

토마토 수경재배에서 배양액의 pH 조절에 의한 풋마름병 방제

이중섭* · 최지호 · 서상태 · 한경숙 · 박종한 · 장한익

원예연구소 원예환경과

Control of Tomato Wilt Disease by Amending pH of Nutrient Solution in Hydroponic System

Jung-Sup Lee*, Ji-Ho Choi, Sang-Tae Seo, Kyoung-Suk Han, Jong-Han Park and Han-Ik Jang

Department of Horticultural Environment, National Horticultural Research Institute,

Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea

(Received on July 11, 2005)

The effect of pH on the survival of *R. solanacearum* and its transmission via roots of tomato in hydroponic culture were studied in laboratory and greenhouse. In laboratory experiment, *R. solanacearum* could not survive for 24h in nutrient solution with pH of 4.0 or 4.5, while 1, 14, 51 and 62% of inoculum survived at pH 5.0, 5.5, 6.0 and 6.5, respectively. When tomato plants were inoculated with *R. solanacearum* through wounds on the stems, the bacteria moved downward from the inoculation site to the roots and infectious bacteria were released from the roots into the nutrient solution. Of two pH regimes tested in greenhouse nutrient-film technique(NFT) culture, the *R. solanacearum* population was significantly lower in pH 5.0 than in pH 6.5 in most sampling data. In treatments in which *R. solanacearum* was introduced by transplanting two root-inoculated plants, significantly more plants developed wilt at pH 6.5(34 out of 48 plants) than at pH 5.0(11 out of 48 plants). In addition, when the bacterium was introduced by transplanting two stem-inoculated plants at pH 6.5, seven out of 24 plants developed wilt.

Keywords : Hydroponics, pH, *Ralstonia solanacearum*, Tomato bacterial wilt

토마토 풋마름병은 *Ralstonia solanacearum*에 의해 작물체의 뿌리 및 지제부 줄기에 감염되고 지상부는 푸른 상태로 급격히 시들어 고사하는 병해이다. 풋마름병은 우리나라에서 토마토, 담배, 고추, 가지, 참깨, 생강, 해바라기 7가지 작물에 발생하는 것으로 보고 되었으며(한국식물병리학회, 1998), 그 중에서도 토마토에서 가장 심하게 발생하는 것으로 알려졌다(이, 1999). *R. solanacearum*은 이식과 중경 또는 토양 선충 등에 의해 상처 난 식물의 뿌리나 2차근이 생기는 부위를 통해 침입하여 뿌리의 피질에서 집락을 형성하여 도관을 타고 번식함으로써 양분과 수분의 통로를 막아 식물을 고사시킨다(Vasse, 1995). *Ralstonia solanacearum*은 그람음성, 간균으로 짧은 관상극생 편모를 갖고 토마토뿐만 아니라 가지, 피망, 담

배, 무, 참깨 등 33과 197종이 넘는 넓은 기주범위를 가지고 있다. *R. solanacearum*은 고온을 좋아하며, 최적생육 온도는 35~37°C, 최고 41°C, 최저 10°C에서도 생장이 가능하다(식물세균병학, 1999). 풋마름병균은 종자전염 또는 옮겨 심을 때 전파될 수 있으며, 재배관리중 인간의 손 또는 작업도구와 유인, 전정 및 수확할 때에도 감염될 수 있다. 최근에는 수경재배중의 토마토에서도 심각한 피해를 유발하고 있다. 특히, 한번 공급하였던 배양액을 폐기하지 않고 재공급할 경우에는 시설내의 모든 토마토에 급속히 전파될 수 있다. 풋마름병원균은 보통 약산성 또는 중성인 pH에서 생육이 왕성하나, pH를 4.5 정도로 더욱 낮추면 작물을 보호하면서 풋마름병으로부터의 피해를 감소시킬 수 있다(Blettin, 2004). 따라서 본 연구에서는 *R. solanacearum*이 pH 5.0 이하 또는 9.0 이상에는 생육할 수 없다는 점을 이용하여 수경재배에 있어 pH의 *R. solanacearum*에 대한 토마토 뿌리로부터의 생육과 전염에 미치는 영향을 조사하였다.

*Corresponding author

Phone)+82-31-290-6232, Fax)+82-31-290-0406

E-mail)jslee@rda.go.kr

재료 및 방법

*Ralstonia solanacearum*에 대한 배양액의 pH 조절효과.

