

安祖花细菌性疫病的 Nested-PCR 检测

孟 鹤¹, 金茂勇², 肖橘清², 张宝珠², 明 军¹, 袁素霞¹, 刘 春^{1,*},
张 宁³

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 北京市大兴区苗圃, 北京 102601; ³ 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

摘 要: 根据基因库中已发表的安祖花细菌性疫病致病菌粉黛黄单胞杆菌(*Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*) 基因序列设计引物 XcF₁/XcR₁、XcF₂/XcR₂, 通过扩增条件优化, 建立了安祖花细菌性疫病的 Nested-PCR 检测方法, 可以直接从感染细菌性疫病的安祖花组织 DNA 中扩增出 1 条 343 bp 的特异性条带。分析表明该序列完全存在于 GenBank 登录的 *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* 序列 X70380.1 中。通过对安祖花植株进行 Nested-PCR 扩增, 在植株不同部位均检测到了 343 bp 的特异性条带, 且病原菌在植株中分布不均匀, 其中老叶叶柄中扩增强度最高, 根茎连接处、老叶、嫩叶柄、嫩叶、佛焰苞柄扩增强度次之, 根、佛焰苞和花序中扩增最弱。

关键词: 安祖花; 细菌性疫病; 粉黛黄单胞杆菌; Nested-PCR

中图分类号: S 682.1⁺4

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 10-2017-06

Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* on *Anthurium andraeanum* by Nested-PCR

MENG He¹, JIN Mao-yong², XIAO Ju-qing², ZHANG Bao-zhu², MING Jun¹, YUAN Su-xia¹,
LIU Chun^{1,*}, and ZHANG Ning³

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² Beijing Daxing Nursery, Beijing 102601, China; ³ College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: A Nested-PCR method was developed to detect the bacterial pathogens of *Anthurium andraeanum* by using two sets of specific primers designed according to *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* gene sequences. All samples infected by *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* could be amplified by Nested-PCR, yielding one special band with size of 343 bp. The amplified sequences were presented in the *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* sequence X70380.1 in GenBank. *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* was detected by Nested-PCR from different parts of *Anthurium andraeanum*, and the distribution of pathogens in plants was uneven. Remarkably high amplification existed in old petioles, followed by stem-root joints, old leaves, young petioles, young leaves and spathe petiole, and the weakest amplification was in root, spathes and inflorescences.

收稿日期: 2011-05-30; 修回日期: 2011-09-29

基金项目: 中国农业科学院与北京市大兴区科技合作项目 (YLHH200900106); 北京市科技计划研发攻关项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: liuchun@mail.caas.net.cn)

Key words: *Anthurium andraeanum*; bacterial blight; *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*; Nested-PCR

安祖花 (*Anthurium andraeanum*) 为天南星科花烛属多年生草本植物。由细菌引起的安祖花疫病初期表现为叶片背部淡黄色水浸状污斑, 随后斑点呈棕黑色, 边缘发黄, 邻近组织枯萎黄化。病菌由输导组织进一步扩展, 传染到整个植株, 造成系统性感染, 最终导致植株死亡 (Norman & Alvarez, 1994a)。该病害严重制约安祖花的产业发展 (Norman & Alvarez, 1989; Priorp & Rott, 1989; 张荣意 等, 2003)。

安祖花细菌性疫病主要由单胞菌属中的粉黛黄单胞杆菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*) 引起 (Alvarez et al., 1994; Fukui et al., 1999a, 1999b), 靠接触、水溅和污染的灌溉水传播, 发展速度快, 死亡率高 (Kelaniyangoda & Wickramarathne, 2009), 可潜伏侵染, 在愈伤组织中可存活 4 个月以上, 在组培苗中可存活 1 年以上, 无任何症状, 并可通过组培苗的继代传播, 组培苗出瓶后潜伏期 3~6 个月, 一旦发病条件合适, 将大规模爆发 (Norman & Alvarez, 1994a; Fukui et al., 1996)。

