

二斑叶螨的卵和丝网对西花蓟马生长发育和繁殖的影响*

岳臻^{1,2} 邝军锐^{1**} 田甜¹

(1. 贵州大学昆虫研究所 贵州山地农业病虫害重点实验室 贵阳 550025;

2. 中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100193)

摘要 为探讨二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 的卵和丝网对西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 的影响, 本文研究了西花蓟马分别取食健康菜豆叶片、带二斑叶螨卵的菜豆叶片、带卵 + 丝网的菜豆叶片 3 种不同情况下, 西花蓟马生长发育、存活和繁殖情况, 并获得了其生命参数。结果表明西花蓟马在带二斑叶螨卵的菜豆叶片上发育最快, 其未成熟期为 11.35 d, 明显短于另外两个处理, 在带有二斑叶螨卵和丝网的菜豆叶片上成虫获得率最低为 63%, 西花蓟马在不同处理之间的成虫寿命和繁殖力没有明显的差异; 西花蓟马取食 3 种菜豆叶片的内禀增长率分别为 0.1779、0.1827 和 0.1710。以上结果说明取食二斑叶螨的卵可缩短西花蓟马发育时间, 对种群增长有利, 二斑叶螨的丝网可降低西花蓟马的存活率。

关键词 西花蓟马, 二斑叶螨, 捕食, 生长发育, 繁殖

Effects of the eggs and webs produced by *Tetranychus urticae* on the development and reproduction of *Frankliniella occidentalis*

YUE Zhen^{1,2} ZHI Jun-Rui^{1**} TIAN Tian¹

(1. The Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of Mountainous Region, Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The effects of the presence of eggs and webs produced by *Tetranychus urticae* Koch on the development, survival rate and reproduction of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) were studied on bean leaves subjected to three treatments (healthy leaves, bean leaves with the eggs of *T. urticae*, bean leaves with the eggs and webs of *T. urticae*). *F. occidentalis* was found to develop fastest on bean leaves with the eggs of *T. urticae*. Under these conditions the immature period was 11.35 days, significantly shorter than for the other two treatments. The lowest survival rate, 63%, occurred when *F. occidentalis* fed on bean leaves with both eggs and webs of *T. urticae*. Longevity and reproduction of adult *F. occidentalis* were not significantly different among the three treatments. The intrinsic rates of increase (r_m) of experimental populations of *F. occidentalis* were 0.1779, 0.1827 and 0.1710, respectively, on healthy bean leaves, bean leaves with the eggs of *T. urticae* and bean leaves with the eggs and webs of *T. urticae*. The results indicate that *F. occidentalis* development was fastest when it fed on the eggs of *T. urticae*, and that the presence of *T. urticae* webs can reduce the survival rate of *F. occidentalis*.

Key words *Frankliniella occidentalis*, *Tetranychus urticae*, predation, development, reproduction

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 自 2003 年传入我国后, 逐渐成为一种重要的农业害虫, 这和西花蓟马强大的适应能力、竞争力、寄

主植物多、发育时间短、繁殖力强及杂食性等特性有关 (Van Rijn *et al.*, 1995; Hulshof *et al.*, 2003; 盖海涛等, 2010; 吕要斌等, 2011)。在贵阳地区西花

* 资助项目: 贵州省国际合作项目 (黔科合外 G 字 [2011] 7002 号); 国家自然科学基金 (31160367)。

** 通讯作者, E-mail: jrzhi@126.com

收稿日期: 2012-09-02, 接受日期: 2012-12-09

蓟马和另一种重要的农业害虫二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 常混合发生(岳臻等, 2012), 两种害虫均喜欢取食植物的幼嫩组织, 存在着明显的种间竞争关系。但西花蓟马是杂食性害虫, 除了取食植物外, 还可以取食花粉和叶螨的卵(González and Wilson, 1982; Trichilo and Leigh, 1986, 1988; Wilson *et al.*, 1996; Agrawal *et al.*, 1999)。与植食性食料相比, 二斑叶螨的卵能为西花蓟马提供更多的营养, 可使西花蓟马发育历期缩短, 繁殖力提高(Trichilo and Leigh, 1988), 但二斑叶螨的丝网对西花蓟马的取食、产卵、行走等行为会产生一定的阻碍作用(Pallini *et al.*, 1998; Roda *et al.*, 2000)。在西花蓟马和二斑叶螨共存时, 二斑叶螨的卵和丝网可能对西花蓟马的种群增长产生影响。本文研究了西花蓟马取食健康菜豆叶片、带二斑叶螨卵的菜豆叶片、带二斑叶螨卵+丝网的菜豆叶片时的发育历期、存活率、寿命及生命参数, 以探索二斑叶螨的卵和丝网对西花蓟马的影响, 为了解两种害虫的种间关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试虫源 西花蓟马和二斑叶螨: 均采自贵州省贵阳市花溪区平桥菜地豆科植物上, 经鉴定后, 在人工气候室内分别用四季豆豆荚和菜豆植株饲养纯化多代后供试。

