maikop State Technological University", tel.: 8 (903) 4388306;

Tatlok Ruslan Kimovich, Candidate of Biology, assistant professor of the Department of Land Management of the Faculty of Agricultural Technologies of FSBEI HPE "Maikop State Technological University", tel.: 8 (961) 8187835.

VARIABILITY OF VALUABLE INDUSTRIAL PROPERTIES OF EUGENOL CONTAINING SPECIES OF OCIMUM L. (Reviewed)

The results of the study of the collection of basil have been presented to identify sources and donors of valuable industrial properties for breeding eugenol basil. Eugenol-containing species have been allocated. Most of the properties have high and very high degrees of variability that suggests hybrid origin of the most of the studied samples of *Ocimum* L. Variation coefficients of certain morphological and biochemical characteristics (ranging from 24.3 to 59.8) show the potential for breeding purposes.

Keywords: eugenol, content, quality of the essential oil, amplitude of the variation of characters.

Экономические реформы 90-х годов привели к деградации отечественного эфиромасличного производства. Парфюмерная, пищевая и фармацевтическая промышленность

всё больше завозят импортное базиликовое эфирное масло, но часто сомнительное по медико-биологическому действию [1]. В последние годы наблюдается повышенный спрос на натуральные эфирные масла. В ряду природных источников натурального эвгенола для нужд производства является базилик (*Ocimum L.*).

В начале 30-х годов прошлого столетия проблема получения отечественного эвгенола занимала центрально место в работах научно-исследовательских учреждениях эфирномасличной промышленности. Особенно активно вёл поиск и оценку эвгенол содержащих видов базилика Никитский ботанический сад. В 1937 году среди интродуцированных базиликов П.А. Нестеренко и Т.И. Книшевецкая выделили образец с выходом на свежие целые растения 0,3% эфирного масла, содержащего 70% эвгенола [2]. С тех пор этот сорт, под названием Юбилейный, возделывается до настоящего времени. В условиях Краснодарского края и Адыгеи промышленный сорт, наряду с положительными качествами, имеет ряд недостатков, затрудняющих его возделывание. Растянутый период вегетации и высокие требования к температурным условиям не позволяют получать полностью созревшие семена, поэтому возделывается как рассадная культура. Заболевание фузариозом ставит под угрозу его культуру. В связи с ростом потребности в натуральном базиликовом масле, возникла необходимость усилить научный поиск биологических ресурсов для создания сортов, приспособленных к местным условиям.

Одним из возможных доноров хозяйственно полезных признаков для улучшения существующих сортов является полиморфный род базилика (*Ocimum L.*) семейства губоцветные – *Lamiaceae Lindl (Labiatae Juss)*. Обширный род, охватывает около 200 видов [3], распространенных в диком состоянии в субтропических и тропических странах. Некоторые источники указывают на распространение до 1500 видов этого рода. На наш взгляд, ввиду того, что различные виды этого перекрестно опыляемого, полиморфного рода легко скрещиваются между собой в естественных условиях, авторы относят гибриды и разновидности к самостоятельным видам, давая им различные названия. В мировой флоре род *Ocimum* изучен недостаточно, все разнообразие видов еще не приведено в окончательную систему [4]. Наиболее полно изучено около 70 видов базилика. Большинство известных нам видов базилика отличаются широкой внутривидовой химической изменчивостью [5].

Иванова К.В. и Цытович К.И. проводили изучение коллекции *O. basilicum L.* для целей селекции овощных культур [6]. А.С. Бородкин и М.М. Гиренко изучали изменчивость признаков базилика огородного (*Ocimum basilicum L.*). По морфологическим признакам подразделили вид *O. basilicum L.* на 8 групп с определённым комплексом признаков, причём по признаку проявления антоциановой пигментации на растении выделили три типа: зелёные, фиолетовые и промежуточные [7]. Биохимическую оценку образцов проводили на содержание сухого вещества, аскорбиновой кислоты, сахаров и каротина.

Оценка коллекционных образцов на содержание и компонентный состав эфирного масла, с целью выявления источников и доноров высокой продуктивности и других хозяйственно-ценных признаков и свойств не проводилась. Цель работы – оценить характер изменчивости хозяйственно полезных признаков эвгенол содержащих видов базилика, выделить из коллекции образцы с ценными признаками для селекции базилика эвгенольного.

