

ANETA KRAMEK

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wykorzystanie markerów RAPD do oceny różnicowania genotypowego polskich odmian pszenżyta ozimego

The application of RAPD markers to estimation of genotypic diversity of Polish winter triticale cultivars

Celem pracy była ocena różnicowania genotypowego 22 polskich odmian pszenżyta ozimego za pomocą markerów RAPD. Ocenę polimorfizmu międzyodmianowego przeprowadzono w oparciu o 15 starterów RAPD, które zostały wyselekcjonowane spośród 48 wstępnie testowanych na pięciu genotypach pszenżyta ozimego. Wybrane oligonukleotydy amplifikowały łącznie 135 fragmentów DNA, z których 87 (64,44%) było polimorficznych. Wartość indeksów podobieństwa genetycznego wynosiła średnio 0,862 i wahała się od 0,734 pomiędzy odmianami Malno i Tewo do 0,903 między odmianami Marko i Fidelio. Największy dystans genetyczny w stosunku do pozostałych odmian stwierdzono u odmiany Tewo (0,785), a najbardziej podobną do wszystkich odmian okazała się odmiana Fidelio (0,855). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono niewielkie różnicowanie genotypowe analizowanych odmian pszenżyta ozimego.

Słowa kluczowe: markery RAPD, pszenżyto, różnicowanie genotypowe

The aim of this study was estimation of genotypic diversity of 22 Polish winter triticale cultivars based on RAPD markers. The estimation of intercultural polymorphism was carried out basing on 15 RAPD primers, which were selected among 48 primers tested on 5 winter triticale genotypes. The chosen oligonucleotides generated 135 fragments of DNA, 87 of them (64.44%) were polymorphic. The mean value of similarity index was 0.862 and fluctuated from 0.734 between cv. Malno and cv. Tewo to 0.903 between cv. Marko and cv. Fidelio. The highest average genetic distance to all examined cultivars was observed in the cv. Tewo (0.785), the cv. Fidelio was the most similar to other cultivars. On the base of obtained results a low level of genotypic diversity was stated among the studied winter triticale cultivars.

Key words: genotypic diversity, RAPD markers, triticale

WSTĘP

We współczesnej hodowli roślin i nasiennictwie coraz częściej wykorzystywane są techniki biologii molekularnej oparte na analizie DNA, które są szybkie i dają jednoznaczne wyniki. Wiążą się one z wykorzystaniem markerów DNA, przedsta-

wiających polimorfizm na poziomie DNA. Ponadto markery DNA dziedziczą się zgodnie z prawami Mendla i nie podlegają modyfikującemu wpływowi czynników środowiska. Zastosowanie markerów DNA jest bardzo szerokie i umożliwia między innymi: ocenę zmienności genetycznej materiałów hodowlanych, identyfikację odmian, dobór właściwych komponentów do krzyżowań, potwierdzenie mieszańcowego charakteru uzyskanego potomstwa, identyfikację i selekcję pożądaných form, czy też przewidywanie efektu heterozji (Wolko, Bartkowiak-Broda, 1997; Broda, 2000; Masojć 2000; Milczarski i in., 2001; Stojałowski i Góral, 2002; Twardowska i in., 2002; Tyrka, Kociuba, 2002; Broda, Wojciechowski, 2004; Tams i in., 2004, 2005).

U zbóż do identyfikacji materiałów hodowlanych i oceny zróżnicowania genetycznego wykorzystuje się między innymi technikę RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams i in., 1990). Ten system markerowy, oparty na łańcuchowej reakcji polimerazy z użyciem starterów o długości 10 nukleotydów, umożliwia diagnozowanie tożsamości genetycznej przy użyciu niewielkich ilości materiału roślinnego. Za wykorzystaniem tej techniki na szeroką skalę przemawiają stosunkowo niski koszt oraz prosta procedura analiz. Jednak nie wszystkie amplifikowane fragmenty są stabilne i powtarzalne, co wskazuje na konieczność wstępnej selekcji starterów generujących prążki markerowe (Williams i in., 1990; Masojć, 2000; Milczarski i in., 2001; Stojałowski i Góral, 2002; Twardowska i in., 2002).

