

## Hybridations naturelles entre *Globodera rostochiensis* et *G. pallida*

Murielle THIÉRY\*, Didier MUGNIÉRY\*, Didier FOUVILLE\* et Arjen SCHOTS\*\*

\* Laboratoire de Zoologie de l'ENSA de Rennes, INRA, B.P. 29, 35650 Le Rheu, France et

\*\* Laboratory for Monoclonal Antibodies, P.O. Box 9060, 6700 GW Wageningen, Pays-Bas.

Accepted for publication 31 August 1995.

**Résumé** – Pour offrir le maximum de possibilités à *Globodera rostochiensis* et *G. pallida* de se croiser, une expérience est réalisée en pots où un cultivar résistant à *G. rostochiensis* est cultivé en présence des deux espèces, l'inoculum de *G. rostochiensis* étant cinq fois plus important que celui de *G. pallida*. Le contenu des kystes F1 obtenus est testé par trois méthodes. Inoculés par groupes de cinq juvéniles sur des plantes cultivées en boîte de Petri, une proportion légèrement plus faible des juvéniles F1, comparés à de purs *G. pallida* ne parvient pas à pénétrer et à se développer dans les racines. Le test Elisa réalisé sur les juvéniles F1 avec l'anticorps monoclonal WPG2 montre que quelques kystes contiennent des hybrides dans une proportion difficile à estimer. L'utilisation d'enzymes de restriction sur des zones de l'ADN ribosomique non transcrites et amplifiées par PCR démontre clairement l'existence d'hybrides. Leur relative proportion est estimée par une analyse d'un échantillon de 30 kystes F1 analysés individuellement : un ne contient que des hybrides, trois autres en contiennent partiellement, un est un pur *G. rostochiensis* et les autres sont de purs *G. pallida*. L'hybridation naturelle est donc possible entre ces deux espèces et doit se réaliser en conditions naturelles. Il y a donc des risques que des populations hybrides se créent.

**Summary** – *Natural hybridization between Globodera rostochiensis and G. pallida* – An experiment was conducted in pots which offered the maximum of possibilities for *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* to hybridise. An inoculum of *G. pallida* cysts was mixed with a five-fold larger inoculum of *G. rostochiensis* pathotype R01/4 and was used with a cultivar resistant to *G. rostochiensis*. The F1 cysts were characterised and compared with pure *G. pallida* by three different methods. In tests with groups of five J2's on plants growing in Petri dishes, a slightly greater proportion of juveniles from the F1 cysts failed to penetrate the roots and develop than from the pure *G. pallida* control. The results indicated about 9 to 18 % of hybrids. Tests with WPG2 monoclonal antibody with Elisa demonstrated that some cysts contained hybrids with a proportion difficult to estimate. Examination of the internal transcribed spacers of the ribosomal gene following amplification using PCR reaction and cutting with restriction enzymes clearly demonstrated the presence of hybrids. The relative proportion of the hybrids, calculated from an analysis of a sample of 30 individual F1 cysts, shown that one was a complete hybrid, three were partly hybrids, one was a pure *G. rostochiensis* and the remainders were pure *G. pallida*. These results clearly demonstrated that natural hybridisation between these two sibling species is possible and probably occurs in natural conditions. Consequently, there is a risk that hybrid populations may eventually emerge.

**Key-words** : ADNr, anticorps monoclonaux, ITS, marqueurs moléculaires, nématodes.

Les deux espèces, *Globodera rostochiensis* et *G. pallida*, ont été séparées par Stone (1972) à la suite des travaux de nombreux auteurs portant sur la couleur des femelles (Guile, 1966), la forme des boutons basaux des juvéniles (Stone, 1972), la longueur du stylet des juvéniles (Bouwman & Ross, 1972), le rapport de Granek (Green, 1971) et le nombre de rides du périnée (Ellis & Hesling, 1974). Ces résultats ont été confirmés par les études d'électrophorèse monodimensionnelle (Trudgill & Parrot, 1972) et bidimensionnelles des protéines (Bossis & Mugniéry, 1993), de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) sur des portions transcrites de l'ADN ribosomique (Thiéry & Mugniéry, 1996). Les hybridations réalisées *in vitro* par Parrot (1972) et Mugniéry (1979) ont montré que ces espèces se croisaient librement mais les juvéniles formés ne sont pas viables ou donnent des mâles stériles. Le fait que ces deux espèces coexistent dans les mêmes champs et sur les mêmes pommes de terre sans hybridation ap-

