

УДК 577.391; 539.12.04

**ЛОКАЛЬНЫЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ АДРОНОВ
ВЫСОКИХ ЭНЕРГИЙ СЕРПУХОВСКОГО УСКОРИТЕЛЯ ПРОТОНОВ
НА СЕМЕНА *ZEA MAYS L.* ПРИ ИХ ПРОРАСТАНИИ
В ОТКРЫТОМ ГРУНТЕ**

Кожокару А.Ф., Юров С.С.

*ФГБУН «Институт биофизики клетки РАН», Московская область,
Пушино, e-mail: aurelium@inbox.ru*

Был изучен онтогенез растений кукурузы *Zea mays L.* в F_1 поколении, выращенных в открытом грунте из семян, облученных высокими ингибирующими дозами $3 \cdot 10^3$ – $8 \cdot 10^4$ Гр адронов высоких энергий (АВЭ) вторичного хронического излучения Серпуховского ускорителя протонов. Ряд адронных морфогенетических биологических эффектов вегетативного (высота растения) и генеративного (длина и количество ветвей соцветия) характера коррелировал с дозами облучения. Ряд вегетативных (длина межузловых расстояний стебля и 1-го листа от корня) и сформированных генеративных (длина и количество початков) признаков имел значения, укладывающиеся в куполообразную зависимость от дозы АВЭ. Обнаружены локальные адронные биологические эффекты в онтогенезе растений, поскольку величины морфогенетических эффектов АВЭ отклонялись от их значений на среднестатистических кривых доза – эффект. Эти эффекты обусловлены крайней анизотропией пространственного распределения АВЭ и, следовательно, различной биологической эффективностью воздействия АВЭ.

Ключевые слова: адроны высоких энергий, облученные адронами семена растений, локальный адронный биологический эффект, онтогенез первого F_1 поколения, открытый грунт

**LOCAL MORPHOGENETIC EFFECTS OF SERPUKCHOV PROTON
ACCELERATOR OF HIGH ENERGY HADRONS ON SEEDS
ZEA MAYS L. DURING ITS GERMINATION IN OPEN GROUND**

Cojocar A.F., Urov S.S.

*Federal state budget scientific establishment Institute of cell biophysics,
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, e-mail: aurelium@inbox.ru*

It was studied ontogenesis of maize *Zea mays L.* plants in F_1 generation growing in open ground from seeds which were irradiated by high energy hadrons (HEN) of Serpukhov proton accelerator second chronic irradiation in high inhibiting doses $3 \cdot 10^3$ – $8 \cdot 10^4$ Gr. One hadron morphogenetic biological effects row of vegetative (plant height) and generative (length and quantity of branches in flower collection) character correlated with radiation doses. Another row of vegetative (length of distances between stem knots and of the first leaf from the root) and formed generative (length and quantity of corn ears) signs has values corresponding to dome-formed dependence from the HEN dose. The local hadron biological effects in plant ontogenesis were revealed because magnitudes of morphogenetic HEN effects were deviated from its signs on middle-statistical curves dose – effect. These effects are conditioned by very large anisotropy of space HEN distribution and therefore by different biological effectiveness of HEN action.

Keywords: high energy hadrons, plant seeds irradiated by hadrons, local hadron biological effect, ontogenesis of the first F_1 generation, open ground

Проблемы общей радиобиологии электромагнитных излучений (ЭМИ) семян и растений достаточно хорошо изучены, менее исследованы эти проблемы в космической радиобиологии в условиях космических полетов (КП) на орбитальных станциях и в модельных экспериментах на Земле. Такие исследования имеют теоретическое значение, поскольку позволяют выявить механизмы действия факторов КП и пострadiационного восстановления растений (решить проблемы репарации), в значительной степени определяющих их радиоустойчивость и радиочувствительность. Большое значение имеет изучение вопросов стимуляции роста и развития растений, изменений, касающихся как биохимического обмена, так и генетического аппарата. Данные актуальные исследования

также имеют практическое значение в связи с тем, что проросшие семена и растения являются важнейшими источниками питания, витаминов и образования кислорода при длительных полетах на борту космического корабля, повышающими сопротивляемость организма к вредным воздействиям и заболеваниям. Подобные исследования могли бы помочь найти пути практического преодоления несовместимости при скрещивании и гибридизации растений, пути адаптации и селекции новых сортов и подвидов растений на Земле и в космосе. Растения и семена являются удобным, неприхотливым и недорогим тест-объектом целого организма, позволяющим проводить серийные исследования на Серпуховском ускорителе протонов У-70 (коллайдере) и в космическом полете.

