



Le piastre utilizzate in laboratorio.

## Consorzi fungini che facilitano la germinazione dei semi Una proposta di natural base solution per azioni di rivegetazione

*La ricerca presentata nell'articolo evidenzia come i funghi possano avere interazioni positive con il mondo delle piante anche a partire proprio dai primi stati di vita: i semi. Grazie all'azione dei funghi e dei loro enzimi sarebbe infatti possibile attuare dei processi di pre-trattamento al fine di aumentare il tasso di germinazione di piante con dormienza fisica per favorire azioni di rivegetazione.*

**\*,\*\* Marta Elisabetta Eleonora  
Temporiti  
\*,\*\* Solveig Tosi**

### Funghi: generalità

**Q**uando si parla di funghi a tutti vengono in mente subito i funghi edibili. Questi, però, sono solo una piccola parte (circa 3000 specie [1]) rispetto alle oltre 100.000 specie attualmente accettate [2]. In presenza di una così vasta varietà di funghi, si pensi che si stimano tra i 2,2 milioni e i 3,8 milioni di specie fungine sulla Terra, è intuibile che questi svolgano un ruolo molto importante per il pianeta.

La grande maggioranza delle specie fungine conosciute trascorre almeno una parte del proprio ciclo vitale nel suolo, dove può svolgere differenti ruoli biologici: decompositori, simbionti mutualisti o patogeni di piante e animali [3]. Svolgendo queste funzioni, i funghi guidano il ciclo del carbonio nel suolo e mediano la nutrizione minerale delle piante in ecosistemi naturali e antropici, giocando un ruolo chiave nella lotta ai cambiamenti climatici e nel ripristino di aree inquinate [4].

### Funghi filamentosi

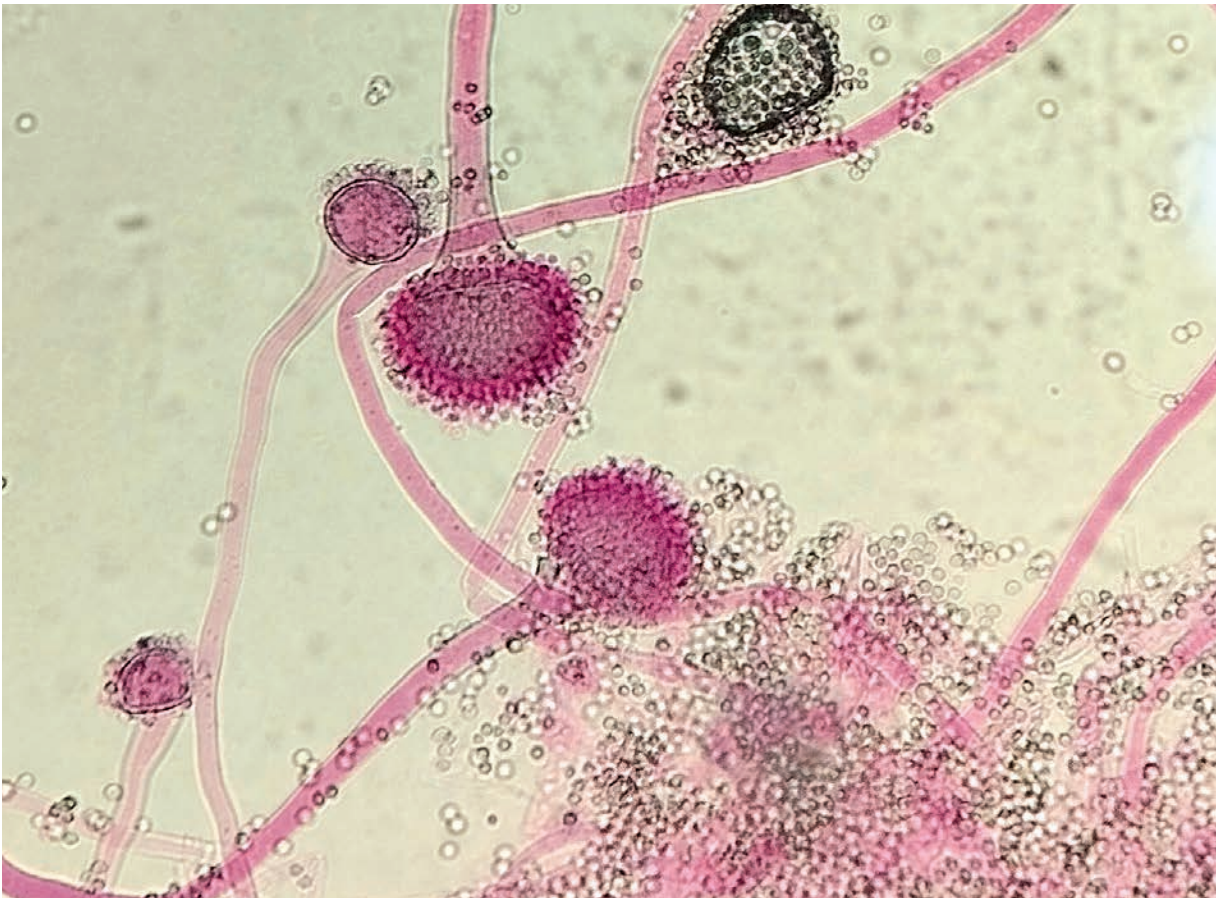
I funghi filamentosi, comunemente chiamati muffe, sono formati da lunghe cellule filiformi, che si accrescono apicalmente fino a formare una rete più o meno fitta, chiamata micelio (dal greco *mycos*, fungo): il vero e proprio corpo del fungo. La crescita apicale delle ife consente al fungo di coprire lunghe distanze e di invadere molti substrati di natura differente [5]. Successivamente, la produzione di enzimi extracellulari permette loro di degradare il substrato con cui vengono a contatto per ricavarne fonti di nutrimento. Questa produzione è una caratteristica fondamentale del loro stile di vita, che sia esso saprotrofo o simbiote parassita o mutualista. Infatti, sono in grado di rispondere agli stimoli ester-

