

대두 calmoduline유전자 SCaM-5를 발현하는 형질전환 토마토의 병 저항성 검정

이효정¹, 백동원¹, 이옥선¹, 이지영¹, 김동균¹, 정우식¹, 윤재길², 이신우², 곽상수³, 남재성⁴, 김도훈⁴, 윤대진^{1*}
¹경상대학교 대학원 응용생명과학부, 식물분자생물학 및 유전자조작연구소, ²진주산업대학교 생명자원과학대학 작물생명과학과,
³한국생명공학연구원 환경생명공학연구센터, ⁴동아대학교 생명자원과학대학 분자생명공학부

SCaM-5, a soybean calmodulin, is required for disease resistance against both a bacterial and fungal pathogen in tomato, *Lycopersicon esculentum*

Hyo-Jung Lee¹, Dongwon Baek¹, Ok-Sun Lee¹, Jiyoung Lee¹, Donggiun Kim¹, Woo Sik Chung¹, Jae-Gil Yun²,
Sin Woo Lee², Sang-Soo Kwak³, Jaeseung Nam⁴, Doh Hoon Kim⁴ and Dae-Jin Yun^{1*}

¹Division of Applied Life Science (BK21 program), and Environmental Biotechnology National Core Research Center,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²College of Life Science and Natural Resources, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

³Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Yusong,
Daejeon 305-806, Korea

⁴Faculty of Molecular Biotechnology, Dong-A University, Busan, 604-714, Korea

ABSTRACT The calmodulin as a Ca²⁺-binding protein mediates cellular Ca²⁺ signals in response to a wide array of stimuli in higher eukaryotes. Plants produce numerous calmodulin isoforms that exhibit differential gene expression patterns and sense different Ca²⁺ signals. SCaM-5 is a soybean calmodulin that is involved in plant defense signaling. Here, we constructed a SCaM-5 cDNA under control of CaMV 35S promoter and transformed it into tomato (*Lycopersicon esculentum*). The constitutive over-expression of SCaM-5 in tomato plants exhibited a high levels of pathogenesis-related (PR) gene expression, and conferred an enhanced resistance to two fungal pathogen (*Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*), and a bacterial pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Thus, this results collectively suggest that SCaM-5 plays an important role in plant defense of tomato.

Key words: calmodulin, disease resistance, pathogen-related gene, fungi, bacteria

서 론

식물과 병원균의 상관관계에 대한 연구는 인류가 농경 생활을 시작한 이래로 매우 중요한 연구 주제 중의 하나이다. 현재 작물 생산의 약 12% 정도가 병원균의 침입에 의하여 손실되어져 왔을 뿐만 아니라 이러한 손실을 감소시키기

위한 농약 사용은 환경오염의 주범이 되어져 오고 있다. 또 지속적인 살균제 사용으로 많은 병원균들이 내성을 가지게 되어 새로운 병원균 종이 생겨나게 되며 작물의 질을 떨어 뜨림으로서 인체에 악영향을 미치게 되었다. 이러한 제반문제의 해결을 위해서 최근에 식물의 질병을 조절할 수 있는 항 곰팡이성, 내충성 등 병 저항성 유전자를 확보하고자 하는 시도가 전 세계적으로 이루어지고 있다. 유용유전자가 확보되어지면, DNA 재조합, 형질전환, 분자 육종 기술 등을

*Corresponding author Tel 055-751-6256 Fax 055-759-9363
E-mail: djyun@gnu.ac.kr

통하여 산업화가 가능한 식물체를 개발함으로써 농업생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다 (Lee *et al.* 2003).

