

SELEÇÃO DE PROGÊNIES DE MILHO DOCE DE ALTO VALOR NUTRITIVO COM AUXÍLIO DE TÉCNICAS ELETRÓFORÉTICAS¹

EDILSON PAIVA², MARIA JOSÉ V. VASCONCELOS³, SIDNEY NETTO PARENTONI⁴,
ELTO EUGÊNIO G. e GAMA e RICARDO MAGNAVACA²

RESUMO - Através do cruzamento da cultivar de milho superdoce BR-400 contendo o gene **brittle-1** com a população CMS-456 (QPM), de grãos com endosperma vítreo-amarelo portadores do alelo opaco-2 modificado, foram selecionadas 48 progênies endogâmicas ($S_2 + 1$ sib) com constituição fenotípica doce e grãos de endosperma vítreo-amarelo. Estas progênies foram submetidas a análises eletroforéticas e análises quantitativas de lisina e triptofano. Padrões protéicos de polipeptídeos do grupo das zeínas foram utilizados com sucesso como ferramentas auxiliares na identificação de progênies de constituição genotípica doce, com altos teores de lisina e triptofano e endosperma vítreo-amarelo. Foram discutidas as relações entre padrões protéicos das zeínas e conteúdo dos aminoácidos lisina e triptofano na proteína do endosperma.

Termos para indexação: Opaco-2 modificado, proteína, lisina, triptofano, **brittle-1**.

SELECTION OF HIGH QUALITY PROTEIN SWEET CORN PROGENIES THROUGH ELECTROPHORESIS TECHNIQUES

ABSTRACT - Forty-eight endogamic sweet corn progenies ($S_2 + 1$ sib) with vitreous-yellow kernels were obtained from crosses between a sweet corn cultivar based on the gene brittle-1 (BR-400), and a high quality protein maize (QPM) based on a modified opaque-2 allele (CMS-456). These progenies were subjected to gel electrophoresis and quantitative lysine and tryptophan analysis. Protein patterns of zeins were utilized with success as auxiliary tools for the identification of the sweet corn progenies with high content of lysine and tryptophan associated with a vitreous-yellow kernel characteristic. Relations between electrophoretic protein patterns of zeins and the content of lysine and tryptophan present in the endosperm protein were discussed.

Index terms: modified Opaque-2, lysine, tryptophan, brittle-1.

INTRODUÇÃO

O milho doce (*Zea mays* L.) apresenta altos teores de açúcares no endosperma. O caráter doce no milho se deve à presença de um ou vários genes mutantes que acarretam mudanças no teor e no tipo dos carboidratos presentes no endosperma dos grãos. O milho doce é consumido no estágio de grão pastoso, o qual ocorre cerca de vinte dias após a polinização, na maio-

ria das cultivares. Nos Estados Unidos, é uma das hortaliças mais populares (Boyer & Shannon 1983), embora no Brasil o seu consumo ainda seja bastante reduzido (Tosello 1978), o que se deve principalmente ao desconhecimento do produto e à falta de cultivares adequadas à comercialização.

Várias mutações genéticas que afetam a composição química (proteínas e carboidratos) do endosperma de grãos de milho têm sido descritas (Coe & Neuffer 1977). Dessas, cerca de quatorze têm sido utilizadas no melhoramento do milho doce (Boyer & Shannon 1983).

Uma avaliação das características genéticas das cultivares de milho doce existentes mostrou que essas possuem uma base genética bastante estreita (Garwood 1976). Exceção ocorreu em

¹ Aceito para publicação em 12 de fevereiro de 1992.

² Eng. - Agr., Ph.D., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS), Caixa Postal 151, CEP 35700 Sete Lagoas, MG.

³ Bioquímica, EMBRAPA/CNPMS.

⁴ Eng. - Agr., EMBRAPA/CNPMS.

um programa para obtenção de cultivares de milho doce adaptadas a condições tropicais (Brewbaker & Banafunzi 1975, Brewbaker 1977), onde a seleção massal e de "pedigree" foi feita em populações compostas de ampla base genética.