Основными физическими факторами космического полета (ФФКП) являются невесомость, вибрация, ускорение, ЭМИ, а также излучение нового типа, исходящее от ядерных частиц – адронов высоких энергий (АВЭ), исследованных нами [1, 5, 8]. Была обнаружена в значительной степени низкая репарбельность генетических и соматических повреждений, индуцированных ФФКП. Космические излучения вызывают ряд специфических мутаций, приводящих к значительным изменениям живых организмов, как на микро, так и на макро биологическом уровнях [1, 4, 6]. Микролокальные изменения проявляются как генетические эффекты – хромосомные aberrации, делеции, изолюкусные разрывы, транслокации, встречаются эти мутации, однако, с очень небольшой частотой. На кораблях типа «Восток» и «Восход» были обнаружены также особые типы цитогенетических нарушений (многоядерные полиплоидные клетки, сферические фрагменты хромосом, клетки разной формы) и изменения расположения ядра в объеме клеток, приводящее к изменению генетической активности различных кластеров генов и снижению адаптационных возможностей живых организмов [3]. Макролокальные, крупные (очаговые) нарушения тканевых структур организмов, проявляющиеся как морфологические изменения тканей (регистрируемые также с очень низкой частотой), связывают с действием ядерных частиц – сверхжестких АВЭ космоса [8, 9]. У семян томатов, побывавших в космическом полете, нами обнаружены множественные повреждения клеточных структур [8]. Отмечается недостаточная повторяемость результатов и иногда их резкое различие, когда в одной части биоматериала наблюдались генетические эффекты, а в другой – нет. Необходимо было выявить фактор, ответственный за разброс данных. Нами был проведен сравнительный анализ действия ионизирующих факторов космического пространства – ЭМИ, АВЭ, γ -излучения и тяжелых заряженных частиц [4, 5, 8]. Было выяснено, что для излучения АВЭ характерны локальные адронные биологические эффекты (ЛАБЭ), на порядки изменяющие выживаемость и показатели мутагенеза отдельных биообъектов [1, 9]. ЛАБЭ был показан нами на примере очень низкой выживаемости бактериофага в 2% образцов при 375 Гр [1].

Сходный характер энергетических спектров адронов в поле вторичного излучения ускорителя протонов и космического излучения позволяет моделировать биологические эффекты жесткого космического излучения на ускорителе [2, 5, 10]. Иссле-

дование действия адронных биологических эффектов и средств защиты от них [4, 5, 7] необходимо для определения и обеспечения норм безопасности людей, работающих с излучениями высоких и сверхвысоких энергий (на ускорителях, космических орбитальных станциях, АЭС).

Цель исследования: выявление морфогенетических эффектов вторичного излучения Серпуховского ускорителя протонов У-70 на семена кукурузы *Zea mays* L. при их прорастании в открытом грунте, в онтогенезе первого поколения (F_1) растений, выращенных из этих семян. Предварительные результаты работы были доложены на VI Съезде по радиационным исследованиям [10], а также на Весенней Сессии РАЕ [6].

Материалы и методы исследования

Биологические исследования проводили в поле воздействия вторичного излучения от протонов 70 ГэВ, генерируемого в районе главной мишени, для которого возможно получить высокие дозы при предельно большом вкладе заряженных и незаряженных адронов высоких энергий в полный поток частиц. Была выбрана линия, соответствующая нулевому углу вылета адронов из мишени («нулевая линия»). Биологические объекты размещались как вдоль нее на разном расстоянии от мишени (1–6 м), так и поперек линии (2 образца) таким образом, чтобы обеспечить при одновременном облучении нужные вариации доз. Оценочные вычисления показали, что АВЭ по спектру энергий в этом районе находятся в диапазоне 10–40 ГэВ (средняя по спектру энергия нейтронов – 47 ГэВ, протонов – 5 ГэВ, пионов – 3,5 ГэВ) за минуту [4]. Помимо адронов в местах облучения имеются нейтроны с энергией менее 20 МэВ, лептоны и фотоны. Вместе с каждым биообъектом устанавливались активационные детекторы, а в одной из точек находилась также тканезквивалентная ионизационная камера.