Материал и методы. Материалом для исследований послужила коллекция, включающая 254 образца 18 видов и разновидностей базилика. Полевые опыты проводили на Вознесенской опытной станции ВНИИЭМК и на Майкопской опытной станции ВИР. Оценка коллекционных образцов проводили в полевых условиях, согласно методических указаний ВИР [8], основное внимание обращали на фенологию, скороспелость, холодостойкость, урожай зеленой массы, содержание и компонентный состав эфирных масел. Местонахождение, размеры и количество масла содержащих железок определяли с помощью микроскопа МБС-2, окулярного микрометра и цифрового USB-микроскопа. Биохимический анализ растений на содержании эфирных масел проводили в лабораториях опытных станций и токсикологической лаборатории ФГБУ «Кристалл». Содержание эфирного масла в сырье определяли по методу Гинзберга. Для анализа растительные пробы измельчали, отбирали две пробы по 50 г и одну 10 г – для определения влажности. Полученный после отгонки дистиллят

обрабатывали серным эфиром трёхкратно в присутствии 30 г перекристаллизованной поваренной соли. Эфирные вытяжки в количестве 80-100 г сушили прокаленным сульфатом натрия, эфир отгоняли на водяной бане. Содержание эвгенола определяли рефрактометрическим методом.

Качественный состав масла определяли методом газовой хроматографии на приборе «Кристалл 5000.2» с ионной ловушкой «PolarisDSQ», с масс – селективным детектированием (ГХ/МС), работавшем в режиме ионизации электронным ударом при 70 эВ и оборудованном капиллярной колонкой HP-5MS длиной 30см и внутренним диаметром 0.25 мм. Газ-носитель – гелий. Температура инжектора и интерфейса составляли 2800°C. Температура колонки программировалась от 900°C до 3100°C со скоростью 35 тал в режиме снятия масс-спектров в диапазоне от 31 до 550 m/z. После проведения хроматографирования масс-спектры (соответствующие вершинам хроматографических пиков), сравнивали с масс-спектрами библиотек «PMW_TOX3», «NIST05» и «Wiley7N». Идентификацию выявленных компонентов проводили в режиме регистрации по полному ионному току.

Числовые характеристики признаков, полученные в исследованиях, подвергали статистической обработке. Количество измерений определяли в каждом отдельном случае математическим путем.

Результаты и обсуждение. При изучении коллекции базилика на содержание эфирного масла и компонентный состав масел, замечено, что у большинства изучаемых видов базилика в эфирном масле содержится эвгенол. Чтобы провести оценку коллекционных образцов на содержание эвгенола в масле, требуются лабораторное оборудование и дорогостоящие анализы. Для предварительной оценки образцов базилика можно использовать упрощенный метод [1]. При действии крепкой азотной кислотой на листья растения, желёзки содержащие эвгенол окрашиваются в ярко оранжевый цвет. Причём, чем выше содержание эвгенола, тем интенсивнее окраска.

Предложенный метод позволяет, достаточно удовлетворительно для практической работы, выделить эвгенол содержащие образцы (табл. 1).

Таблица 1 – Распределение видов базилика по содержанию эвгенола в эфирном масле

Эвгенол содержащие виды и разновидности	Кол-во образцов, шт.	Не содержащие эвгенол виды и разновидности	Кол-во образцов, шт.
<i>Ocimum basilicum</i> L.:		<i>Ocimum basilicum</i> L.	18
var. <i>album</i> Benth.	7	<i>Ocimum irvinei</i> Mort.	12
var. <i>anisatum</i> Benth.	6	<i>Ocimum suave</i> Willd.	8
var. <i>glabratum</i> Benth.	6	<i>Ocimum adscendens</i> Willd.	6
var. <i>purpurascens</i> Benth.	5	<i>Ocimum pilosum</i> Willd.	5
var. <i>georgicum</i> Kand.	3	<i>Ocimum ovatum</i> Benth.	5
<i>Ocimum canum</i> Sims.	14	<i>Ocimum minimum</i> L.	5
<i>Ocimum viride</i> Willd.	10	<i>Ocimum micranthum</i> Willd.	4
<i>Ocimum sanctum</i> L.	7	<i>Ocimum anisatum</i> Hort.	4
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	12	<i>Ocimum mexicanum</i> Hort.	2
<i>Ocimum menthaefolium</i> Hochst.	5		
<i>Ocimum kilimandscharicum</i> G.	5		
<i>Ocimum carnosum</i> L.	3		
<i>Ocimum americanum</i> L.	3		

Из всей проанализированной коллекции базилика, наличие эвгенола в эфирном масле отмечено у 96 образцов. Видимо, значительная часть образцов способна синтезировать эвгенол.

Дальнейшее изучение изменчивости хозяйственно-ценных признаков проводили на выделенных эвгенол содержащих образцах.