1리터 당 6.0 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 6.5 mM KNO_3 , 1.7 mM MgSO_4 , 0.5 mM KCl , 1.6 mM KH_2PO_4 , 20 μM EDTA-Fe , 9 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 9 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 μM H_3BO_3 , 0.7 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 와 0.3 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 로 배양액을 조제하였다. 5 mM- NaH_2PO_4 버퍼를 첨가한 뒤 멸균된 배양액은 0.1 M-HCl과 NaOH를 사용하여 pH를 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5로 조절하였다. 각각의 pH 처리는 2개의 멸균된 시험관에 10 ml의 배양액을 넣고, rifampicin-resistant strain인 *R. solanacearum*(PR-Rif^r)를 [2×10^5 colony-forming units(CFU)ml⁻¹]의 농도로 맞추어 혼합한 뒤, 실온(22~24°C)에서 2, 6, 24시간 방치한 후 각 시험관으로부터 0.1 ml씩을 3회 취하고 cycloheximide 200 mg l⁻¹와 rifampicin (NBY-CR) 100 mg l⁻¹을 혼합한 nutrient broth-yeast extract agar medium (Gross & Vidaver, 1979)에 도말하였다. 접종된 plate는 실온에서 배양하였고 5~7일 경과후 콜로니가 발생하였다. 대조구로서 세균이 접종된 시험관에서 pH 6.5로 조정하고 0.05 ml의 용액을 5번 취하여 NBY-CR 배지에 도말하였다.

식물체내 *Ralstonia solanacearum*의 이동. 암면 플러그포트(3×3 cm)에서 토마토를 파종한 후 4엽이 전개되는 시기에 배양실 내에 있는 수정배배지로 이식하였다. 배양실은 16시간 광처리와 8시간 동안 암기를 두었으며, 주간 23°C, 야간 18°C로 조절하였고 광도는 200 μEm^{-2} 로 처리하였다. 각각의 베드는 4 l 부피의 플라스틱 포트에 구성되어 있고, 플라스틱 필름으로 포장되어 있는 것을 사용하였으며, 3×3 cm의 홈이 패여진 구멍에 플라스틱 컵을 끼우고 토마토를 정식하였다. 플라스틱 포트내의 배양액 조성은 위에서 언급한 바와 같은 배양액(pH 5.8) 조성으로 가득 채웠으며, 증류수 대신 수돗물을 사용하였다. 포트내의 배양액은 4 mm 길이의 플라스틱 관을 통하여 공기방울이 공급되도록 하였다. pH 5.8~7.0 범위의 배양액, 그리고 염류농도(EC 2.3-2.5 mS cm^{-1})는 1주일에 한번씩 수돗물과 새로운 배양액을 첨가함으로써 교정하였으며, 배양액의 pH가 7.0 이상일 때는 0.1 M의 HCl을 사용하여 5.8로 낮추었다. 토마토의 줄기접종은 8엽 단계의 토마토 8주를 5엽 위치에서 칼집을 내어 NBY agar 배지에서 5일간 배양된 *R. solanacearum*(PR-Rif^r) 콜로니를 접종하였다.

접종되지 않은 토마토 8주는 대조구로 사용되었으며, 4주일 후 접종된 토마토 4주와 접종되지 않은 대조구 4주를 무작위로 채집하여, 줄기 부분은 감염부위 5 cm 아

래에서부터 0.5 cm의 길이로 절단하였다. 절단된 줄기 부분은 5 g l⁻¹ sodium hypochlorite(99.9%)에 2분 동안 처리한 후 멸균수로 세척하고 NBY-CR 배지에 접종하였다. 또한, 수관부 5 cm 아래에서부터 10개의 뿌리단편(1 cm)을 절단한 후 위와 같은 처리를 하여 감염되지 않은 부분을 위로 향하여 NBY-CR 배지에 접종하였다. 실온에서 7일 배양 후, 식물조직의 세균은 NBY-CR 배지로 접종되었으며 PR-Rif^r 형질을 나타내는 콜로니를 형성하였다. 접종 3주일 후 감염 식물체의 뿌리에서 *R. solanacearum*이 방출되었으며, 이러한 현상을 1주일 간격으로 확인하였다. 4개의 포트에서 배양액을 1 ml씩 5회 취하여 NBY-CR 배지에 도말하였다. 도말후 배지는 clean bench에서 10~15분간 건조 후 실온에서 배양하였다. 5~7일 후 배지는 PR-Rif^r와 같은 콜로니 형태를 나타내었으며, 이렇게 하여 식물체내 *R. solanacearum*의 이동여부를 조사할 수 있었다.