ni grazie all'espressione genica controllata e alla secrezione di particolari enzimi in risposta ai fattori scatenanti dell'ambiente [6]. Queste caratteristiche hanno permesso ai funghi filamentosi di occupare un'ampia gamma di nicchie ecologiche. I funghi sono spesso colonizzatori di ambienti estremi: li possiamo trovare nei crateri di vulcani [7], in ambienti iperalini (con una salinità superiore al 38‰) [8] o in ambienti particolarmente freddi e inospitali come l'Antartide [9]. Inoltre li troviamo nel suolo come organismi liberi o associati alle radici delle piante. In questo caso possono essere presenti nella rizosfera o associati simbioticamente alle radici, formando le micorrize. Con il termine micorrizza (dal greco *mycos*, fungo e *rhiza*, ra-

dice) si intende un'associazione simbiotica mutualistica tra un fungo e la radice di una pianta, in cui il fungo fornisce alla pianta acqua e sali minerali presenti nel terreno e riceve carboidrati necessari alla crescita [10]. Tra le molte forme di micorrizzazione, le micorrize arbuscolari (o endomicorrize) sono delle simbiosi obbligate in cui i funghi penetrano all'interno delle cellule e dei tessuti della pianta ospite e con una vita al di fuori di essi molto limitata [11]. Si stima che circa l'80% delle specie di piante terrestri siano coinvolte in relazioni simbiotiche con i funghi micorrizici [12].

### Funghi promotori della crescita delle piante

Un'altra grande categoria di funghi della rizosfera è forma-



Ingrandimento al microscopio di un fungo filamentoso.



Foto di Andreas Rockstein

*Vicia* sp. Presso l'Università degli Studi di Pavia è attiva una sperimentazione sull'utilizzo dei funghi promotori della crescita di differenti specie del genere *Vicia*.



