

## PERANAN VITAMIN C DAN ACETOSYRINGONE PADA TRANSFORMASI GENETIK ANGGREK *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* MELALUI *Agrobacterium tumefaciens*

Dwiyani, R.,<sup>1</sup> Purwantoro, A.,<sup>2</sup> Indrianto, A.,<sup>3</sup> dan Semiarti, E.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Doktorat, Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pasca Sarjana  
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>2</sup> Staf pengajar Fakultas Pertanian dan Program Studi Bioteknologi, Universitas Gajah Mada,  
Yogyakarta

<sup>3</sup> Staf pengajar Fakultas Biologi dan Program Studi Bioteknologi, Yogyakarta.  
E-mail: rdwiyani@yahoo.com

### ABSTRAK

*Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* adalah spesies anggrek alam asli Indonesia yang di habitat asalnya sudah mulai langka karena kerusakan hutan. Pengembangan metode transfer gen untuk tujuan modifikasi genetik diperlukan baik untuk perbaikan sifat-sifat tanaman maupun konservasi. Metode transfer gen melalui *Agrobacterium tumefaciens* untuk anggrek *V. tricolor* belum ada protokolnya, sehingga perlu dikembangkan. Penelitian ini menggunakan protokorm *Vanda tricolor* Lindl. forma Bali yang berumur 8 minggu setelah semai sebagai target transformasi. T-DNA membawa gen *KNAT1* yang dikontrol oleh promotor CaMV dari *Cauliflower Mosaic Virus* serta membawa gen *NPTII*, yakni gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin untuk seleksi transforman. T-DNA ini dikonstruksi dalam vektor biner Pgreen dan ditransfer ke genom tanaman melalui *A. tumefaciens* strain LBA4404. Deteksi transgen dilakukan dengan PCR untuk mengamplifikasi fragmen gen *KNAT1* sepanjang 1200bp dengan primer spesifik *KNAT1*. Tujuan dari penelitian ini adalah: 1) mengetahui peran vitamin C pada transformasi anggrek *V. tricolor* dalam mengatasi *browning* (pencoklatan); 2) menentukan pada tahapan mana (inokulasi dan atau kokultivasi) acetosyringone perlu ditambahkan dalam proses transformasi; dan 3) menentukan perlakuan yang menghasilkan persentase kandidat transforman dan frekuensi transformasi tertinggi. Hasil penelitian mendapatkan bahwa aplikasi vitamin C mencegah terjadinya *browning* pada protokorm anggrek *V. tricolor* yang ditransformasi meningkatkan persentase protokorm hijau setelah seleksi transforman. Persentase kandidat transforman dan frekuensi transformasi tertinggi diperoleh jika acetosyringone diaplikasikan pada tahap inokulasi dan kokultivasi, kemudian diberi perlakuan vitamin C setelah kokultivasi.

Kata kunci: Aggrek *V. tricolor*, *Agrobacterium*, Acetosyringone, vitamin C

### ABSTRACTS

*Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* is an Indonesian wild orchid which is now extremely rare in nature due to its habitat destruction. Development of an appropriate method for improving *Vanda* orchid through genetic modification could be valuable for horticulture and, indirectly, also for conservation. The protocol of gene transfer mediated by *Agrobacterium tumefaciens* for *V. tricolor* orchid has not been established, therefore it is important to be improved. This research used 8 week-old protocorms as target of transformation. The T-DNA harbored the *KNAT1* gene under the control promoter of 35S from Cauliflower Mosaic Virus (35 S CaMV promoter) and the *NPTII* gene, a kanamycin resistant gene as selectable marker for transformant selection. This T-DNA was constructed in the binary vector PGreen and transfer to the plant genome mediated by *A. tumefaciens* strain LBA4404. Transformed candidates were confirmed by PCR that amplified 1200bp *KNAT1* gene fragment using a pair of *KNAT1* gene specific primer. The aim of the research : 1) To investigate the role of ascorbic acid in preventing browning on the transformation of *V. tricolor* orchid; 2) To find out in which step during transformation acetosyringone should be applied; 3) To find out the appropriate treatment to obtained greatest transformant candidates and highest transformation frequency. This research investigated that application of ascorbic acid increased the percentage of green protocorms after selection of transformants. Greatest transformant candidates and highest transformancy frequency were obtained when acetosyringone was applied in the inoculation and co-cultivation, then ascorbic acid was applied after co-cultivation.