目前, 还无有效方法防治粉黛黄单胞杆菌引起的安祖花细菌性疫病 (Isabelle et al., 2006), 通过早期鉴定去除携带病菌的种苗成为预防该病的主要方法。

国内外报道的检测安祖花细菌性疫病的方法主要有选择性培养基、鉴别寄主反应、血清学试验等 (Norman & Alvarez, 1989, 1994b; Lipp et al., 1992), 上述方法需将病原菌分离培养, 耗时长, 效率低且灵敏度不高; Isabelle 等 (2006) 利用 Nested-PCR 方法对粉黛黄单胞杆菌分离菌株进行检测, 灵敏度高, 但操作步骤复杂。

本试验的目的是建立直接利用植物组织 DNA, 通过 Nested-PCR 技术检测的方法, 在病症出现前能够快速、准确检测安祖花粉黛黄单胞杆菌引起的细菌性疫病, 为采取有效防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于2010年12月在中国农业科学院蔬菜花卉研究所完成。

具有粉黛黄单胞杆菌侵染症状的安祖花 ‘水晶花烛’ (*Clarinervium*) 和 ‘密西西比’ (*Mississippi*) 样品由中国农业科学院蔬菜花卉研究所收集和保存。

外表无感染症状的安祖花组培苗和植株为北京市大兴区苗圃提供的品种 ‘雨布’ (*Poncho*) 和 ‘阿拉巴马’ (*Alabama*)。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取安祖花总 DNA。将经冷冻干燥处理的安祖花植物组织放入已灭菌的研钵中, 加入液氮研磨后, 加入已预热 (65 °C) 的 2%CATB 缓冲液 650 μ L, 65 °C 水浴 1 h, 冷却至 15 °C 以下, 再加入等体积的 24:1 氯仿/异戊醇, 上下混匀 5 min, 13 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min。取上清液 400 μ L, 加入预冷的 700 μ L 的乙醇溶液于 1.5 mL 离心管中, 轻轻上下颠倒混匀, 4 °C 冰箱静置 60 min 以上。13 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 晾干, 加入 100 μ L H_2O (含 1 μ L RNase) 溶解 DNA, 37 °C 水浴 30 min 去除 RNA。然后利用紫外分光光度计和 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取的 DNA 纯

度。稀释 DNA 至所需浓度 (约 $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 于 -20°C 冰箱中保存待用。

1.2.2 引物设计与合成

根据 NCBI GenBank 收录的粉黛黄单胞杆菌基因序列 X70380.1, 应用 Primer Premier 5.0 设计软件设计其特异引物 XcF₁/XcR₁、XcF₂/XcR₂, 序列见表1。

表 1 粉黛黄单胞杆菌引物序列
Table 1 Primer sequences of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*

引物 Primer	上游引物 (5' - 3') Upstream primer	下游引物 (5' - 3') Downstream primer	产物大小/ bp Product size
一次PCR One-step PCR XcF ₁ /XcR ₁	CGGCGGTAATGAACCTTTG	ATCAACGACCCGAGTAGACG	1 086
Nested-PCR XcF ₂ /XcR ₂	CTTCATCTCCTCGGTTTCT	CAAGCTGTTCAATCGGGTCA	343

1.2.3 Nested-PCR 反应体系、扩增程序及电泳

对 Nested-PCR 的各引物浓度及 PCR 反应的变性、退火至延伸条件以及循环次数等进行优化, 确定扩增粉黛黄单胞杆菌最佳的反应模式为: 1 次 PCR 反应体系为 $20 \mu\text{L}$, 包括: *Taq* PCR buffer $4 \mu\text{L}$, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP Mixture $1.6 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物各 $0.6 \mu\text{L}$, $5 \mu\text{L}$ DNA, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ *Taq* 酶 $0.4 \mu\text{L}$ 。

经优化的 PCR 程序为: 94°C 预变性 5 min ; 94°C 变性 30 s , 56°C 退火 30 s , 72°C 延伸 90 s , 40 个循环; 再 72°C 延伸 10 min , 最后于 4°C 结束反应。

