

rDNA-ITS 및 CAPS 분석에 의한 꽃송이버섯 (*Sparassis crispa*) 수집균주의 계통분류학적 특성구분

정종천, 이명철¹, 전창성, 이찬중, 신평균

농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, ¹국립농업과학원 농업유전자원센터

Phylogenetic relationships of medicinal mushroom *Sparassis crispa* strains using the rDNA-ITS and CAPS analysis

Jong-Chun Cheong, Myung-Chul Lee¹, Chang-Sung Jhune, and Chan-Jung Lee and Pyeong-Gyun Shin

Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science,

Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

¹National Agrobiodiversity Center, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon

(Received February 18, 2010. Accepted March 8, 2010)

ABSTRACT : This study was carried out to analyze the genetic relationships among 22 strains of *Sparassis crispa*, which were collected from various regions of worldwide. The cleaved amplified polymorphic sequence were obtained from the ribosomal DNA ITS regions of each strain. Based on the sequence analysis, the presence of five different groups were observed. Most strains shared the high nucleotide sequence similarity (about 90%) to each other, except only one strain, KACC50866. Nucleotide sequence similarity of KACC50866 was below 10% to other strains, indicating the genetic relatedness of strain KACC50866 was low compared to other strains. More works such as mitochondria genome analysis should help to determine the precise genetic diversity of *S. crispa* strains.

KEYWORDS : PCR, RAPD, ribosomal DNA, Sequencing, *Sparassis crispa*

서 론

꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 민주름버섯목(Aphyllophoreles), 꽃송이버섯과(*Sparassidaceae*)에 속하는 버섯이다(2000, 이 등; 2003, 김 등). 또한 이 버섯은 낙엽송, 전나무, 잣나무 등 침엽수의 지체부에서 발생하는데 살아있는 나무의 심재부를 부후하는 임목 해균에 속한다(1993, 김). 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 항암(2000, Ohno), 항전이(2009, Yamamoto) 등의 효과가 알려져 있으며, 이러한 인자로 β -1,3-D-glucan이 밝혀져 이에 대한 분리방법이 진행되어 최근에는 나노입자 크기로 분리가 가능해졌다

(2007, Tada; 2009, Park). 특히, 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)에서 면역활성이 높다고 알려진 β -1,3-D-glucan 함량이 43.6 g/100 g으로 이미 기능성 버섯으로 알려진 잎새버섯이나 신령버섯보다 2~4배나 높다고 보고되었다(1999, 中島). 일본의 中島(1999)가 인공배배 배지조성을 보고하였으며, 우리나라에서도 균의 배양적 특성(1998, Shim 등)과 ribosomal DNA 분석(2000, 김), 균의 생태적 특성(1993, 김)에

관한 연구 보고가 있다. 또한 Wang 등(2004)은 핵과 미토콘드리아 rDNA를 이용하여 꽃송이뿐만 아니라 중요 버섯간의 유연관계를 분석하였고, Dai 등(2006) 및 Blanco-Dios 등(2006)은 미토콘드리아 atp6, 핵 rDNA 및 rpb2를 사용하여 꽃송이버섯의 새로운 품종의 유연관계를 분석하였다.

본 시험은 국내·외에서 수집한 꽃송이버섯 22균주에 대하여 rDNA ITS region에 대한 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 및 염기서열을 토대로 분자생물학적 유연관계를 분석하여 균주의 다양성을 확인코자 수행하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 시험에 사용한 꽃송이버섯균은 국내·외에서 22균주를 수집하여 4±0.5℃의 항온기에 저장하고, 25±0.5℃ 항온기에서 계대배양하면서 사용하였으며 수집균주 내역은 Table 1과 같다.

분자생물학적 유연관계 분석

Genomic DNA의 분리 및 rDNA ITS영역의 PCR 증폭 PDB(Potato Dextrose Broth; DIFCO 254920)배지에 30일간 정치배양 후 여과한 균사체를 동결시켜서 Graham