Celem pracy była wstępna ocena zróżnicowania genotypowego krajowych odmian pszenżyta ozimego za pomocą markerów RAPD.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły 22 polskie odmiany pszenżyta ozimego wyhodowane przez firmy hodowlane: DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. oraz Hodowlę Roślin Strzelce Sp. z o.o. i wpisane do Rejestru Odmian w latach 1982–1999 (tab. 1).

DNA wyizolowano zgodnie z metodą Milligana (1992) z koleotypy 5-dniowych siewek w dwóch powtórzeniach dla każdej odmiany i doprowadzono do stężenia 20 ng/μl. Amplifikację DNA przeprowadzono według zmodyfikowanej metody Williams i wsp. (1990). W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 15 μl wchodziły: 1× bufor do PCR (10 mM Tris pH 8,8, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40) (Fermentas, Litwa), 160 μM każdego dNTP, 500 nM startera, 1,75 mM MgCl₂, 40 ng genomowego DNA, 0,45 U *Taq* DNA Polymerase (Fermentas, Litwa). Reakcję amplifikacji przeprowadzono na termocyklerze Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) dla dwóch prób DNA z każdego genotypu, prowadząc jednocześnie reakcję kontrolną bez matrycy DNA. Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 2 minuty w temperaturze 95°C, 45 cykli: 94°C — 45s, 36°C — 45s, 72°C — 45s, z końcową inkubacją przez 10 minut w temperaturze 72°C.

Spośród wstępnie testowanych na 5 genotypach 48 starterów do oceny polimorfizmu wybrano 15 z nich (tab. 2). Każdy starter sprawdzano dwukrotnie w celu potwierdzenia powtarzalności uzyskanych wzorów.

Ocena podobieństwa genotypowego 22 odmian pszenżyta ozimego w oparciu o polimorfizm markerów RAPD i ich rodowody

Genotype similarity estimation of 22 winter triticale cultivars based on RAPD marker polymorphism, and the pedigrees

Lp. No.	Odmiana Cultivar	Rodowód odmiany*** Pedigree of cultivar***
1	Tewo (D, 1991*)	0,785** (LT 392/76 × LT 363/75) × Grado
2	Tornado (S, 1996)	0,794 MAH 6353 × Mo 7877-1
3	Malno (S, 1987)	0,797 Mo 4107/78/19 × A-8-1
4	Kitaro (D, 1999)	0,812 (Moniko × Malno) × Presto
5	Moniko (D, 1990)	0,818 CT 124/76 × LT 210/74
6	Vero (D, 1992)	0,824 CT 447/77 × Lasko
7	Pinokio (D, 1996)	0,824 (135/16/82 × LT 627/80) × Dagro
8	Alzo (S, 1997)	0,825 Ugo × MAH 9531-6
9	Lamberto (D, 1998)	0,825 (CT 929/84 × Moniko) × Presto
10	Prego (D, 1992)	0,825 Lasko × C 149579
11	Grado (D, 1984)	0,826 (6A 298 × C 954/72) × LT 310/72
12	Purdy (D, 1992)	0,829 Dagro × Salvo
13	Presto (D, 1989)	0,829 Dagro × Lasko
14	Ugo (S, 1988)	0,831 (35/76-10 × AD 206) × CT 93/76
15	Prado (S, 1998)	0,833 MAH 7387-11 × MAH 7226-1
16	Moreno (D, 1992)	0,835 (LT 173/73 × Lanca) × Dagro
17	Disco (D, 1997)	0,835 (KT 77 × LT 363/75) × Dagro
18	Lasko (D, 1982)	0,837 T 57 × C 1203/67 × (Bezostaja 1 × Dańkowska Północna) × 6 TA 206
19	Piano (D, 1998)	0,840 (CT 343/80 × L 346/80) × Grado
20	Marko (S, 1997)	0,847 Almo × CHD 782
21	Eldorado (D, 1996)	0,854 (Mtz.78/82 × LAD 627/80) × Presto
22	Fidelio (D, 1997)	0,855 (135/16/82 × L 627/80) × Presto
Średnie podobieństwo wszystkich odmian		0,826
Mean similarity of all cultivars		

* — rok rejestracji; registration year

D — DANKO Hodowla Roślin Sp z o. o.

S — Hodowla Roślin Strzelce Sp z o. o.