식물은 병원균의 침입을 인식하여 신호 전달 체계를 통해 병원균에 대해 방어반응을 하고 있다. 식물의 생체방어 신호 전달은 식물이 병원균에 접촉되어지거나 병원균의 분해물에 의해 생기는 직·간접적인 부산물 등 병원균 침입의 신호를 인지하는 초기 신호전달과 이렇게 인지된 신호를 G protein, kinase, phosphatase, ion flux 등을 통하여 증폭하고 또한 2차 신호전달물질 (reactive oxygen species, jasmonic acid, salicylic acid) 을 통하여 최종방어 산물을 유도하는 과정, 그리고 이런 일련의 과정들로 인하여 유도되어진 최종방어 산물인 항균성 물질 및 PR (pathogenesis-related protein) 단백질이 직접 병원균에 작용하는 과정으로 구별된다 (Bolognesi *et al.* 2002; Collinge *et al.* 1993; Florack and Stiekema 1994; Gao *et al.* 2000; Garcia-Olmedo *et al.* 1998). chitinases (Melchers *et al.* 1993; Collinge *et al.* 1993), glucanases (Garcia-Olmedo *et al.* 1998), ribosome interacting proteins (Bolognesi *et al.* 2002; Chen *et al.* 2002), defensins (Lehrer *et al.* 1991), 이러한 식물의 생체방어 과정에 의하여 발현되는 최종산물인 PR단백질은 in vitro에서 anti-microbial 활성을 가질 뿐만이 아니라, 이들 단백질을 발현하고 있는 식물체는 다수의 병원균에 대한 저항성이 강화된다는 사실이 보고되었다 (Yun *et al.* 1997).

동물과는 달리 식물에서는 다양한 형태의 Calmodulin (CaM) 유전자가 존재한다. CaM 은 Ca^{2+} -binding motif 인 EF-hands 4개를 가지고 있으며 Ca^{2+} signaling 을 조절하는 중요한 인자이다. Ca^{2+} 과 결합한 CaM 은 kinases, phosphatases, nitric-oxide synthase 뿐만 아니라 receptor, ion channel, G-proteins, and transcription factors와 같은 protein 들을 조정함으로써 세포내에서 Ca^{2+} 신호를 전달하게 된다 (Park *et al.* 2004). 콩과 작물에서는 5개의 CaM 형태 (SCaM-1부터 SCaM-5까지) 가 존재한다. SCaM-1, SCaM-2, SCaM-3 유전자는 동물의 CaM 유전자와 96% 이상 유사성을 가지고 있으며, SCaM-4 와 SCaM-5 는 약 78% 정도의 유사성을 가지고 있다. 이러한 유사성의 차이는 결국 단백질 구조의 차이를 나타내어서 서로 다른 표적 (target) 단백질을 활성화 시키는 원인이 되어지기도 한다 (Heo *et al.* 1999; Park *et al.* 2004; Park *et al.* 2004).

식물체내에서 비 보존적인 SCaM 유전자는 생체내의 방어 신호 전달에 관여한다는 보고 (Heo *et al.* 1999; Park *et al.* 2004) 에 근거를 두고 본 연구에서는 SCaM-5 형질전환 토마토를 제작하여 곰팡이와 bacteria 등의 병원균이 침입하였을 때 내성을 가지는지를 연구하였다. 이상의 결과를 바탕으로 하여 SCaM-5의 생체방어 역할을 토마토 형질전환 체에서 검증하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 생장 방법

토마토 (*Lycopersicon esculentum*) 형질전환에는 대과종인 서광 (Pink forcer, Seminis Korea) 품종을 사용하였다. 토마토 종자를 멸균수로 세척하고 70% 에탄올로 1차 표면소독 후, 1% 왁스 (sodium hypochlorite) 용액으로 20분간 담가 2차 표면소독을 하였다. 그리고 왁스를 제거하기 위해 멸균수로 5회 반복하여 세척을 하였다. 소독한 종자는 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에서 심고 형광 빛에서 16시간 암 8시간의 광주기, 25°C 의 조건으로 발아시키고 1주일 자란 유식물체의 자엽 절편체를 식물체 재분화 및 형질전환 재료로 사용하였다.

