

PHÂN TÍCH *in silico* CÁC GENE MÃ HÓA PROTEIN SWEET Ở CÂY DÈN LẤY HẠT (*Amaranthus hypochondriacus* L.)

La Việt Hồng^{1*}, Cao Phi Bằng², Chu Đức Hà³, Hoàng Tấn Quảng⁴

¹ Viện Nghiên cứu Khoa học & Ứng dụng, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, Tp. Phúc Yên, Vĩnh Phúc, Việt Nam

² Khoa Khoa học tự nhiên, Trường Đại học Hùng vương, Tp. Việt Trì, Phú Thọ, Việt Nam

³ Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ, ĐHQG Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Hà Nội, Việt Nam

⁴ Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế, Tinh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ La Việt Hồng <laviethong@hpu2.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 08-05-2021; Ngày chấp nhận đăng: 06-07-2021)

Tóm tắt. SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporter) là một trong các họ protein có chức năng vận chuyển đường quan trọng ở thực vật. Trong nghiên cứu này, 20 gene mã hóa các protein SWEET trong hệ gene cây dền lấy hạt (*Amaranthus hypochondriacus* L.) đã được xác định và phân tích. Chiều dài các gene này dao động từ 729 đến 9324 nucleotide và hầu hết gene có bốn hoặc năm intron. Các protein suy diễn có chiều dài từ 226 tới 311 amino acid và mang sáu hoặc bảy xoắn xuyên màng đặc trưng. Hầu hết các protein này có tính kiềm với pI 8,08–9,73. Phân tích cây phả hệ cho phép phân chia các AhSWEET thành bốn nhóm, nhóm I (ba gene), nhóm II (bảy gene), nhóm III (tám gene) và nhóm IV (hai gene). Các gene này phân bố không đồng đều trong hệ gene của cây dền lấy hạt. Mười hiện tượng nhân gene đã được phát hiện hình thành nên các cặp gene SWEET lặp ở loài cây này, trong đó chủ yếu là hiện tượng nhân gene trên toàn hệ gene. Các gene lặp trong cặp hình thành từ quá trình nhân gene chịu sự tác động của chọn lọc âm, giữ ổn định trình tự nucleotide. Kết quả của nghiên cứu này là cơ sở cho các nghiên cứu xa hơn như nghiên cứu chức năng gene hoặc cải tiến di truyền.

Từ khóa: SWEET, đặc điểm gene, biểu hiện gene, cây di truyền, dền lấy hạt

In silico characterization of genes encoding SWEET protein in grain aramanth (*Amaranthus hypochondriacus* L.)

La Viet Hong^{1*}, Cao Phi Bang², Chu Duc Ha³, Hoang Tan Quang⁴

¹ Institute of Scientific research and Application, Hanoi Pedagogical University N°2, Phuc Yen City, Vietnam

² Faculty of Natural Science, Hung Vuong University, Viet Tri City, Phu Tho, Vietnam

³ Faculty of Agricultural Technology, University of Engineering and Technology, VNU, 144 Xuan Thuy St., Hanoi, Vietnam

⁴ Institute of Biotechnology, Hue University, Road 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam

* Correspondence to La Viet Hong <laviethong@hpu2.edu.vn>

(Received: 08 May 2021; Accepted: 06 July 2021)

Abstract. SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporter) is one of the essential protein families transporting sugar in plants. In this study, 20 genes encoding the SWEET proteins were identified from the grain aramanth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) genome and analyzed. The genomic

full-length of these genes ranges from 729 to 9324 nucleotides, most of which have four or five introns. The predicted proteins have 226 to 311 amino acids and possess six or seven conserved transmembrane helix regions. Most of these proteins are alkaline, with pI 8.08–9.73. Analysing the phylogeny, we can classify SWEETs of *Amaranthus hypochondriacus* L. (AhSWEET) into four groups: group I (three genes), group II (seven genes), group III (eight genes), and group IV (two genes). These genes are not equally distributed in the grain aramanth genome. Ten gene duplication events were detected, forming the duplicated SWEET gene pairs, including nine WD events. The duplicated gene pairs are affected by the purifying selection, which stabilizes the coding sequences of these genes. This result is a basis for further studies, such as gene function or genetic modification using SWEET genes.