* Corresponding author : ☎ (031)290-0372, Fax, (031)290-0209,

E-mail: jcheong@korea.kr

Table 1. The list of *Sparassis crispa* used in this study

Tentative No.	Isolates No.	Genebank Accession No.	Source
SC-1	KACC 50866	AY156938	Korea
SC-2	ASI 150006	AY156934	Korea, Private
SC-3	ASI 150001	AY156933	KCTC 26168, CBS 143.75, German
SC-4	ASI 150002	AY156935	KCTC 26150, CBS 308.31, Netheland
SC-5	ASI 150003	AY156939	KCTC 26150, CBS 408.71, Netheland
SC-6	ASI 150007	AY156940	F-4212, Japan
SC-7	ASI 150008	AY156941	F-4279, Japan
SC-8	ASI 150009	AY156942	F-4328, Japan
SC-9	ASI 150010	AY156943	F-4358, Japan
SC-10	ASI 150011	AY156944	ATCC 38048, German
SC-11	ASI 150012	AY156945	Japan, Private
SC-12	ASI 150013		FRI 69525
SC-13	ASI 150014		DGSc 1, Korea
SC-15	ASI 150015		DGSc 3, Korea
SC-16	ASI 150016		DGSc 4, Kuangrung, Korea
SC-17	ASI 150017		DGSc 5, CBS 830.91, Netheland
SC-18	ASI 150018	AY156946	FRI 69006, Korea
SC-19	ASI 150019	AY156947	FRI 69008, Korea
SC-20	ASI 150004	AY156936	KCTC 26150, CBS 830.91, Netheland
SC-21	ASI 150005	AY156937	KCTC 26180, CBS 716.94, Netheland
SC-22	ASI 150020	AY156948	Yanggi F-003, Poland
SC-23	ASI 150021	AY156949	Yanggi CH-105, USA

(1994)의 방법에 따라 분리한 genomic DNA를 PCR 반응용액의 주형 DNA로 사용하였다. 공시균주의 rDNA ITS 영역을 증폭하기 위하여 White 등(1990)에 의해 보고된 primer ITS 1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 primer ITS 4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하였다. PCR 반응은 2.5 mM dNTP, 10 μ l의 10 \times buffer(100 mM Tris pH 9.0, 50 mM KCl, 10% Triton X-100), 25 mM MgCl₂, 100 pmol primer, 0.5 μ l의 Taq polymerase(Promega Co.), 30 ng genomic DNA를 멸균수와 함께 희석하여 총량을 100 μ l로 하였다. PCR 증폭기는 PTC-100TM(MJ Research Co.)을 이용하였다. PCR 반응 조건은 95 $^{\circ}$ C, 4 min.에 변성시킨 후 반응조건은 95 $^{\circ}$ C, 1 min.; 58 $^{\circ}$ C, 1 min.; 72 $^{\circ}$ C, 2 min.으로 35번 증폭하여 72 $^{\circ}$ C, 8 min.에서 다형성을 형성하게 하였다

제한효소 절단 분석

ITS region의 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 분석을 위하여 PCR 증폭이 확인된 rDNA의 산물을 2 vol.의 100% 에탄올과 1/10 vol.의 3 M Na-AcOH을 첨가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간 처리한 후, 5분간 원심분리(12,000 rpm)하여 DNA를 침전시키고 다시 70% 에탄올로 세척하여 건조한 후 30 μ l의 멸균한 3차 증류수에 녹였다. Spectrophotometer로 1 μ g되게 정량한 후 제한효소 HaeIII, HinfI, MspI, HhaI, Sau 3A 및 AluI 등 6가지의 4-base cutting 효소를 이용하여 제조회사의 권장 반응조건에 따라 절단하였다. 절단된 단편들은 1 \times TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, glacial acetic acid pH 8.0)에

서 COSMO BIO사의 MUPID-21을 사용하여 1% agarose에 전기영동하여 ethidium bromide 용액(1 μ g ml⁻¹)으로 염색한 후 DNA 단편다형성을 UV상에서 관찰하였다.

PCR 산물의 클로닝 및 염기서열 분석

PCR 증폭된 rDNA ITS 영역의 염기서열 분석을 위하여 이들 유전자 단편을 pGEM-T vector system(Promega Co.)을 이용하여 cloning 한 후, E. coli DH5 α competent cell에 형질전환하고, ampicilin(25ug/ml), X-gal 및 IPTG가 첨가된 LB 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride) 배지에 E. coli를 도말한 후 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양하여 white colony를 선별하였다.

형질전환된 E. coli의 colony 중 한 strain당 5개의 colony를 무작위로 선별하여 3 ml의 LB 배지, 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 진탕 배양한 후 Qiagen Mini kit(Qiagen Co.)를 이용해서 plasmid를 분리 정제하였다.