Key words: *V. tricolor* orchid, *Agrobacterium*, acetosyringone, ascorbic acid

## PENDAHULUAN

Sejak tahun 2007 melalui program revitalisasi pertanian, anggrek oleh pemerintah Indonesia ditetapkan sebagai produk hortikultura unggulan. Pengembangan anggrek difokuskan pada peningkatan produksi untuk memenuhi kebutuhan pasar dalam negeri maupun luar negeri, namun peningkatan kualitas juga dicanangkan untuk jangka panjang (Departemen Pertanian RI, 2007).

Di dunia terdapat lebih dari 30 000 spesies anggrek alam, 75% diantaranya terdapat di daerah tropis (Banks, 1999) dan di Indonesia terdapat kurang lebih 5000 spesies (Irawati, 2002). Salah satu diantara anggrek alam Indonesia adalah *Vanda tricolor* Lindl. varietas *Suavis*. Spesies ini tersebar di Sulawesi, Jawa dan Bali (Gardiner, 2007).

Keberadaan spesies anggrek ini di alam sudah mulai langka akibat kerusakan hutan karena ulah manusia maupun bencana alam. Erupsi gunung Merapi pada Oktober 2010 menyebabkan *V. tricolor* yang tumbuh di lereng Merapi ini terancam punah. Dengan demikian diperlukan perhatian untuk tujuan konservasi maupun perbaikan sifat-sifat hortikulturik tanaman melalui riset di perguruan tinggi maupun lembaga penelitian lainnya.

Perbaikan sifat-sifat tanaman dapat dilakukan melalui rekayasa genetika yaitu penyisipan gen. Penyisipan gen asing ke genom tanaman melalui *Agrobacterium tumefaciens* memiliki beberapa keuntungan, yakni tanaman transgenik yang dihasilkan bersifat fertil dan gen asing yang disisipkan pada genom diturunkan pada progeninya (Rhodora and Thomas, 1996; Opabode, 2006).

Transfer gen dalam penelitian ini dilakukan melalui *Agrobacterium tumefaciens* dengan target transformasi berupa protokorm (embrio anggrek yang sudah berkecambah) seperti metode yang dilakukan oleh Semiarti *et al.*, (2007). Pencoklatan pada jaringan target setelah kokultivasi seringkali dijumpai pada transformasi yang dilakukan melalui *A. tumefaciens*, sehingga menurunkan efisiensi transformasi (Dan, 2008). Untuk anggrek *V. tricolor*, kondisi ini diperburuk dengan tingginya senyawa fenolik dari jaringan tanaman

sehingga dapat memicu terjadinya pencoklatan (*browning*) dengan intensitas yang tinggi akibat oksidasi senyawa fenolik. Aplikasi vitamin C dilakukan untuk mengatasi pencoklatan jaringan target setelah kokultivasi dengan *Agrobacterium*, karena vitamin C dikenal sebagai antioksidan kuat yang dapat mencegah pencoklatan sekaligus dapat menstimulasi terjadinya organogenesis, embriogenesis somatik dan pertumbuhan tunas dalam mikropropagasi pada beragam spesies tanaman (Dan, 2008) serta dilaporkan mampu meningkatkan efisiensi transformasi (Enriquez-Obregon *et al.*, 1998).

Dalam penelitian ini juga digunakan acetosyringone (AS) untuk meningkatkan efisiensi transformasi, karena Semiarti *et al.*, (2007) hanya mendapatkan efisiensi transformasi 1,17%. Efektivitas penggunaan AS pada transformasi dengan *Agrobacterium* telah dilaporkan sebelumnya untuk anggrek *Phalaenopsis* hybrid (Mishiba *et al.*, 2005).

Tujuan dari penelitian ini adalah: 1) mengetahui peran vitamin C pada transformasi anggrek *V. tricolor* dalam mengatasi *browning* (pencoklatan); 2) menentukan pada tahapan mana (inokulasi dan atau kokultivasi) acetosyringone perlu ditambahkan dalam proses transformasi; dan 3) menentukan perlakuan yang menghasilkan persentase kandidat transforman dan frekuensi transformasi tertinggi.