온실내 NFT 실험. 10개의 NFT 시설로 온실에서 실시하였다. NFT 시설은 각각 0.15×4.0 m 크기로 되어 있으며 위쪽 저장탱크에는 200 l 정도의 배양액을 저장할 수 있다. NFT 베드 다른 한 쪽에는 15 l 크기의 물통이 있고 분당 1 l의 유속으로 중력에 의해 배양액을 흘러 보낼 수 있다. 물통에서 NFT 베드로 순환되는 배양액은 펌프를 통해 다시 저장탱크로 이동하게 된다.

각 NFT 베드마다 암면배지(7×7×7 cm³)에서 키운 토마토 12주씩을 이식한 후 무작위로 실험구를 선정하여 (1) pH 5.0/무접종 (2) pH 6.5/무접종 (3) pH 5.0/뿌리접종 (4) pH 6.5/뿌리접종 (5) pH 6.5/줄기접종으로 구분하여 처리 하였다.

병원균은 감염된 토마토를 베드의 각 줄 위쪽 끝으로 옮겨 심음으로써 시설내의 처리구로 배양액에 혼합되도록 각 처리구에 접종하였다. 접종을 위한 토마토는 옮겨 심기 2주전에 수관부에서 5 cm 정도 아랫부분을 절단한 후 15분 동안 병원균이 혼합된 배양액에 PR-Rif^r(3×10^8 CFU ml⁻¹) 침지한 뒤 정사각형의 암면배지에 이식하였다. 식물의 줄기감염은 PR-Rif^r NBY agar 배지에서 5일 배양된 병원균을 칼에 묻혀서 토마토 2~3엽시기 되는 부분에 상처를 내어 접종하였다. 병원균의 밀도를 알아보기 위한 배양액 샘플은 베드의 제일 낮은 쪽 끝에서 취하여 조사하였다. 병원균의 밀도에 따라 0.1~0.5 ml 정도의 용액을 5회 취하여 NBY-CR 배지에 도말하고 5일 후 콜로니 수를 측정하였다. 한편, 병징이 나타나지 않은 식물들로부터 각각 하나의 줄기단편(약 3 cm)을 수집(수관위 약 30 cm 부분) 후 NBY-CR 배지에 7일간 배양한 후 실온에서 *R. solanacearum*의 콜로니 측정하였다.

데이터 분석. 배양액내 다른 pH 환경에서 *R. solanacearum*의 재 감염율을 구하는 실험은 Skal & Rohlf(1969)의 방법을 사용하였다. 병에 걸린 식물체 각각의 서로 다른 처리에 따른 양상은 SAS 통계프로그램(SAS Institute Inc., 1985)을 사용하였다.

결 과

***Ralstonia solanacearum*에 대한 배양액의 pH 조절효과.** pH 변화가 *R. solanacearum*의 생육환경에 미치는 영향은 매우 높았다(Table 1). pH가 낮을수록 병원균 생육에 크게 영향을 나타내었다. 24시간 처리 후 pH 4.5, 5.0, 6.5에서 각각 0, 1, 62%의 생존률을 보였다.

식물체내 *Ralstonia solanacearum*의 이동. 감염된 처리구는 접종 4주 후 눈에 띄는 증상을 나타내진 않았지만, 접종부위를 중심으로 수관과 병징이 나타나지 않은

뿌리를 포함하여 다양한 위치에서 *R. solanacearum*을 관찰 할 수 있었다(Table 2). *R. solanacearum*은 접종 4-5주 후 배양액으로부터 분리되었으며, 농도는 평균적으로 각각 14 (± 6.4 , n=4), 87(± 31.8 , n=4) CFUml⁻¹로 나타났다. 5주째에는 토마토 8주중 5주는 시들음현상이 나타났다. 접종하지 않은 식물체에 대해서는 병원균의 감염이 일어나지 않았으며, 배양액내에서도 병원균이 발견되지 않았다.

온실내 NFT 실험

pH의 조절. 모든 실험구에서는 pH가 상승하는 경향이 있었다. pH 5.0으로 조절시에는 6.5로 조절하였을 때 보다 변화의 폭이 증가되었다. 또한, pH 5.0에서는 24시간만에 5.5로 상승하였고 pH 6.5처리구에서는 pH 상승률이 비교적 낮았다.