염기서열을 결정하기 위하여 Sanger 등(1977)의 dideoxy chain termination method를 응용한 Bigdye Terminator Sequencing Kit ver1.0 (ABI Co.)을 사용하여 sequencing PCR을수행하였다. PCR반응은 96 $^{\circ}$ C에 10초간 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에 5초간 annealing, 60 $^{\circ}$ C에 4분간 polymerization을 35회 반복하였다. 반응액을 정제하기 위하여 에탄올로 침전시킨 후 염기서열 분석에 사용하였다. 염기서열 분석을 위한 전기영동은 acrylamide와 urea, TBE을 섞어 4.5% polyacrylamide gel을 만든 후 Automatic sequencer(Perkin Elmer, ABI 377)를 사용하였다. Jukes와 Cantor(1969)의 방법을 이용하여 evolutionary distance matix를 작성하고,

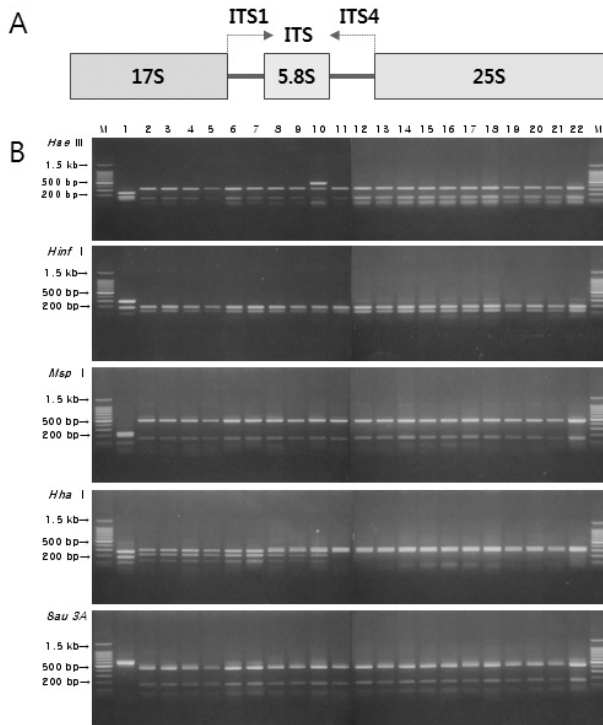


Fig. 1. A structure of rDNA gene and primer design for PCR amplification of ITS region(A) and restriction fragment pattern of PCR-amplified of rDNA ITS region (B) from *Sparassis crispa*.

MEGA(molecular evolutionary genetics analysis; Kumar 등, 1993)의 neighbor-joining 방법을 이용하여 이들 자료를 통하여 생성된 계통수를 작성하였다. 또한 사용된 균주들의 계통학적 유연관계 분석을 위하여 Lasergene사의 DNASTAR software의 Megalignterogram을 이용하여 rDNA-ITS의 염기서열을 clusterV algorithm으로 분석하였다.

결과 및 고찰

꽃송이버섯 수집균주의 ITS 영역 구조 분석

Fig. 1-A는 일반적인 고등균류의 rDNA gene cluster로서 ITS 영역은 곰팡이류에 있어서 종내 또는 종간의 변이가 다수 있는 것으로 보고되어 왔다(Mitchell, 1995).

본 시험에서 primer 1과 primer 4에 의한 꽃송이버섯 수집균의 ITS영역은 603~607 bp 였으며 균주간의 밴드 크기는 SC-1을 제외하고는 명확하게 구분되지 않았다(Fig. 1).

제한효소 절단 분석

꽃송이버섯 수집균주들의 rDNA ITS 영역의 PCR 산물에 대하여 4bp를 인지하는 *Hae* III, *Hinf* I, *Msp* I, *Hha* I,

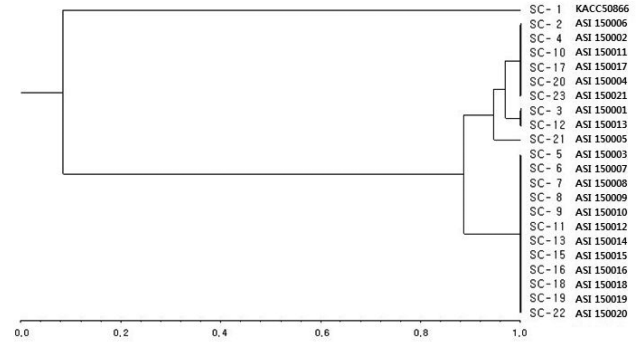


Fig. 2. Phenogram based on restriction patterns of *Sparassis crispa* rDNA ITS region PCR-RFLP

Sau 3A, *Alu* I 등을 사용하여 제한효소 단편의 다형성을 살펴보았다.