parente confirme la validité de ces deux espèces, bien que Kort et Jaspers (1973) émettent certains doutes sur cet état de fait après analyse morphométrique des juvéniles de *Globodera* trouvés en sympatrie. Den Nijs (1992), à la suite d'expérimentations menées en pots de végétation, conclut que ces espèces ne se croisent pas, qu'elles se reproduisent indépendamment et qu'elles coexistent de façon stable dans les conditions de l'expérimentation. Ces expériences avaient été menées en plaçant un inoculum identique des deux espèces auprès d'une variété hôte, permettant le développement de chacune des deux espèces. La température de l'expérimentation avait été choisie de manière telle qu'aucune des deux espèces ne soit particulièrement favorisée.

Dans des conditions abiotiques neutres, 20 °C et 16 h de photopériode, c'est-à-dire ne favorisant pas une espèce par rapport à l'autre, nous avons placé les deux espèces sur un végétal, hôte de l'une des espèces et résistant à l'autre. La résistance quasi absolue induite

par le gène H1 vis-à-vis de *G. rostochiensis* Ro 1/4 induit un blocage des juvéniles dans les racines dès leur pénétration mais permet cependant à certains juvéniles d'évoluer jusqu'au stade mâle. Ce gène H1 est très peu efficace à l'égard de *G. pallida* Pa 2/3. Femelles et mâles sont donc produits. Nous avons analysés la F1 pour détecter l'éventuelle présence d'hybrides naturels.

## Matériel et méthodes

Les nématodes utilisés sont *G. rostochiensis* Ro 1/4 population Ecosse (GR), *G. pallida* 2/3 population Guiclan (GP) et leurs hybrides ♀ GR Ecosse × ♂ GP Guiclan produits *in vitro* selon le procédé déjà utilisé par Mugniéry (1979). Ces hybrides seront dénommés H.

Cinq kystes de *G. pallida* et 25 kystes de *G. rostochiensis* sont enfermés dans un tulle de Nylon de maille 150 µm et déposés dans un pot de végétation rempli d'1 kg de mélange de terre franche, de sable et de terreau en proportion égale. Le potentiel infestant est évalué à 5 J2/g pour *G. pallida* et 25 J2/g pour *G. rostochiensis*. Un témoin négatif est constitué avec un inoculum de 30 kystes de *G. pallida* Guiclan. Un tubercule de pomme de terre, cv. Aminca, possédant le gène H1, est cultivé dans ce substrat. Les pots sont placés en serre climatisée à 20 °C. Après sénescence, les kystes néoformés, dénommés F1, sont extraits et conservés à 4 °C pendant quatre mois.

Après mise en éclosion des kystes F1 dans de l'exsudat radiculaire de pomme de terre, cinq juvéniles fraîchement éclos sont déposés sur des racines de pomme de terre, cvs Aminca et Désirée, cultivées en boîte de Petri selon la méthode décrite par Mugniéry et Person (1976). Les nématodes développés sont identifiés par simple examen des racines ou dissection si nécessaire. Ils sont répartis dans les classes suivantes : J2 n'ayant pas pénétré, J2/3 non développés, mâles et femelles. Les structures de population sont analysées par le test 2<sup>1</sup> de Kullback (cf. Arbonnier, 1966), choisi de préférence au  $\chi_2$  pour ses propriétés de parfaite additivité. Le développement observé est comparé à celui des juvéniles de *G. pallida*, obtenus à partir des témoins GP élevés en serre sur le cv. Aminca.

Les kystes F1 provenant du cv. Aminca cultivé en serre sont analysés selon le protocole Elisa décrit par Schots *et al.* (1992), avec l'anticorps monoclonal spécifique des *Globodera* (WGP1) et l'anticorps spécifique de *G. pallida* (WGP2). Trente kystes sont analysés individuellement en utilisant les concentrations suivantes : 400, 200, 100, 50 œufs par ml. Après essais préalables, la densité optique est lue 24 h plus tard. Chaque plaque comporte l'antigène standard néerlandais (GPNL) avec huit répétitions, l'antigène GP Guiclan avec quatre répétitions et les antigènes provenant de dix kystes F1. Deux plaques sont réalisées comme répétitions avec les mêmes antigènes GPNL, GP Guiclan et F1.