Скороспелость – очень важный признак базилика для условий Адыгеи. Учитывая задачи выведения новых скороспелых сортов, чтобы сделать производство натурального эвгенола высоко рентабельным, оценка коллекции по длине вегетационного периода имеет

огромное значение. Большинство изучаемых образцов базилика ежегодно вызревает в местных условиях и дают полноценные семена. Продолжительность периода от всходов до созревания семян на центральном соцветии составляла в среднем 63-97 дней. Вегетационный период при рассадной культуре у них на 15-48 дней короче, чем у промышленного сорта Юбилейный.

Таблица 2 – Характеристика эвгенол содержащих образцов по длине вегетационного периода

Вид, разновидность	Число дней от посадки рассады в поле до:							
	начала цветения ц/соцветия				созревания семян на ц/соцветии			
	min	max	средн ее	Cv, %	min	max	средн ее	Cv, %
<i>O. canum</i> Sims.	37,9	67,3	54,3	38,3	71,5	94,8	85,7	37,7
<i>O. carnosum</i> L.	39,7	56,7	43,7	40,0	57,9	84,6	68,4	41,4
<i>O. viride</i> Willd.	41,1	68,8	55,8	43,8	73,6	99,3	85,3	43,9
<i>O. sanctum</i> L.	42,8	67,9	54,8	41,8	75,3	97,4	84,7	46,6
<i>O. menthaefolium</i>	38,9	58,8	47,7	46,4	71,1	95,5	80,7	49,0
<i>O. basilicum</i> L.	32,5	52,5	38,9	49,7	64,4	90,3	70,3	51,2
var. <i>album</i> Benth.	36,6	55,5	40,5	42,9	63,8	89,0	68,7	48,7
var. <i>purpurascens</i>	48,6	68,2	53,2	35,5	70,5	99,3	78,5	37,9
<i>O. gratissimum</i> L.	32,2	70,4	55,5	35,8	66,6	96,7	72,5	38,8
Юбилейный	76,6	125,5	94,6	48,8	138,8	176,6	144,8	47,7
Вознесенский-87	67,2	107,8	78,8	36,7	117,5	155,4	127,4	28,3

* Cv, % - уровень варьирования признака.

Результаты изучения коллекции базилика говорят о широкой амплитуде изменчивости признака скороспелости в пределах вида. Скороспелые образцы, с рядом других полезных признаков, могут служить ценными донорами при межвидовой гибридизации.

Все изучаемые образцы базилика теплолюбивы. В молодом возрасте при минусовой температуре воздуха заболевают, покрываются некротическими пятнами и отмирают. Среди взрослых растений (в фазе цветения) встречаются особи, которые переносят кратковременные, ночные заморозки до – 3-4°C. Наибольшая холодостойкость базилика наблюдается у местных образцов, происходящих из районов с континентальным климатом (Узбекистана, Казахстана, Киргизии, Ирана, Афганистана и др.), где происходил отбор особей приспособленных к воздействию низких ночных температур.

Степень поражения образцов базилика фузариозом учитывали в рассадный период и в поле на инфекционном участке. Подавляющее число образцов устойчивы к возбудителю болезни – грибку *Fusarium oxysporum* var. *Basilice*. В группу растений, устойчивых к заболеванию фузариозом, выделено 86 образцов, представляющих определённый интерес для селекции на иммунитет.

Высота растений (от условной корневой шейки до центрального соцветия) колебалась от 24 до 147 см. Число ветвей первого порядка – от 6 до 22, второго порядка – от 2 до 42 побегов, что определяло разную степень ветвистости эвгенол содержащих образцов базилика. Степень варьирования этих признаков очень высокая. Наблюдаются большой разброс показателей между образцами по числу листьев на растении, при среднем числе 345 листьев, встречаются виды базилика, имеющие более 1700 хорошо развитых листьев. По размеру листьев отмечается очень большие различия. Длина листовой пластинки от 1,2 см у мелколистных особей, достигает 14,4 см у крупнолистных форм базилика, ширина листьев колеблется от 0,7 см до 6,2 см. Достаточно много коллекционных образцов имеют мощный, хорошо развитый куст, масса надземной части растения колеблется от 75 до 820 граммов.

Таблица 3 – Изменчивость морфологических признаков эвгенол содержащих образцов базилика

№ п/п	Признак	Ед. изм.	Значение признака			
			среднее	min	max	Cv, %*
1	Высота растения	см	44,5	24,3	137,4	40,4
2	Число побегов 1-го порядка	шт.	16,2	6,4	22,5	34,8
3	Число побегов 2-го порядка	шт.	22,3	2,3	42,8	23,4
4	Длина листовой пластинки	см	5,4	1,2	14,4	31,1
5	Ширина листовой пластинки	см	3,8	0,7	6,2	27,7
6	Число листьев	шт.	445,1	166,3	1748,4	38,3
7	Масса растения (70% влажности)	г	165,3	74,7	819,7	35,5
8	Продолжительность вегетационного периода (от посадки до цветения)	дни	58,7	43,7	123,3	28,9

*Cv, % – уровень варьирования признака.