As cultivares de milho doce tradicionais são, na sua maioria, recessivas para o gene **sugary-1**, e apresentam ainda duas limitações: um período muito curto de colheita e uma rápida perda no teor de açúcares logo após a colheita (Boyer & Shannon 1983, Brewbaker 1977). Ao contrário, cultivares contendo endosperma **brittle** ou **shrunk** mantêm altos teores de açúcares por períodos mais longos e apresentam baixa taxa de conversão de açúcares para amido, após a colheita. Devido a essa característica, cultivares que possuem os alelos **brittle** e **shrunk** são chamadas superdoços, enquanto as que contêm o gene **sugary** são conhecidas como doces (Creech 1965, Jennings & McCombs 1969, Holder et al. 1974a e 1974b, Tsai & Glover 1974, Garwood et al. 1976, Hannah & Basset 1977).

No milho doce a redução no acúmulo de polissacarídeos, principalmente amido, leva a um aumento no teor de proteínas no endosperma (Misra et al. 1975). As zeínas, do grupo das prolaminas, são as proteínas mais abundantes em grãos de milho normais, chegando a atingir 60% da proteína total do endosperma (Wilson 1983). Zeínas são proteínas deficientes em dois aminoácidos essenciais, lisina e triptofano, o que resulta na baixa qualidade nutritiva. Existem, no entanto, linhagens mutantes que contêm os genes "opaco-2" e "floury" que reduzem a síntese de zeínas e, conseqüentemente, aumentam a percentagem de proteínas ricas em lisina e triptofano, no endosperma. Mutantes duplos de milho doce contendo altos teores de açúcares e proteínas ricas em lisina e triptofano têm sido desenvolvidos com o objetivo de serem utilizados na alimentação humana como hortaliças de alto valor protéico (Misra et al. 1975, Silva et al. 1978).

Recentemente, com a finalidade de melhorar as características agronômicas de genótipos opacos, melhoristas têm utilizado modificado-

res do gene opaco-2 na obtenção de cultivares que associam alta qualidade protéica com endosperma vítreo. Estes genótipos são chamados de **Quality Protein Maize (QPM)**, (Vasal 1975, Vasal et al. 1980, Magnavaca et al. 1988).

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de mutantes duplos de milho doce de alto valor nutritivo, contendo o gene **brittle 1** associado a um gene opaco modificado para endosperma vítreo, utilizando, para sua seleção, padrões protéicos das zeínas, obtidos através de técnicas eletroforéticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Como fonte do gene **brittle-1** (bt_1bt_1) foi utilizada a cultivar de milho doce BR-400, lançada pela EMBRAPA (CNPMS/CNPH) com o nome de Super Doce. A BR-400 é uma variedade derivada do composto **Hawaiian Super Sweet 9**, de ampla base genética (Brewbaker 1977), adaptada para cultivo nos trópicos e capaz de acumular altos teores de açúcares nos grãos. A população CMS-456 (QPM) foi utilizada como fonte do gene opaco-2 (o_2o_2). O CMS-456 (QPM) foi obtido na EMBRAPA/CNPMS através de seleção massal feita na população **POOL-26**, proveniente do programa de melhoramento de milho de alta qualidade protéica do Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz Y Trigo (CIMMYT), México. A população CMS-456 (QPM) possui o gene opaco-2 associado a outros alelos que conferem ao endosperma uma característica vítreo-amarela. Como controle foram também utilizadas as cultivares BR 106, Doce Opaco e o CMS 20 Opaco.

Dos cruzamentos feitos entre o CMS-456 (QPM) e a cultivar doce BR-400, foram selecionadas inicialmente 70 progênes F_1 , com grãos de fenótipo normal e constituição genotípica $Bt_1bt_1O_2o_2$. As quatro melhores plantas de cada progênie foram autofecundadas. De cada espiga S_1 foram separados, utilizando um diafanoscópio, grãos de constituição fenotípica $o_2o_2Bt_1$ - opaca não-doce. Estes grãos foram plantados, e as plantas resultantes, autofecundadas. A escolha desse grupo foi feita com a finalidade de aumentar a chance de se obterem progênes S_2 com grãos doces de cor amarelo-vítrea associada a alta qualidade protéica. Foram selecionadas 48 progênes S_2 , as quais foram submetidas a uma geração de cruzamento dentro de cada família ($S_2 + 1$ sib) com a finalidade de selecionar progênes com sementes doce, amarelo vítreo e al-

ta qualidade protéica; grãos desse último cruzamento foram submetidos a eletroforese e as análises quantitativa de lisina tryptofano e de proteína total.