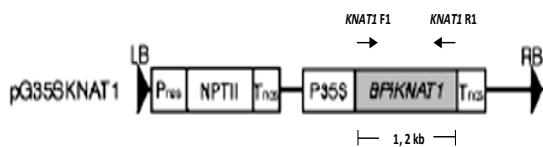
## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Fakultas Biologi UGM dan laboratorium Genetika dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian UGM selama 6 bulan (Desember 2010 sampai dengan Mei 2011).

Bahan tanaman yang digunakan adalah protokorm anggrek *V. tricolor* Lindl. yang berumur 8 minggu setelah penanaman (MSP). Buah sumber biji untuk menghasilkan protokorm diperoleh dari Bedugul (Bali) yang berumur 6 bulan setelah polinasi.

T-DNA membawa gen *KNAT1* yang dikontrol oleh promoter CaMV dari *Cauli flower Mosaic Virus* serta membawa gen *NPTII*, yakni gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin untuk seleksi transforman. T-DNA

ini dikonstruksi dalam vektor biner pGreen dan ditransfer ke genom tanaman melalui *A. tumefaciens* strain LBA4404. Konstruksi Ti-plasmid dalam *Agrobacterium* ini diperoleh dari Dr. Endang Semiarti (Fakultas Biologi UGM). Struktur T-DNA tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.1 (Semiarti *et al.*, 2007):



Gambar 1. Struktur T-DNA pada *pG35S:KNAT1*. Gen *BP/KNAT1* (1,2kb) dibawah kontrol promoter 35S dari *cauli flower mosaic virus*(CaMV). RB= *Right Border*; LB= *Left Border*; Pnos= promoter dari gen nopaline synthase; Tnos= *polyadenylation site* dari gen nopaline synthase; *NPTII*= Gen neomycin phosphotransferase; P35S= promoter 35S dari *CaMV*. *KNAT1 F1* dan *KNAT1 R1* adalah oligonukleotida primer spesifik untuk mengamplifikasi gen *BP/KNAT1* sepanjang 1,2 kb

Transformasi dilakukan dengan tahapan sebagai berikut: **1) Pembuatan suspensi kultur *Agrobacterium***: bakteri dikulturkan pada medium LB (ditambah antibiotik 200 mgL<sup>-1</sup> kanamisin) selama 24-48 jam pada suhu 30°C. Pada saat kultur bakteri ini mencapai OD<sub>600</sub> = 0,8, sel bakteri dipanen untuk digunakan dalam transformasi. Selanjutnya dibuat suspensi dengan mencampur 1 bagian kultur bakteri ditambah dengan 4 bagian medium NP cair; **2) Prekultur protokorm anggrek target transformasi**: prekultur protokorm anggrek dilakukan 3 hari sebelum inokulasi, dengan memindahkan protokorm anggrek umur 8 MSP ke medium NP yang ditambah 1,5 ppm 2,4-D. **3) Inokulasi**: protokorm direndam dengan suspensi kultur *Agrobacterium* selama 30 menit. Pada tahap inokulasi ini dilakukan perlakuan Acetosyringone (AS) yaitu tanpa AS dan penambahan 25 ppm AS; **4) Kokultivasi**: Protokorm yang sudah diinokulasi dengan *Agrobacterium* dipindah ke medium NP yang ditambah 25 ppm AS atau tanpa AS (sebagai perlakuan AS) dan dikokultivasi selama 3 hari; **5) Eliminasi *Agrobacterium***: eliminasi *Agrobacterium* dilakukan dengan antibiotik meropenem seperti yang dilakukan oleh Mishiba *et al.* (2005). Pada tahap ini dilakukan perlakuan vitamin C, yaitu dengan

ditambah 15 ppm vitamin C dan tanpa vitamin C (0 ppm) pada medium eliminasi. Eliminasi bakteri ini dilakukan selama 7 hari, dengan penggantian medium sebanyak 2 kali; **6) Seleksi transforman**: seleksi transforman dilakukan selama 5 minggu dengan 300 mgL<sup>-1</sup> kanamisin. Nilai konsentrasi kanamisin 300 mgL<sup>-1</sup> merupakan hasil uji kanamisin pada non-transforman yang diperoleh pada penelitian pendahuluan oleh penulis (data tidak diperlihatkan).