Высокая амплитуда изменчивости отмечается и по другим морфологическим признакам в пределах вида, Большинство признаков имеет высокую и очень высокую степень изменчивости, что предполагает гибридогенное происхождение большинства изучаемых коллекционных образцов рода *Ocimum*L. Коэффициенты вариации показателей отдельных морфологических признаков (в пределах от 34,3 до 59,8), говорят о потенциальных возможностях вида для целей селекции.

В растениях базилика в период роста и развития изменяется количество эфирного масла и его компонентный состав [1, 4], однако, предварительную оценку образцов на содержание эвгенола можно проводить и в ранний период на рассаде, готовой к высадке.

Количество желёзок на листьях базилика изучаемых образцов имеет очень высокую степень изменчивости. Максимальный коэффициент вариации по числу желёзок отмечен у образцов *O.basilicum* – базилика огородного, *O.menthaefolium* – мятнолистного, *O.sanctum* – священного. Высокий уровень варьирования количества желёзок у изучаемых видов указывает на достаточный запас генетической изменчивости и возможности для селекции базилика эвгенольного.

Таблица 4 – Количество маслосодержащих желёзок на нижней стороне листа среднего яруса растения

№ п/п	Вид, разновидность	Кол-во образцов	Количество желёзок (шт. на 1 см ²)			
			среднее	min	max	Cv, %*
1	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	7	674	290	1786	29,8
2	<i>Ocimum canum</i> Sims.	7	462	276	863	34,9
3	<i>Ocimum viride</i> Wiedl.	6	306	120	678	48,2
4	<i>Ocimum sanctum</i> L.	6	361	187	780	51,4
5	<i>Ocimum americanum</i> L.	6	304	96	587	43,7
6	<i>Ocimum minimum</i> Sims.	5	458	277	790	34,3
7	<i>Ocimum menthaefolium</i> Hoc.	5	426	264	743	57,3
8	<i>Ocimum kilimanqaricum</i> L.	3	398	187	962	49,2
9	<i>Ocimum basilicum</i> L.	21	356,	143	863	59,9
10	Basikik	8	387	124	856	49,8

* Cv, % - уровень варьирования признака.

Выявлена положительная корреляция между уровнем накопления эфирного масла в растении и количеством желёзок ($R = 0,88$). По густоте расположения желёзок на листьях можно, с достаточной точностью для практических целей, судить о процентном содержании эфирного масла в растении.

Отобраны образцы с высоким содержанием эфирного масла и эвгенола в масле, перспективные и по другим хозяйственно ценным признакам, для дальнейших исследований.

Газохроматографический анализ эфирного масла, полученного из образцов эвгенол содержащих видов, на компонентный состав показал большое разнообразие (табл. 5).

Таблица 5 – Коллекционные образцы с высоким содержанием эфирного масла и эвгенола в масле

№ п/п	№ ** по каталогу	Вид, разновидность	Содержание эфирного масла, %		Содержание эвгенола в эфирном масле, %
			в свежем сырье (70% влажности)	в абсолютно сухом сырье	
1	94	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	0,5137	2,0035	72,8
2	97	<i>Ocimum canum</i> Sims.	0,4528	0,9123	59,4
3	98	<i>Ocimum canum</i> Sims.	0,3486	1,3478	28,1
4	11	<i>Ocimum viride</i> Willd.	0,2188	0,6567	36,3
5	61	<i>Ocimum sanctum</i> L.	0,1473	0,4021	42,3
6	16	<i>Ocimum americanum</i> L.	0,1342	0,3987	22,4
7	17	<i>Ocimum menthaefolium</i> Hoc	0,3034	0,6877	32,8
8	91	<i>O. basilicum</i> var. <i>minimum</i>	0,1763	0,4893	42,3
9	64	<i>O. basilicum</i> var. <i>anisatum</i>	0,1348	0,4684	12,2
10	79	<i>O. basilicum</i> var. <i>georgicum</i>	0,1673	0,5368	28,8
11	109	<i>O. basilicum</i> var. <i>album</i> Bent.	0,1577	0,4366	17,6
12	90	<i>O. basilicum</i> var. <i>purpurescen</i>	0,1342	0,4005	23,4
13	61	<i>Ocimum basilicum</i> L.	0,3288	0,9893	68,4
14	72	<i>Ocimum basilicum</i> L.	0,3842	0,8734	63,3

** Временный номер по каталогу ВИР.

Предварительно выделенные эвгенол содержащие образцы, с хозяйственно ценными признаками, подвергались более детальному химическому анализу на современном оборудовании, что позволило подразделить виды и разновидности базилика на четыре группы:

- 1 – образцы, не содержащие эвгенол;
- 2 – с низким содержанием (5-20%) эвгенола;
- 3 – со средним (25-50%) содержанием;
- 4 – с высоким (более 50%) содержанием эвгенола в эфирном масле.