Les espaceurs internes transcrits (ITS) des kystes néoformés provenant du cv. Aminca cultivé en serre sont analysés selon deux protocoles distincts. Pour le premier, quinze kystes sont prélevés au hasard, ouverts individuellement et 30 œufs prélevés au hasard sont écrasés individuellement à sec entre lame et lamelle et leurs ITS sont amplifiés directement sans purification d'ADN (Fig. 1) selon les modalités décrites par Thiéry et Mugniéry (1996) : le broyat est recouvert par 18 µl d'un mélange d'amplification contenant 10 mM Tris HCl pH 9, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Triton X100, 0,02 % de gélatine, 100 µM de chaque dNTPs, 0,5 µM de chacune des amorces, 0,5 unité de Taq ADN polymérase (Appligène) et de l'eau ultra-pure. L'amplification est réalisée avec un thermocycleur Perkin Elmer Cetus 480, programmé pour 30 cycles, chaque cycle étant de 1 min à 94 °C (dénaturation), 50 s à 60 °C (hybridation des amorces) et 1 min à 72 °C (polymérisation). L'enzyme de restriction choisie pour différencier les deux espèces est TaqI (Boehringer). La digestion est réalisée dans le tampon B de Boehringer pendant une nuit et est révélée sur gel d'agarose.

Pour le deuxième protocole, quinze kystes sont prélevés au hasard et ouverts individuellement. Trente œufs sont prélevés au hasard, écrasés et réunis dans un même tube pour amplification. Le résultat peut faire apparaître uniquement le profil GP, GR ou hybride. Dans les deux premiers cas, on considérera que tous les œufs appartiennent à l'espèce GP ou GR. Sinon, 30 autres œufs sont reprélevés au hasard dans les kystes en question, écrasés individuellement et préparés selon la même technique. Des œufs issus de kystes GR et GP sont utilisés comme témoin.

## Résultats

Le développement des juvéniles F1 sur racines de pomme de terre cultivées en boîte de Petri est relativement proche de celui des juvéniles GP (Tableau 1). Sur le cv. Désirée, le 2<sup>1</sup> est significatif : 8,58 pour trois degrés de liberté (d d l). Cette différence de structure est essentiellement due au rapport des sexes, les F1 produisant proportionnellement moins de femelles et plus de mâles. La même observation est faite avec le cv. Aminca avec un 2<sup>1</sup> global hautement significatif (19,56 pour 3 ddl), la différence de structure étant due essentiellement à un déficit de pénétration et à un rapport de sexes plus favorable aux mâles chez les F1 par rapport à GP.

Compte tenu de la viabilité connue des hybrides (Mugniéry, 1979) s'exprimant par un développement très faible des nématodes hybrides ne donnant que des mâles, on peut estimer la proportion d'hybrides chez les F1 par le déficit en femelle. Si toutes les différences observées entre F1 et GP sont dues à la présence d'hybrides, on peut estimer entre 9 % (cas du cv. Désirée) et 18 % (cas du cv. Aminca) le pourcentage d'hybrides dans la génération F1. Ces différences entre cultivars

**Tableau 1.** Développement comparatif des F1 et de *Globodera pallida* sur les cvs Désirée et Aminca.

	cv. Désirée		cv. Aminca	
	<i>G. pallida</i>	F1	<i>G. pallida</i>	F1
J2 inoculés	72 x 5 = 360	66 x 5 = 330	44 x 5 = 220	54 x 5 = 255
J2/3 bloqués	4	2	5	13
Mâles	17	27	27	37
Femelles	292	240	142	114
Pénétration	87 % a	82 % b	77 % a	64 % b
Développement	99 % a	99 % a	97 % a	92 % b
Mâles/femelles	0,06 a	0,11 b	0,16 a	0,32 b

Les chiffres suivis de lettres différentes présentent des différences significatives au seuil 5 %.

pourraient s'expliquer par la présence de quelques J2 appartenant à *G. rostochiensis*.