토마토 형질전환

식물 형질전환용 vector 를 제작하기 위하여 먼저 SCaM-5 의 coding 된 염기를 *Xba*I과 *Cl*aI의 제한효소로 절단시켰다. pGA643 vector의 CaMV 35S promoter 와 5'/3' terminator 영역 사이를 *Xba*I과 *Cl*aI 의 제한효소로 절단한 후 이미 절단되어진 SCaM-5 유전자를 그 사이에 연결하였다. pGA643 vector (Control)와 pGA643-SCaM-5 (SCaM-5)를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 에 형질전환 시킨 후, 형질전환된 LBA4404 를 토마토의 자엽 절편체에 감염시켜 형질전환시켰다. 형질전환된 토마토는 shoot 유도배지 (MS 기본배지, IAA 0.87 mg/ℓ, zeatin 1.75 mg/ℓ, kanamycin 50 mg/ℓ, cefotaxime 250 mg/ℓ)에서 재분화 시켰다 (Horsh *et al.* 1985).

Northern blot 분석

pGA643 vector (Control) 와 pGA643-SCaM-5 (SCaM-5) 가 형질전환된 토마토에서 총 RNA 를 추출하기 위하여 Hong 등 (1987)의 방법으로 하였다. 총 RNA 10 µg을 1.2% formaldehyde agarose gel 에서 전기영동을 한 뒤, Gel 위에 Gene Screen membrane (NEN, Boston, MA)을 놓고, membrane 에 RNA 를 옮겨주었다. UV cross-linker 를 이용하여 RNA 를 고정을 시킨 후, Random primer DNA labeling kit (TAKARA)를 사용해 α -[32 P]dCTP로 probe 인 SCaM-5 유전자와 PR-5 유전자를 각각 표지하였다. 65°C 에서 hybridization buffer 에서 18시간동안 반응시키고, α -[32 P]dCTP 로 labeled priming 된 것을 씻어 주기 위해서 1차적으로 1% SDS, 2 × SSC washing buffer로 65°C 에서 15분, 2차적으로 1% SDS, 0.2 × SSC washing buffer 로 65°C 에서 15분 2번 반복해주었다. 씻어준

membrane 은 필름 카세트에 필름과 함께 넣어서 -80°C 에서 3일 동안 보관한 후에 필름을 현상하였다 (Baek *et al.* 2004).

병원균 처리

형질전환된 토마토를 무균상태에서 곰팡이 일종인 *P. capsici*와 *F. oxysporm*을 감염시켰다. SCaM-5 가 가장 많이 발현되어지는 2-4번 식물체와 가장 작게 발현되어지는 4-2번 식물체를 이용하였으며, 대조군으로 pGA643 vector (control) 로 형질전환한 식물체를 이용하였다. 각각의 형질전환 토마토의 shoot 를 계대시키고 뿌리를 호르몬이 없는 배지에서 키웠다. 1/2 MS 배지에서 키운 형질전환된 토마토 위에 2개의 곰팡이 포자의 agar plugs (직경 0.5 cm 정도의 크기)를 올려놓았다. 이렇게 감염시킨 다음 3일, 5일, 8일 후에 포자가 형성한 균사의 반지름 직경을 측정하였다. 병원균에 의해 나타나는 증상은 감염 후 7일째부터 조사하기 시작하였다.

Avirulent *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (*Pst* DC3000)를 감염시키기 위하여 먼저 *Pst* DC3000 strain 을 배지 (bacto tryptone 10 g/l, protease peptone 10 g/l, dipotassium phosphate 1.5 g/l, Magnesium sulfate 1.5 g, pH 7.0) 에 OD₆₀₀ = 1 (2 × 10⁷ cfu/ml)까지 키웠다. OD₆₀₀ = 0.1까지 희석시킨 후 뿌리가 자란 토마토에서 뿌리 끝을 약간 (1-2 cm) 정도 자르고 *Pst* DC3000 가 들어있는 용액에 1분 동안 담근 뒤, 다시 MS 배지에 키웠다. Bacteria 에 감염되어 나타나는 증상은 1주일째부터 조사하기 시작하였다.