Хроматографический анализ эфирного масла, полученного из образцов эвгенол содержащих видов, на компонентный состав показал большое разнообразие. Встречаются и промежуточные типы, синтезирующие эфирные масла с различным набором составляющих компонентов. Часто два морфологически идентичные образца содержат разное количество эфирного масла совершенно различных по компонентному составу. Это возможно обусловлено не только генетически, но и влиянием стадии вегетации, климатическими, почвенными и другими условиями.

Заключение

Ocimum L. – полиморфный род, включает несколько эвгенол содержащих видов, разновидностей, гибридов и рас, способных к синтезу различных типов эфирных масел с изменённым компонентным составом.

На основании комплексной оценки коллекции, выделены скороспелые, более холодостойкие и устойчивые к заболеванию фузариозом эвгенол содержащие образцы для селекции высокопродуктивных сортов базилика эвгенольного, пригодных для природно-климатических условий Краснодарского края и Адыгеи. Род *Ocimum* L. обладает большим генетическим потенциалом и может служить ценным исходным материалом для селекции.

Литература:

1. Бородкин А.С., Гиренко М.М. и др. Изменчивость признаков и внутривидовая типизация базилика *Ocimum basilicum* L. // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1982. Т. 72, вып. 3. С. 69-78.

2. Иванова К.В. Исходный материал, селекция и семеноводство малораспространенных овощных культур // Методика селекции и семеноводства овощных культур. 1964. С. 303-306.

3. Иванова К.В., Гиренко М.М. и др. Методические указания по изучению коллекции малораспространенных овощных культур. Л., 1968. 14 с.

4. Ильченко Г.Н., Берёзкин Н.Г. и др. Изменение количества и состава эфирного масла по мере роста и развития базилика эвгенольного // Вестник Адыгейского государственного университета. 2013. Вып. 4(125). С. 52-56.

5. Канделаки Г.В. К ботаническому изучению *Ocimum basilicum* L. // Труды Тбилисского ботанического института. №22. Тбилиси. 1962. С. 43-58.

6. Нестеренко П.А., Книшевецкая Т.М. и др. Евгенольный базилик *Ocimum gratissimum* L. М.-Л.: Пищепромиздат. 1939. 86 с.

7. Шабалина А.Э. Разработка и совершенствование методов стандартизации стоматологических средств и материалов, содержащих эвгенол: автореф. дис. канд. хим. наук. М., 2008. 20 с.

8. Guillaumin A. Les ocimuma essence. Bull des sciencesPharmacologues. Vol.38. Paris, 1930. P. 46-57.

References:

1. Borodkin A.S., Ghirenko M.M. [and others]. Variability of properties and intraspecific typing of *Ocimum basilicum* L. basil // Bulletin of applied botany, genetics and breeding. 1982. V. 72. Iss. 3. P. 69-78.

2. Ivanova K.V. The raw material, selection and seed- breeding of rare vegetable crops // Methods of breeding and seed production of vegetable crops. 1964. P. 303-306.

3. Ivanova K.V., Ghirenko M.M. [and others]. Guidelines for the study of the collection of rare vegetable crops. L., 1968. 14 p.

4. Ilchenko G.N., Berezkin N.G. [and others]. Changing the number and composition of the essential oil during the growth and development of eugenol basil // Herald of Adygh State University. 2013. Iss. 4 (125). P. 52-56.

5. Kandelaki G.V. On the botanical study of *Ocimum basilicum* L. // Proceedings of the Tbilisi Botanical Institute. № 22. Tbilisi, 1962. P. 43-58.

6. Nesterenko P.A., Knishevetskaya T.M. Eugenol basil *Ocimum gratissimum* L. М.-Л.: Pishchepromizdat, 1939. 86 p.

7. Shabalina A.E. Development and improvement of methods of standardization of dental products and materials containing eugenol: abstr. dis. ... Cand. of Chemistry. М., 2008. 20 p.

8. Guillaumin A. Les ocimuma essence. Bull des sciencesPharmacologues. Vol. 38. Paris, 1930. P. 46-57.