Nested-PCR 反应体系为 $20 \mu\text{L}$, 包括: *Taq* PCR buffer $4 \mu\text{L}$, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP Mixture $1.6 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物各 $0.6 \mu\text{L}$, $2 \mu\text{L}$ 一次 PCR 产物, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ *Taq* 酶 $0.4 \mu\text{L}$ 。

经优化的 PCR 程序: 94°C 预变性 5 min ; 94°C 变性 30 s , 58°C 退火 30 s , 72°C 延伸 40 s , 35 个循环; 再 72°C 延伸 10 min , 最后于 4°C 结束反应。

在 PCR 扩增仪上进行扩增, 进行琼脂糖 (1.2%) 凝胶电泳, 利用 Gel Doc1000 凝胶分析仪观测电泳结果, 并照相记录。

1.2.4 PCR 扩增产物测序

在得到阳性扩增后, 全部试验重复 1 次。得到的 PCR 扩增产物经回收纯化后, 用 pDM18-T vector 载体连接转化大肠杆菌 DH-5 α 感受态细胞, 在 LB 培养基上 37°C 培养 16 h , 挑取白色菌落, 碱裂解法提取质粒 DNA, 利用 PCR 技术进行阳性克隆筛选。

DNA 测序由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成, 将测序结果与 GenBank 上已登录的细菌基因序列作 BLAST 比对。

1.2.5 Nested-PCR 检测植株不同部位细菌分布

利用上述 CTAB 法提取发病安祖花根、根茎连接处、老叶柄、老叶、嫩叶柄、嫩叶、佛焰苞柄、佛焰苞、花序下半部分、花序上半部分、同盆相邻植株叶片、分蘖小植株叶片 DNA, 并稀释到相同浓度, 分别利用 Nested-PCR 检测植株不同部位中细菌分布, 3 次重复。

1.2.6 应用 Nested-PCR 检测安祖花组培苗

应用 Nested-PCR 方法检测大兴苗圃安祖花组培苗, 并用安祖花细菌性疫病 ELISA 试剂盒 (美国 Agdia 公司) 验证, 按照试剂盒使用说明进行操作。结果判定标准为: 阳性 OD 值 ≥ 2.1 倍的阴性 OD 值, 且阳性 OD 值 ≥ 2.1 倍的空白对照的 OD 值。

2 结果与分析

2.1 Nested-PCR 的特异性及其产物的克隆测序结果

以 H₂O 为阴性对照, 利用 Nested-PCR 从带有粉黛黄单胞杆菌的安祖花叶片组织中扩增出单一的目标谱带, 大小约为 343 bp (图 1)。

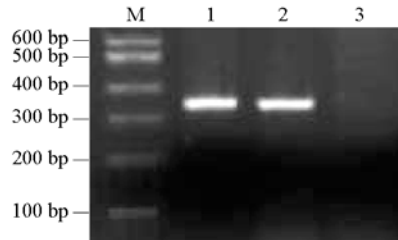


图 1 Nested-PCR 特异性试验

M. DNA 标记 I; 1. ‘水晶花烛’; 2. ‘密西西比’; 3. 水。

Fig. 1 Specificity of Nested-PCR

M. DNA marker I; 1. ‘Clarinervium’; 2. ‘Mississippi’; 3. H₂O.

回收纯化的粉黛黄单胞杆菌目的片段的核苷酸序列, 长度为 343 bp, 与设计的 PCR 产物大小一致。将该序列与 GenBank 上已登录的细菌基因序列作 BLAST 比对 (图 2), 证实扩增产物与序列 X70380.1 同源性在 99% 以上, 证明了 Nested-PCR 检测结果的可靠性。