** — Średnie podobieństwo badanych odmian do pozostałych; The mean similarity of the examined cultivars to other cultivars

*** — Rodowody odmian: Listy Odmian Roślin Uprawnych (1982–1999); Pedigrees of the cultivars: Lists of Agricultural Plants (1982–1999)

Uzyskane produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie na 1,5% żelu agarozowym zawierającym 0,01% bromku etydy w buforze TBE przez 2 godziny przy napięciu 120V. Rozdzielone fragmenty DNA podświetlano na transiluminatorze UV i fotografowano na filmach Polaroid. Uzyskane po amplifikacji prążki DNA analizowano przy zastosowaniu programu komputerowego Scion Imane Beta 3b. Masę prążków określano porównując je z markerem wielkości GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Litwa) wykorzystując program 'Dnafrag' wersja 3,03.

Obecność lub brak prążka traktowano jako pojedynczą cechę i przypisywano jej odpowiednio wartość 1 lub 0. Podobieństwo genetyczne (SI — similarity index) pomiędzy parami wszystkich badanych odmian szacowano zgodnie z formułą Dice, za Nei i Li (1979).

Tabela 2

Sekwencje starterów RAPD oraz charakterystyka produktów amplifikacji po ich włączeniu do reakcji PCR

Sequences of RAPD primers and characteristic of amplification products of their PCR reactions

Lp. No.	Starter RAPD primer	Sekwencja 5'-3' Sequence 5'-3'	Liczba prążków Number of bands			Zakres wielkości prążków (pz) Range of bands size (pz)	
			polimorficznych polymorphic	monomorficznych monomorphic	całkowita total	min	max
1	A-07	GAA AAG GGT G	5	2	7	320	1000
2	A-16	AGC CAG CGA A	5	3	8	400	1800
3	D-16	AGG GCG TAA G	9	2	11	380	1500
4	F-05	CCG AAT TCC C	8	3	11	420	1800
5	G-01	GGG AAT TCG G	1	5	6	480	2300
6	G-02	TGC TGC AGG T	9	3	12	340	1400
7	J-10	AAG CCC GAG G	2	7	9	380	1400
8	M-07	CCG TGA CTC A	2	6	8	480	1550
9	T-04	GTC CTC AAC G	5	4	9	460	1200
10	U-02	CTG AGG TCT C	6	1	7	320	1500
11	U-225	CGA CTC ACA G	9	4	13	480	2900
12	U-534	CAC CCC CTG C	10	2	12	480	1800
13	U-535	CCA CCA ACA G	3	2	5	720	1800
14	U-572	TTC GAC CAT C	7	2	9	420	1800
15	U-600	GAA GAA CCG C	6	2	8	280	2800
Całkowita liczba prążków Total numbers of bands			87	48	135		
Średnio na starter Mean per primer			5,8	3,2	9		

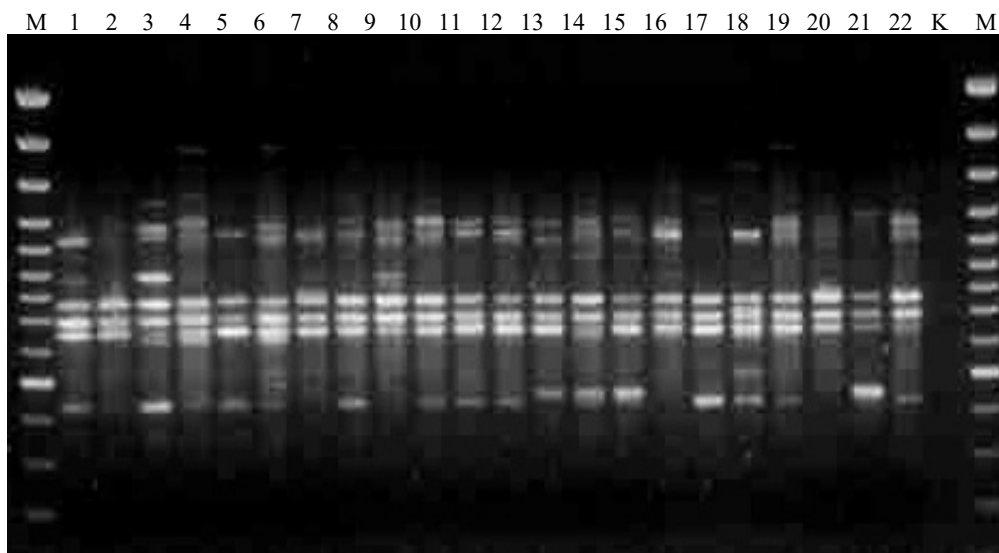
Matrycę SI uzyskaną na podstawie analizy polimorfizmu zidentyfikowanego metodą RAPD wykorzystano do konstrukcji dendrogramu metodą UPGMA (rys. 3) przy zastosowaniu programu NTSYS-pc (Rohlf, 2001).