1.1.2 供试植物 菜豆: 在人工气候室内盆栽, 以获取无虫害污染的干净寄主植物, 其叶片作为供试材料。

1.1.3 试验仪器及试验条件 本实验在人工气候箱中进行(RXZ 系列多段可编程智能人工气候箱, 宁波江南仪器厂生产)。设定温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, RH 为 70%, 光照时间为 L:D = 14:10。

1.2 试验方法

1.2.1 不同菜豆叶片的处理 菜豆叶片分为 3 种处理: A: 健康菜豆叶片, 剪成近方形(约 9 cm^2); B: 菜豆叶片+二斑叶螨的卵+二斑叶螨的丝网, 将菜豆叶片用吸水纸框分成约 9 cm^2 的方形区域, 每个框内挑上 10 头雌成螨, 产卵 12 h 后挑走雌成螨, 保留叶片上二斑叶螨的卵(40~50 粒)及丝网, 沿着吸水纸框剪下方形区域; C: 健康菜豆叶片+二斑叶螨的卵, 处理同 B, 但叶片上只保留

二斑叶螨的卵, 二斑叶螨结的丝网用软毛笔扫走。

1.2.2 不同叶片处理下西花蓟马各虫态发育历期的观察和记录 将西花蓟马雌、雄成虫放在 3 种菜豆叶片的养虫盒内, 任其产卵 8 h 后移去成虫, 每日早、晚 8:00 在解剖镜下各观察一次, 发现有若虫孵化出来时立即开始接虫实验。将单头初孵若虫分别小心地接于 10 mL 离心管中, 以 3 种不同处理的菜豆叶片饲养, 每种处理供试西花蓟马为 100 头, 每天更换一次新鲜食料。每日早、晚 8:00 各观察一次, 记录西花蓟马的发育历期和存活情况, 直至羽化为成虫, 若虫龄期的确定以发现虫蜕为准。

1.2.3 不同叶片处理下西花蓟马成虫寿命和繁殖情况 将 1.2.2 中饲喂处理羽化的西花蓟马成虫雌、雄配对, 继续用相应处理的菜豆叶片饲养, 每天更换相应的菜豆叶片, 直到西花蓟马雌、雄成虫全部死亡。并将取食产卵过的菜豆叶片继续在养虫室内保留 5 d 以上至叶片组织内西花蓟马的卵全部孵化, 以每天孵化的 1 龄若虫数作为产卵量的估计(Watts, 1934), 将 3 种处理中每天所产的 1 龄若虫转移到另外的养虫小室内分别饲养至成虫, 分辨雌雄并进行计数, 计算其子代性比。

1.2.4 不同叶片处理下西花蓟马卵历期的观察和记录 将取食 3 种不同处理菜豆叶片的西花蓟马雌成虫产卵后的叶片分别收集起来, 将叶片的叶柄处包裹吸水棉, 放置在养虫室内, 每日早、晚 8:00 在解剖镜下各观察一次, 记录卵的孵化情况, 共观察 100 粒, 从产卵到卵孵化的时间为卵的发育历期。

1.3 生命表参数的计算方法

繁殖特征生命表参数计算方法: 净生殖率 $R_0 = \sum L_x M_x$; 平均世代周期 $T = \sum L_x M_x x / R_0$; 内禀增长率 $r_m = (\ln R_0) / T$; 周限增长率 $\lambda = e^{r_m}$; 种群加倍时间 $t = \ln 2 / r_m$; 其中 x 为按天划分的单位时间间距; L_x 表示任一个体在 x 期间的存活率; M_x 表示在 x 期间平均每雌产雌数。

1.4 数据处理

试验数据均用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 18.0 软件进行分析。利用 Duncan 氏新复极差法对西花蓟马各虫态在不同处理下的发育历期和繁殖力等进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 二斑叶螨的卵和丝网对西花蓟马发育历期的影响