Query 2	CTTCATCTCCCTCGCGTTTCTCAAGCCCGGTGTAGCCGCTGTCCGCGCACAGCGTGTCT	61
Subject 2953487	CTTCATCT-CCTCGCGCTTCTCAAGCCCGGTGTAGCCGCTGTCCGCGCACAGCGTGTCT	2953545
Query 62	CCTTGCCGTGCAGCAGCTTGTGCGCTTGTGTGATATCGGCCACGTTGGCCGCGCTGCACT	121
Subject 2953546	CCTTGCCGTGCAGCAGCTTGTGCGCTTGTGTGATATCGGCCACGTTGGCCGCGCGCAT	2953605
Query 122	CCACGTGGTGCACCGCCCGAGTTCATCGTCCACCCGATGTGCGCTTCATCCCGAAGT	181
Subject 2953606	CGACGTGGTGCACCGCCCGAGTTCATCGTCCACCCGATGTGCGCTTCATCCCGAAGT	2953665
Query 182	-AGTACTGGTTGCCCTTCTTGGTTTGGTGCATCTCCGGATCGCGCTCGCCATCCTTGTTC	240
Subject 2953666	CA-TATGATTCCCTTCTTGGTATGGTGCATGTCCGGATCGCGCTCGCCCTGCTTGTTC	2953724
Query 241	TGGTCGAGCTGGGCGCAGCGATGATCGTGGCGTCCACGATCGTCCCGCCGCGCAAGCTC	300
Subject 2953725	TTCGTCGAAGTGGGCGCCGCAATGATCGTGGCATCCACGATCGTCCCGCCGCGCAAGCTC	2953784
Query 301	TGCCCTTGCGCGACAGGTGCGCGTTGACCCGAT-GAAACAGCTT	344
Subject 2953785	TGCCCTTGCGCGACAGGTGCGCGTTGACCCGATTGAA-CAGCTT	2953828

图 2 扩增产物序列在 GenBank 中与 X70380.1 Blast 比对的结果

Query: Nested-PCR 产物序列; Subject: X70380.1 部分序列。

Fig. 2 Blast results between PCR products and X70380.1 in GenBank

Query: Sequence of Nested-PCR; Subject: Partial sequence of X70380.1.

2.2 Nested-PCR 体系对不同取样部位的粉黛黄单胞杆菌检测

分别将从同一感病植株的根、根茎连接处、老叶柄、老叶、嫩叶柄、嫩叶、佛焰苞柄、佛焰苞、花序下半部分、花序上半部分、同盆相邻植株叶片、分蘖小植株叶片中提取的 DNA 稀释到相同浓度, 进行 Nested-PCR, 在以上样品的 DNA 中都检测到了清晰的扩增谱带 (图 3)。

结果表明: 致病菌在植株的各个部位均有分布, 且在老叶的叶柄中扩增最强; 根茎连接处、老叶、嫩叶柄、嫩叶、佛焰苞柄扩增强度次之; 在根、佛焰苞和花序中扩增最弱; 对于同盆中的另一个植株以及分蘖小植株, 虽然没有发病症状, 也出现了扩增谱带, 其中分蘖小植株的扩增较弱。



图 3 不同取样部位 Nested-PCR 扩增图

1: 根; 2: 根茎连接处; 3: 老叶柄; 4: 老叶; 5: 嫩叶柄; 6: 嫩叶; 7: 佛焰苞柄; 8: 佛焰苞; 9: 花序下半部分; 10: 花序上半部分; 11: 同盆相邻植株叶片; 12: 分蘖小植株叶片; 13: 阳性对照; 14: H₂O。

Fig. 3 The specificity of Nested-PCR using samples from different parts of plant

1: Root; 2: Stem-root joint; 3: Old petiole; 4: Old leaf; 5: Young petiole; 6: Young leaf; 7: Spathe petiole; 8: Spathe; 9: Lower part of inflorescence; 10: Upper part of inflorescence; 11: Leaf of adjacent plant; 12: Leaf of tillering plant; 13: Positive control; 14: H₂O.