WYNIKI I DYSKUSJA

Zdaniem Twardowskiej i wsp. (2002) przydatność markerów RAPD do identyfikacji genotypów zależy w dużym stopniu od wybranego startera generującego stabilne polimorficzne produkty amplifikacji. Terzi (1998) użył 7 starterów RAPD do analizy zróżnicowania 12 odmian pszenżyta. Z kolei Masojć (2000) do odróżnienia odmian żyta, pszenicy i pszenżyta wykorzystał 8 starterów. W przypadku niektórych gatunków liczba potrzebnych starterów może być dużo większa. Przykładem mogą tu być badania Iqbal i wsp. (1997), którzy do oceny zróżnicowania 23 odmian bawełny użyli 49 starterów.

W niniejszej pracy ocenę polimorfizmu polskich odmian pszenżyta ozimego przeprowadzono w oparciu o 15 starterów RAPD, które zostały wyselekcjonowane spośród 48 wstępnie testowanych na pięciu genotypach (tab. 2). Wybrane oligonukleotydy amplifikowały łącznie 135 odcinków DNA, z których 87 (64,44%) było fragmentami polimorficznymi. Wielkość uzyskanych prążków wahała się od 280 do 2900 pz. Całkowita liczba prążków generowanych z zastosowaniem poszczególnych starterów wynosiła od 5 dla startera U-535 do 13 dla U-225, przy czym średnio na starter przypadało 9 amplifikowanych fragmentów. Z kolei liczba prążków polimorficznych wahała się od 1 dla

G-01 do 10 dla U-534. Średnia liczba prążków polimorficznych przypadających na jeden starter wynosiła 5,8 (tab. 2). Przykładowo starter F-05 amplifikował łącznie 11 fragmentów DNA o wielkości od 420 do 1800 pz. Osiem z nich było produktami polimorficznymi, a trzy monomorficznymi (rys. 1, tab. 2).



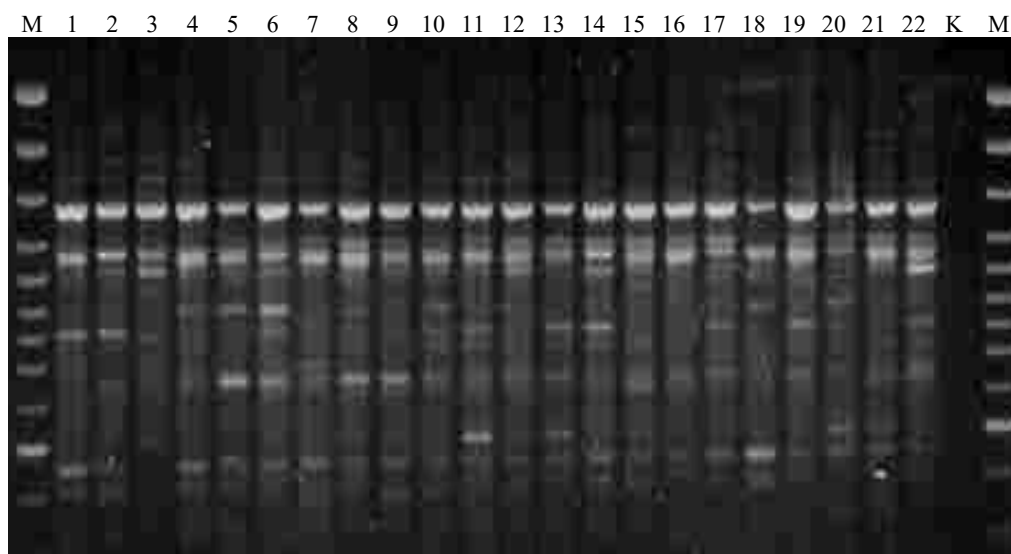
Rys. 1. Fragmenty DNA amplifikowane po włączeniu do reakcji PCR startera RAPD — F-05
 M — marker wielkości, 1 — Prego, 2 — Moniko, 3 — Tewo, 4 — Malno, 5 — Presto, 6 — Lasko,
 7 — Purdy, 8 — Ugo, 9 — Grado, 10 — Moreno, 11 — Eldorado, 12 — Fidelio, 13 — Disco,
 14 — Piano, 15 — Marko, 16 — Alzo, 17 — Lamberto, 18 — Tornado, 19 — Prado, 20 — Kitaro,
 21 — Vero, 22 — Pinokio, K — kontrola negatywna