Foto di Richard Droker

*Hydnellum peckii*.

ta dai cosiddetti funghi promotori della crescita delle piante (Plant Growth-Promoting Fungi: PGPF). I PGPF sono un gruppo eterogeneo di funghi saprotrofi non patogeni che instaurano un mutualismo non obbligato con una vasta gamma di piante ospiti. La loro peculiarità è il coinvolgimento in una serie di interazioni complesse con le piante, che riguarda la fitostimolazione. Infatti sono in grado di sviluppare strategie distinte per stimolare il miglioramento della germinazione dei semi, del vigore delle piantine, della crescita delle radici, dell'efficienza fotosintetica, della crescita delle piante, della fioritura e della produttività di frutti [13]. Inoltre i PGPF hanno anche effetti benefici nella soppressione dei microrganismi fitopatogeni, operando come agenti di controllo

biologico [14]. Pertanto questa eterogenea categoria di funghi è sempre più studiata in un'ottica di miglioramento del benessere e delle performance delle piante, considerando i PGPF uno dei potenziali ingredienti attivi nella formulazione di biofertilizzanti e micofungicidi [15].

#### Obiettivo della ricerca

Lo studio che stiamo sviluppando nel laboratorio di Micologia dell'Università degli Studi di Pavia pone le sue basi proprio sull'utilizzo dei funghi promotori della crescita delle piante (PGPF). Inserendosi in un più ampio progetto finanziato dal PNRR (Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza), questa ricerca mira ad aumentare la germinabilità dei semi di differenti specie del genere *Vicia* L. Questa pianta è una leguminosa,

nota volgarmente come veccia, autoctona italiana, che si vuole reintrodurre nelle ampie aree di monoculture al fine di aumentare la biodiversità di queste zone.

#### Dormienza e germinazione dei semi

Alcune specie per germinare hanno bisogno che il tegumento duro del seme venga scarificato al fine di permettere l'assorbimento di acqua: in questi casi il seme presenta una dormienza chiamata "fisica". Con il termine scarificazione si intende la formazione di un'incisione superficiale, nel nostro caso appunto del tegumento, necessaria per superare questo tipo di dormienza. La dormienza dei semi è un blocco intrinseco temporaneo alla germinazione che si è evoluto in modo diverso nelle varie specie attraverso l'a-

dattamento al clima prevalente negli habitat di distribuzione [16]. La dormienza può facilitare la persistenza dei semi in periodi sfavorevoli, assicurando che la germinazione avvenga quando le condizioni ambientali sono più favorevoli allo sviluppo delle piantine, permettendo quindi una germinazione programmata [17]. Dal 50 al 90% delle specie di piante selvatiche di tutto il mondo produce semi che sono dormienti al momento della maturazione, con caratteristiche specifiche di dormienza determinate dalla distribuzione della specie, dalla forma di crescita e da fattori genetici [18]. Come accennato, i semi utilizzati per il nostro studio sono provvisti di dormienza fisica, ovvero semi il cui tegumento esterno

è formato da cellule con spesse pareti secondarie lignificate, che lo rendono impermeabile alla penetrazione dell'acqua. La dormienza fisica decade quando lo strato esterno del seme viene degradato o danneggiato al punto di consentire l'assorbimento dell'acqua (imbibizione) [19]. In natura questo danneggiamento può avvenire, ad esempio, in seguito all'ingerimento da parte di un animale i cui succhi gastrici ledono il tegumento senza digerirlo; o al rotolamento, determinato dal vento, sul terreno che produce abrasioni al rivestimento esterno del seme [20].

#### Selezione dei ceppi fungini

Al fine di aumentare la biodiversità di aree a monocultura at-

traverso l'introduzione di diverse specie di *Vicia*, è necessaria una preliminare scarificazione dei semi. Questo processo, se effettuato manualmente, richiede molto tempo e, quindi, un dispendio economico elevato. Per ovviare a questo problema, il nostro laboratorio si è adoperato per selezionare funghi filamentosi in grado di svolgere questo processo essenziale per la germinazione.

A tale scopo sono stati isolati 69 ceppi fungini autoctoni delle aree in esame mediante diluizioni seriali di suolo fino a una concentrazione di  $10^{-3}$ , su piastre Petri contenenti degli specifici terreni di coltura, che sviluppano colore intorno alla colonia quando questa è in grado di secernere laccasi, enzimi

ELEUTEROPIÙ

STRESS?  
AFFRONTALO  
CON UN ALLEATO  
IN PIÙ.