西花蓟马各虫态在 3 种不同处理菜豆叶片上的发育历期见表 1。由表 1 可知,不论取食何种食料,西花蓟马卵的发育历期基本上没有差异。西花蓟马 1 龄若虫取食带有二斑叶螨卵和丝网的叶片时发育历期最长,取食带有二斑叶螨卵的叶片时发育历期最短,表明对于西花蓟马 1 龄若虫,二斑叶螨的丝网对西花蓟马取食活动产生的阻碍作用大于二斑叶螨卵产生的促进作用,造成西花蓟马 1 龄若虫的发育历期比在健康菜豆叶片上还

长。对于西花蓟马 2 龄若虫,取食带有二斑叶螨卵的菜豆叶片,其发育历期明显短于其它两种处理,说明二斑叶螨的卵对西花蓟马的发育有明显的促进作用。西花蓟马 2 龄若虫在健康菜豆叶片上的发育历期和在有二斑叶螨卵和丝网的菜豆叶片上的没有明显差异,说明二斑叶螨卵的促进作用和丝网的阻碍作用相互抵消。西花蓟马的预蛹期和蛹期不食不动,不受二斑叶螨卵和丝网的影响;从整个未成熟期来看,西花蓟马取食带有二斑叶螨卵的菜豆叶片的发育时间,明显短于另外两种处理,表明取食二斑叶螨的卵缩短了西花蓟马的发育时间。

表 1 二斑叶螨的卵和丝网对西花蓟马发育历期的影响(d)

发育阶段 Stage	处理 Treatment		
	健康菜豆叶片	菜豆叶片 + 二斑叶螨卵	菜豆叶片 + 二斑叶螨卵 + 丝网
	Healthy bean leaf	Bean leaf with <i>T. urticae</i> eggs	Bean leaf with <i>T. urticae</i> eggs and webs
卵期 Egg	3.03 ± 0.02a	3.02 ± 0.02a	3.03 ± 0.02a
1 龄若虫期 1st instar	2.27 ± 0.04b	2.07 ± 0.03c	2.55 ± 0.04a
2 龄若虫期 2nd instar	2.93 ± 0.06a	2.71 ± 0.06b	2.91 ± 0.05a
预蛹期 Prepupa	1.07 ± 0.02a	1.06 ± 0.02a	1.04 ± 0.02a
蛹期 Pupa	2.43 ± 0.03a	2.38 ± 0.03a	2.45 ± 0.03a
未成熟期 Immature	11.89 ± 0.07a	11.35 ± 0.09b	12.02 ± 0.08a

注:表中数字为平均值 ± 标准误,同行数据后标有不同小写字母表示同一发育阶段不同处理间在 0.05 水平差异显著(Duncan 氏新复极差测验法)。下表同。

The data in the table are presented as mean ± SE, and followed by different small letters in same row indicate significantly different at 0.05 level by Duncan’s multiple range test. The same below.

2.2 二斑叶螨的卵和丝网对西花蓟马各龄期存活率的影响

西花蓟马的各虫态取食不同菜豆叶片时存活率也不完全相同,但差异不太大(表 2)。西花蓟马取食带有二斑叶螨卵和丝网的菜豆叶片时的成虫获得率最低,明显低于另外两种处理,说明二斑叶螨的丝网显著地抑制了西花蓟马的存活。

2.3 二斑叶螨的卵和丝网对西花蓟马成虫寿命和繁殖力的影响

西花蓟马取食 3 种不同处理的菜豆叶片时,不论雌雄成虫寿命、产卵前期、产卵期,还是每雌

产卵量和日均卵量均差异不显著(表 3),表明二斑叶螨的卵和丝网对西花蓟马繁殖力的影响不显著。但是西花蓟马取食带二斑叶螨卵和丝网的菜豆叶片时,雌性比略大于其他两种处理。

2.4 二斑叶螨的卵和丝网对西花蓟马实验种群生命表参数的影响

西花蓟马取食不同处理菜豆叶片的年龄特征存活率和成虫的年龄特征繁殖力分别见图 1 和图 2。由图 1 可知,在成虫前期曲线非常平稳,在成虫后期 L_x 倾斜坡度较大,说明大量成虫个体的死亡集中在成虫生命的后期。取食带有二斑叶螨卵

表 2 二斑叶螨的卵和丝网对西花蓟马存活率的影响

Table 2 Effects of the egg and web produced by *Tetranychus urticae* on the survival rates of *Frankliniella occidentalis*