결과 및 고찰

토마토에서의 SCaM-5 의 발현

콩과 식물에서 SCaM-5 유전자를 분리하여 식물의 binary vector 인 pGA643 vector 에 *XbaI/ClaI* 의 제한 효소를 이용하여 재조합하였다 (Figure 1A). 이렇게 재조합 되어진 pGA643-SCaM-5 와 pGA643 vector 를 토마토에 형질전환시켰다. 형질전환된 토마토에서 잎을 따서 RNA를 추출하고 northern blot 분석을 통하여 발현정도를 분석하였다. pGA643 vector (control) 형질전환 토마토에서는 SCaM-5가 발현되어 지지 않는 반면에 pGA643-SCaM-5 (SCaM-5) 형질전환 토마토에서는 항상 발현되어져 있다는 사실을 확인하였다 (Figure 1B). 이 중에서 SCaM-5 가 많이 발현되어지는 2-4번 토마토 식물체와 적게 발현되어지는 4-2번 토마토 식물체를 가지고 병원균 실험을 하였다.

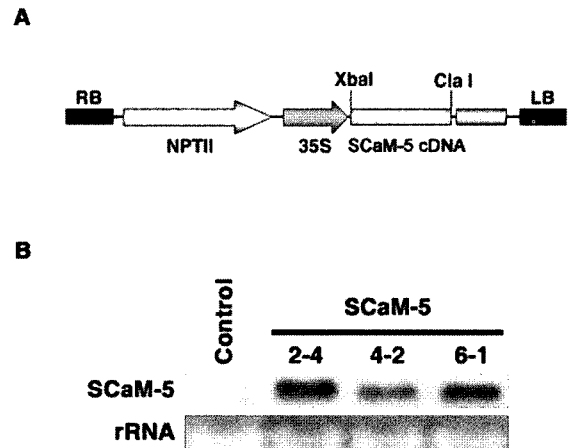


Figure 1. The expression of SCaM-5 in transgenic tomato plants. (A) Schematic map of a binary vector that contains SCaM-5 used for transformation. LB, left T-DNA border sequence; RB, right border sequence; 35S, CaMV 35S promoter. (B) Northern blot analysis. Transgenic tomato plants transformed with pGA643-SCaM-5 (SCaM-5) and control plant transformed with pGA643 vector (Control), were analyzed for SCaM-5 expression. Equal loading of RNA (10 µg in each lane) was confirmed by pre-staining the gel with ethidium bromide (lower; rRNA). RNA blots were probed with ³²P-labeled SCaM-5 cDNA.

SCaM-5가 형질전환된 토마토에서의 PR 유전자의 발현

토마토에서 SCaM-5 에 의해 식물 생체방어 신호전달 기작을 활성화 시키는지를 조사하기 위하여 PR 유전자 (PR-5)가 발현되어지는지를 northern blot 분석을 통하여 관찰하였다. 그 결과 SCaM-5 가 형질전환된 토마토에서 PR-5 유전자는 항상 발현되어지는 것을 확인하였고 (Figure 2), 따라서 SCaM-5 는 병원균이 침입했을 때와는 상관없이 항상 식물 생체방어 신호기작을 활성화 시킨다는 사실을 증명하였다.