Eleuterococco, Codonopsis, Tulsì, Aronia, Olivello spinoso e Goji: con la sua formula a base di piante toniche, adattogene e antiossidanti, ELEUTEROPIÙ contribuisce a ristabilire il giusto equilibrio psico-fisico per affrontare con energia anche i momenti più impegnativi. Un aiuto prezioso, proprio quando serve di più.



scopri lo qui



info@fitomedical.com  
www.fitomedical.com



**FITOMEDICAL**  
star bene è naturale



Grazie all'azione dei funghi e dei loro enzimi sarebbe possibile attuare dei processi di pretrattamento, al fine di aumentare il tasso di germinazione di piante con dormienza fisica.

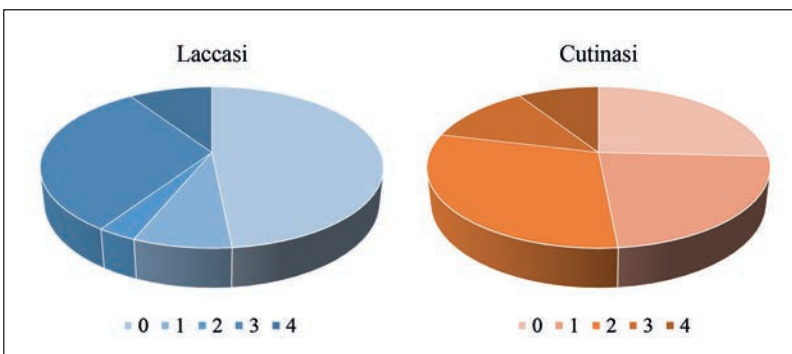
coinvolti nella degradazione della lignina. La formazione di colore è dovuta all'utilizzo da parte del fungo e alla trasformazione del colorante ABTS [acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico)] nel terreno di coltura. Questo colorante non fenolico viene ossidato dalla laccasi allo stato più stabile, responsabile del colore blu-verde. L'intensità del colore può essere correlata all'intensità dell'attività enzimatica [21]. Le colonie

così selezionate sono state testate anche per la capacità di produrre cutinasi, una famiglia di enzimi extracellulari in grado di idrolizzare i legami estere del polimero vegetale cutina [22]. In questo test, il viraggio di colore del terreno di coltura da rosso a giallo indica la produzione di questa tipologia di enzimi [23]. Il cambiamento di colore del terreno di coltura per entrambi i test ha permesso di individuare i ceppi fungini maggiormente

produttori di laccasi e cutinasi allo scopo di utilizzarli nei processi di scarificazione dei semi. In Figura 1 si possono osservare le percentuali di ceppi fungini in grado di produrre questi enzimi in base a una valutazione qualitativa del viraggio del colore, in una scala che va da 0 a 4, dove 0 si riferisce a una mancanza di cambiamento di colore (attività enzimatica nulla) e 4 all'intensità massima (alta attività enzimatica). Sulla base dei risultati ottenuti, è stato necessario un ulteriore passaggio: l'identificazione morfologica delle colonie isolate.

Questo passaggio risulta di fondamentale importanza al fine di eliminare i ceppi potenzialmente patogeni per le piante, come quelli appartenenti al genere *Fusarium*. Questo genere, infatti, è molto conosciuto per le malattie che induce come appassimenti, ruggini, marciumi e

Figura 1: Percentuale di ceppi fungini in grado di produrre laccasi (a sinistra) e cutinasi (a destra). La scala della produzione si basa su una valutazione qualitativa che va da 0 (nessuna produzione) a 4 (massima produzione).



cancri di molte colture orticole, campestri, ornamentali e forestali, sia negli ecosistemi agricoli sia in quelli naturali [24], ed è quindi inadatto a essere utilizzato per lo scopo in esame.