Sampel untuk deteksi gen diambil secara acak dari setiap perlakuan. Selanjutnya kandidat transforman yang masih berupa seedling sangat kecil dengan 1 daun yang baru muncul, diambil sebagian daunnya, diisolasi DNA nya dengan metode Doyle and Doyle (1990). Selanjutnya dilakukan *PCR* (Polymerase Chain Reaction) dengan primer spesifik untuk gen *KNAT1* yakni primer *KNAT1 F1* dengan sekuen 5'-CTTCCTAAAGAAGCACGGCAG-3' an primer *KNAT1 R1* dengan sekuen 5'-CCAGTGACGCTTTCTTTGGTT-3' (Takara, Jepang). Hasil PCR selanjutnya dielektroforesis.

Pengamatan dilakukan dengan jalan mencatat jumlah protokorm yang masih hijau setelah seleksi (5 minggu pada media seleksi) dan jumlah protokorm yang masih hijau setelah proses regenerasi, yaitu 4 minggu setelah berakhirnya seleksi. Persentase kandidat transforman = (jumlah protokorm yang masih hijau setelah proses regenerasi/ jumlah protokorm yang ditransformasi) x 100%. Frekuensi Transformasi = (jumlah kandidat transforman yang positif mengandung transgen/ jumlah sampel kandidat yang di PCR) x Persentase kandidat transforman.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase kandidat transforman dan frekuensi transformasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Yang perlu digarisbawahi dari data pada Tabel 1 adalah bahwa pemberian vitamin C merupakan suatu keharusan dalam proses transformasi protokorm anggrek *V. tricolor*, karena tanpa pemberian vitamin C tidak diperoleh kandidat transforman setelah proses regenerasi. Transformasi dari genom tanaman dengan *A. tumefaciens* adalah eksploitasi dari

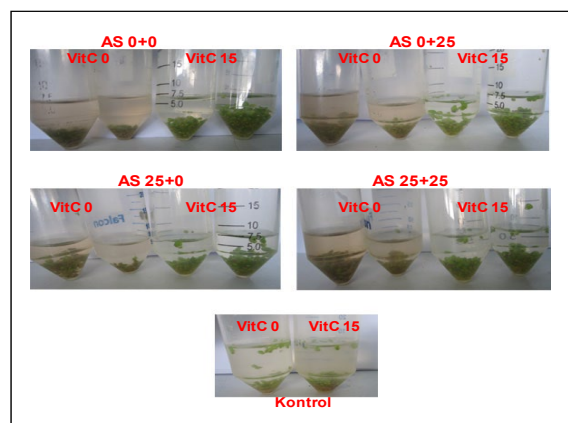
Tabel 1. Efek Perlakuan Acetosyringone (AS) dan Vitamin C (%) terhadap Persentase Kandidat transforman dan Frekuensi Transformasi

Perlakuan			Nama Perlakuan	Jumlah protokorm yang ditransformasi	Jumlah / Persentase protokorm hijau setelah seleksi	Jumlah / persentase kandidat transforman	Positif transgen / sampel PCR	Frekuensi Transformasi
Aplikasi AS saat inokulasi (ppm)	Aplikasi AS saat Kokultivasi (ppm)	Aplikasi Vitamin C paska kokultivasi (ppm)						
0	0	0	AS0+ 0,Vit C0	660	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
0	25	0	AS0+25,VitC0	566	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
25	0	0	AS25+0,VitC0	512	0(0 %)	0 (0 %)	-	-
25	25	0	AS25+25,VitC0	550	1 (0,18%)	0 (0 %)	-	-
0	0	15	AS0+ 0,Vit C 5	830	18 (1,69 %)	3 (0,36 %)	1/3	0,12%
0	25	15	AS0+25,VitC15	600	47(7,83 %)	15 (2,50 %)	3/4	1,88%
25	0	15	AS25+0,VitC15	768	40 (5,21 %)	8 (1,04 %)	2/4	0,52%
25	25	15	AS25+25,VitC15	631	78 (12,36 %)	30 (4,75 %)	4/5	3,8%