배양액내 *Ralstonia solanacearum*의 밀도. 뿌리에 접종 처리한 토마토 2주는 pH 6.5에서보다 5.0에서 병원균의 밀도가 낮았다. 처리구 1에서 pH 5.0에서는 평균 콜로니수는 50 CFU ml⁻¹로 나타난 반면, pH 6.5에서는 100 CFU ml⁻¹ 이상의 균농도를 보였다(Fig. 1a). pH 6.5에서 줄기에 접종된 처리구는 동일 pH하에서 뿌리에 접종된 처리구보다 균 농도가 낮았으며, 대조구에서는 *R. solanacearum*은 관찰되지 않았다(Fig. 1b).

발병 확산정도. 처음 시들음 증상이 나타난 시기는 pH 6.5, 뿌리 접종 처리구에서 39일 지난 뒤 육안으로 확인할 수 있었다. 그 다음으로 증상이 나타난 시기는 49일째였다. Table 3과 같이 첫 번째로 보이는 증상은 두 번째 증상보다 약 2주 빨리 나타났고, 뿌리에 접종한 처리구에서 병징은 pH 5.0 보다 pH 6.5에서 빨리 전개되었으며, pH 6.5 상태에서 줄기에 접종된 처리구는 접종 후 77일 후에 병징이 나타났다. pH 6.5로 뿌리에 접종한 식물체에서는 71%(34/48), pH 5.0으로 뿌리에 접종한 처리구에

Table 1. Mean number of colony-forming units per plate and relative recovery rate(R%) of *Ralstonia solanacearum* after an incubation period of 2, 6 and 24h in nutrient solution with pH 4.0~6.5

pH	2h		6h		24h	
	No. CFU ^a	R% ^b	No. CFU	R%	No. CFU	R%
4.0	8	4 a ^c	0	0 a	0	0 a
4.5	38	19 b	0	0 a	0	0 a
5.0	64	31 c	7	3 b	2	1 b
5.5	98	48 d	52	25 c	29	14 c
6.0	167	81 e	147	72 d	106	51 d
6.5	199	97 f	191	93 e	127	62 e

^aMean number of colony-forming units (CFU) on 12 nutrient broth-yeast extract agar plates.

^bThe recovery rate is relative to that at pH 6.5 with 0 h incubation (100%, average=205.2).

^cValues followed by the same letter are not statistically different from each other at P=0.05 (Sokal & Rohlf(1969)).

Table 2. Detection of *Ralstonia solanacearum* in tomato plants 4 weeks after stem inoculation

Distance below inoculation point (cm)	Plant number ^a							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0	+	+	+	+	+	+	+	+
5-30	+	+	+	+	+	+	+	+
35	- ^b	-	-	-	+	+	+	+
Crown ^c	+	+	+	+	+	+	+	+
Root	3/10	6/10	4/10	1/10	3/10	4/10	4/10	7/10

No *Ralstonia solanacearum* was found in noninoculated control plants.

^aPlants 1-4 and 5-8 are from the first and second experiments, respectively.

^bNo tissue available for testing.

^cNumber of root segments with *Ralstonia solanacearum*/total number of root segments sampled.