处理	1 龄若虫	2 龄若虫	预蛹期	蛹期	成虫获得率(%)
Treatment	1st instar	2nd instar	Prepupa	Pupa	Adults obtained rate
健康菜豆叶片	100.00	81.00	98.77	92.50	73.00
Healthy bean leaf					
菜豆叶片 + 二斑叶螨卵	98.00	85.71	95.24	95.00	76.00
Bean leaf with <i>T. urticae</i> eggs					
菜豆叶片 + 二斑叶螨卵和丝网	93.00	80.65	90.67	94.12	63.00
Bean leaf with <i>T. urticae</i> eggs and webs					

表 3 西花蓟马取食 3 种不同菜豆叶片时的成虫寿命和繁殖力

Table 3 The adult longevity and fecundity of *Frankliniella occidentalis* feeding on three different treated bean leaves

参数	健康菜豆叶片	二斑叶螨卵 + 菜豆叶片	二斑叶螨卵和丝网 + 菜豆叶片
Parameters	Healthy bean leaf	Bean leaf with <i>T. urticae</i> eggs	Bean leaf with <i>T. urticae</i> eggs and webs
雄成虫寿命(d)	10.59 ± 0.45 a	11.16 ± 0.71 a	11.38 ± 0.74 a
Longevity of male			
雌成虫寿命(d)	15.41 ± 0.51 a	15.69 ± 0.61 a	15.47 ± 0.71 a
Longevity of female			
产卵前期(d)	1.22 ± 0.10 a	1.00 ± 0.10 a	1.16 ± 0.11 a
Preoviposition			
产卵期(d)	12.88 ± 0.48 a	13.22 ± 0.59 a	13.19 ± 0.69 a
Oviposition			
产卵后期(d)	1.31 ± 0.21 a	1.47 ± 0.22 a	1.30 ± 0.12 a
Post-oviposition			
日均产卵量(粒)	3.90 ± 0.17 a	4.25 ± 0.20 a	4.38 ± 0.23 a
Fecundity/ day /female			
每雌生殖力(粒)	60.00 ± 3.22 a	65.22 ± 3.30 a	68.41 ± 5.05 a
Fecundity/ female			
性比(♀ / ♂)	1.56	1.50	1.63
Sex ratio			

和丝网的菜豆叶片,西花蓟马的存活率较其它两组处理低。从西花蓟马平均产雌数 M_x 曲线可以看出每雌平均产雌数出现几个峰值,产卵高峰期过后,有几个低峰出现,但是总的趋势是每雌平均产雌数在减少,直至产卵结束。取食带有二斑叶螨卵的菜豆叶片时在第 15 天最先达到最大产雌量,而取食带有二斑叶螨卵和丝网的菜豆叶片时平均产雌数达到最大值的时间最迟,但它的峰值最高,主要原因是该处理下雌性比较高。

西花蓟马取食不同处理菜豆叶片的生命参数见表 4。由表 4 可知,内禀增长率 r_m 和周限增长率 λ 均是在带有二斑叶螨卵的菜豆叶片上最大 ($r_m = 0.1827, \lambda = 1.2005$),说明取食二斑叶螨的卵有利于西花蓟马种群数量的增加。平均世代周期 T 和种群加倍时间 t 均是在带有二斑叶螨卵和丝网的处理中最大,说明二斑叶螨的丝网使西花蓟马的平均世代周期和种群加倍时间略微增长。

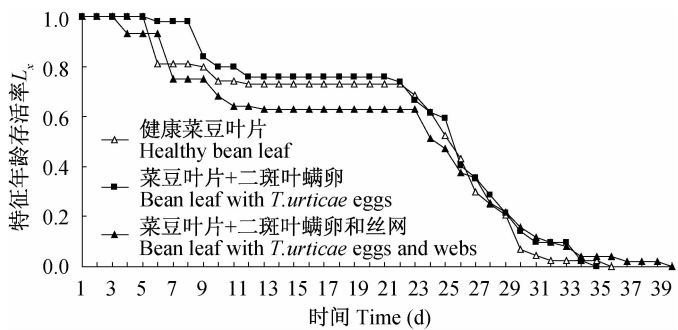


图 1 西花蓟马取食不同处理叶片时的年龄特征存活率

Fig. 1 Age specific survival rate (L_x) of *Frankliniella occidentalis* feeding on different bean leaves