2.3 Nested-PCR 对安祖花组培苗的检测

应用该方法随机抽样检测由北京大兴苗圃提供的品种‘雨布’和‘Alabama’组培苗 5 株 (图 4), 发现样品 1、2、3、5 的检测结果为阴性, 样品 4 的检测结果为阳性。通过对 Nested-PCR 产物测序, 分析发现样品 4 的扩增产物与序列 X70380.1 同源性在 99% 以上, 与本文 2.1 中带有粉黛黄单胞杆菌的叶片组织扩增序列一致。采用安祖花细菌性疫病 ELISA 试剂盒 (美国 Agdia 公司) 检测上述样品提取液, 按照试剂盒使用说明操作并用酶标仪检测试验, 结果与 Nested-PCR 检验结果一致。证明本试验采取的 Nested-PCR 方法具有较高的准确性, 可以用于大量组培苗的检测。

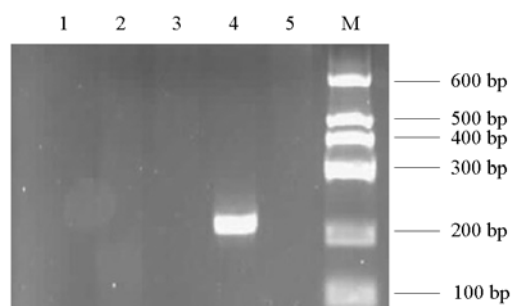


图 4 安祖花组培苗 Nested-PCR 检测

M: DNA marker II; 1~3: ‘雨布’组培苗; 4、5: ‘阿拉巴马’组培苗。

Fig. 4 Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* in tissue culture plantlets by Nested-PCR

M: DNA marker II; 1-3: Tissue culturing seedlings of ‘Poncho’; 4, 5: Tissue culturing seedlings of ‘Alabama’.

3 讨论

目前已报道的安祖花病害主要有细菌性疫病、炭疽病、叶斑病等。其中由粉黛黄单胞杆菌引起的细菌性疫病具有毁灭性, 是重点防治对象 (Brion, 2000)。Isabelle 等 (2006) 将感染细菌性疫病的叶片置于 CS 培养基上分离细菌, 然后将细菌提取液作为底物进行 PCR 检测。而本试验中通过对检测引物进行改进, 能够直接从携带粉黛黄单胞杆菌的安祖花植物组织 DNA 中扩增出细菌特异性条带, 简化了操作步骤, 并且能够在组培苗与细菌性疫病潜伏感染阶段检测出病原菌, 便于在安祖花发病之前对疾病进行控制, 提高了可操作性。组培苗中的潜伏感染是造成安祖花细菌性疫病大规模爆发的根本原因。本试验中随机选取 9 株安祖花组培苗提取 DNA 并进行 Nested-PCR 检测, 检测出含有粉黛黄单胞杆菌的植株 1 株, 并通过测序和 ELISA 检测两种方法对结果进行验证, 证明了本试验方法对组培苗检测的准确性。

细菌在感病植株体内各组织器官具有不均匀分布特性。因此, 检测的部位差异可能造成检测结论的偏差。本试验中分别对安祖花的不同部位——根、根茎连接处、老叶柄、老叶、嫩叶柄、嫩叶、佛焰苞柄、佛焰苞、花序下半部分、花序上半部分进行检测, 结果发现, 在整个植株中都检测到了粉黛黄单胞杆菌的特异性条带, 在所提取的植物 DNA 含量基本相同的条件下, 可以明显地观察到

扩增谱带亮度的差别,老叶的叶柄中扩增最强;根茎连接处、老叶、嫩叶柄、嫩叶、佛焰苞柄扩增强度次之;在根、佛焰苞和花序中扩增最弱。这可能与病原菌的传播方式以及植物代谢强度有关(徐榕雪等,2007)。粉黛黄单胞杆菌主要通过叶片背面气孔感染,疏导组织传播,且繁殖速度缓慢,因此造成细菌在富含输导组织的叶柄中积累,在植株中分布不均匀,这一结果对于进行安祖花脱细菌的研究有重要意义。

