

竹节花黄斑驳病毒启动子的缺失分析及功能^{*}

吴 标 潘瑞琴 芦 睿 田颖川

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

提 要 竹节花黄斑驳病毒(CoYMV)是侵染单子叶植物竹节花的一种双链环状 DNA 病毒,它的启动子可介导外源基因在烟草韧皮部特异表达。为了研究其组织特异性表达的最佳启动子区域,对 CoYMV 启动子进行了 5'端五种不同长度的缺失分析,用不同长度的启动子片段与 GUS 基因及 NOS3'端转录中止序列构建了全长启动子及 5 个缺失启动子序列的六个嵌合 GUS 基因植物表达载体。利用农杆菌将上述嵌合基因转化烟草外植体后,每种表达载体都获得了一批转基因烟草植株。转化再生烟草植株的 PCR 分析、GUS 酶活测定及 GUS 组织染色的结果表明六种类型的嵌合基因已整合到烟草染色体中,并有五种表达出 GUS 活性。缺失到-870bp 的启动子比全长启动子(1040bp)的活性约高 78%,870bp 比-585bp 启动子介导的 GUS 活性略高但差别不明显,缺失到-447 和-232 时 GUS 活性有明显下降,但仍具有韧皮部特异表达的特性。当缺失到 TATA box 附近的-44bp 时启动子丧失组织特异性,GUS 活性也降低到测不出来的水平。以上结果表明 CoYMV 启动子从转录起始位点上游-870bp~-230bp 及-232bp 下游区分别与启动子的活性和韧皮部组织特异性密切相关,870bp 上游可能存在一个负调控序列,所以该启动子的活性和组织特异性的最佳调控区应在-870bp 或-585bp 的下游区。CoYMV 启动子与 35S 启动子驱动 GUS 基因在烟草中表达的活性相比,前者为后者的 70%左右,考虑到前者仅在韧皮部细胞表达而后者为组成型表达,所以 CoYMV 启动子在韧皮部的活性可能与 35S 启动子相当或更高。CoYMV 启动子在其它转基因植物中驱动外源基因表达的特点正在研究中。

关键词 CoYMV 启动子,缺失分析,韧皮部特异表达,转基因烟草植株

分类号 S432.4 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)01-0015-22

竹节花黄斑驳病毒(CoYMV)是一种侵染单子叶植物竹节花(*Commelina diffusa*)的无包膜杆状病毒。类似于花椰菜花叶病毒(CaMV),其基因组为双链环状 DNA,每条链都在特定的位点中断。Medberry 等人^[1]对 CoYMV 研究结果表明其基因组大小为 7489bp,但转录物却比基因组长 120 个核苷酸。其 mRNA 包含 3 个开放阅读框(ORF),编码分子量为 15kD、23kD 和 216kD 的蛋白质。Medberry 等人^[2]后来对 CoYMV 启动子进行了分析,通过转基因烟草证明该启动子驱动 GUS 基因特异地在韧皮部,韧皮部相关细胞及根、茎、叶的轴向薄壁组织中,在整个花药中,尤其在绒毡层中有很高的表达。与带双增强子的 CaMV35S 启动子相比,CoYMV 启动子在烟草悬浮细胞中的活性仅为前者的 30%,而在玉米悬浮细胞中的活性为前者的 25%。他们^[3]对该启动子-230bp 下游的缺失分析结果表明-159~-84bp 之间的序列是维管组织特异表达所必需。CoYMV 的这些特性使之有可能成为介导外源基因在维管组织(韧皮部)中特异表达的有应用价值的启动

^{*} 本研究得到国家“863”计划的资助及国际科学与文化中心(ICSC)世界实验室的部分资助

收稿日期:1997-08-28,修回日期:1998-04-08

子。

为了探索 CoYMV 启动子在不同植物中驱动外源基因表达的特点并获得其韧皮部特异表达的最佳启动子序列,我们对启动子进行了缺失分析。通过 GUS 基因对每个缺失启动子在转基因烟草中的功能进行了分析,初步确定了 CoYMV 的最佳启动子区。本文报道这些实验的结果并对启动子的重要区域的功能进行了讨论。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 :大肠杆菌 DH5 α 及根癌农杆菌 LBA4404 由本实验室保存;pBI121 质粒购自 Clontech 公司;CoYMV 启动子克隆 pColBam-seq302 质粒由明尼苏达大学 Olaszewski 教授惠赠。

1.1.2 植物材料 :烟草 K326 种子由中国农业科学院山东烟草研究所韩晓东研究员提供。转化所用烟草为无菌培养的 K326 幼苗。

1.1.3 试剂及仪器 :限制性内切酶及修饰酶购自 Boehringer 公司、Promega 公司或 BRL 公司;同位素 α -³⁵S-dATP α -³²P-dCTP 购自 NEN 公司;T7 DNA 测序盒购自 Pharmacia 公司;PCR 引物由中国科学院微生物研究所技术室或上海生物技术公司合成;Taq DNA 聚合酶购自中国科学院遗传研究所或上海生物技术公司,其它试剂购自 Sigma 公司或国内有关厂家或公司。GUS 酶活测定使用 Hoffer Pharmacia 公司的 DyNA Quant200 型荧光测定仪;GUS 组织染色结果用解剖镜观察并照相。

1.2 方法

1.2.1 CoYMV 启动子的 5'端缺失 :利用 CoYMV 启动子序列内的内切酶位点 EcoRV、ClaI、XbaI 及 HindIII 等通过完全或部分酶解从启动子的 5'端进行不同长度的缺失,酶解条件及酶解后 DNA 的连接、大肠杆菌转化等方法均按文献 [4] 进行。