Однократное, хроническое облучение семян *Zea mays* L. со средней влажностью 11% проводили в начале апреля 2009 г. в полиэтиленовых мешочках в количестве 50 шт. в каждом. Биообъекты фиксировались липкой изолентой вдоль «нулевой линии». На ускорителе проведено 3 сеанса облучения с продолжительностью экспозиции 30 сут. Сухие семена, облученные на ускорителе и контрольные, высевали в открытый грунт. Посев проводили на глубине 10–15 мм с расстоянием между семенами 10 см. Анализ проводили в течение всего онтогенеза F_1 поколения по морфогенетическим признакам формирующегося растения. На каждую дозу в полевых условиях были исследованы показатели 2–3 растений. Для необлученного контроля приводятся усредненные данные для трех растений, разброс данных был незначителен по критерию Стьюдента. Значения точек контроля на рисунках совпадают для опытной и среднестатистической кривой, нулевое значение контроля не учитывать на рис. 2–6. Был исследован районированный на севере Молдавии в Единецком районе особый сорт семян кукурузы сорта «Ханган» с достаточно высокой устойчивостью к внешним неблагоприятным климатическим условиям и облучению, по сравнению с другими сортами кукурузы и другими видами семян.

**Результаты исследования
и их обсуждение**

1. Общая высота растений. Данный показатель был выбран для первичного анализа биологического действия АВЭ, т.к. этот признак учитывает общее состояние проростков и растений.

На рис. 1 представлена зависимость высоты растений *Zea mays* в их онтогенезе при однократном, хроническом воздействии различных доз адронного излучения на семена. При дозе $3 \cdot 10^3$ Гр высота растения кукурузы составляла 80 см (54,4%), при снижении дозы АВЭ до $8 \cdot 10^1$ Гр – 140 см (94,4%), в контроле (без облучения) – 150 см (100%). Следовательно, с увеличением дозы адронного воздействия увеличивается его ингибирующий эффект. Следует отметить, однако, наличие на представлен-

ном графике «выбросных» точек – сильного ингибирования роста (растения № 7 и 11) и точек существенной стимуляции (растения № 4, 6 и 10) по сравнению с точками среднестатистической корреляционной кривой. Выбросным точкам высоты растений, которые получили значительно более высокую дозу по расчету, чем на среднестатистической кривой ($3 \cdot 10^3$ Гр против $8 \cdot 10^2$ и $3 \cdot 10^3$ Гр против $2 \cdot 10^2$ Гр), соответствовало увеличение относительной биологической эффективности (ОБЭ) от 3,7 до 15 и более. Присутствие выбросных точек на графике свидетельствует об отсутствии корреляционной зависимости эффекта адронного излучения от дозы в этих точках, что связано с особенностями действия адронного излучения – наличием ЛАБЭ.

2. Количество метелок (ветвей) в соцветии представлено на рис. 2.

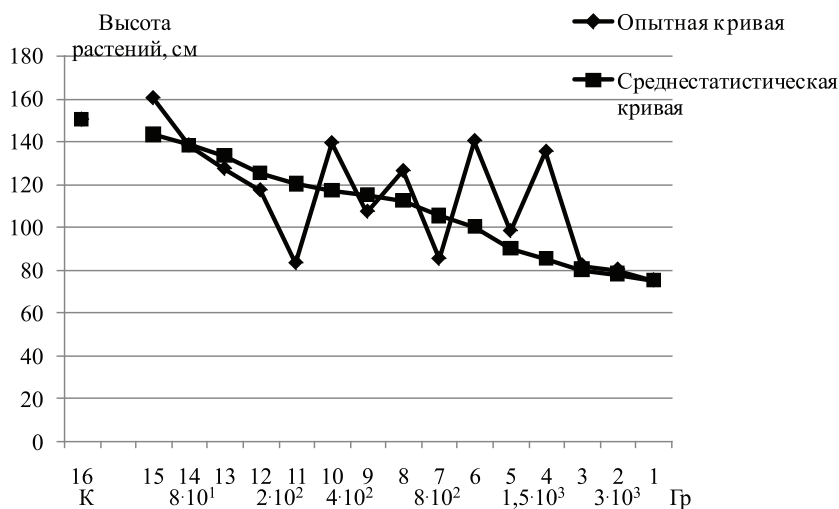


Рис. 1. Зависимость высоты растений *Zea mays* L. от дозы адронного воздействия Серпуховского ускорителя протонов 70 ГэВ