Para as análises de proteína e aminoácidos, os grãos foram submersos em água por um período de 20 min, após o que removeu-se o pericarpo e embrião com o auxílio de um bisturi. A porção do endosperma restante foi então triturada em um moinho tipo ciclone, e a farinha obtida, coada em peneira de malha 0,35 mm.

A percentagem de proteína das cultivares em estudo foi determinada multiplicando-se o teor de N, obtido pelo método de Kjeldahl, pelo fator 6,25 (Association of Official Agricultural Chemists 1980).

As análises de triptofano e lisina na fração proteína das amostras foram realizadas de acordo com o método descrito por Hernandez & Bates (1969).

O fracionamento protéico para a separação dos diferentes grupos de proteínas foi feito seguindo-se o esquema proposto por Landry & Moureaux (1970), com algumas modificações. Uma amostra de vinte miligramas de farinha foi suspensa por 10 min em 200 μ l de uma solução 0,5 M de NaCl sob agitação e submetida a uma centrifugação a 3.000 g por 10 min para extração das albuminas e globulinas (Fração I). Para a extração das zeínas, o precipitado da fração I foi lavado com água, centrifugado e suspenso em 2-propanol 70% (2-PROH), e novamente centrifugado (Fração II). A seguir, o precipitado foi novamente suspenso em solução de 2-PROH 70% e 3% de 2-mercaptoetanol (2-ME), e centrifugado (Fração III). Finalmente, para a extração das glutelinas, o precipitado da fração III foi suspenso em tampão borato (TB) pH 10, com 3% de 2-ME e centrifugado (Fração IV). Esta foi suspensa em TB pH 10 com 3% 2-ME e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS), e também centrifugado (Fração V). A proporção 1:10 entre o peso da amostra e o volume da solução extratora, tempo de incubação de 10 min com agitação e a centrifugação de 3.000 g por 10 min, utilizados no preparo da fração I, foram mantidos no preparo das demais frações.

Fez-se também a extração conjunta das zeínas (Frações II e III), ressuspensando o precipitado da Fração I diretamente em solução contendo 2-PROH (70%) e 2-ME (3%).

Para obtenção dos padrões eletroforéticos das proteínas presentes nas diferentes frações, os sobrenadantes destas foram misturados na proporção 1:1 com uma solução tampão contendo 62,5 mM de tris-HCl pH 6,8, 2,3% de SDS, 5% de 2-ME, 10% de glicerol e 0,1% de azul de bromofenol. A mistura foi aquecida

em banho maria a 100°C por 5 min, e 50 μ l foram aplicados no gel.

Os géis foram preparados com 5% de acrilamida, região de formação de camadas (Staking gel), e 15% de acrilamida, região de separação (Running gel). A corrida foi desenvolvida a temperatura ambiente, aplicando-se uma corrente constante de 12 mA por uma hora, seguida de um período de três horas a 24 mA. Para a coloração das bandas protéicas, foi utilizada uma solução de coomassie azul brilhante R-250 a 0,1%, diluída em etanol/ácido acético/água (50:10:40 V/V) por 12 horas. Para lavagem do gel, foi utilizado metanol/ácido acético/água (5:10:85 V/V).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Fig. 1 são apresentados padrões obtidos por eletroforese das albuminas, globulinas, prolaminas (zeínas) e glutelinas, extraídos do endosperma de grãos de milho doce das cultivares BR-400 e Doce Opaco. Diferenças marcantes estão presentes nos polipeptídeos das frações II e III, que constituem o grupo das zeínas, proteínas solúveis em álcool (2-PROH) na ausência (Fração II) e na presença (Fração III) de um agente redutor (2-ME). A quantidade de zeínas presentes no endosperma da cultivar doce não opaca (BR-400) foi maior do que aquela da cultivar doce opaca (Doce Opaco). Houve uma re-

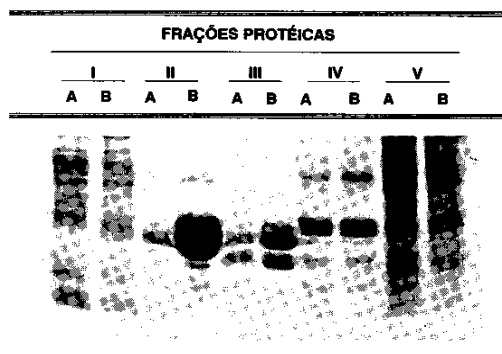


FIG. 1. Padrões de eletroforese das proteínas presentes na Fração I (Albuminas e Globulinas), nas frações II e III (Zeínas) e nas frações IV e V (Glutelinas), extraídas de endosperma das cultivares Doce Opaco (A) e BR-400 (B).