国内的安祖花成品多为双株苗且盆中多有分蘖。本试验中分别对染病植株的同盆植株以及同一盆中的分蘖小苗进行检测,结果发现同盆植株虽未表现出症状,但也扩增出明显的条带;分蘖小苗中扩增出微弱条带,说明也分布有少量细菌。这可能是由于植株都来源于同一批带菌组培苗,或粉黛黄单胞杆菌以疏导组织为传播途径并通过污染的栽培基质和灌溉水传染同盆中另一株。

References

- Alvarez A, McElhaney R, Fukui R. 1994. Studies of the infection process in anthurium blight using a bioluminescent strain of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*. Proceedings of Hawaii Anthurium Ind Conf 6th//Delate K M, Yoshimura E R. Hawaii Inst Trop Agric Human Res. Honolulu: University of Hawaii: 12 (9): 31 - 37.
- Brion Duffy. 2000. Survival of the anthurium blight pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* in field crop residues. European Journal of Plant Pathology, 106: 291 - 295.
- Fukui R, Fukui H, Alvarez A M. 1999a. Comparisons of single versus multiple bacterial species on biological control of anthurium blight. Phytopathology, 89: 366 - 373.
- Fukui R, Fukui H, Alvarez A M. 1999b. Suppression of bacterial blight by a bacterial community isolated from the guttation fluids of anthurium. Appl Environ Microbiol, 65: 1020 - 1028.
- Fukui R, Fukui H, McElhaney R, Nelson S C, Alvarez A M. 1996. Relationship between symptom development and actual sites of infection in leaves of *Anthurium* inoculated with a bioluminescent strain of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*. Applied and Environmental Microbiology, 62 (3): 1021 - 1028.
- Isabelle Robène-Soustrade, Philippe Laurent, Lionel Gagnevin, Emmanuel Jouen, Olivier Pruvost. 2006. Specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* in anthurium (*Anthurium andraeanum*) tissues by Nested PCR. Applied and Environmental Microbiology, 72 (2): 1072 - 1078.
- Kelaniyangoda D B, Wickramarathne M S. 2009. Development of pre-detection technique for bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*) disease in anthurium to produce healthy planting materials. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 42 (7): 643 - 649.
- Lipp R L, Alvarez A M, Benedict A A, Berestecky J. 1992. Use of monoclonal antibodies and pathogenicity tests to characterize strains of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*. Phytopathology, 82: 677 - 682.
- Norman D J, Alvarez A. 1989. A rapid method for the presumptive identification of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* and other xanthomonads. Plant Disease, (73): 654 - 658.
- Norman D J, Alvarez A M. 1994a. Latent infections of *in vitro* anthurium caused by *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*. Plant Cell Tissue Organ Cult, 39: 55 - 61.
- Norman D J, Alvarez A M. 1994b. Rapid detection of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* in anthurium plants with a miniplate enrichment/ELISA system. Plant Dis, 78: 954 - 958.
- Prior P, Rott P. 1989. Bacterial leaf spot of anthurium (*Anthurium* spp.) caused by a *Pseudomonas* sp. in the french West Indies. Journal of Phytopathology, 124: 215 - 224.
- Xu Rong-xue, Ming Jun, Mu Ding, Liu Chun, Tang Geng-guo, Wang Xiao-wu. 2007. Detection of three lily viruses by multiplex RT-PCR. Acta Horticulturae Sinica, 34 (2): 443 - 448. (in Chinese)
- 徐榕雪, 明 军, 穆 鼎, 刘 春, 汤庚国, 王晓武. 2007. 百合三种病毒的多重RT-PCR检测. 园艺学报, 34 (2): 443 - 448.
- Zhang Rong-yi, Tan Zhi-qiong, Liu Ai-rong. 2003. Symptoms of bacterial blight caused by *Xanthomonas* on *Anthurium andraeanum* and identification of its causal organism. Chinese Journal of Tropical Crops, 24 (2): 80 - 85. (in Chinese)
- 张荣意, 谭志琼, 刘爱荣. 2003. 黄单胞菌引致安祖花疫病的症状和病原菌鉴定. 热带作物学报, 24 (2): 80 - 85.