proses infeksi oleh patogen (Wojtaszek, 1997; Dan, 2008). Infeksi ini diduga menyebabkan luka pada permukaan protokorm dan mengakibatkan senyawa fenolik yang ada pada sel-sel protokorm keluar dan terjadi oksidasi sehingga menyebabkan pencoklatan. Adanya vitamin C sebagai antioksidan kuat (Dan, 2008) mencegah terjadinya oksidasi tersebut sehingga juga mencegah pencoklatan. Tanpa vitamin C, pencoklatan tersebut menyebabkan rendahnya jumlah protokorm hijau yang dihasilkan setelah proses seleksi karena protokorm sudah mati sebelum proses seleksi berakhir. Gambar 2 memperlihatkan bagaimana senyawa fenolik tersebut keluar dari jaringan tanaman pasca kokultivasi. Tampak warna merah pada perlakuan tanpa pemberian vitamin C, menandakan adanya senyawa fenolik, namun tidak pada perlakuan dengan vitamin C. gambar ini sekaligus menjelaskan bahwa senyawa fenolik keluar dari jaringan tanaman karena infeksi oleh *Agrobacterium*, sebab pada protokorm yang tidak ditransformasi (kontrol) tidak dijumpai adanya warna merah baik dengan ataupun tanpa vitamin C.

Dari 8 perlakuan yang diuji, perlakuan "AS25+25,VitC15" memberikan persentase kandidat transforman tertinggi (4,75%) dan frekuensi transformasi tertinggi (3,8%), menunjukkan bahwa penggunaan AS pada tahap inokulasi dan tahap kokultivasi memberikan hasil terbaik. Diduga perlakuan ini memberikan periode waktu interaksi AS dan *Agrobacterium* yang paling lama (30 menit saat inokulasi dan 3 hari saat kokultivasi) dibandingkan perlakuan

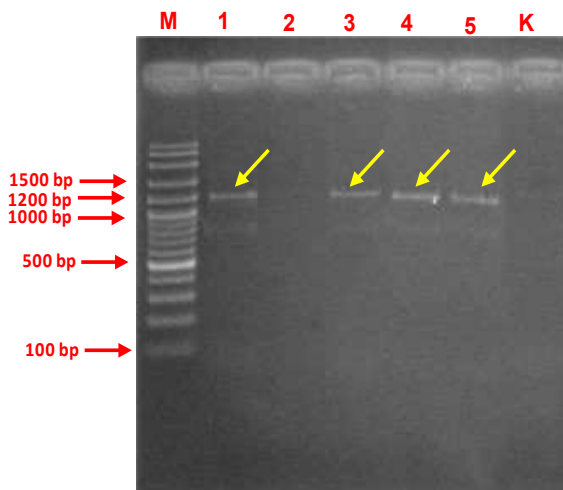
lainnya, yakni 30 menit jika AS diberikan tahap inokulasi saja atau 3 hari jika diberikan pada tahap kokultivasi. Proses transfer T-DNA ke genom tanaman dimediasi oleh kerjasama dari protein-protein yang dikode oleh gen-gen yang terdapat pada *virulence region*, disebut *Vir-genes* yang terdapat pada Ti plasmid dan juga oleh gen-gen yang terdapat pada kromosom bakteri (Jeon *et al.*, 1998). Selanjutnya produk dari *gen Vir* ini yang akan memfasilitasi transfer T-DNA ke dalam genom tanaman. Chin *et al.*, (2007) memperoleh hasil serupa, dimana penggunaan 100µM AS pada saat infeksi dan kokultivasi meningkatkan efisiensi transformasi melalui *Agrobacterium* pada anggrek *Cymbidium*.



Gambar 2. Kondisi protokorm empat hari setelah dishaker pada media cair dengan perlakuan vitamin C pasca kokultivasi dengan *Agrobacterium*. Tampak warna merah pada perlakuan tanpa vitamin C pada protokorm yang ditransformasi, menandakan adanya senyawa fenolik yang larut ke media cair akibat infeksi oleh *Agrobacterium*

Efektivitas penggunaan AS pada transformasi melalui *Agrobacterium* telah dilaporkan sebelumnya untuk anggrek *Phalaenopsis* hybrid (Mishiba *et al.*, 2005). Hasil ini juga menunjukkan bahwa penggunaan AS pada tahap inokulasi dan kokultivasi meningkatkan frekuensi transformasi menjadi 29 kali lipat dibandingkan tanpa AS. Jika dibandingkan dengan hasil yang diperoleh Semiarti *et al.*, (2007) tanpa penggunaan AS, maka penggunaan AS dalam penelitian ini meningkatkan frekuensi transformasi ini menjadi kurang lebih 3 kali lipat.