SCaM-5가 형질전환된 토마토의 병저항성 강화

In vivo 상에서의 SCaM-5 가 곰팡이 병원균에 대하여 저항성을 가지는지를 관찰하기 위하여 pGA643-SCaM-5 (SCaM-5) 가 도입된 형질전환 토마토와 pGA643 vector (Control)가 도입된 형질전환 토마토에 각각 곰팡이인 *P. capsici*와 *F. oxysporm*를 감염시켰다 (Figures 3, 4). MS 배지에 키운 각각의 형질전환 토마토에 *P. capsici*와 *F. oxysporm*의 포자가 자란 agar plugs 를 옮겨놓았다. 감염시킨 후, 7일째에 갈색의 줄기 고사 (stem rotting; necrosis)가 생기고 줄기의 생장이 보다 작아지는 현상과 같은 병원균에 의한 증상이 나타나기 시작하였다. 감염시킨 후 14일이 지난 뒤, control 토마토에서는 병원균에 의한 이러한 증상들이 나타났지만, SCaM-5 토마토

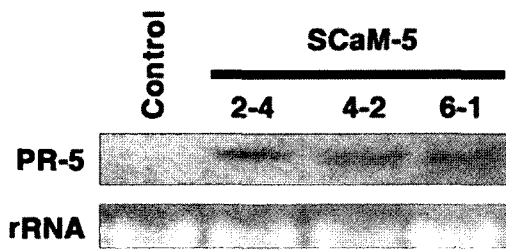


Figure 2. Constitutive expression of PR-5 genes in transgenic SCaM-5 tomato plants. Total RNAs were isolated from pGA643-SCaM-5 (SCaM-5) or pGA643 vector (Control) transgenic plants. Equal loading of RNA (10 µg in each lane was confirmed by pre-staining the gel with ethidium bromide (lower; rRNA). RNA blots were probed with ³²P-labeled PR-5 cDNA.

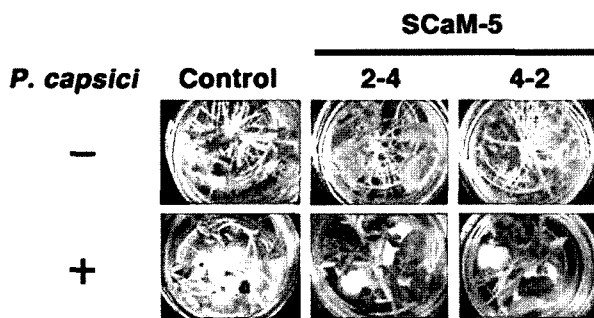


Figure 3. SCaM-5 confers resistance against *P. capsici* in transgenic tomato plants. Two agar plugs of *P. capsici* hyphae were placed in phytatrays containing growing tomato plants transformed with pGA643-SCaM-5 (SCaM-5) or pGA643 vector (Control). Photographs were taken 2 weeks after inoculation. Three independent experiments show similar results.

에서는 이러한 증상이 전혀 나타나지 않았다 (Figure 3). 21일이 지난 후, control 토마토에서는 잎이 마르고, 줄기가 고사되어 결국에는 죽는다는 사실도 관찰하였다. 이와 대조적으로 SCaM-5 형질전환 된 토마토는 잎에서 부분적으로 necrosis 영역이 조금 나타났을 뿐 전혀 영향을 받지 않았다 (Figure 3). *F. oxysporum*의 포자를 도말했을 때도 마찬가지로 SCaM-5 토마토에서는 처음 접종한 부분과는 명확히 범위가 구별되어 지게 나타났다. 반면 control 토마토에서는 곰팡이의 포자가 보다 과도하게 자라는 현상을 관찰하였다 (Figure 4).

In vivo 상에서의 SCaM-5 가 bacterial pathogen 에 대해서도 저항성을 가지는지를 관찰하기 위하여 pGA643-SCaM-5 (SCaM-5)가 형질전환된 토마토와 pGA643 vector (Control) 가 형질전환된 토마토에 avirulent *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000)를 감염시켰다 (Figure 5). 각각의 형질전환된 토마토의 뿌리를 약간 절단한 후, *Pst* DC3000 strain을 키운 배지에 담구고 다시 MS 배지에 키워 bacterial pathogen에 대해 나타나는 증상을 관찰하였다. 감염시킨 후 7 일째에 곰팡이에 의해 나타나는 증상과 같은 증상이 나타나