Fig. 1. DNA fragments amplified after including the RAPD primer F-05 to the PCR reaction
 M — size marker, 1 — Prego, 2 — Moniko, 3 — Tewo, 4 — Malno, 5 — Presto, 6 — Lasko,
 7 — Purdy, 8 — Ugo, 9 — Grado, 10 — Moreno, 11 — Eldorado, 12 — Fidelio, 13 — Disco,
 14 — Piano, 15 — Marko, 16 — Alzo, 17 — Lamberto, 18 — Tornado, 19 — Prado, 20 — Kitaro,
 21 — Vero, 22 — Pinokio, K — negative control

Całkowita liczba prążków powielanych przez starter A-16 wynosiła 8. Zakres wielkości prążków mieścił się w przedziale od 400 do 1800 pz. 5 amplifikowanych fragmentów było produktami polimorficznymi, a 3 — monomorficznymi (rys. 2, tab. 2).

Gozalez i wsp. (2002), prowadząc prace mające na celu konstrukcję genetycznej mapy pszenżyta z zastosowaniem markerów RAPD, RAMP, SSR i AFLP, otrzymali 5016 produktów amplifikacji, z których 500 (9,9%) było fragmentami polimorficznymi. Podobne wyniki otrzymali również Stojałowski i Góral (2002), badając wykorzystanie markerów RAPD i ISSR do różnicowania linii cms pszenżyta ozimego z cytoplazmą *Triticum timopheevi*. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy stwierdzili, że startery RAPD ujawniły od 1 do 6 stabilnych produktów amplifikacji, z których tylko 12,2% było produktami polimorficznymi, natomiast startery ISSR dały od 4 do 12 powtarzalnych

produktów, z których również niewielki odsetek (18,1%) stanowiły produkty polimorficzne umożliwiające identyfikację genotypów.