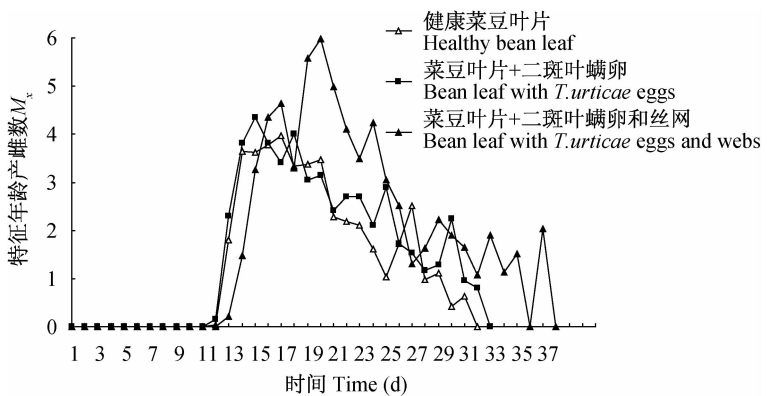


图 2 西花蓟马取食不同处理叶片时的年龄特征繁殖力

Fig. 2 Age specific fecundity (M_x) of *Frankliniella occidentalis* feeding on different bean leaves

表 4 西花蓟马取食 3 种不同菜豆叶片的生命表参数

Table 4 Life table parameters of <i>Frankliniella occidentalis</i> feeding on three different treated bean leaves			
参数 Parameters	健康菜豆叶片 Healthy bean leaf	二斑叶螨卵 + 菜豆叶片 Bean leaf with <i>T. urticae</i> eggs	二斑叶螨卵和丝网 + 菜豆叶片 Bean leaf with <i>T. urticae</i> eggs and webs
净生殖率 R_0 Net reproductive rate	28.0021	32.3074	32.8894
平均世代周期 T Mean generation time	18.7316	19.0180	20.4286
内禀增长率 r_m Intrinsic increase rate	0.1779	0.1827	0.1710
周限增长率 λ Finite increase rate	1.1947	1.2005	1.1865
种群加倍时间 t Population doubling time	3.8964	3.7931	4.0537

3 讨论

国内外有许多学者研究了 25℃ 条件下西花蓟马取食菜豆叶片时的生长发育和繁殖情况,但不同学者的结果有一定的差异。如 Brødsgaard 等 (1994) 和 Bünthe 等 (1990) 的研究表明,西花蓟马的未成熟期分别为 13.2 d 和 14.3 d,雌成虫的产卵量分别为 29.6 粒和 32.4 粒。李景柱等 (2011) 以菜豆叶片饲养西花蓟马,未成熟期和每雌产卵量分别为 14.4 d 和 81.47 粒。本文研究的西花蓟马取食健康菜豆叶片的结果和前人的研究也不完全相同,这种差异可能与所用的蔬菜品种、不同地理种群西花蓟马以及实验容器不同有关。

Trichilo 和 Leigh (1988) 发现西花蓟马同时取食植物组织和二斑叶螨的卵比单独取食植物组织时,其发育速度增快,后代成虫寿命增加。1 头西花蓟马每天可取食 12 至 40 粒二斑叶螨的卵,但是西花蓟马并不是特别喜食二斑叶螨的卵,并且也不会主动搜寻二斑叶螨的卵 (Trichilo and Leigh, 1986),只是在西花蓟马遇到二斑叶螨卵时才会对其捕食 (Wilson *et al.*, 1991)。本研究表明西花蓟马取食带有二斑叶螨卵的菜豆叶片和无卵的菜豆叶片相比,西花蓟马未成熟期缩短,但繁殖力没有明显的差异。据观察西花蓟马 2 龄若虫在菜豆上对二斑叶螨卵的捕食量每天大约 1~4 粒,明显低于西花蓟马若虫在棉花上对二斑叶螨卵的日均捕食量 (Trichilo and Leigh, 1988),这可能是造成西花蓟马取食二斑叶螨的卵时,其繁殖力没有增加的原因。

在有二斑叶螨的丝网时,西花蓟马对二斑叶螨卵的捕食降低,丝网会限制西花蓟马运动,西花蓟马会避开二斑叶螨的丝网而转向取食植物组织 (Trichilo and Leigh, 1986)。因此当二斑叶螨的卵和丝网同时存在时,西花蓟马的未成熟期和只取食菜豆叶片时没有显著地差异,可能是二斑叶螨卵的促进作用和丝网的负作用相互抵消。西花蓟马成虫受二斑叶螨丝网的影响较小,造成不论何种处理下,西花蓟马的寿命和繁殖力没有差异。