Les résultats obtenus par le test Elisa sont extrêmement difficiles à interpréter quantitativement (Tableau 2). Le sérum WGP1 réagit positivement et avec une densité optique semblable à GP, GR, H et aux œufs contenus dans les kystes F1. Ce résultat est normal puisque ce sérum est spécifique des *Globodera*. Avec le sérum WGP2, les résultats sont très différents. Les densités optiques issues de GR et de H sont nulles. Les résultats obtenus avec les œufs de la population Guiclan

sont analogues à ceux obtenus avec l'échantillon standard néerlandais. Le Tableau 2 montre l'augmentation de la densité optique avec la concentration d'antigènes. Sont indiquées, en sus des données extrêmes, les valeurs moyennes calculées pour quatre répétitions de Guiclan et huit de l'antigène standard, issues d'une plaque. Compte tenu des écarts importants entre valeurs minimales et maximales, le diagnostic s'effectue ainsi : tout kyste F1 ayant une densité optique comprise entre ces valeurs ou supérieure à la valeur maximale est diagnostiqué comme étant totalement *G. pallida*. Deux F1 présentent à la concentration 400 œufs/ml une densité optique très inférieure à la valeur minimale de GP Guiclan. On estimera qu'une partie seulement appartient à *G. pallida*. La proportion est estimée à 50 %. Un seul F1 présente une absence totale de réaction. On estimera que les œufs sont tous hybrides, bien que la possibilité d'avoir affaire à *G. rostochiensis* ne puisse pas être écartée. Sur la totalité des 30 kystes F1 testés ainsi, deux peuvent être considérés comme ne contenant que des œufs hybrides, cinq comme contenant une proportion de l'ordre de 50 % d'œufs hybrides et 23 comme ne contenant que des œufs de type GP Guiclan.

L'enzyme de restriction utilisée, la TaqI, révèle trois bandes chez GP et deux chez GR. Une bande est commune. Une vérification faite avec des hybrides H préparés individuellement comme indiqué précédemment montre qu'ils présentent quatre bandes, la bande commune, la bande spécifique de GR et les deux bandes spécifiques de GP (Fig. 2). Sur les 30 kystes testés en PCR-RFLP sur les ITS, 25 contiennent des œufs qui ont tous le phénotype *G. pallida* (Fig. 3). Un seul

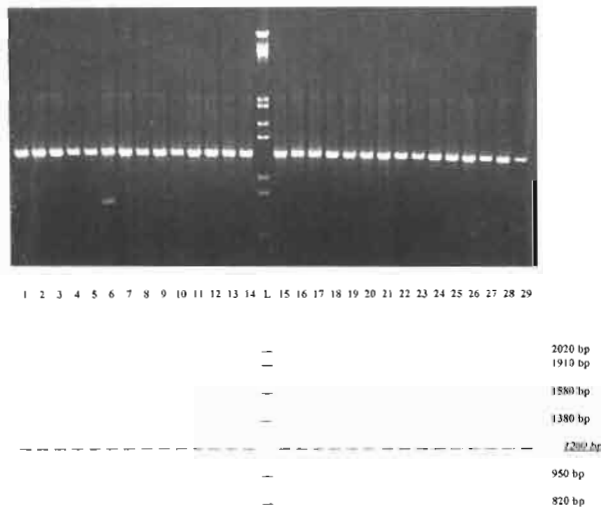
**Tableau 2.** Densités optiques (DO) lues en test Elisa avec l'anticorps monoclonal WGP2 après 24 heures.

	Concentration œufs/ml				Diagnostic
	50	100	200	400	
GPNL	0,043 (0,007-0,087)	0,296 (0,060-0,817)	0,935 (0,505-1,401)	1,154 (0,668-1,158)	
GP Guiclan	0,033 (0,012-0,094)	0,063 (0,028-0,093)	0,256 (0,114-0,507)	0,990 (0,656-1,225)	
F1 n° a	0,069	0,243	0,263	1,007	GP 100 %
F1 n° b	0,013	0,064	0,285	0,691	GP 100 %
F1 n° c	0,042	0,116	0,784	1,332	GP 100 %
F1 n° d	0,048	0,078	0,357	0,625	GP 100 %
F1 n° e	0,140	0,334	1,219	1,643	GP 100 %
F1 n° f	0,015	0,051	0,138	0,329	GP 50 %
F1 n° g	0,025	0,054	0,250	1,185	GP 100 %
F1 n° h	0,077	0,075	0,160	0,701	GP 100 %
F1 n° i	0,154	0,088	0,393	0,385	GP 50 %
F1 n° j	0,006	0,011	0,006	0,005	GP 0 %

Les résultats entre parenthèses correspondent aux valeurs maximales et minimales des DO entre répétitions.