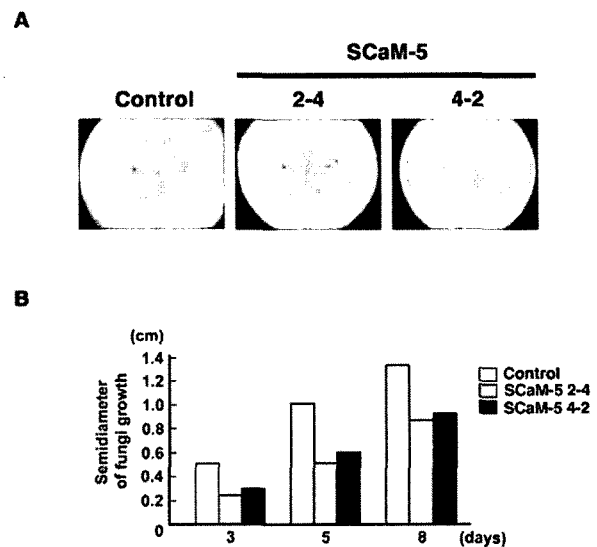


Figure 4. Transgenic tomato plants expressing SCaM-5 inhibit fungal growth. (A) Two agar plugs of *F. oxysporum* hyphae were placed in phytatrays growing pGA643 vector (Control) transgenic plant and pGA643-SCaM-5 (SCaM-5) transgenic plants. Photographs were taken from the bottom of the phytatrays to show the hyphae growth of the fungi. (B) The hyphae semi-diameters were measured after 3, 5 and 8 days of incubation. The results are mean value of three independent experiments.

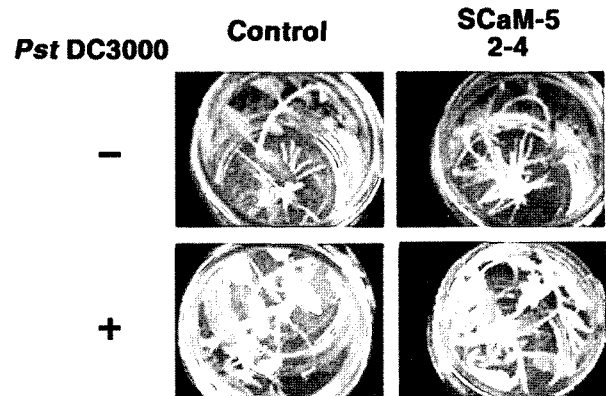


Figure 5. SCaM-5 confers resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) in transgenic tomato plants. pGA643-SCaM-5 (SCaM-5) or pGA643 vector (Control) tomato plants dipped into solution containing *Pst* DC3000. Photographs were taken 1 weeks after inoculation. The results are representative of three different trials.

기 시작하였다. 위의 결과와 마찬가지로 control 토마토에서는 잎이 마르고 줄기의 생장이 늦어지면서 고사되어가는 반면 SCaM-5 토마토에서는 이러한 현상이 나타나지 않았다 (Figure 5). 이와 같은 결과를 바탕으로 SCaM-5 유전자는 곰팡이 (*P. capsici*와 *F. oxysporum*)와 bacteria (*Pst* DC3000)에 의한 병원균 침입에 대한 병저항성 강화에 관여되어진다는 사실을 확인하였다.