Keywords: SWEET, gene characterization, gene expression, phylogeny, grain aramanth

1 Mở đầu

Dền lấy hạt (*Amaranthus hypochondriacus* L.) là loài cây nhiệt đới thuộc chi *Amaranthus* có giá trị kinh tế và dinh dưỡng cao [1]. Chi này trước đây được trồng rộng rãi ở Trung và Nam Mỹ và gần đây đã được phát triển ở nhiều nước như Mexico, Guatemala, Peru, miền bắc Ấn Độ, Nepal để lấy hạt và Trung Quốc, Đông Nam Á, miền nam Ấn Độ, Tây Phi và vùng Caribe để lấy rau. Trong đó, cây dền lấy hạt (*A. hypochondriacus* L.) được coi là cây lương thực rất hứa hẹn nhờ vào tiềm năng tạo sinh khối và năng suất hạt lớn cũng như khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi (như hạn, đất mặn, kiềm, acid hay nghèo dinh dưỡng và bệnh) cao [2]. Hệ gene của cây dền lấy hạt được giải trình tự là tài nguyên tốt giúp tăng cường các tiến bộ nghiên cứu tiến hóa, chọn giống cũng như các đặc tính di truyền khác của loài cây này [3, 4].

Họ SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporter) là tập hợp các protein tham gia vận chuyển đường sucrose ở thực vật [5]. Các protein thuộc họ SWEET có cấu trúc đặc trưng gồm bảy vùng xoắn xuyên màng. Ngoài chức năng vận chuyển sucrose, nhóm protein này còn có chức năng trong sự phát triển hoa, quả và hạt, vận chuyển gibberellin và liên quan đến khả năng chống chịu stress vô sinh [5]. Vì vậy, họ gene mã hóa các SWEET đã được nghiên cứu ở nhiều loại thực vật như *Aarabidopsis thaliana* [6], lúa [7], ca cao [8] và một số loài thực vật khác [9]. Tuy nhiên, đến

nay chưa có nghiên cứu về họ gene *SWEET* ở cây dền lấy hạt được thực hiện.

Công trình này hướng tới mục tiêu xác định các gene mã hóa SWEET trong hệ gene của cây dền lấy hạt, phân tích các đặc điểm cấu trúc, sự phân bố của gene cũng như các đặc điểm hóa lý lý thuyết của các protein SWEET ở loài cây này và sự biểu hiện gene. Những kết quả nghiên cứu này bước đầu cung cấp các thông tin khoa học về cấu trúc, chức năng của các SWEET của loài cây công nghiệp quan trọng này.

2 Nguyên liệu và phương pháp

2.1 Cơ sở dữ liệu

Trình tự hệ gene của cây dền lấy hạt được lấy từ website phytozome (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Ahypochondriacus_er) [10].

2.2 Xác định các gene thuộc họ SWEET ở cây dền lấy hạt

Các protein SWEET của cây *Arabidopsis* [6] được sử dụng làm khuôn dò để tìm kiếm các gene tương đồng trên dữ liệu hệ gene của cây dền lấy hạt nhờ chương trình BLAST [11].

2.3 Phân tích các đặc điểm hóa – lý

Công cụ Protparam của ExPASy [12] được sử dụng để phân tích các đặc điểm vật lý, hóa học của các protein. Cấu trúc exon/intron được xây

dựng nhờ GSDB 2.0 [13]. Cấu trúc xoắn xuyên màng của các AhSWEET được xác định nhờ TMHMM Server v. 2.0 [14]. Vị trí khu trú dưới tế bào được xác định bằng ProtComp 9.0 trên Softberry <http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>) và Yloc [15].