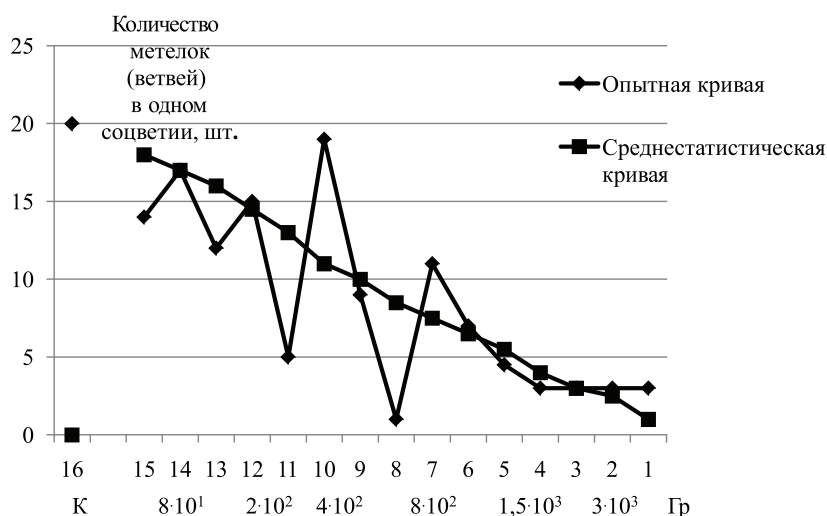


Рис. 2. Дозовая зависимость количества метелок (ветвей) в одном соцветии растений *Zea mays* L. в F_1 поколении от дозы адронного воздействия

Этот показатель, по сравнению с предыдущим, уже является чисто генетическим, т.к. именно в этом органе образуются и созревают мужские гаметы (пыльца) – споры. Последующее опыление (оплодотворение) ими яйцеклеток с помощью рылец и есть процесс F_1 и начало F_2 поколения, что особенно важно при анализе изучения влияния адронного излучения. Из представленного рисунка закономерно выявляется тот же характер дозовой зависимости индукции метелок-ветвей: по сравнению с контролем относительно небольшие дозы $8 \cdot 10^1$ Гр незначительно снижают выход у растений генеративных органов, а с дозы $2 \cdot 10^2$ до $3 \cdot 10^3$ Гр идет резкое снижение количества метелок (ветвей) до двух у одного растения. Одновременно наблюдается ряд локальных выбросных то-

чек, как и на рис. 1. При дозе $2 \cdot 10^2$ Гр количество метелок у растения № 11 составило лишь 5 шт. вместо прогнозируемых 12 по общей корреляционной среднестатистической кривой, а при дозе $8 \cdot 10^2$ Гр – 1 шт. вместо 9. При дозе $4 \cdot 10^2$ Гр наблюдается выпадающая экспериментальная точка, но уже не угнетающего характера, а ярко выраженной стимуляционной природы. Таким образом, в данных результатах вновь выявляется действие ЛАБЭ как угнетающего, так и стимулирующего характера, когда величина эффекта не полностью коррелирует с его значениями на среднестатистической кривой и с полученной дозой, являющейся ингибирующей по отношению к контролю.

3. Высота соцветий представлена на рис. 3.