**Tableau 3.** Phénotype des œufs des kystes F1 examinés par PCR-RFLP des ITS.

Nombre de kystes	Phénotype des œufs (30) examinés par kyste		
	GP	Hybrides	GR
25	30	0	0
1	16	14	0
1	14	16	0
1	23	7	0
1	0	30	0
1	0	0	30

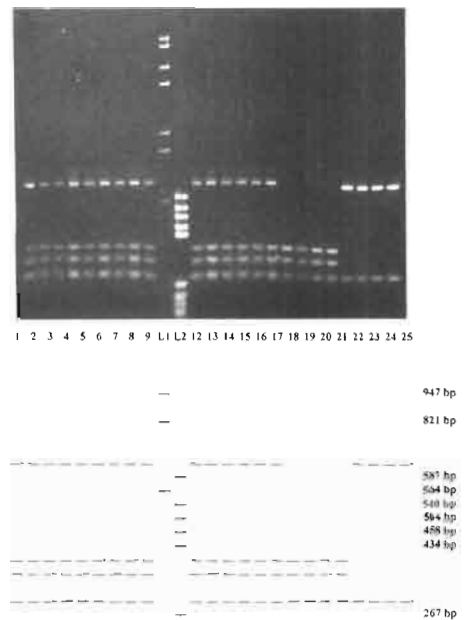


**Fig. 1.** Région amplifiée des ITS à partir de 29 juvéniles de *Globodera pallida* (l'amplificat correspondant au 30<sup>e</sup> juvénile ne figure pas sur cette photo, il a été déposé sur un autre gel. Coloration au bromure d'éthidium, migration sur gel d'agarose 1 %. Marqueur ADN  $\lambda$  HindIII/EcoRI).

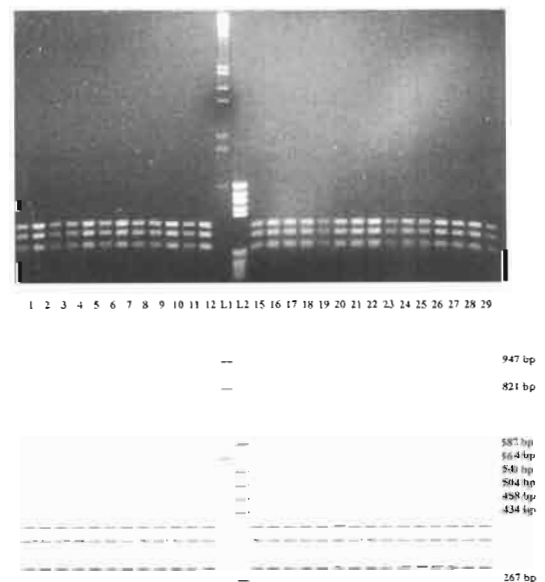
contient des œufs présentant tous un phénotype hybride et un seul contient des œufs ne présentant que le phénotype *G. rostochiensis*. Trois contiennent des œufs à phénotype *G. pallida* et hybride (Fig. 4). La proportion relative des œufs hybrides est de 50, 48 et 23 % (Tableau 3).