Resistensi tanaman anggrek *V. tricolor* yang tinggi terhadap antibiotik kanamisin menyebabkan proses seleksi tanaman transforman menjadi relatif sulit karena sangat bias. Tetapi hasil yang diperoleh dari analisis PCR (Gambar 3) dapat membuktikan bahwa transgen memang benar-benar terintegrasi pada genom tanaman anggrek. Diantara kandidat tersebut terdapat "non transforman", artinya meskipun tanaman tersebut terseleksi dengan kanamisin namun ternyata tidak tersisipi gen. Tanaman 'non transforman' dikenal dengan istilah 'escapes', yang sering terjadi pada metode transformasi yang menggunakan gen *NPTII* sebagai penyeleksi (Dan, 2008).



Gambar 3. Elektroforegram hasil amplifikasi DNA dari kandidat transforman *35S::KNATI V. tricolor* dengan primer spesifik gen *KNATI* (KNAT1F1- KNAT1R1) pada perlakuan "AS25+25,VitC15". 1, 2, 3, 4, 5 = Kandidat transforman; K = Kontrol (Non-transforman); M = DNA Marka dari VC 100bp Plus DNA Ladder Vivantis. Tanda panah kuning menunjukkan pita sepanjang 1200bp (untuk gen *KNATI*).

Selanjutnya pembuktian bahwa transgen tersebut memang diekspresikan pada tanaman transforman dan tampak pada fenotipnya, maka akan didapatkan tanaman transgenik yang diharapkan. Dalam penelitian ini, penggunaan vitamin C sebagai antioksidan setelah kokultivasi protokorm dengan *Agrobacterium* dalam proses transformasi genetik menyebabkan frekuensi transformasi yang diperoleh meningkat, sehingga kemungkinan mendapatkan tanaman transgenik yang positif membawa gen *KNATI* cukup besar.

## SIMPULAN

Aplikasi vitamin C diperlukan pada transformasi protokorm anggrek *V. tricolor* melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Persentase kandidat transforman dan frekuensi transformasi tertinggi diperoleh jika acetosyringone diaplikasikan pada tahap inokulasi dan kokultivasi, kemudian diberi perlakuan vitamin C setelah kokultivasi.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional Republik Indonesia untuk Hibah Doktor yang diterima penulis (pertama) pada tahun 2010.

## DAFTAR PUSTAKA

- Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian RI. 2007. Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis: Rangkuman Kebutuhan Investasi. Edisi Kedua. 83 hal.
- Banks, D.P. 1999. Tropical Orchids of Indonesia. Singapore: Periplus Edition (HK) Ltd 64p.
- Chin, DP., Mishiba, K., & Mii, M. *Agrobacterium* mediated transformation of protocorm like bodies in *Cymbidium*. 2007. Plant Cell Rep, 26: 735-743
- Dan, Y. 2008. Biological functions of antioxidants in plant transformation. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 44: 149-161.

- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Enriquez-Obregon, G.A., Vasquez-Padron, R.I., Prieto-Samsonov, D.L., Perez, M. & Selman-Housein, G. 1997. Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. *Biotechnologia aplicada*, 14 : 169-174.
- Gardiner, L.M. 2007. *Vanda tricolor* Lindl. Conservation in Java, Indonesia: Genetic and Geographic Structure and History. *Lankesteriana*, 7: 272-280.
- Irawati. 2002. Pelestarian jenis anggrek Indonesia. Buku panduan Seminar Anggrek Indonesia 2002. Hal: 34-45.
- Jeon, G.A., Eum, J.S., & Sim, W.S. 1998. The role of inverted repeat (IR) sequence of the *VirE* gene expression in *Agrobacterium tumefaciens* pTiA6. *Molecules and Cells*, 8: 49-53.
- Mishiba, K., Chin, DP., & Mii, M. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. *Plant Cell Rep*, 24: 297-303
- Opabode, J.T. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency, Review. *Biotechnol. and Mol, Biol.* 1: 12-20.
- Rhodora, R.A. & Thomas, K.H. 1996. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of Japonica and Indica rice varieties, *Planta* 199: 612-617.
- Semiarti, E., Ari Indrianto, A. Purwantoro, S. Isminingsih, N. Suseno, T. Ishikawa, Y. Yoshioka, Y. Machida, & C. Machida. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of the wild orchid species *Phalaenopsis amabilis*. *Plant Biotechnol*, 24 : 265-272.
- Wojtaszek, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem, J.* 322: 681-691.