dução visível no teor das zeínas (Fração II e III) na cultivar Doce Opaco em relação à cultivar BR 400 Doce não-opaca (Fig. 1). Alguns polipeptídeos foram mais afetados pela presença do gene Opaco-2 do que outros, à semelhança do descrito por Larkins (1980) para cultivares opacas não-doces. Este efeito do gene opaco-2, reduzindo diferencialmente a síntese e o acúmulo de diferentes polipeptídeos de zeínas na cultivar Doce Opaca, foi explorado como critério de seleção na obtenção de mutantes duplos de milho superdoce de alto valor nutritivo, contendo o gene *brittle-1* associado a um gene *opaco-2* modificado para endosperma vítreo. Para tal, foi feita uma extração conjunta das zeínas (Frações II e III) do endosperma de grãos de várias progêneses ($S_2 + 1$ sib), de genótipo doce e fenótipo de coloração vítreo-amarela.

Na Fig. 2, são apresentados os padrões protéicos das diferentes classes de zeínas presentes no endosperma de grãos de dez progêneses ($S_2 + 1$ sib) escolhidas ao acaso. Há uma nítida variação entre as progêneses quanto ao tipo e quantidade dos polipeptídeos de peso molecular 27, 22 e 19 kD. Baseando-se nas variações dos padrões eletroforéticos das zeínas (Fig. 1), foi possível agrupar as progêneses em três grupos distintos. Grupo A, progêneses 2, 4 e 10, que apresentam baixos teores do polipeptídeo de peso molecular 27 kD; grupo B, progê-

nies 6, 7 e 9, apresentando quantidades equivalentes dos três polipeptídeos (27, 22 e 19 kD); e grupo C, progêneses 1, 3, 5 e 8 com altos teores do polipeptídeo 27 kD e reduzidos teores dos de 22 e 19 kD.

As progêneses agrupadas nos três grupos descritos A, B e C foram submetidas a análises quantitativas de proteína total do endosperma e dos aminoácidos lisina e triptofano presentes na proteína. Os resultados obtidos (Tabela 1), mostram que os teores de lisina e triptofano foram mais altos nas progêneses do grupo C, ou seja aquelas que apresentaram altos teores do polipeptídeo 27 kD e baixos teores dos de peso molecular 22 e 19 kD. O conteúdo de lisina e triptofano na proteína dos grãos do grupo C foi semelhante ao encontrado nos progenitores CMS-456 (QPM) e BR-400, 60% maior do que o das progêneses dos grupos A e B, 100% maior do que a cultivar de endosperma normal (BR-106) e, 40 e 25% menor do que os das cultivares Doce Opaco e CMS-20 Opaco, respectivamente, as quais possuem o gene *Opaco-2* não modificado. Os genótipos QPMs são conheci-

TABELA 1. Representação esquemática de padrões eletroforéticos de zeínas presentes nos grupos A, B e C de progêneses de milho doce e percentagens de proteína total, lisina e triptofano em cultivares de milho doce, doce opaco, opaco, QPM, normal e progêneses dos grupos A, B e C.

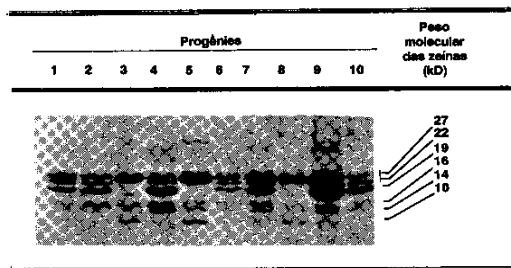


FIG. 2. Zimogramas dos componentes das zeínas presentes no endosperma de milhos superdoce provenientes de dez progêneses ($S_2 + 1$ sib) obtidas do cruzamento da cultivar BR-400 com a população CMS-456 (QPM).