Fig. 1-B에서 5종의 제한효소 중 *Hha* I 은 각 균주들에 대한 특이적인 단편양상을 보였다. 그러나 다른 제한효소에서 KACC50866을 제외하고는 균주간에 큰 차이가 없었다.

이 단편들의 위치를 토대로 Fig. 2의 Dendrogram을 작성한 결과 4개의 군으로 그룹화되었다. KACC50866은 다른 균주들과의 유연관계가 20%이하로 멀고, 균의 배양적 특성을 조사하여 보고한 정 등(2002)의 결과에서도 KACC50866은 ASI 150010과 탄소원, 질소원, 배양온도, 배지 pH 등에서 차이가 많은 것으로 보아 꽃송이버섯이 아닌 것으로 생각된다. 다른 21균주들은 90%이상의 유연관계를 보이면서 4개의 그룹으로 나타났다. 즉 ASI150002, 150004, 150006, 150011, 150017, 150021 (I 그룹); ASI150001, 150013 (II 그룹); ASI150005 (III 그룹); ASI150007, 150008, 150009, 150010, 150012, 150014, 150015, 150016, 150018, 150019, 150020 (IV 그룹)으로 구분되었다.

rDNA의 제한효소 단편양상을 이용하여 종을 간이적으로 동정하기 위해서는 각 종별로 많은 계통을 확보하여 이들의 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 양상이 종 특이적이며 균일하다는 점이 증명되어야 하지만 본 시험에서는 수집균주 계통수의 제한으로 한계가 있었다.

ITS 영역의 염기서열을 이용한 꽃송이버섯속균의 유연관계

꽃송이버섯(*Sparassis* species) 공시균주의 ITS 영역에 대한 염기서열 결과는 GenBank에 기탁하였다(Accession No. AY156933~156949; 17개). clustal V algorithm을 이용하여 이들의 유사성을 분석한 결과는 Fig. 3과 같으며, 이들의 ITS 전영역에 대한 염기서열 상동성 비교분석은 Table 2에 나타내었다. KACC50866 균주를 제외한 ASI150001~150021 균주들간에 94% 이상으로 매우 높은 상동성을 보여 이들 21균주는 모두 같은 종으로 생각할 수 있으나 도입된 지역별