### Creazione di consorzi fungini

Per aumentare l'attività enzimatica dei ceppi selezionati, è stata valutata la possibilità di utilizzare più ceppi contemporaneamente. Infatti le interazioni fungine possono essere categorizzate in quattro tipologie principali (Fig. 2): crescita intrecciata, iper-proliferazione dell'antagonista, lieve inibizione reciproca e forte inibizione reciproca [25]. Con il termine "crescita intrecciata" si intende la capacità di due specie fungine di coesistere in stretta

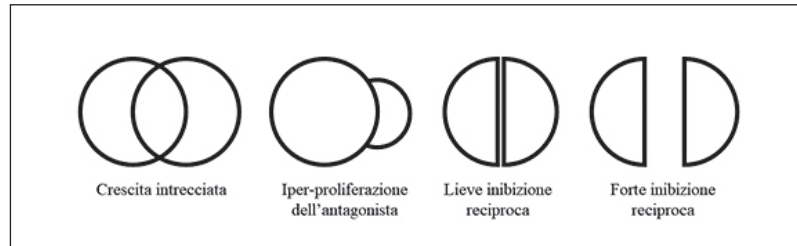


Figura 2: Tipologie di interazioni fungine.

prossimità, formando una rete di ife intrecciate. Quando invece uno dei due funghi si accresce e sopprime la proliferazione dell'altro si parla di iper-proliferazione dell'antagonista. Questo tipo di interazione è spesso osservato in ambienti competitivi, in cui i funghi si contendono risorse limitate. In presenza di una lieve inibizione reciproca, le due specie fungine si inibiscono reciprocamente, anche se non

sufficientemente da provocare una soppressione o iper-proliferazione completa. Nonostante l'inibizione, entrambi i funghi possono ancora coesistere nello stesso ambiente. Infine, quando l'inibizione reciproca diventa forte, le due specie fungine si inibiscono reciprocamente anche quando sono fisicamente separate o lontane nello spazio. L'inibizione può avvenire mediante il rilascio di composti



Foto di Matt Lavin

Un esemplare di *Penstemon deustus* in un ambiente ricco di presenza fungina.

**TECNO-LIO**  
L'energia della Vita

**LAVORAZIONI C/TERZI**  
Integratori alimentari  
in capsule, liquidi e liofilizzati

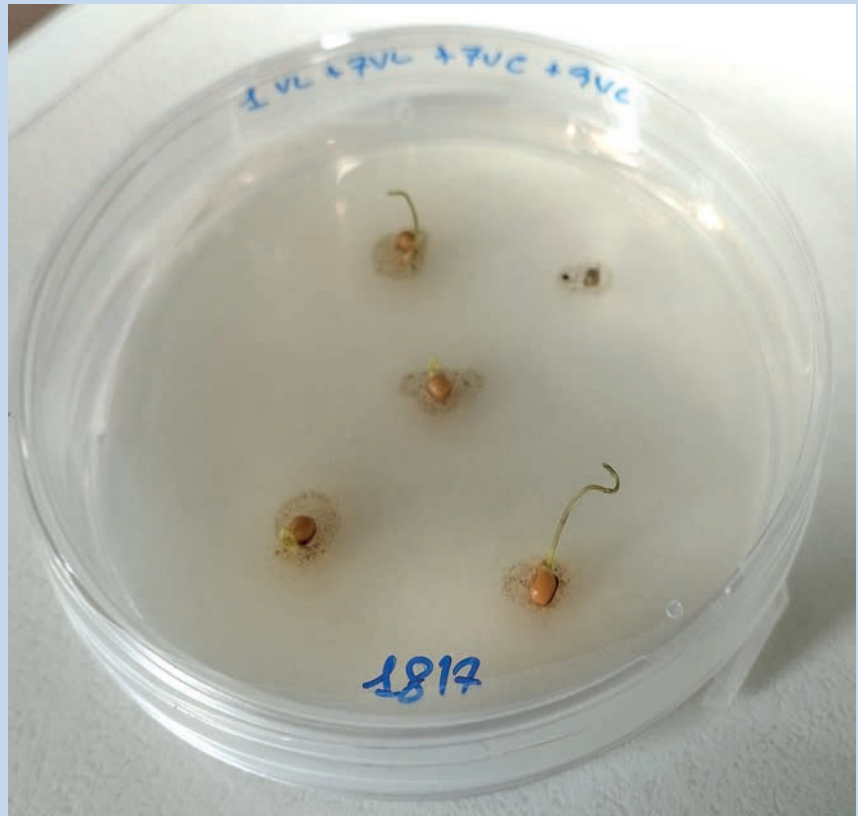
**Si eseguono produzioni di piccoli e medi lotti**