本文人为设置了二斑叶螨的密度,研究了该螨的卵及其丝网对西花蓟马的影响,而在田间二斑叶螨的密度在不同植株或同一植株的不同部位差异很大,因此,室内实验的结果并不能够准确地反应田间实际情况。因此,在自然条件下西花蓟

马与二斑叶螨的关系还需要进一步研究。

参考文献 (References)

- Agrawal AA, Kobayashi C, Thaler JS, 1999. Influence of prey availability and induced host-plant resistance on omnivory by western flower thrips. *Ecology*, 80(2):518 – 523.
- Brødsgaard HF, 1994. Effect of photoperiod on the bionomics of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera, Thripidae). *J. Appl. Entomol.*, 117(1/5):498 – 507.
- Bünthe R, Kuo-Sell HL, Sell P, 1990. Predation of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera:Thripidae) by the predatory bugs *Anthocoris nemorum* and *Anthocoris gallarum-ulmi* (Heteroptera:Anthocoridae). *Med. Fac. Land. Rijksunlv. Gent.*, 55(2a):323 – 334.
- González D, Wilson LT, 1982. A food-web approach to economic thresholds: a sequence of pests/predaceous arthropods on California cotton. *Entomophaga*, 27 (Spec. issue):31 – 43.
- Hulshof J, Ketoja E, Vanninen I, 2003. Life history characteristics of *Frankliniella occidentalis* on cucumber leaves with and without supplemental food. *Entomol. Exp. Appl.*, 108(1):19 – 32.
- Pallini A, Janssen A, Sabelis MW, 1998. Predators induce interspecific herbivore competition for food in refuge space. *Ecology Letters*, 1(3):171 – 177.
- Roda A, Nyrop J, Dicke M, English-Loeb G, 2000. Trichomes and spider-mite webbing protect predatory mite eggs from intraguild predation. *Oecologia*, 125(3):428 – 435.
- Trichilo PJ, Leigh TF, 1986. Predation on spider mite eggs by the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera:Thripidae), an opportunist in a cotton agroecosystem. *Environ. Entomol.*, 15(4):821 – 825.
- Trichilo PJ, Leigh TF, 1988. Influence of resource quality on the reproductive fitness of flower thrips (Thysanoptera:Thripidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 81(1):64 – 70.
- Van Rijn PCJ, Mollema C, Steenhuis-Broers GM, 1995. Comparative life history studies of *Frankliniella occidentalis* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera:Thripidae) on cucumber. *Bull. Entomol. Res.*, 85(2):285 – 297.
- Watts JG, 1934. Comparison of the life cycles of *Frankliniella tritici* (Fitch), *F. fusa* (Hind) and *Thrips tabaci* Lind. (Thysanoptera:Thripidae) in south Carolina. *J. Econ. Entomol.*, 27(6):1158 – 1159.
- Wilson LJ, Bauer LR, Walter GH, 1996. ‘Phytophagous’

thrips are facultative predators of two-spotted spider mites (Acari: Tetranychidae) on cotton in Australia. *Bull. Entomol. Res.*, 86(3):297 – 305.

Wilson LT, Trichilo PJ, Gonzalez D, 1991. Natural enemies of spider mites (Acari: Tetranychidae) on cotton: density regulation or casual association? *Envioron. Entomol.*, 20(3):849 – 856.

盖海涛, 鄧军锐, 李肇星, 蒋永金, 2010. 西花蓟马和花蓟马在温度逆境下的存活率比较. *生态学杂志*, 29(8): 1533 – 1537.

李景柱, 鄧军锐, 盖海涛, 2011. 寄主和温度对西花蓟马生长发育的影响. *生态学杂志*, 30(3):558 – 563.

吕要斌, 张治军, 吴青君, 杜予州, 张宏瑞, 于毅, 王恩东, 王鸣华, 王满困, 童晓立, 吕利华, 谭新球, 付卫东, 2011. 外来入侵害虫西花蓟马防控技术与示范. *应用昆虫学报*, 48(3):488 – 496.

岳臻, 鄧军锐, 胡宛, 2012. 西花蓟马与二斑叶螨的种间竞争关系. *贵州农业科学*, 40(2):65 – 69.