**Discussion**

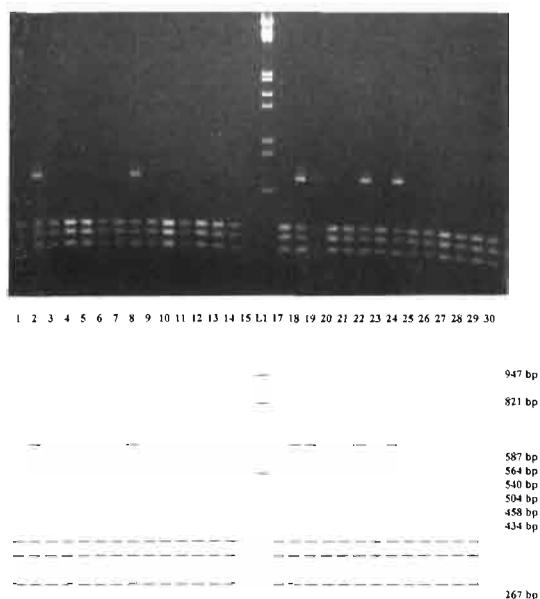
Les différences de développement entre juvéniles issus des kystes F1 et des kystes de *G. pallida* sont très ténues. Quand elles sont significatives pour la pénétration, le développement ou le rapport des sexes, elles sont faibles. Le calcul effectué pour déterminer la proportion d'œufs hybrides montre que cette proportion est très petite. Si cette proportion correspond à la réalité, il est clair que le test utilisé, compte tenu de tous les facteurs de variation qui peuvent jouer, n'est pas adapté à cette analyse.



**Fig. 2.** Fragments de restriction des ITS amplifiés de juvéniles de *Globodera rostochiensis*, *G. pallida* et de leurs hybrides obtenus in vitro. Digestion par TaqI. (Puits 1-9 et 12-17 : hybrides; 18-21 : *G. pallida*; 22-25 : *G. rostochiensis*).



**Fig. 3.** Fragments de restriction des ITS amplifiés de 27 juvéniles issus d'un kyste F1 ne contenant aucun hybride. Digestion par TaqI.



**Fig. 4.** Fragments de restriction des ITS amplifiés de 29 juvéniles issus d'un kyste contenant des hybrides. Digestion par *TaqI*. (Puits 2-8-18-19-22-24 : phénotype hybride; autres puits : phénotype *Globodera pallida*).

L'utilisation des anticorps spécifiques montre qu'un seul kyste F1 (cas du F1 n° j) contient des œufs ne réagissant pas du tout au sérum WGP2. Ces œufs peuvent appartenir à *G. rostochiensis* ou être tous hybrides. Pour les autres kystes, les densités optiques sont à comparer à celles issues des antigènes GPNL et GP. Pour ces derniers, la variabilité de réponse est très importante. On ne peut donc pas calculer précisément la proportion d'œufs hybrides à l'intérieur d'un kyste F1. Cependant, il est raisonnable de penser que les kystes F1 n° f et n° i contiennent des œufs hybrides mais dans une proportion difficile à préciser. Réciproquement, on peut estimer que les autres kystes F1 contiennent un grand nombre d'œufs non hybrides. Si 10 à 40 % d'œufs étaient hybrides, la technique utilisée ne permettrait pas d'en avoir l'assurance et de les différencier de purs GP.

L'utilisation des ITS permet seule d'affirmer véritablement l'existence d'œufs hybrides. Ces œufs hybrides sont présents en partie ou en totalité à l'intérieur de quelques kystes. D'autre part, il est démontré que quelques kystes de *G. rostochiensis* se sont formés sur le cv. Aminca. Dès lors, les résultats ambigus obtenus par les autres méthodes d'analyse s'expliquent, notamment les différences de comportement entre F1 et GP sur les cvs Désirée et Aminca. Ces œufs ne réagissent pas plus que les hybrides au sérum WGP2, ce qui rend les résultats des tests sérologiques extrêmement aléatoires. Seule la technique PCR-RFLP sur les ITS permet de lever toute ambiguïté.

Les deux espèces, *G. rostochiensis* et *G. pallida*, sont donc capables de s'hybrider dans des conditions très

proches des conditions naturelles. La présence de ces deux espèces sur la même parcelle est un phénomène courant (Kort & Bakker, 1980) et l'utilisation de cvs résistant à *G. rostochiensis* est une méthode de lutte classique. Cependant, malgré la présence d'un inoculum de *G. rostochiensis* cinq fois plus important que celui de *G. pallida*, il est évident que très peu d'hybrides naturels sont formés. Si l'on suppose que tous les kystes F1 contiennent en moyenne le même nombre d'œufs, on obtient une proportion d'hybrides de 7 %, ce qui est extrêmement faible. On peut penser que la plus forte attraction sexuelle exercée par les femelles de *Globodera* sur les mâles de leur propre espèce est la raison majeure de ce faible taux d'hybridation (Green, 1980).