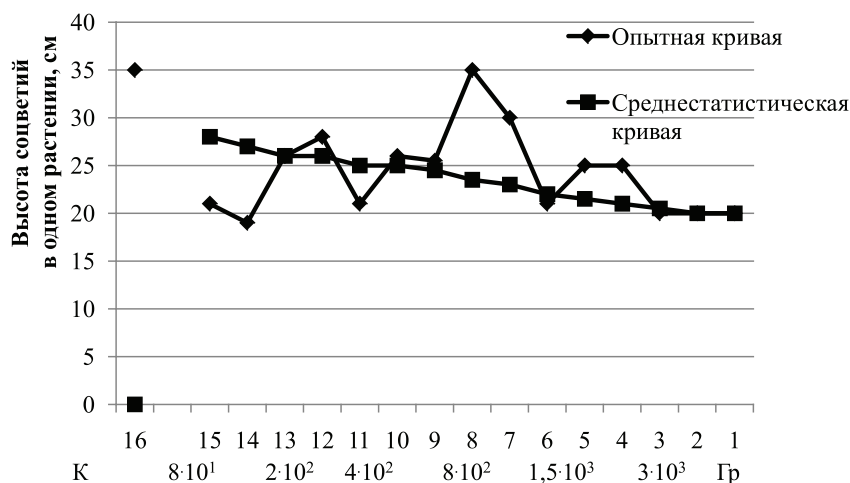


Рис. 3. Зависимость высоты соцветий в одном растении *Zea mays* L. от дозы адронного воздействия

Экспериментальный анализ изменений высоты соцветий *Zea mays* показал сходную дозовую зависимость, что и при анализе количества метелок – увеличение ингибирующего эффекта АВЭ с увеличением дозы облучения, однако эта корреляционная зависимость менее выражена при меньших дозах (наблюдается большее ингибирование). Имеются также и выпадающие точки, соответствующие ЛАБЭ. Следует отметить, что у растения № 8 одновременно обнаруживается как угнетающий (рис. 2), так и стимулирующий локальный биологический эффект адронного воздействия (рис. 3), т.е. произошло генетическое изменение по двум изучаемым признакам.

4. Междоузловые расстояния пазушных листьев различных ярусов стебля *Zea mays*.

На рис. 4 представлены данные по адронным биологическим эффектам на величину первого междоузловым расстояния (МР), начиная от корня.

На рис. 4 видно, что зависимость величин 1-го МР, измеренных от корня, от дозы облучения носит куполообразный характер, при этом по мере удаления МР от гипокотилия влияние облучения уменьшается (на рис. 2–4-ое расстояния МР не приводятся). Для двух растений № 9 и 11 при дозе излучения $4 \cdot 10^2$ и $2 \cdot 10^2$ Гр обнаружены высокие ЛАБЭ, что проявляется по уменьшению МР до низкого значения 1 см. Такое же резкое угнетение наблюдается у этих растений по 2-му, 3-му и 4-му междоузловым расстояниям стебля от корня (на рисунке не показано). Следовательно, адроны способны индуцировать не только точечные мутации, но и сложные комплексные структурно наследуемые изменения, закрепленные в генотипе *Zea mays* (изменения типа делеций – коротких, средних и протяженных) и проявляющиеся в процессе онтогенеза в фенотипе F_1 поколения.

5. Индукция роста початков *Zea mays*. Графические материалы по данному признаку представлены на рис. 5.

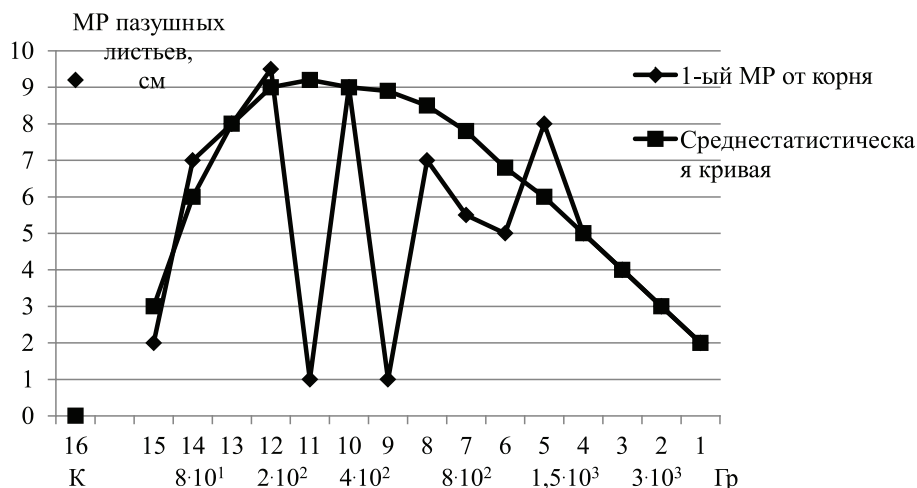


Рис. 4. Дозовая зависимость междуузловых расстояний пазушных листьев различных ярусов стебля растений при адронном облучении семян *Zea mays*. Приводятся опытная и среднестатистическая кривые для 1-го MP от корня