Progêneses/ cultivares	Padrões eletro- foréticos	Proteína	Lisina ²	Tripto- fano ²
		total ¹		
		%		
Grupo A (doce)		15,3 ³	1,9	0,39
Grupo B (doce)		15,9	1,9	0,38
Grupo C (doce)		14,6	3,1	0,68
BR 400 (doce)		13,5	3,1	0,68
CMS 456 (QPM)		9,6	3,1	0,69
Doce-opaco		12,6	5,0	1,16
CMS-20 opaco		8,6	4,1	0,92
BR 106 (normal)		8,6	1,5	0,28

¹ % no endosperma

² % na proteína total

³ Médias de 3 repetições

dos por apresentarem teores de lisina e triptofano intermediários entre genótipos normais (BR 106) e aqueles contendo o gene *Opaco-2* não modificado (CMS 20 Opaco) (Vasal et al. 1980, Magnavaca et al. 1988, Paiva et al. 1991), e esta tendência pode também ser observada nas progênies do grupo C, não mostrando ação interalélica entre o gene *brittle 1* e o gene *Opaco-2* modificado nesse grupo. As progênies dos grupos A e B apresentaram teores de lisina e triptofano comparáveis aos da cultivar de milho de endosperma comum BR-106.

Verificou-se, nas progênies do grupo C, uma relação positiva entre o conteúdo do polipeptídeo de 27 kD e o alto teor de lisina e triptofano na proteína do endosperma de grãos do grupo C. Este tipo de relação foi também descrita por Wallace et al. (1990) e Paiva et al. (1991) em estudos de extração, quantificação e distribuição de zeínas em grãos de milhos normais e QPMs, onde foi demonstrado que, para se ter a característica de endosperma vítreo associada a altos teores de lisina e triptofano, o grão precisa conter também altos teores do polipeptídeo de 27 kD, denominado por alguns autores de gama-zeína.

O maior teor de proteína total presente nos genótipos doces (Tabela 1), e atribuído à redução do acúmulo de amido, a qual resulta num aumento da participação das proteínas no peso seco dos grãos doces.

Recombinações entre quinze progênies ($S_2 + 1$ sib) selecionadas e pertencentes ao grupo C foram feitas, obtendo-se um sintético de milho superdoce, adaptado aos trópicos, de ampla base genética, com alta qualidade protéica, coloração amarelo-vítrea do grão e boas características agrônomicas, e que passará a integrar o programa de melhoramento de milho doce do CNPMS/EMBRAPA e servirá ainda como material básico em trabalhos de biologia molecular que envolvam estudos de modificadores do gene *Opaco-2*.

CONCLUSÕES

1. Padrões protéicos de zeínas, obtidos através de técnicas eletroforéticas, podem ser

utilizados com sucesso como marcadores na seleção de milho doce de alta qualidade protéica.

2. Há uma relação positiva entre o teor de zeínas de peso molecular de 27 kD e o alto teor de lisina e triptofano no endosperma de grãos de milho.

3. A utilização da cultivar QPM amarela CMS-456 permitiu a obtenção de mutantes duplos de milho superdoce com coloração amarelo-vítrea associada e característica de alta qualidade protéica.

4. Nos mutantes duplos de milhos superdoces de alta qualidade protéica (grupo C), os alelos *brittle-1* e *Opaco-2* não mostraram ação interalélica, tendo em vista que os teores dos aminoácidos e proteína foram semelhantes aos progenitores isolados.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (Washington, EUA). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists**. 13. ed. [S.l.], 1980. p.858.
- BOYER, C.D.; SHANNON, J.C. The use of endosperm genes for sweet corn improvement. In: PLANT breeding reviews. West Lafayette: USA Purdue University, 1983. v.1, p.139-161.
- BREWBAKER, J.L. "Hawaiian super-sweet # 9" corn. *HortScience*, v.12, p.355-356, 1977.
- BREWBAKER, J.L.; BANAFUNZI, N. "Hawaiian super-sweet # 6" corn. *HortScience*, v.10, p.427-428, 1975.
- COE, E.H.; NEUFFER, M.C. The genetics of corn. In: SPRAGUE, G.F. (Ed.). **Corn and corn improvement**. Madison: American Society Agronomy, 1977. p.111-223.
- CREECH, R.G. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. *Genetics*, v.52, p.1175-1186, 1965.
- GARWOOD, D.L. **Sweet corn breeding questionnaire summary**. Pennsylvania: State University, 1976. Mimeo.
- GARWOOD, D.L.; McARDLE, F.J.; VANDERLICE, S.F.; SHANNON, J.C. Postharvest carbohydrate transformations and processed quality of high sugar maize genotypes. *Journal of the*