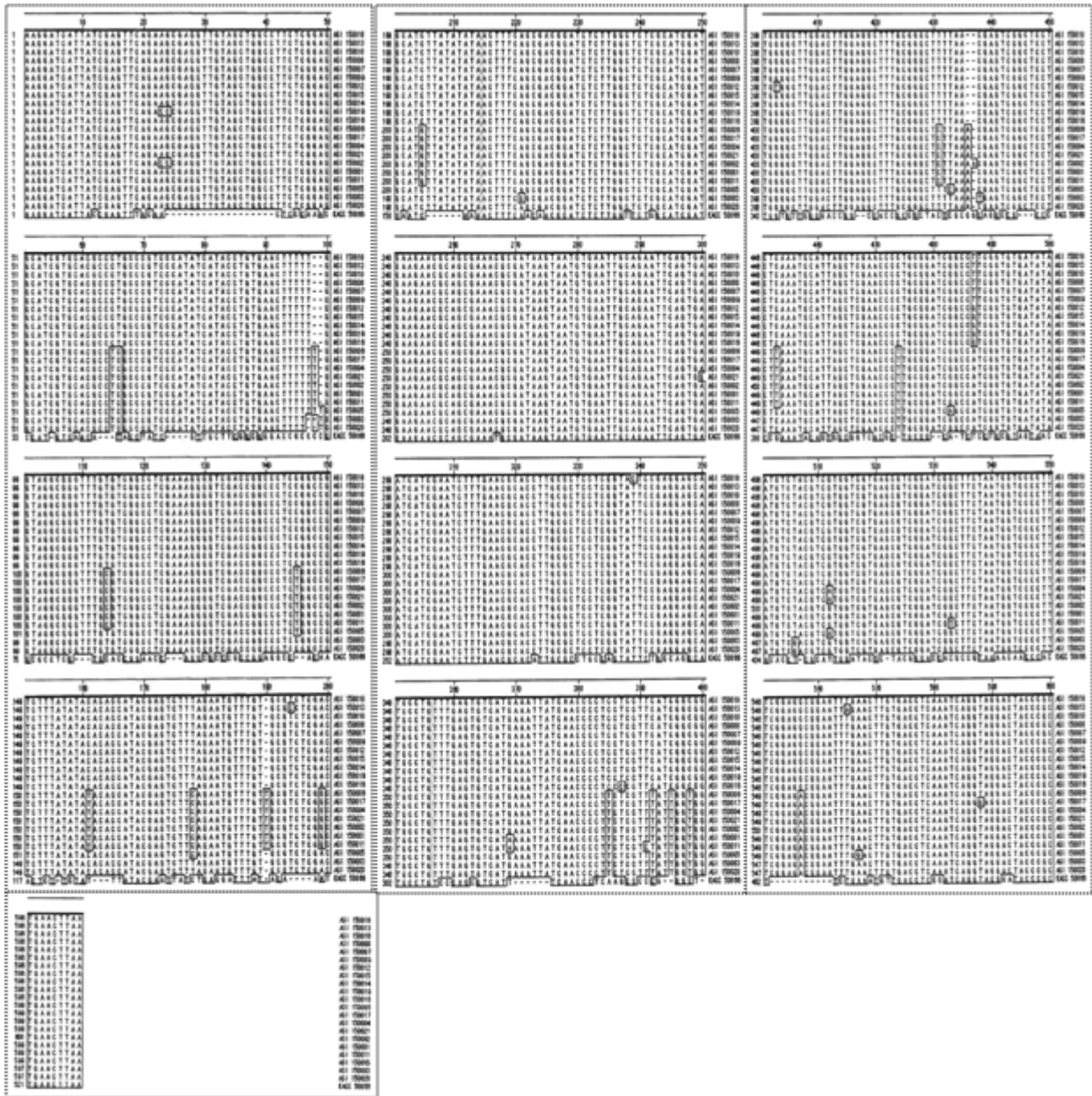


Fig 3. Comparison of rDNA ITS region sequences from different strains, *Sparassis crispa*. Gene Bank accession number: ASI150001=AY156934, ASI150002=AY156933, ASI150003=AY156935, ASI150004=AY156936, ASI150005=AY156937, ASI150006=AY156938, ASI150007=AY156939, ASI150008=AY156940, ASI150009=AY156941, ASI150010=AY156942, ASI150011=AY156943, ASI150012=AY156944, ASI150013=AY156945, ASI150014=AF308848, ASI150015=AF308850, ASI150016=AF308851, ASI150017=AF308852, ASI150018=AY156946, ASI150019=AY156947, ASI150020=AY156948, ASI150011=AY156949.

로 2그룹으로 구분이 되었다. 한국에서 수집된 ASI150013, 150014, 150015, 150016, 150018, 150019와 일본에서 도입한 ASI150007, 150008, 150009, 150010, 150012의 11개 균주가 99% 이상의 유사도를 보였고, 독일에서 도입된 ASI150001, 150011, 네덜란드의 ASI150002, 150004, 150017 등 유럽지역의 균주들이 다른 한 그룹으로 묶여 한

국과 일본의 균주들과는 유사도가 약간 낮은 것으로 나타났다(Fig. 4).

적요

본 시험은 국내외에서 수집한 꽃송이버섯균 22균주에 대

Table 2. Levels of similarity based on nucleotide sequence of ITS from *Sparassis crispa* strains