2.4 Xây dựng bản đồ gene, cây phả hệ và phân tích tiến hóa

Bản đồ gene được xây dựng nhờ MapChart [16] căn cứ vào vị trí của các gene trên các NST của cây dền lấy hạt. Trình tự protein suy diễn SWEET của cây dền lấy hạt, và một số cây có các SWEET đã được xác định trên quy mô hệ gene như ca cao (đại diện thân gỗ hai lá mầm có nguồn gốc nhiệt đới), *A. thaliana* (hai lá mầm), lúa (một lá mầm) và của rêu (thực vật bậc cao) được giống cột bằng MAFFT [17], cây phả hệ được xây dựng nhờ phần mềm MEGA X [18]. Kiểu chọn lọc được xác định thông qua Codon-based Z-test of Selection nhờ sử dụng phần mềm MEGA X [18].

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Đặc điểm các gene SWEET ở cây dền lấy hạt

Tổng số 20 gene mã hóa protein SWEET đã được xác định ở trong hệ gene cây dền lấy hạt (Bảng 1). Các protein AhSWEET đều mang vùng bảo tồn đặc trưng (MtN3_slv (PF03083) cho họ SWEET [6]. Chiều dài các gene mã hóa SWEET ở cây dền lấy hạt rất khác nhau, từ 729 đến 9324 nucleotide (Bảng 1). Ngoại trừ *AhSWEET18*, các gene này đều mã hóa không liên tục, trong đó có 7 gene có 4 intron, 11 gene có 5 intron, và 1 gene (*AhSWEET10*) có 6 intron (Bảng 1). Chiều dài các phân tử protein dao động trong khoảng từ 226 (*AhSWEET07*) tới 311 (*AhSWEET13*) amino acid; khối lượng phân tử lý thuyết từ 24,55 kDa (*AhSWEET07*) tới 34,91 kDa (*AhSWEET19*). Giá trị pI lý thuyết nằm trong khoảng từ 8,13 tới 9,73, chứng tỏ các AhSWEET có tính base. Như vậy, các SWEET của cây dền lấy hạt có đặc điểm lý – hóa khá tương đồng với SWEET của cây ca cao [8].

Bảng 1. Đặc điểm các gene SWEET của cây dền lấy hạt

Gene	Tên locus	Nhóm	GL (bp)	PL (aa)	MW (kD)	pI	NST	IN	TMH	SCL ProtComp	SCL YLOC
<i>AhSWEET01</i>	AH002968	III	3575	284	32,13	8,13	2	4	7	PM	PM
<i>AhSWEET02</i>	AH002969	III	2931	291	33,57	9,29	2	5	7	PM	PM
<i>AhSWEET03</i>	AH005219	III	2609	236	26,03	8,64	3	5	6	PM	PM
<i>AhSWEET04</i>	AH006986	IV	9324	244	27,02	9,17	4	5	7	PM	PM
<i>AhSWEET05</i>	AH010210	I	2157	231	26,04	8,93	6	5	7	PM	PM
<i>AhSWEET06</i>	AH010397	III	1816	251	28,36	9,27	6	5	7	PM	PM
<i>AhSWEET07</i>	AH011342	II	3527	226	24,55	9,49	7	4	7	PM	PM
<i>AhSWEET08</i>	AH011343	II	3715	266	29,39	9,35	7	4	7	PM	PM
<i>AhSWEET09</i>	AH012029	I	3225	234	26,11	9,23	7	4	6	PM	ECP
<i>AhSWEET10</i>	AH012869	III	3026	280	31,73	9,73	8	6	6	PM	PM
<i>AhSWEET11</i>	AH015671	II	4116	249	27,80	8,78	10	5	6	PM	PM
<i>AhSWEET12</i>	AH017357	III	2387	261	29,70	9,26	11	5	7	PM	PM
<i>AhSWEET13</i>	AH017358	III	4644	311	34,77	8,64	11	5	7	PM	PM
<i>AhSWEET14</i>	AH018141	II	3570	252	27,50	9,64	12	4	7	PM	PM