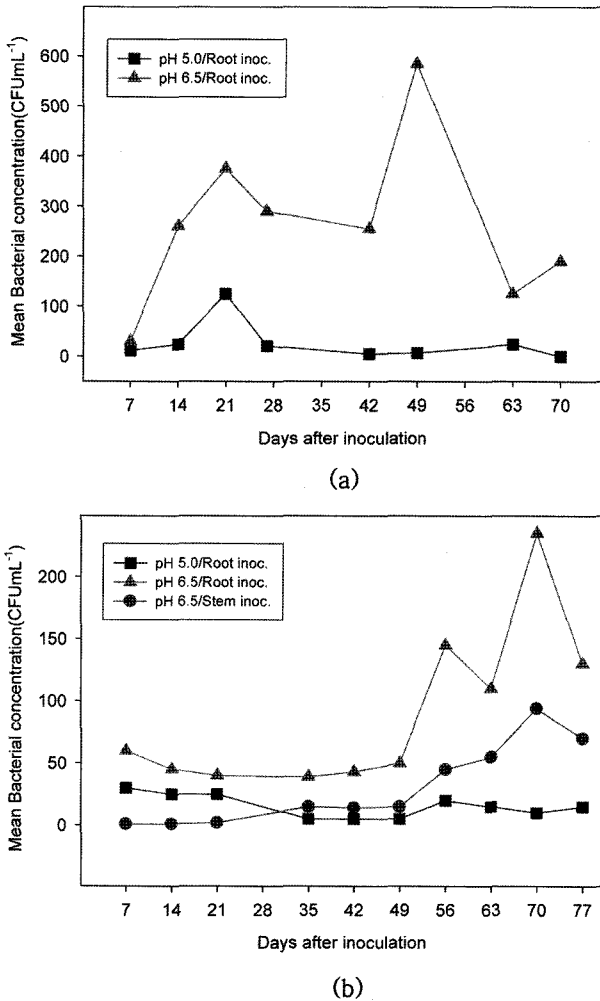


Fig. 1. Concentration (CFU ml⁻¹) of *Ralstonia solanacearum* in the nutrient solution of three different treatments (pH 5.0/root inoculation; pH 6.5/root inoculation; pH 6.5/stem inoculation). (a) Experiment 1; (b) experiment 2. *Statistically different from value for pH 5.0/root inoculation on the same sampling date (P=0.05, two-tailed t-test). **Statistically different from values of both pH 5.0/root inoculation and pH 6.5/stem inoculation on the same sampling date (P=0.05, two-tailed t-test).

서는 27%(13/48), pH 6.5, 줄기접종 처리구에서는 29%(7/24)의 감염율을 각각 보였다. 모든 처리구에 있어서 가장 처음 보이는 증상은 식물체의 한쪽 또는 몇 개의 하위엽과 신초부위가 시드는 증상이었다. 병이 진행됨에 따라 식물체 전체가 시들었으며 결국에는 고사하였다. 감염된 식물체의 배드 시설내 병원균의 확산 전염은 무작위적으로 발생되었으며, 그 외 세균에 오염된 비료, 작업중 오염 현상 등으로 인한 감염은 없었다.

고찰

수경재배지에서 배양액내의 pH 환경은 *R. solanacearum*의 생존에 큰 영향을 나타내었다. pH 4.0~6.5 범위내에서 pH가 낮을수록 병원균의 생존율은 낮았다. 이러한 현상은 일반적으로 토양에서 재배하는 것 보다 쉽게 pH를 변화시킬 수 있으므로 식물병 방제에 폭 넓게 응용할 수 있다. 또한, 간단한 pH 조절로 쉽게 재배중에 식물체의 뿌리로 이동하는 병원균의 밀도를 낮추어 줄 수 있다. *R. solanacearum*는 식물체 상부로 부터 뿌리쪽으로 이동하여 배양액으로 방출될 수 있다는 것을 추측할 수 있었다 (Bilings, 1982). NFT 배양법과 암면재배에서 이러한 오염된 배양액을 다시 순환하여 사용하면 시설내 전체에 급격히 *R. solanacearum* 병원균이 확산되는 결과를 초래하게 된다.

배양액의 pH를 5.0으로 조절하였을 때 24시간 후에는 5.5로 높아지고 7일이 지나면 6.1로 되기 때문에 pH를 매주 수동적으로 교정해 주어야 한다. 수경재배지에서의 토마토의 생육에 있어 추천할 만한 pH는 5.5~6.2 사이로 발표된 바 있으며 (Portree, 1996), 최근 연구에서는 토마토 생산에 있어 적합한 pH는 4.5~5.0이라고 보고되고 있다 (Adams, 1999). 그러나, 현재까지는 이러한 pH가 뿌리의 생육환경 또는 배양액에 적합한지 확실하게 구명된 바는

Table 3. Effect of pH on total number of tomato plants with bacterial wilt symptoms (39, 51, 64 and 70 days after inoculation) and those infected with *Ralstonia solanacearum* (80 days after inoculation) in greenhouse NFT units at pH 6.5 and 5.0

Treatment	Days after inoculation					Number of plants tested
	39	51	64	70	80	
pH 6.5/root inoc.	3 a ^{ab}	9 a	12 a	23 a	34 a	48
pH 5.0/root inoc.	0 a	1 b	2 b	3 b	13 b	48
pH 6.5/stem inoc.	0 a	0 b	0 b	0 b	7 b	24
pH 6.5/non-inoc.	0	0	0	0	0	48
pH 5.0/non-inoc.	0	0	0	0	0	48

The bacterium was introduced by transplanting two root-inoculated(root inoc.) or stem-inoculated(stem inoc.) tomato plants.
^aEach number represents the sum of two repeated experiments except those from treatment pH 6.5/stem inoc.
^bValues followed by the same letter in the same column are not significantly different at P=0.05(Fisher's two-tailed exact test).