Il n'en demeure pas moins démontré que les hybridations entre *G. rostochiensis* et *G. pallida* existent, infirmant ainsi les résultats de den Nijs (1992). La faible proportion d'hybrides formés montre que ces hybridations ne peuvent influencer sur la dynamique de chacune des espèces, confirmant ainsi les résultats précédents (den Nijs, 1992). La quantité d'œufs hybrides pouvant se former dans un écosystème fortement infesté laissera cependant toujours un doute sur une quelconque possibilité de développement de populations hybrides, compétitives et à virulence accrue, surtout si les espèces en présence appartiennent à des populations génétiquement proches.

#### Remerciements

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du projet européen PL 920062 portant sur l'origine des introductions de nématodes du genre *Globodera* en Europe.

#### References

- ARBONNIER, P. (1966). L'analyse de l'information. Aperçu théorique et applications à la loi multinomiale. *Ann. Sci. forest.*, 23 : 950-1017.
- BOSSIS, M. & MUGNIÉRY, D. (1993). Specific status of six *Globodera* parasites of solanaceous plants studied by means of two-dimensional gel electrophoresis with a comparison of gel patterns by a computed system. *Fundam. appl. Nematol.*, 16 : 47-56.
- BOUWMAN, L. A. & ROSS, H. (1972). Differentiation between *Heterodera rostochiensis* and an undescribed allied species by female colour, morphometrics and pathogenicity. *Nematologica*, 18 : 265-269.
- ELLIS, P. R. & HESLING, J. J. (1974). Morphology of cysts of *Heterodera rostochiensis* and *H. pallida*. *Nematologica*, 20 : 226-241.
- GREEN, C. D. (1971). The morphology of the terminal area of the round cyst nematode S.G., *Heterodera rostochiensis* and allied species. *Nematologica*, 17 : 34-46.
- GREEN, C. D. (1980). Nematode sex attractant. *Helminth. Abstr., Ser. B.*, 49 : 81-93.
- GUILLE, C. T. (1966). Cyst chromogenesis in potato cyst eelworm pathotypes. *Pl. Pathol.*, 15 : 125-128.

- KORT, J. & BAKKER, J. (1980). The occurrence of mixtures of potato cyst nematode pathotypes or species. *Nematologica*, 26 : 272-274.
- KORT, J. & JASPERS, C. P. (1973). Shift of pathotypes of *Heterodera rostochiensis* under susceptible potato cultivars. *Nematologica*, 19 : 538-545.
- MUGNIÉRY, D. (1979). Hybridation entre *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) et *G. pallida* (Stone). *Revue Nématol.*, 2 : 153-159.
- MUGNIÉRY, D. & PERSON, F. (1976). Méthode d'élevage de quelques nématodes à kyste du genre *Heterodera*. *Sci. agron., Rennes*, 217-220.
- DEN NIJS, L.J.M.F. (1992). Do *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* interbreed in semi-natural conditions? An examination of the next generations. *Fundam. appl. Nematol.*, 15 : 545-550.
- PARROT, D. M. (1972). Mating of *Heterodera rostochiensis* pathotypes. *Ann. appl. Biol.*, 71 : 271-273.
- SCHOTS, A., GOMMERS, F. J. & EGBERTS, E. (1992). Quantitative ELISA for the detection of potato cyst nematodes in soil samples. *Fundam. appl. Nematol.*, 15 : 55-61.
- STONE, A. R. (1972). *Heterodera pallida* n. sp. (Nematoda : Heteroderidae), a second species of potato cyst nematode. *Nematologica*, 18 : 591-605.
- THIÉRY, M. & MUGNIÉRY, D. (1996). Interspecific spacers rDNA restriction fragment length polymorphism in *Globodera* species, parasites of Solanaceous plants. *Fundam. appl. Nematol.*, 19 : 471-479.
- TRUDGILL, D. J. & PARROT, D. M. (1972). Disk electrophoresis and larval dimensions of British, Dutch and other populations of *Heterodera rostochiensis* as evidence of the existence of two species, each with pathotypes. *Nematologica*, 18 : 141-148.