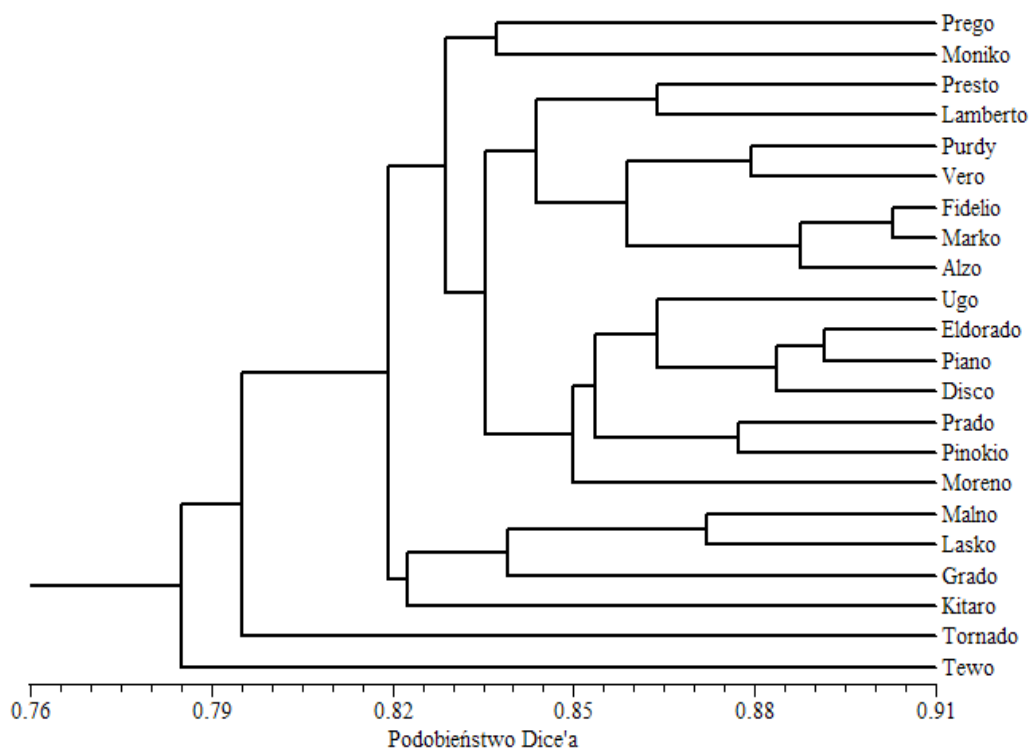


Rys. 2. Fragmenty DNA amplifikowane po włączeniu do reakcji PCR startera RAPD — A-16
 M — marker wielkości, 1 — Prego, 2 — Moniko, 3 — Tewo, 4 — Malno, 5 — Presto,
 6 — Lasko, 7 — Purdy, 8 — Ugo, 9 — Grado, 10 — Moreno, 11 — Eldorado, 12 — Fidelio,
 13 — Disco, 14 — Piano, 15 — Marko, 16 — Alzo, 17 — Lamberto, 18 — Tornado,
 19 — Prado, 20 — Kitaro, 21 — Vero, 22 — Pinokio, K — kontrola negatywna

Fig. 2. DNA fragments amplified after including the RAPD primer A-16 to the PCR reaction
 M — size marker, 1 — Prego, 2 — Moniko, 3 — Tewo, 4 — Malno, 5 — Presto,
 6 — Lasko, 7 — Purdy, 8 — Ugo, 9 — Grado, 10 — Moreno, 11 — Eldorado, 12 — Fidelio,
 13 — Disco, 14 — Piano, 15 — Marko, 16 — Alzo, 17 — Lamberto, 18 — Tornado,
 19 — Prado, 20 — Kitaro, 21 — Vero, 22 — Pinokio, K — negative control

Wartość indeksów podobieństwa (SI) dla wszystkich badanych odmian pszenżyta ozimego była wysoka i wahała się od 0,734 pomiędzy odmianami Malno i Tewo do 0,903 między odmianami Marko i Fidelio, a średnio wynosiła 0,826 (rys. 3, tab. 1).

Największy dystans genetyczny w stosunku do pozostałych odmian stwierdzono u odmiany Tewo (0,785), a najbardziej podobną do wszystkich odmian była odmiana Fidelio (0,855). Wysokie podobieństwo badanych odmian może wynikać z wykorzystania podobnych komponentów do ich otrzymania. Z przeprowadzonej analizy rodowodów wynika, że np. odmiana Dagro występuje w rodowodach następujących odmian: Disco, Moreno, Pinokio, Presto, Purdy. Odmiany o dużym podobieństwie genetycznym pochodziły głównie z DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. (tab. 1). Na dendrogramie (rys. 3) badane odmiany utworzyły grupy skupień, które na ogół nie odzwierciedlały związków wynikających z ich pochodzenia. Odmiany mające po jednym wspólnym komponencie rodzicielskim (Fidelio, Kitaro, Lamberto, Moreno, Pinokio, Presto, Purdy) nie tworzyły ze sobą bezpośrednich skupień, co może wynikać ze specyfiki zastosowanych markerów.



Rys. 3. Dendrogram 22 odmian pszenżyta ozimego uzyskany metodą UPGMA w oparciu o markery RAPD

Fig. 3. The dendrogram of 22 winter triticale cultivars generated by the UPGMA method based on the RAPD markers

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki wskazują na niewielkie zróżnicowanie genotypowe badanych odmian pszenżyta ozimego. Są one zgodne z doniesieniami innych autorów (González i in., 2002; Stojalowski i Góral, 2002; Tams i in., 2002), którzy również oceniali genotypowe zróżnicowanie materiałów hodowlanych pszenżyta jako relatywnie niewielkie. O dużym podobieństwie odmian pszenżyta (średnio 82%), określonym przy zastosowaniu uproszczonej metody AFLP, informują również Tyrka i Kociuba (2002). Z kolei Milczarski i wsp. (2001), badając możliwość wykorzystania markerów RAPD do identyfikacji 16 krajowych odmian pszenżyta ozimego stwierdzili, że zastosowane przez nich markery nie potwierdziły zależności rodowodowych i były w większości zlokalizowane w regionach genomów pochodzących od komponentów rodzicielskich różnicujących badane odmiany. Zdaniem autorów do pełnej oceny polimorfizmu konieczne jest objęcie badaniami znacznie większej liczby *loci* RAPD. Tams i wsp. (2002) sugerują, że do precyzyjnej oceny dystansu genetycznego należy zastosować szeroki

zestaw markerów, zaś Schut i wsp. (1997) podają, że ocena ta powinna się opierać równocześnie na kilku systemach markerowych.