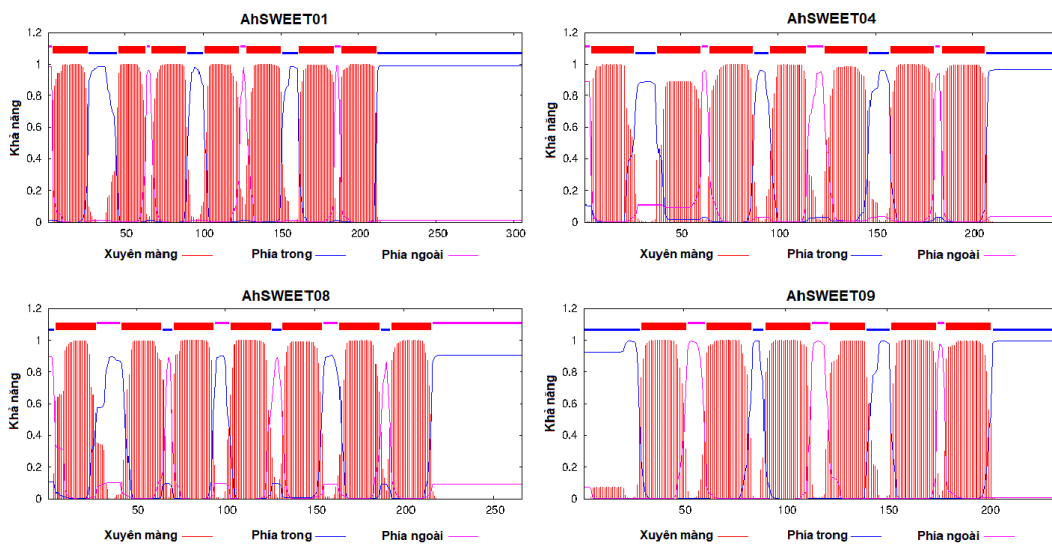
Gene	Tên locus	Nhóm	GL (bp)	PL (aa)	MW (kD)	pI	NST	IN	TMH	SCL ProtComp	SCL YLOC
AhSWEET15	AH018142	II	4074	254	28,43	9,09	12	4	7	PM	PM
AhSWEET16	AH019666	I	5525	231	25,14	9,54	13	5	6	PM	PM
AhSWEET17	AH020207	IV	5364	226	25,29	8,88	13	5	7	PM	PM
AhSWEET18	AH020859	II	729	242	26,95	9,64	14	0	7	PM	ECP
AhSWEET19	AH021078	II	4813	249	28,29	9,58	14	5	7	PM	PM
AhSWEET20	AH022171	III	2890	308	34,91	8,74	15	4	7	PM	PM

Ghi chú: GL là kích thước gene; PL là chiều dài protein; MW là khối lượng protein; NST là nhiễm sắc thể; IN là số lượng intron; TMH là số lượng xoắn xuyên màng; SCL là khu trú dưới tế bào; PM là plasma membrane (màng sinh chất); ECP là Extracellular Space (không gian ngoại bào).

Hầu hết các AhSWEET (15/20) có cấu trúc không gian với bảy vùng xoắn xuyên màng (Hình 1). Tuy nhiên, có tới năm AhSWEET chỉ có sáu xoắn xuyên màng (Bảng 1). Cấu trúc đặc trưng bảy xoắn xuyên màng của các AhSWEET tương đồng với các SWEET của nhiều loài đã biết như *A. thaliana*, lúa [6], ca cao [8] và ở một số loài khác [5]. Các SWEET có số xoắn xuyên màng ít hơn bảy cũng đã được quan sát ở cây ca cao [8]. Phân tích vị trí định khu dưới tế bào bằng công cụ ProtComp cho thấy tất cả các AhSWEET nằm trên màng sinh chất; việc kiểm tra với công cụ Yloc cho thấy 18 trong tổng số 20 AhSWEET nằm trên màng sinh

chất, hai phân tử còn lại (AhSWEET09 và AhSWEET18) gắn với hệ thống tiết không gian ngoại bào (Bảng 1). Kết quả này phù hợp với kết quả phân tích cấu trúc của các protein SWEET với các xoắn xuyên màng đặc trưng. Kết quả này cũng tương đồng với phân tích vị trí khu trú dưới tế bào của các SWEET ở cây ca cao [8].