- Integratori in capsule formato 0 in barattolo o in blister
- Integratori liquidi in monodose da 10 e 15 ml
  - Integratori con contagocce
  - Liquidi e soluzioni in flaconi fino a 1000 ml
- Liofilizzazione in monodose con sigillatura sottovuoto
- Integratori di nostra produzione con possibilità di personalizzazione
- Lavorazione materie prime fornite dal cliente
  - Confezionamento finale
- Assistenza per formulazioni personalizzate

**Tecno-lio S.r.l.**  
Via Riviera Berica, 260 - 36100 Vicenza  
Tel. 0444530465 - fax. 0444532275  
E-mail: [info@tecno-lio.it](mailto:info@tecno-lio.it)  
Website: [www.tecno-lio.it](http://www.tecno-lio.it)



Il ventaglio di colori che si genera con l'attività del test delle cutinasi.



Una fase del test di germinazione eseguito in laboratorio.

diffusibili o composti organici volatili (VOC).

I ceppi che mostravano una crescita intrecciata o una lieve inibizione sono stati considerati idonei alla coesistenza per le fasi successive dello studio. Questo ha permesso di creare dei consorzi fungini, ovvero gruppi di due o più ceppi fungini in grado di coesistere. Sono stati poi selezionati quattro consorzi in base alle loro

capacità di produrre laccasi e cutinasi. In particolare è stato utilizzato un consorzio con produzione enzimatica assente, al fine di verificare se fosse sufficiente la sola azione meccanica delle ife o se, al contrario, fosse necessaria la produzione di almeno una tipologia di enzimi per facilitare l'azione meccanica delle ife (consorzio 1). Il consorzio 2 è stato selezionato sulla base della produzione di cutinasi, enzima coinvolto nella degradazione di materiale vegetale per lo più fogliare; mentre il consorzio 3 è formato da ceppi caratterizzati da un'alta produzione di laccasi, più specificamente per la lignina di cui è fatto il tegumento. Infine, il consorzio 4 è stato creato con funghi ad alta capacità di produzione di entrambi gli enzimi ad alti livelli (Tab. 1).

ati e sono stati contati i semi germinati dopo 7 e 21 giorni. Oltre ai semi per il trattamento sono stati allestiti due controlli: uno positivo scarificato manualmente per assicurare la germinazione del seme e uno negativo non scarificato (Fig. 3). I risultati ottenuti, hanno mostrato che, come previsto, i semi utilizzati per il controllo negativo (non scarificati) non sono germinati, mentre quelli del controllo positivo (scarificato manualmente) hanno dato una percentuale di germinazione del 100% già dopo 7 giorni. Per quanto riguarda i trattati è interessante notare come, benché la scarificazione richiesta per la germinazione sia di tipo fisica, non è sufficiente la sola presenza di ife fungine per intaccare lo spesso tegumento del seme (consorzio 1), ma è necessaria l'azione degli enzimi prodotti. Questo è stato con-

	Capacità del consorzio
Consorzio 1	Assenza di produzione enzimatica
Consorzio 2	Elevata produzione di cutinasi, nessuna laccasi
Consorzio 3	Elevata produzione di laccasi, non di cutinasi
Consorzio 4	Elevata produzione sia di laccasi sia di cutinasi

Tabella 1: consorzi utilizzati per la scarificazione di semi di diverse specie di *Vicia sp.*

capacità di produrre laccasi e cutinasi. In particolare è stato utilizzato un consorzio con produzione enzimatica assente, al fine di verificare se fosse suffi-

### Test di germinazione

I semi, resi disponibili dalla Banca del Germoplasma Vegetale del DSTA, Università di Pavia, sono stati messi a contatto con ciascuno dei consorzi cre-

fermato anche dai risultati ottenuti dal consorzio 2. Infatti le cutinasi sono enzimi aspecifici per questa tipologia di substrato e la germinazione è avvenuta più tardi (21 giorni) e per una quantità minore di semi (10%), suggerendo come l'azione enzimatica non fosse ottimale per il tegumento e la penetrazione delle ife fosse difficoltosa. Infine, per entrambi i consorzi (3 e 4) con un'elevata produzione di laccasi si è vista una percentuale di germinazione già dopo 7 giorni del 20% dei semi.