WNIOSKI

1. Metoda RAPD pozwoliła na wstępną ocenę zróżnicowania genotypowego polskich odmian pszenżyta ozimego.
2. Otrzymane wyniki wskazują na duże podobieństwo genotypowe badanych odmian mimo stosowania różnych komponentów do ich otrzymywania.

LITERATURA

- Broda Z. 2000. Diagnostyka molekularna w badaniach zmienności genetycznej roślin. *Hod. Rośl. Nasien.* 4: 36 — 37.
- Broda Z., Wojciechowska A. 2004. Przyszłość hodowli roślin w diagnostyce molekularnej. *Hod. Rośl. Nasien.* 2: 2 — 4.
- González J.M., Jouve N., Gustafson J. P., Muñiz L. M. 2002. A genetic map of molecular markers in × *Triticosecale* Wittmack. In: *Proc. of the 5th Int. Triticale Symp., IHAR Radzików, Poland, 30 June — 5 July 2002*, vol. II: 85 — 93.
- Iqbal J. M., Aziz N., Saeed N. A., Zafar Y. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 94: 139 — 144.
- Lista Odmian Roślin Uprawnych, COBORU, Słupia Wielka: 1982–2003.
- Masojć P. 2000. Identyfikacja odmian pszenżyta przy użyciu markerów RAPD. *Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura* 206 (82): 179 — 184.
- Milczarski P., Banek-Tabor A., Masojć P. 2001. Wykorzystanie markerów RAPD do identyfikacji odmian pszenżyta. *Biul. IHAR* 218/219: 261 — 267.
- Milligan B.G. 1992. *Molecular analysis of populations: a practical approach. Plant DNA isolation.* IRL Press, Oxford, UK: 59 — 88.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269 — 5273.
- Rohlf F. J. 2001. *NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.10q.* Exeter Publishing Ltd., Setauket, N.Y: 171.
- Schut J.W., Qi X., Stam P. 1997. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1161 — 1168.
- Stojałowski S., Góral H. 2002. Wykorzystanie markerów RAPD i ISSR do różnicowania linii CMS pszenżyta ozimego z cytoplazmą *T. timopheevi*. *Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura* 228 (91): 161 — 166.
- Tams S. H., Bauer E., Oettler G., Melchinger A. E. 2004. Genetic diversity in European winter triticale determined with SSR markers and coancestry coefficient. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1385 — 1391.
- Tams S. H., Melchinger A. E., Bauer E. 2005. Genetic similarity among European winter triticale elite germplasm assessed with AFLP and comparisons with SSR and pedigree data. *Plant Breed.* 124: 154 — 160.
- Tams S. H., Melchinger A. E., Oettler G., Bauer E. 2002. Assessment of genetic diversity in European winter triticale using molecular markers and pedigree data. In: *Proc. of the 5th Int. Triticale Symp., IHAR Radzików, Poland, 30 June — 5 July. vol. I: 95 — 103.*
- Terzi V. 1998. RAPD markers for fingerprinting barley, oat and triticale varieties. *J. Genet. Breed.* 51(2): 115 — 120.
- Twardowska M., Banek-Tabor A., Masojć P. 2002. Identyfikacja odmian pszenżyta ozimego przy użyciu techniki RAPD. *Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura* 228 (91): 175 — 178.
- Tyrka M., Kociuba W. 2002. Ocena zróżnicowania genetycznego odmian pszenżyta ozimego 6x za pomocą zmodyfikowanej metody AFLP. *Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura* 228 (91): 185 — 190.

- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* 18: 6531 — 6535.
- Wolko B., Bartkowiak-Broda I. 1997. Metody diagnostyki molekularnej w hodowli roślin [in: *Hodowla roślin. Materiały z I Krajowej Konferencji*], Poznań, 19–20 listopada 1997: 389 — 402.