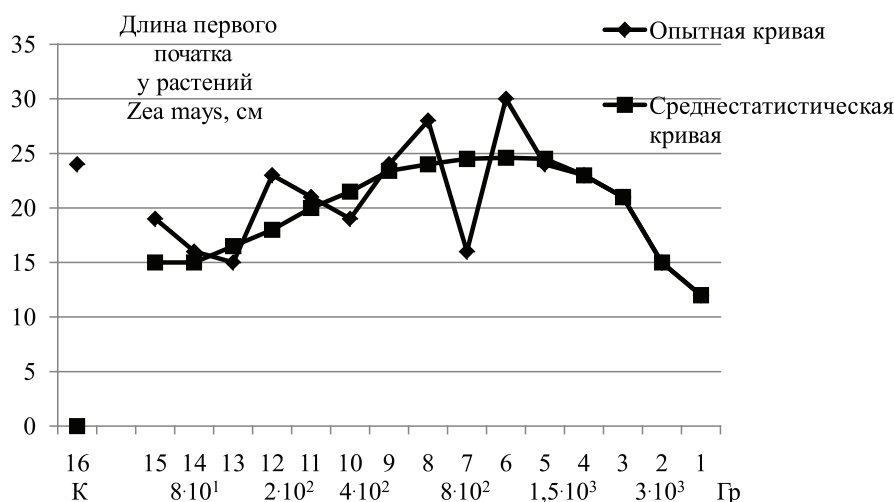


Рис. 5. Зависимость длины початка *Zea mays* L. от дозы адронного воздействия

Как и в случае влияния различных доз АВЭ на длину межузлового сегмента стебля, зависимость длины початков от дозы адронного излучения также имеет куполообразную форму и выбросные точки. Оптимум индукции (стимуляции) находится в пределах от $4 \cdot 10^2$ до $1,5 \cdot 10^3$ Гр, а при дальнейшем увеличении доз от $1,5 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^3$ Гр наблюдается уменьшение длины початков у исследуемых растений. Также как и ранее, находим сниженную выбросную адронную точку по изучаемому биообъекту, т.е. наблюдается ЛАБЭ при смешанной дозе адронного и радиационного излучений $8 \cdot 10^2$ Гр у растения № 7. Экстраполяция данной выбросной точки локального биологического эффекта (по угнетению) приводит к возможной дозе, равной $2 \cdot 10^3$ Гр, которая в 2,5 раза более

эффективна рассчитанной дозы. Стимуляция локального характера характеризуется увеличением длины початка на 4 и 6 см у растений № 8 и 6 при дозе $8 \cdot 10^2$ Гр по отношению к соответствующему значению на среднестатистической кривой и, в данном случае, по отношению к контролю. Стимулирующий эффект характеризуется величиной ОБЭ в 3,7 и составляет 17 и 25%, соответственно.

6. Формирование материнских генеративных органов (початков). На рис. 6 представлена зависимость количества образованных в процессе онтогенеза початков от дозы адронного излучения. Как и ранее, обнаруживаются выбросные точки, связанные с ЛАБЭ, в данном случае, угнетающего характера (растения № 5, 8, 9 и 11) при дозах $2 \cdot 10^2$ – $1,5 \cdot 10^3$ Гр и стимулирующего

(растение № 4) – при дозе облучения в области $1,5 \cdot 10^3$ Гр), по отношению к соответствующим значениям на среднестатистиче-

ской кривой. Истинное стимулирование на единицу по отношению к контролю имелось только у одного растения № 4.