없다. 암면배지상에서 뿌리의 pH 환경은 pH 5.0~6.0의 배양액으로 교정을 하더라도 6.5~7.5로 상승한다. 이러한 뿌리부분의 pH 상승은 초기의 토마토 생육단계에서 가장 난해한 문제이다(R, Huang, unpublished observation).

국내 토마토의 암면재배지에서 뿌리부위의 pH는 보통 6.0~7.0이다(R. Huang, unpublished observation). 앞에서 본 연구결과를 참고할 때 이러한 환경은 *R. solanacearum*이 증식하기에는 매우 좋은 환경이며, 본 병원균에 오염된 배양액을 재순환하여 사용할 경우 *R. solanacearum*균이 시설내 모든 포장에 급속히 확산되는 결과를 초래하게 된다. 작물을 보호하기 위해 급수와 비료성분의 합이 전체 암면 부피의 20~40%가 관주되면 충분한데, 30~60% 이상으로 공급하면 배양액 과잉으로 인해 암면배지상에서 침출수로 남아 베드 내에서 순환하게 되는 것이다.

최근에 재배되는 상업목적의 토마토 품종들은 역병과 같은 뿌리에서 오는 병해에 대해 저항성이 있고, 개방된 시설보다 폐쇄된 시설에서의 재배가 보다 친환경적이기 때문에 배양액의 배수에 대해 소극적이다(Tu 등, 1999). 그러나, 적절한 방제대책없이 배수되어야 할 배양액을 재순환시켜 사용한다면 포장내 병원균의 빠른 확산을 유발시키게 된다. 배수될 배양액을 pH 4.0~4.5로 밤시간 동안 교정시킬 수 있다면 *R. solanacearum*의 생존 가능성은 그만큼 적어지며, 뿌리부분의 pH를 5.0~5.5로 유지시키면 뿌리부위에서 병원균의 이동을 제한할 수 있다.

요 약

수경재배에 있어 배양액의 pH가 *Ralstonia solanacearum*의 토마토 뿌리내의 이동과 배양액 전체로의 전염 확산에 미치는 영향을 조사하였다. 실내실험에서 배양액의 pH를 4.0 또는 4.5로 조절한 배양액을 24시간 방치하였을 경우에는 병원균이 생존할 수 없었으며, pH를 각각 5.0, 5.5, 6.0, 6.5로 조절한 경우에는 1, 14, 51, 그리고 62%의 생존율을 보였다. pH 6.5와 5.0의 두가지 pH 조건하에서 포장내 NFT(nutrient-film technique)배양에서 풋마름병원

균 밀도는 pH 6.5 보다 pH 5.0에서 더 현저하게 낮았다. 모든 데이터에서 풋마름병원균은 pH 6.5에서 현저하게 시들음 증상의 발병율이 높게 발생하였다. 뿌리에 접종된 토마토 포장에서는 pH 5.0 처리구(11/48) 보다 pH 6.5 처리구에서 현저하게 발병율이 높았다(34/48). 줄기에 접종된 병원균은 pH 6.5에서 24주중 7주가 시들음 현상을 나타내었다. 수경재배에 있어서 pH 환경을 조절하여 토마토 시들음병에 잠재적인 역할을 하는 풋마름병의 발병율을 억제할 수 있었다.

참고문헌

- Adams, P. 1999. Plant nutrition demystified. *Acta Horticulturae* 481: 341-344.
- Bulletin OEPP/EPPO Bullitin 34, 173-178 *Ralstonia solanacearum*. 조용섭. 1999. 식물세균병학. 255 pp.
- Gross, D. C. and Vidaver, A. K. 1979. A selective medium for isolation of *Corynebacterium nebraskense* from soil and plant parts. *Phytopathology* 69: 82-87.
- 한국식물병리학회. 1998. 한국식물병명 목록(제 3판). 436 pp.
- 이승돈. 1999. 한국의 주요 식물세균병 발생 및 특성. 서울대학교 농학박사학위논문.
- Portree, J. 1996. *Greenhouse Vegetable Production Guide for Commercial Growers*. British Columbia, Canada : Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Pressman, E., Bar-tal, A., Shaked, R. and Rosenfeld, K. 1997. The development of tomato root system in relation to the carbohydrate status of the whole plant. *Annals of Botany* 80: 533-538.
- SAS Institute Inc. 1985. SAS User's Guide: Statistics, Version 5. Cary, NC, USA:SAS Institute Inc.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1969. Biometry. New York, USA:W. H. Freeman.
- Vasse, J., Frey, P. and Trigalet, A. 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *J. Gen. Microbiol.* 8: 241-251.