Questo suggerisce che effettivamente si tratti dell'enzima da ricercare per la scarificazione dei semi in esame. Infine si può notare che in entrambi i casi di consorzi produttori di cutinasi si è registrato un incremento di semi germinati dopo 21 giorni. Questo suggerisce che, per un eventuale trattamento in più ampia scala, sia necessario un trattamento con funghi produttori di laccasi, così che espletino la loro azione in un tempo più ridotto.

### Conclusioni

Sebbene ulteriori studi andranno ancora condotti per mettere a punto il metodo e per individuare i migliori ceppi fungini da utilizzare in base alle specie di semi da scarificare, questa ricerca ha permesso di evidenziare come i funghi possano avere interazioni positive con il mondo delle piante anche a partire proprio dai primi stati di vita: i semi. Grazie all'azione dei funghi e dei loro enzimi sarebbe quindi possibile attuare dei processi di pretrattamento, al fine di aumentare il tasso di germinazione di piante con dormienza fisica. Questo permetterebbe di reinserire più facilmente nuovi elementi di biodiversità in ambienti fortemente modificati dall'uomo,

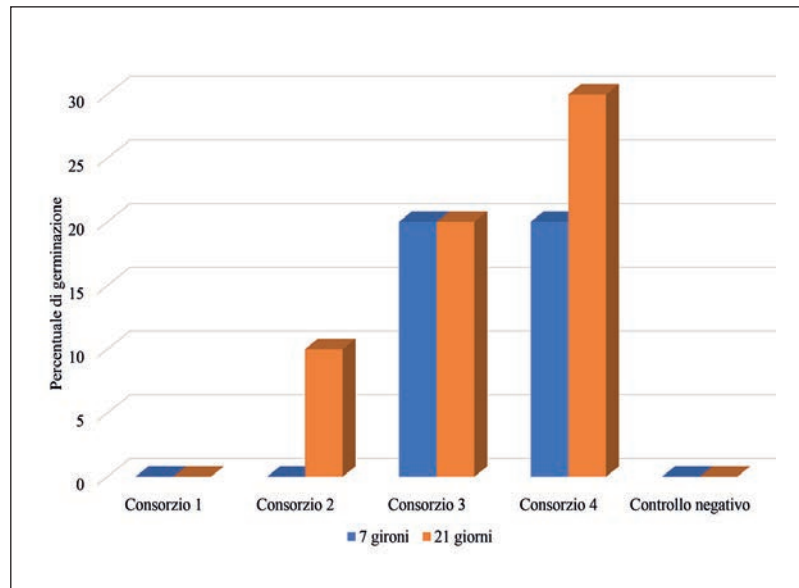


Figura 3: Percentuale di germinazione di semi di *Vicia* sp. dopo 7 e 21 giorni di incubazione con diversi consorzi fungini. Il controllo positivo presenta una percentuale di germinazione del 100% (non riportato).

# IMMUNITY ASSIST 12

## La naturale protezione per il tuo bambino

INTEGRATORE ALIMENTARE a base di *betaglucani estratti da Reishi e Shiitake*, che favoriscono le naturali difese dell'organismo

[www.avdreform.it](http://www.avdreform.it)

Prodotto e distribuito da:  
A.V.D. Reform Srl B.go S. Biagio 9 - PARMA tel. 0521 628498





Una piastra contenente i funghi sottoposti ad analisi.

come le monoculture, utilizzando anche specie vegetali autoctone caratterizzate da dormienza fisica dei semi.

**Ringraziamenti:** si ringraziano il prof. Andrea Mondoni e il dr. Simone Orsenigo del Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente per aver messo a disposizione i semi di *Vicia*.

**\* Laboratorio di Micologia, Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente, Università degli Studi di Pavia, 27100, Pavia**

**\*\* National Biodiversity Future Centre, 90133, Palermo**

## Bibliografia

1 Li, H., Tian, Y., Menolli Jr, N., Ye, L., Karunaratna, S. C., Perez-Moreno, J., ... & Mortimer, P. E. (2021). Reviewing the world's edible mushroom species: A new evidence-based classification system. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1982-2014.