Trên quy mô hệ gene, họ SWEET của cây dền lấy hạt có nhiều gene hơn so với cây *A. thaliana* (17 gene) [6], nhưng có ít gene hơn so với cây lúa và cây ca cao (cùng 21 gene) [8], cũng như cây sắn (28 gene) [19].

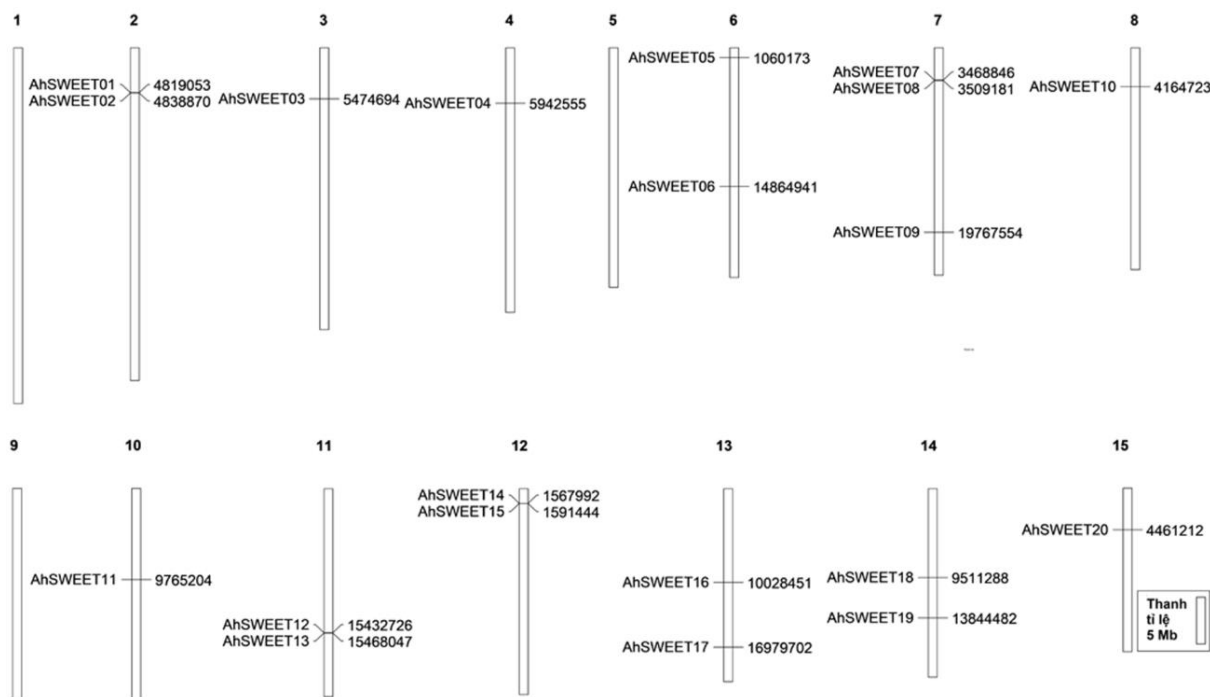


Hình 1. Mô hình cấu trúc không gian của một số AhSWEET được xây dựng nhờ TMHMM Server v. 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)

3.2 Bản đồ di truyền và phân tích cây phả hệ

Các gene *SWEET* phân bố không đồng đều trên toàn bộ hệ gene của cây dền lấy hạt. Không tìm thấy gene *SWEET* nào trên các NST số 1, 5 và

9. Các NST số 3, 4, 8, 10 và 15 chỉ có một gene, NST số 2, 5, 11, 12, 13 và 14 có hai gene, chỉ NST số 7 có ba gene (Hình 2). Sự phân bố không đồng đều của các gene *SWEET* ở cây dền lấy hạt tương đồng với ở cây sắn [19] và cây ca cao [8].