- American Society for Horticultural Science, v.101, p.400-404, 1976.
- HANNAH, L.C.; BASSET, M.J. Use of brittle-A gene in sweet corn breeding. *HortScience*, v.12, p.313-314, 1977.
- HERNANDEZ, H.; BATES, L.S. A modified method for rapid tryptofan analysis of Maize. México: CIMMYT, 1969. 7p. (Research Bulletin, 13).
- HOLDER, D.C.; GLOVER, D.V.; SHANNON, J.C. Interaction of shrunken-2 with five other carbohydrate genes in *Zea mays* L. endosperm. *Crop Science*, v.14, p.643-646, 1974a.
- HOLDER, D.G.; GLOVER, D.V.; SHANNON, J.C. Interaction of shrunken-2 and sugary-1 in dosage series in corn endosperm. *Crop Science*, v.14, p.647-648, 1974b.
- JENNINGS, J.H.; McCOMBS, C.L. Effects of sugary-1 and shrunken-2 loci on kernel carbohydrate contents, phosphorylase and branching enzyme activities during kernel ontogeny. *Phytochemistry*, v.8, p.1357-1363, 1969.
- LANDRY, J.; MOUREAUX, T. Heterogeneity of the glutelins of the grain of corn, selective extraction and composition in amino acids of the insoluble fractions. *Bulletin de la Société Chimie Biologique*, v.52, p.1021-1037, 1970.
- LARKINS, B.A. Seed storage proteins: characterization and biosynthesis. In: MARCUS, A. (Ed.). *The biochemistry of plants; proteins and nucleic acids*. New York: Academic Press, 1980. v.6, p.449-489.
- MAGNAVACA, R.; PAIVA, E.; WINKLER, E.I.; CARVALHO, H.W.L.; SILVA FILHO, M.C.; PEIXOTO, M.J.V.V.D. Avaliação de populações de milho de alta qualidade protéica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.23, n.11, p.1263-1268, 1988.
- MISRA, P.S.; MERTZ, E.T.; GLOVER, D.L. Studies on corn proteins. VI. Endosperm protein changes in single and double endosperm mutants of maize. *Cereal Chemistry*, v.52, p.161-166, 1975.
- PAIVA, E.; KRIZ, A.L.; PEIXOTO, M.J.V.V.D.; WALLACE, J.C.; LARKINS, B.A. Quantitation and distribution of gamma-zein in the endosperm of maize kernels. *Cereal Chemistry*, v.68, n.3, p.276-279, 1991.
- SILVA, W.J.; TEIXEIRA, J.P.F.; ARRUDA, P.; LOVATO, M.B. Nutrimaiz, a tropical sweet maize cultivar of high nutritional value. *Maydica*, v.23, p.129-136, 1978.
- TOSSELLO, G.A. Milhos especiais e seu valor nutritivo. In: MELHORAMENTO e produção do milho. 2. ed. Campinas, SP: Fundação Cargill, 1978. v.1, p.375-409.
- TSAI, C.Y.; GLOVER, D.V. Effect of the brittle-1 sugary-1 double mutant combination on carbohydrate and postharvest quality of sweet corn. *Crop Science*, v.14, p.808-810, 1974.
- VASAL, S.K. Use of genetic modifiers to obtain normal-type kernels with the opaque-2 gene. In: PURDUE UNIVERSITY. *High-quality protein maize*. Stroudsburg, Dowden: Hutchinson & Ross, 1975. p.197-216.
- VASAL, S.K.; VILLEGAS, E.; BJARNASON, M.; GELAW, B.; GOERTZ, P. Genetic modifiers and breeding strategies in developing hard endosperm opaque-2, materials. In: CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE MAIZ Y TRIGO, (México). *Improvement of quality traits of maize for grain and silage use*. The Hague: Nijhoff, 1980. p.27-73.
- WALLACE, J.C.; LOPES, M.A.; PAIVA, E.; LARKINS, B.A. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of zein modified opaque-2 maize. *Plant Physiology*, v.92, p.191-196, 1990.
- WILSON, C.M. Biochemistry genetics, nutritive value. In: GOTTSCHALK, W.; MULLER, H.P. *Seed proteins*. The Hague Netherlands: Martinus Nijhoff/Junk, 1983. p.271-307.