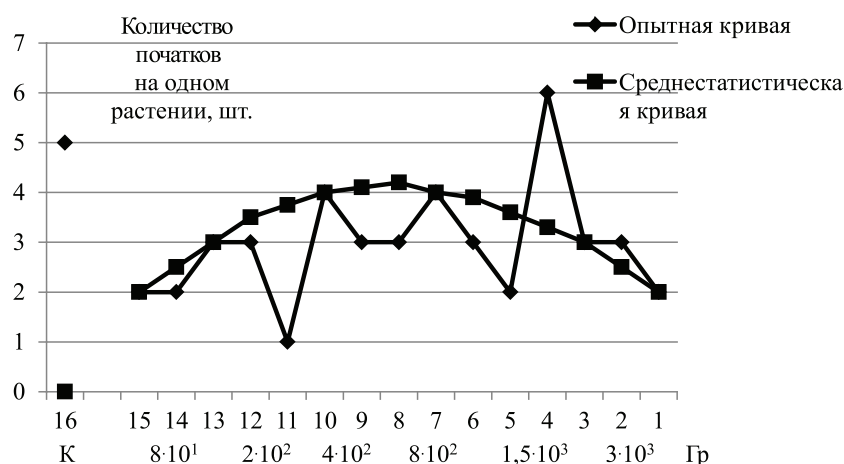


Рис. 6. Зависимость количества початков *Zea mays* L. от дозы адронного воздействия

Заключение

Несмотря на значительные успехи современной радиационной биологии и космической физики, проблемы биологического и радиационно-химического действия АВЭ остаются пока полностью нерешенными. Анализ имеющихся экспериментальных и теоретических работ показывает, что большинство из них посвящено изучению действия АВЭ только на биологические молекулы, бактериофаги, бактерии и клетки. Биологическое действие АВЭ на целые организмы изучено недостаточно. Для большинства экспериментальных работ характерны недостатки, связанные с методикой и физико-дозиметрическим обеспечением исследований, а также с отсутствием теоретических работ, в которых использованы адекватные модели описания процесса торможения АВЭ в биологической ткани. Имеющиеся в литературе сведения о биологическом и радиационно-химическом действии АВЭ носят лишь качественный характер, и изучение количественных закономерностей поглощения энергии в биологической среде, действия АВЭ на макромолекулы и клетки, на целый организм (семена и растения), определение ОБЭ являются актуальными задачами современной космической радиобиологии.

Впервые нами были выявлены морфогенетические изменения проростков семян и высших растений *F*₁ поколения *Zea mays* L. в открытом грунте, индуцируемые сильным типом воздействий высоких доз ($8 \cdot 10^1$ – $3 \cdot 10^3$ Гр) вторичного излучения ядерных частиц – адронов высоких энер-

гий Серпуховского ускорителя протонов на семена. Первично АВЭ воздействовали на семена *Zea mays*, затем их воздействие на завязь семян проявлялось в процессе роста проростков в онтогенезе растений. Анализ экспериментальных результатов обнаружил наличие среднестатистической дозовой корреляционной зависимости индукции роста растений угнетающего характера: для одного вегетативного признака – высоты растения и двух генеративных признаков – количества метелок в соцветии и высоты соцветий. По двум признакам, связанным с вегетативными органами растения, непосредственно образованным из завязи, наблюдалась куполообразная дозовая зависимость: по длине 1-го от корня межузловое расстояние и длине первого листа. При куполообразной кривой зависимости уже относительно невысокие дозы АВЭ оказывали сильное ингибирующее действие – более сильное, чем должно было бы быть исходя из корреляционной линейной зависимости доза-эффект, что можно объяснить в данном случае первичным действием излучения АВЭ на клетки зародыша семян. К воздействию малых доз оказались более чувствительными также показатели, касающиеся сформировавшихся генеративных органов – длины и количества початков. В данном сообщении приводятся данные величин локальных адронных биологических эффектов, не полностью коррелирующих с полученной дозой облучения адронов вследствие проявления локального радиационного фактора (ЛРФ) и отклоняющихся от значений среднестатистической кривой. ЛАБЭ появляются