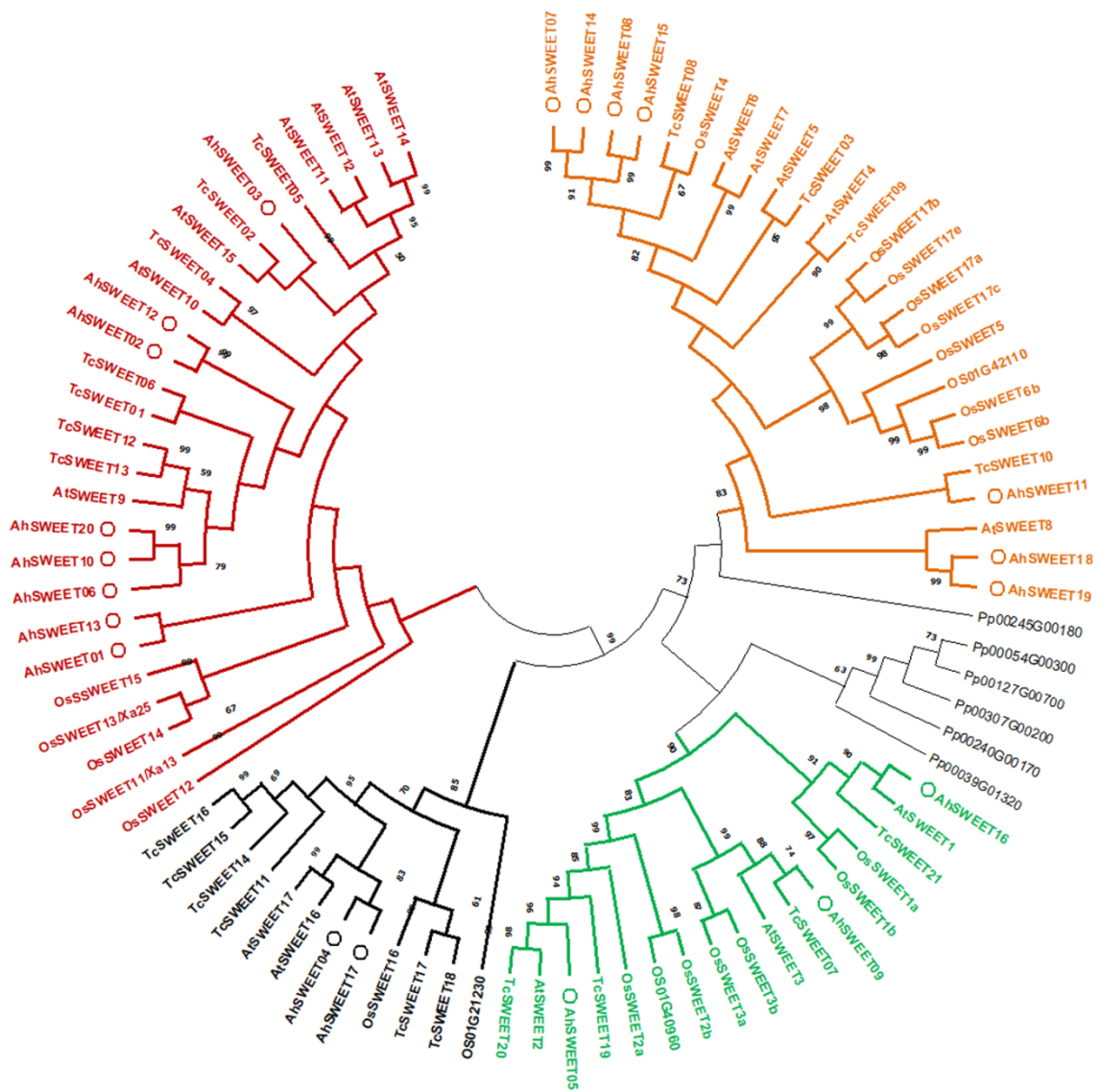


Hình 2. Bản đồ di truyền được xây dựng từ các *SWEET* của cây dền lấy hạt

Cây phả hệ (Hình 3) cho thấy rằng các *SWEET* của cây dền lấy hạt thuộc về bốn nhóm I-IV, tương tự như cây phả hệ được xây dựng từ các protein *SWEET* của các loài [8, 9]. Nhóm I (màu xanh dương) có ba gene, nhóm II (màu vàng cam) có bảy gene, nhóm III (màu nâu đỏ) có tám gene trong khi nhóm IV (màu đen) chỉ có hai gene. Như vậy nhóm III là nhóm có số lượng gene nhiều nhất trong họ *SWEET*. Kết quả này tương đồng với ở cây ca cao [8] và cây *A. thaliana* [9].

Vị trí trên các NST và mức độ tương đồng của các gene *AhSWEET* cho phép xác định một số sự kiện nhân gene đã xảy ra. Kết quả này góp phần giải thích sự tăng số lượng các gene trong họ này.

Có tổng số 10 sự kiện nhân gene đã được xác định (Bảng 2), trong đó các sự kiện nhân gene trên toàn hệ gene (whole genome duplication, WD) giữ vai trò chính (chính sự kiện WD). Chỉ có một sự kiện nhân gene trước sau (tandem duplication) phát sinh ra các cặp gene tương đồng *TcSWEET01* và *TcSWEET02* hoặc cặp *AhSWEET12* và *AhSWEET13*. Sau khi hiện tượng nhân gene TD xảy ra với một trong hai cặp gene trên, sự kiện nhân gene WD xảy ra kế tiếp dẫn tới hình thành hai cặp gene lặp *AhSWEET01* và *AhSWEET13*, *AhSWEET02* và *AhSWEET12* trên NST số 2 và NST số 11. Các sự kiện nhân gene *SWEET* đã được quan sát ở nhiều loài thực vật khác và là cơ sở giải thích sự hình thành số lượng lớn gene họ này [8, 9].



Hình 3. Cây phả hệ được xây dựng từ các SWEET của cây Dền lấy hạt (Ah), cây *A. thaliana* (At), cây cao (Tc), cây lúa (Os) và cây rêu (Pp) bằng phương pháp Neighbor-Joining với giá trị bootraps 1000

Bảng 2. Đặc điểm tiến hóa của các gene SWEET lặp của cây dền lấy hạt

Gene lặp 1	Gene lặp 2	Kiểu nhân gene	dS/dN	Kiểu chọn lọc
<i>AhSWEET07</i>	<i>AhSWEET14</i>	WD	9,118	Âm
<i>AhSWEET08</i>	<i>AhSWEET15</i>	WD	11,143	Âm
<i>AhSWEET16</i>	<i>AhSWEET19</i>	WD	4,440	Âm
<i>AhSWEET04</i>	<i>AhSWEET17</i>	WD	6,819	Âm
<i>AhSWEET01</i>	<i>AhSWEET13</i>	WD	6,747	Âm
<i>AhSWEET02</i>	<i>AhSWEET12</i>	WD	7,265	Âm
<i>AhSWEET01</i>	<i>AhSWEET02</i>	TD	6,084	Âm

Gene lặp 1	Gene lặp 2	Kiểu nhân gene	dS/dN	Kiểu chọn lọc
<i>AhSWEET12</i>	<i>AhSWEET13</i>	TD	9,582	Âm
<i>AhSWEET06</i>	<i>AhSWEET10</i>	WD	8,437	Âm
<i>AhSWEET06</i>	<i>AhSWEET20</i>	WD	10,410	Âm
<i>AhSWEET10</i>	<i>AhSWEET20</i>	WD	8,745	Âm

Kết quả phân tích tỷ lệ các dạng đột biến nucleotide của các cặp gene *SWEET* lặp cũng cho thấy các cặp gene lặp chịu tác động của chọn lọc âm (negative selection hoặc purifying selection).