ASI No.	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
150001	-	98.7	96.4	99.7	96.2	99.8	94.5	94.5	94.5	94.5	99.7	94.4	94.2	94.5	94.5	94.2	99.7	94.4	94.2	96.7	99.5	01
150002		-	95.4	98.7	95.6	98.8	94.4	94.4	94.4	94.4	98.4	94.2	94.0	94.4	94.4	94.0	98.7	94.2	94.7	95.7	98.5	02
150003			-	96.4	97.7	96.5	97.2	97.2	97.2	97.2	96.0	97.0	96.9	97.2	97.2	96.9	96.4	97.0	96.9	99.7	96.2	03
150004				-	96.5	99.8	94.5	94.5	94.5	94.5	99.3	94.4	94.2	94.5	94.5	94.2	99.7	94.4	94.2	96.7	99.8	04
150005					-	96.4	95.9	95.9	95.9	95.9	95.9	95.7	95.4	95.9	95.9	95.5	96.2	95.7	95.5	98.0	96.4	05
150006						-	94.7	94.7	94.7	94.7	99.5	94.5	94.4	94.7	94.7	94.4	99.8	94.5	94.4	96.9	99.7	06
150007							-	100	100	100	94.2	99.7	99.7	99.8	99.8	99.4	94.5	99.8	99.5	97.5	94.4	07
150008								-	100	100	94.2	99.7	99.7	99.8	99.8	99.7	94.5	99.8	99.5	97.5	94.4	08
150009									-	100	94.2	99.7	99.7	99.8	99.8	99.7	94.5	99.8	99.5	97.5	94.4	09
150010										-	94.2	99.7	99.7	99.8	99.8	99.7	94.5	99.8	99.5	97.5	94.4	10
150011											-	94.0	93.9	94.2	94.2	93.9	99.3	94.0	93.9	96.4	99.2	11
150012												-	99.3	99.8	99.8	99.7	94.4	99.5	99.5	97.4	94.2	12
150013													-	99.5	99.5	99.3	94.2	99.5	99.2	97.2	94.0	13
150014														-	100	99.8	94.5	99.7	99.7	97.5	94.4	14
150015															-	99.8	94.5	99.7	99.7	97.5	94.4	15
150016																-	94.2	99.5	99.5	97.2	94.0	16
150017																	-	94.4	94.2	96.7	99.5	17
150018																		-	99.3	97.4	94.2	18
150019																			-	97.2	94.0	19
150020																				-	96.5	20
150021																					-	21
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	

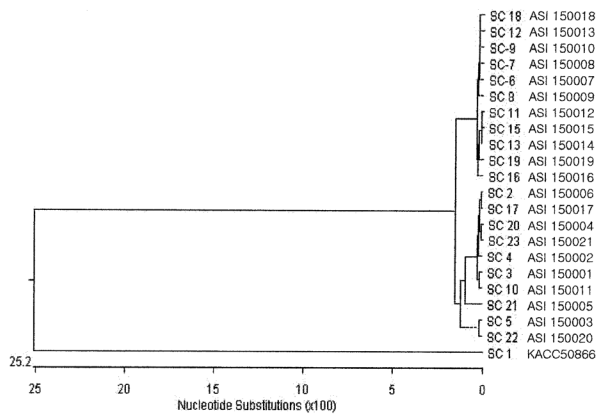


Fig. 4. A structure of rDNA gene and primer design for PCR amplification of ITS region(A) and restriction fragment pattern of PCR-amplified of rDNA ITS region (B) from *Sparassis crispa*. ITS 1 : 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (19mer), ITS 4 : 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (20mer), M: Maker; Lane 1 ~ 22: KACC50866, ASI150006, 150001, 150002, 150003, 150007, 150008, 150009, 150010, 150011, 150012, 150013, 150014, 150015, 150016, 150017, 150018, 150019, 150004, 150005, 150020, and 150011.

하여 분자생물학적 유연관계를 분석하고자 하였다. 수집균주의 ribosomal DNA의 ITS 영역에 대한 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 분석 결과, KACC50866은 다른 균주들과 20%이하의 유연관계를 나타내었으며 나머지 균주들은 90% 이상의 유연관계를 보이면서 4그룹으로 구분되었다. 따라서 이들의 세분화된 분자생물학적 구분을 위하여 rDNA ITS 영역의 염기서열분석을 하여 구분하여 본 결과 KACC50866 균주는 다른 꽃송이버섯균과 유연관계가 매우 낮은 것으로 나타났다. 그리고 나머지 21개 균주는 같은 그룹으로 구분되어 있어 같은 종으로 생각할 수 있으나, 이들을 좀더 세분하기 위해서는 미토콘드리아의 유전자 서열 분석 등이 병행되어야 할 것으로 판단된다.