적 요

농작물 생산에 있어서 병원균 침입에 의한 피해를 줄이는 것은 아주 중요한 과제이다. 식물은 스스로도 생체 방어 신호 전달 기작을 가지고 있지만 그 피해를 줄이는데 있어서 한계가 있다. 본 연구는 콩과 식물에서 분리한 식물생체방어 신호 전달 유전자인 SCaM-5를 토마토에 형질전환하여 형질전환 식물체를 작성하고 병 저항성에 관한 실험을 수행한 것이다. SCaM-5 유전자가 형질전환 된 토마토에서는 pathogen-related (PR-5) 유전자를 항상 발현시킴으로서 계속적으로 식물 생체 방어 신호기작을 활성화 시킨다는 사실을 확인하였다. 또한, SCaM-5를 형질전환 시킨 토마토는 식물에 막대한 피해를 주는 중요한 곰팡이 (*P. capsici*와 *F. oxysporum*)와 bacteria (*Pst* DC3000)에 대하여 병 저항성을 가진다는 것을 검증하였다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 바이오그린21사업, 과학재단 특정 기초연구 사업 (#R01-2006-000-10123-0) 및 환경생명과학국가핵심연구센터 (# R15-2003-012-01002-0)의 지원에 의한 결과로 수행되었다.

인용문헌

- Bolognesi A, Polito L, Lubelli C, Barbieri L, Parente A, and Stirpe F (2002) Ribosome-inactivating and adenine polynucleotide glycosylase activities in *Mirabilis jalapa* L. tissues. *J. Biol. Chem.* 277: 13709-13716
- Chen Y, Vandenbussche F, Rouge P, Proost P, Peumans WJ and Van Damme EJ (2002) A complex fruit-specific type-2 ribosome-inactivating protein from elderberry (*Sambucus nigra*) is correctly processed and assembled in transgenic tobacco plants. *Eur. J. Biochem.* 269: 2897-2906
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U and Vad K (1993) Plant chitinases. *Plant Journal* 3: 31-40
- Florack DE and Stiekema WJ (1994) Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol. Biol.* 26: 25-37
- Gao AG, Hakim SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner BM, Stark DM, Shah DM, Liang J and Rommens CM (2000) Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* 18: 1307-1310
- Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM and Rodriguez-Palenzuela P (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* 47: 479-491
- Heo WD, Lee SH, Kim MC, Kim JC, Chung WS, Chun HJ, Lee KJ, Park CY, Park HC, Choi JY and Cho MJ (1999) Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 766-71
- Hong JC, Nagao RT and Key JL (1987) Characterization and sequence analysis of a developmentally regulated putative cell wall protein gene isolated from soybean. *J. Biol. Chem.* 262: 8367-8376
- Horsh RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholz D, Rogers SG and Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231
- Koo JC, Lee SY, Chun HJ, Cheong YH, Choi JS, Kawabata S, Miyagi M, Tsunasawa S, Ha KS, Bae DW, Han CD, Lee BL and Cho MJ (1998) Two hevein homologues isolated from the seeds of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochem. Biophys. Acta* 1382: 80-90
- Lee OS, Lee B, Park N, Koo JC, Kim YH, Prasad D T, Karigar C, Chun HJ, Jeong BR, Kim DH, Nam J, Yun JG, Kwak SS, Cho MJ, Yun DJ (2003) Pn-AMPs, the hevein-like proteins from *Pharbitis nil* confers disease resistance against phytopathogenic fungi in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry* 62: 1073-1079
- Lehrer RI, Ganz T and Selsted ME (1991) Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* 64: 229-230
- Melchers LS, Sela Buurlage MB, Vloemans SA, Woloshuk CP, van Roekel JS, Peen J, Van den Elzen PJ and Cornelissen BJ (1993) Extra cellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24. Chitinase and beta-1,3-glucanase in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 21: 583-593
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15: 473-497
- Park CY, Heo WD, Yoo JH, Lee JH, Kim MC, Chun HJ, Moon BC, Kim IH, Park HC, Choi MS, Ok HM, Cheong MS, Lee SM, Kim HS, Lee KH, Lim CO, Chung WS and Cho MJ (2004) Pathogenesis-related gene expression by specific calmodulin isoforms is dependent on NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance. *Mol Cells.* 18: 207-13
- Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH, Yoon HW, Lee SH, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Hong JC and Cho MJ (2004) Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol* 135: 2150-61