4 Kết luận

Tổng số 20 gene *SWEET* đã được xác định ở trong hệ gene cây dền lấy hạt. Các *SWEET* của cây dền lấy hạt có cấu trúc đặc trưng cho các *SWEET* đã được biết. Hầu hết các *AhSWEET* có bốn hoặc năm intron. Các protein suy diễn có từ 226 tới 311 amino acid; pI dao động từ 8,08 đến 9,73. Các *AhSWEET* được phân chia thành bốn nhóm điển hình ở thực vật. Hiện tượng nhân gene trên toàn hệ gene là nguyên nhân chính dẫn tới sự tăng số lượng thành viên trong họ *SWEET* ở cây dền lấy hạt.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được thực hiện từ kinh phí của đề tài nghiên cứu cơ bản mã số 08/HĐUT-KHCN do trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 tài trợ.

Tài liệu tham khảo

1. D'Amico S, Schoenlechner R. Chapter 6 - Amaranth: Its Unique Nutritional and Health-Promoting Attributes. In: Taylor JRN, Awika JM, editors. *Gluten-Free Ancient Grains*: Woodhead Publishing; 2017. p. 131-59.
2. Arendt EK, Zannini E. 13 - Amaranth. In: Arendt EK, Zannini E, editors. *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*: Woodhead Publishing; 2013. p. 439-73.
3. Lightfoot DJ, Jarvis DE, Ramaraj T, Lee R, Jellen EN, Maughan PJ. Single-molecule sequencing and Hi-C-based proximity-guided assembly of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) chromosomes provide insights into genome evolution. *BMC Biol.* 2017;15(1):74.
4. Clouse JW, Adhikary D, Page JT, Ramaraj T, Deyholos MK, Udall JA, et al. The Amaranth Genome: Genome, Transcriptome, and Physical Map Assembly. *Plant Genome.* 2016;9(1).
5. Jeena GS, Kumar S, Shukla RK. Structure, evolution and diverse physiological roles of *SWEET* sugar transporters in plants. *Plant Mol Biol.* 2019;100(4-5):351-65.
6. Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature.* 2010;468(7323):527-32.
7. Yuan M, Wang S. Rice Mtn3/saliva/*SWEET* family genes and their homologs in cellular organisms. *Mol Plant.* 2013;6(3):665-74.
8. Bang CP, Dinh NV, Huyen TTT, Man LT, Duong VX. In silico characterisation of genes encoding *SWEET* protein in cocoa (*Theobroma cacao* L.). The 4th National Scientific Conference on Biological research and Teaching in Vietnam; Vinh Phuc, Vietnam: Publishing house of Natural Sciences and Technology; 2020. p. 408-15.
9. Li X, Si W, Qin Q, Wu H, Jiang H. Deciphering evolutionary dynamics of *SWEET* genes in diverse plant lineages. *Scientific Reports.* 2018;8(1):13440.
10. Argout X, Salse J, Aury JM, Guiltinan MJ, Droc G, Gouzy J, et al. The genome of *Theobroma cacao*. *Nat Genet.* 2011;43(2):101-8.
11. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403-10.
12. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and

- analysis tools on the ExPASy server. The proteomics protocols handbook: Springer; 2005. p. 571-607.
13. Guo AY, Zhu QH, Chen X, Luo JC. [GSDS: a gene structure display server]. *Yi Chuan*. 2007;29(8):1023-6.
 14. Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, Sonnhammer ELL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*. 2001;305(3):567-80.
 15. Briesemeister S, Rahnenfuhrer J, Kohlbacher O. YLoc—an interpretable web server for predicting subcellular localization. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(Web Server issue):W497-502.
 16. Voorrips RE. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *Journal of Heredity*. 2002;93(1):77-8.
 17. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772-80.
 18. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35(6):1547-9.
 19. Hà CD, Quỳnh PT, Thu PTL, Cương NV, Dũng LT. Xác định họ gen mã hóa protein vận chuyển Sweet trên cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*. 2018;63(3):140-9.