вследствие специфического свойства адронов: обладая свойством вступать в сильные взаимодействия, они образуют узкий пучок вторичных частиц с крайней анизотропией их пространственного распределения и, следовательно, с различной эффективностью своего специфического воздействия. Адронные (сильные) взаимодействия являются одной из основных характеристик локального адронного эффекта, для которого характерны также: множественная генерация вторичных частиц, среди которых преимущественно присутствуют адроны; весьма малое угловое распределение треков образующихся частиц, тоже преимущественно адронов; возможность расщепления ядра любого химического элемента биологических молекул. Мы полагаем, что АВЭ наряду с другими видами космических излучений участвовали в образовании множества (хаоса) новых химических элементов и молекул в отсутствие атмосферы и, таким образом, способствовали зарождению из них жизни на Земле [4–6, 8]. Впоследствии, при наличии атмосферы, радиоактивный фон и вторичное биогеенное излучение (информационный фактор) могли бы способствовать формированию структурированности и метаболизма живых организмов. Исходя из представленных опытов, поражающее действие АВЭ на завязь семян растений обусловлено мутационными изменениями ДНК клеточного ядра. Возможно, действие АВЭ, таким образом, способствовали видообразованию и эволюции жизни на Земле. АВЭ характеризуются новым физическим механизмом повреждения биологических структур: они опасны тем, что в результате воздействия АВЭ образуется каскад различных атомов и атомных частиц в макромолекулах, что приводит к более эффективным биологическим и радиационно-химическим эффектам, чем другие ионизирующие излучения и процессы возбуждения молекул. При длительных полетах космические корабли должны иметь «магнитный пояс» и особый тип изолирующих материалов, способных защитить космонавтов от действия АВЭ, обладающих высокой проникающей и разрушительной способностью.

Адронный ЛРФ обладает выраженными специфическими особенностями по сравнению с электромагнитным типом взаимодействия (свет, ультрафиолетовое излучение, γ -радиация), хотя электромагнитные волны внутренне присущи адронному взаимодействию как результат их вторичного происхождения.

Список литературы

1. Акоев И.Г., Юров С.С., Леонтьева Г.А. и др. Действие адронов высоких энергий на выживаемость бактерий *E.coli* и бактериофага T4Br⁺ // Радиобиология. – 1974. – Т. 14. – С. 374–377.
2. Головачик В.Г., Лебедев В.Н., Маслов М.А. Моделирование сверхжесткого компонента космического излучения на Серпуховском ускорителе протонов. // Проблемы космической биологии. – Ленинград: Наука, 1989. – Т. 60. – С. 45–59.
3. Делоне Н.Л. У времени в плену. Записки генетика. – М., Росс. гуманист. общество, 2010. – 224 с.
4. Дмитриевский И.М., Юров С.С., Кожокару А.Ф., Нечитайло Г.С. Механизмы действия ионизирующих излучений при возникновении локальных изменений биологических клеточных структур в условиях космического полета. // Современные проблемы науки и образования. – 2008. – № 5. – С. 7–17.
5. Кожокару А.Ф., Юров С.С. Генетические, биохимические и физиологические механизмы радиозащитной эффективности природных антиоксидантов и действия космического адронного и γ -излучений при их моделировании. // Современные наукоемкие технологии. – 2011. – № 1. – С. 11–17.
6. Кожокару А.Ф., Юров С.С. Исследование морфогенетических изменений семян при облучении адронами высоких энергий Серпуховского ускорителя протонов и гамма-радиацией. // Международный журнал экспериментального образования. – 2012. – № 6. – С. 14–15.
7. Моргун В.В., Якимчук Р.А. Мутагенная активность радионуклидных загрязнений в зоне аварии на ЧАЭС. // Физиология и биохимия культурных растений. – 2011. – Т. 43. – № 4. – С. 21–28.
8. Юров С.С., Кожокару А.Ф., Дмитриевский И.М., Нечитайло Г.С. Генетико-физиологические и физико-химические исследования *Licopersicon esculentum* Mill, выращенных из семян, экспонированных в длительном, космическом полете. // Современные проблемы науки и образования. – 2008. – № 5. – С. 24–30.
9. Юров С.С., Ливанова И.А., Смирнова Е.Н. и др. Генетические локальные эффекты космической радиации на бактериофаг T4Br⁺ (эксперимент «Биоритм»). // Успехи космической биофизики. –Пушино, ОНТИ БНЦ г. Пушино, 1978. – С. 38–44.
10. Юров С.С., Кожокару А.Ф., Мыслик А.И. и др. Генетические эффекты, индуцируемые у семян *Zea mays* L адронами высоких энергий Серпуховского ускорителя протонов. // Тезисы докладов VI Съезда по радиационным исследованиям. – М., 2010. – Т. II (секция X). – С. 136.