2 Hyde, K.D., Jeewon, R., Chen, Y.J. et al. The numbers of fungi: is the descriptive curve flattening?. *Fungal Diversity* **103**, 219-271 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00458-2>

3 Bahram, M., & Netherway, T. (2022).

Fungi as mediators linking organisms and ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(2), fuab058.

4 FAO, ITPS, GSBI, CBD and EC. 2020. *State of knowledge of soil biodiversity -Status, challenges and potentialities, Report 2020*. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cb1928en>

5 Steinberg, G., Peñalva, M. A., Riquelme, M., Wösten, H. A., & Harris, S. D. (2017). Cell biology of hyphal growth. *Microbiology spectrum*, 5(2), 10-1128.

6 Archer, D. B., & Wood, D. A. (1995). Fungal exoenzymes. In *The growing fungus* (pp. 137-162). Dordrecht: Springer Netherlands.

7 Wang, X., & Pecoraro, L. (2021). Analysis of soil fungal and bacterial communities in Tianchi Volcano crater, north-east China. *Life*, 11(4), 280.

8 Saccò, M., White, N. E., Harrod, C., Salazar, G., Aguilar, P., Cubillos, C. F., ... & Allentoft, M. E. (2021). Salt to conserve: A review on the ecology and preservation of hypersaline ecosystems. *Biological Reviews*, 96(6), 2828-2850.

9 Rosa, L. H., Zani, C. L., Cantrell, C. L., Duke, S. O., Van Dijk, P., Desideri, A., & Rosa, C. A. (2019). Fungi in Antarctica: diversity, ecology, effects of climate change, and bioprospection for bioactive compounds. *Fungi of Antarctica: diversity, ecology and biotechnological applications*, 1-17.

10 Smith, S. E., & Read, D. J. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.

11 Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., & Rouvelot, A. T. (1990). Role and use of mycorrhizas in horticultural crop production. *Role and use of mycorrhizas in horticultural crop production*, 1000-1006.

12 Wilkes, T. I. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. *Encyclopedia*, 1(4), 1132-1154.

13 Hossain, M. M., & Sultana, F. (2020). Application and mechanisms of plant growth promoting fungi (PGPF) for phytostimulation. *Org. Agric*, 1-31.

14 Verma, P. P., Shelake, R. M., Das, S., Sharma, P., & Kim, J. Y. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF): potential biological control agents of diseases and pests. *Microbial Interventions in Agriculture and Environment: Volume 1:*

*Research Trends, Priorities and Prospects*, 281-311.

15 Adedayo, A. A., & Babalola, O. O. (2023). Fungi That Promote Plant Growth in the Rhizosphere Boost Crop Growth. *Journal of Fungi*, 9(2), 239.

16 Graeber, K., Nakabayashi, K., & Leubner-Metzger, G. (2017). Development of dormancy.

17 Baskin CC, Baskin JM (2014) *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. 2nd edition. Elsevier, Academic Press, San Diego, CA

18 Kildisheva, O. A., Dixon, K. W., Silveira, F. A., Chapman, T., Di Sacco, A., Mondoni, A., ... & Cross, A. T. (2020). Dormancy and germination: making every seed count in restoration. *Restoration Ecology*, 28, S256-S265.

19 Gama-Arachchige, N. S., Baskin, J. M., Geneve, R. L., & Baskin, C. C. (2013). Identification and characterization of ten new water gaps in seeds and fruits with physical dormancy and classification of water-gap complexes. *Annals of Botany*, 112(1), 69-84.

20 Baes, P. O., de Viana, M. L., & Sühling, S. (2002). Germination in *Prosopis ferox* seeds: effects of mechanical, chemical and biological scarifiers. *Journal of arid environments*, 50(1), 185-189.

21 More, S. S., PS, R., & Malini, S. (2011). Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. *Enzyme research*, 2011.

22 Chen, S., Su, L., Chen, J., & Wu, J. (2013). Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1754-1767.

23 Rueda-Rueda, H., Prieto-Correa, E., & Jiménez-Junca, C. (2020). Cutinases obtained from filamentous fungi: a comparison of screening methods. *Dyna*, 87(214), 183-190.

24 Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., ... & Kazan, K. (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annual review of microbiology*, 67, 399-416.

25 Skidmore AM, Dickinson CH. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*. 1976; 66 (1): 57-64.