인용문헌

- 김양섭, 김완규, 석순자, 원항연, 박정식, 이강효, 전창성. 2003. 한국의 버섯(-식용버섯과 독버섯). 동방미디어주식회사. CD-ROM.
- 김지연. 2000. 꽃송이버섯의 리소솜 DNA. 동국대학교 이학석사학위논문.

- 김현중. 1993. 꽃송이버섯균, 해면버섯균 및 덕다리버섯균에 의한 낙엽송 근주 심재부후균에 관한 연구. 강원대학교 농학박사학위논문.
- 농업과학기술원. 1996. 병버섯 배지제조용 액체종균 개발. 시험연구사업보고서(생물자원부편): 635-644.
- 서상영, 유영진, 정기태, 류정, 고복래, 최정식, 김명근. 2005. 꽃송이버섯의 균사생장 최적화. 한국버섯학회지 3(2): 45-51.
- 이태수, 이지열. 2000. 한국 기록종 버섯 재정리 목록. 임업연구원. p 48.
- 정종천, 박정식, 홍인표, 석순자. 2002. 꽃송이버섯의 생육 조건 구명시험. 2001 농업생명공학연구 (농촌진흥청 농업과학기술원): 432-447.
- 정종천, 박정식, 홍인표, 석순자, 전창성, 이찬중. 2008. 꽃송이버섯의 배양적 특성. 한국균학회지 36(1): 16-21.
- 今關六也, 大谷吉雄, 本郷次雄. 1997. 日本のきのこ. 山と溪谷社. p 430.
- 中島三夫. 1999. 驚異の免疫キノコ「ハナビラタケ」. 史輝出版. 東京.
- Blanco-Dios, J. B., Wang, Z., Binder, M. and Hibbett, D. S. 2006. A new *Sparassis* species from Spain described using morphological and molecular data. *Mycol Res.* 110(Pt 10): 1227-1231.
- Dai, Y-C., Wang, Z., Binder, M. and Hibbett, D. S. 2006. Phylogeny and a new species of *Sparassis* (Polyporales, Basidiomycota): evidence from mitochondrial atp6, nuclear rDNA and rpb2 genes. *Mycologia* 98(4):584-592.
- Graham, G. C., Mayer, S. P. and Henry, R. J. 1994. Amplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *Biotechniques*. 16: 175-269.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academy Press, New York, N. Y.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 1993. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, Version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Mitchell, J. I., Robert, P. J. and Moss, S. T. 1995. Sequence or structure/ A short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. *Mycologist* 9(2): 67-75.
- Ohno, N., Miura, N. N., Nakajima, M. and Yadomae, T. 2000. Antitumor 1,3-beta-glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. *Biol Pharm Bull.* 23(7): 866-872.
- Park, H. G., Shim, Y. Y., Choi, S. O. and Park, W. M. 2009. New method development for nanoparticle extraction of water-soluble beta-(1,3)-D-glucan from edible mushrooms, *Sparassis crispa* and *Phellinus linteus*. *J Agric Food Chem.* 57(6): 2147-2154.
- Sanger, F. S., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1997. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 74(12): 5463-5467.
- Shim, J. O., Son, S. G., Yoon, S. O., Lee, Y. S., Lee, T. S., Lee, S. S., Lee, K. D. and Lee, M. W. 1998. The optimal factors for the mycelial growth of *Sparassis crispa*. *Kor. Jour. of Mycology* 26(1): 39-46.
- Tada, R., Harada, T., Nagi-Miura, N., Adachi, Y., Nakajima, M., Yadomae, T. and Ohno, N. 2007. NMR characterization of the structure of a beta-(1,3)-D-glucan isolate from cultured fruit bodies of *Sparassis crispa*. *Carbohydr Res.* 342(17): 2611-2618.
- Wang, Z., Binder, M., Dai, Y. C. and Hibbett, D. 2004. Phylogenetic relationships of *Sparassis* inferred from nuclear and mitochondrial ribosomal DNA and RNA polymerase sequences. *Mycologia* 96(5): 1015-1029.
- White, T. J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to methods and applications. Eds by Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninski, and T. J. White. Academic Press, San Diego, California. pp. 315-322.
- Yamamoto, K., Kimura, T., Sugitachi, A. and Matsuura, N. 2009. Anti-angiogenic and anti-metastatic effects of beta-1,3-D-glucan purified from Hanabiratake, *Sparassis crispa*. *Biol Pharm Bull.* 32(2): 259-263.