1.2.2 缺失启动子 5'端序列的测定 :用 pUC19 reverse 引物和 Pharmacia 公司 T7 测序盒测定 5'端缺失后的启动子末端序列。

1.2.3 中间载体的构建及根癌农杆菌的转化 :用 HindIII 部分酶解、BamHI 完全酶解含缺失后的 CoYMV 启动子质粒,通过电泳分离不同长度的启动子片段,并与用 HindIII 和 BamHI 完全酶解的 pBI121 质粒载体(除去 35S 启动子的大片段)以 1:10 摩尔比混合,用连接酶按文献 [4] 方法连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。通过酶切图谱分析即可筛选到不同长度 CoYMV 启动子-GUS 嵌合基因的中间载体。

将以上含不同长度 CoYMV 启动子-GUS 嵌合基因的中间载体转入根癌农杆菌 LBA4404,参照文献 [5] 的方法进行。

1.2.4 烟草的转化及转基因烟草的筛选 :除生根培养基中卡那霉素浓度为 150mg/L 外,转化和植株再生方法同前文报道^[6]。

1.2.5 转化再生植株的 PCR 检测 (1)烟草 DNA 的提取 :参照文献 [7] 介绍的方法进行。取 10~20mg 烟草叶片放入装有 100 μ L 提取缓冲液(0.1mol/L Tris-HCl pH9.0;10mmol/L EDTA 2% SDS)的 1.5mL Eppendorff 离心管中用一塑料研棒匀浆,然后加入 200 μ L 氯化苄,摇匀后于 50 $^{\circ}$ C 保温 15 min;加入 50 μ L 3 mol/L 乙酸钠 pH5.0 混匀后置 0 $^{\circ}$ C 放置

15 min ;以上混合液经 8 000r/min 离心后取上清溶液 ,加入等体积的异丙醇沉淀 DNA ,再经离心收集 ,真空抽干后将 DNA 溶于 20 μ L 重蒸馏水或 TE 缓冲液(10mmol/L tris-HCl , 1mmol/L EDTA ,pH8.0)备用。(2)烟草 DNA 的 PCR 分析 :取 1 μ L (~20ng)烟草 DNA ,用 GUS 基因引物和 CoYMV 启动子引物(Cop 引物)或 Nos 正链引物在 10 μ L PCR 反应体系(其中 Taq DNA 聚合酶及 PCR 反应缓冲液由厂家提供 ;dNTP 最终浓度为每种 0.2mmol/L ,引物浓度为 1 μ mol/L)中 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min ,然后以 94 $^{\circ}$ C ,1 min ;58 $^{\circ}$ C ,1 min ;72 $^{\circ}$ C ,1 min 反应 30 个循环。反应产物在 1% Agarose 凝胶上进行电泳分析。

引物的序列如下 :

GUS 引物 5'ATCGAAACGCAGCACGATAC3'

Cop 引物 5'TCATCAGTAGAGGACGCACT3'

Nos+ 引物 5'CGCGGTGTCATCTATGTTAC3'

35S 引物 5'CTGACGTAAGGGATGACGC3'

1.2.6 转基因烟草的 GUS 活性检测 (1)烟草总可溶性蛋白的提取参照 Jefferson 等[8 , 9]的方法。取 0.5g 烟草叶片或 0.5g 叶脉组织 ,经液氮冷冻研磨后 ,加入 2.5ml 蛋白提取液(50mmol/L 磷酸钠缓冲液 ,pH7.0 ,10mmol/L EDTA ,0.1% Triton X-100 ,0.1% Sarkosyl ,10mmol/L 巯基乙醇 ,25ng/mL PMSF)摇匀后于 33 000g ,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min ,取上清即为烟草蛋白提取液。蛋白浓度的测定用 Bio-Rad Protein II 测定液按厂家提供的方法进行。蛋白提取液保存于 -80C 备用。(2)GUS 活性的荧光检测参照文献[8]方法进行。以 365nm 激发光波长 ,455nm 发射波长在日立 850 型荧光测定仪上测定标准 MU 及样品荧光值。按 1000nmol/L MU 的相对荧光值为 1 000 ,将测定的蛋白荧光值换算成 MU 标准值然后计算 GUS 比活性 ,以 pmol MU/min \cdot mg 蛋白表示。(3)GUS 活性的组织化学检查 :取转基因或对照烟草的根和茎叶组织 ,其中茎和叶柄用解剖刀切出横截面或纵切面 ,在固定液(0.3% 甲醛 ,10 μ mol/L 吗啡琳乙磺酸 ,pH5.6 ,0.3mol/L 甘露醇)中经真空抽气 30~60s ,然后在室温固定 45 min。按 Jefferson^[9]的方法进行染色反应及乙醇脱色 ,用解剖镜观察 ,照相。

2 结果和讨论

2.1 CoYMV 启动子的缺失分析及中间载体的构建

2.1.1 CoYMV 启动子 5'端的缺失分析 :利用 CoYMV 启动子序列内不同的内切酶位点进行了五种不同长度的缺失 ,在 pColBam302 基础上构建缺失后的 CoYMV 启动子的亚克隆 pd1-302、pd2-302、pd3-302、pd4-302 及 pd5-302(图 1)。将 pColBam-seq 302 用 Sal I 酶切 ,经 Klenow 酶补平后再用 EcoRV 进行部分酶解 ,分离部分酶解产生的大片段连接后即得到缺失到 -870bp 的启动子质粒 pd1-302 ,利用 Cla I 对 pColBam-seq 302 完全酶解后分离产生的大片段 ,用 T4 DNA 连接酶连接后即得到 pd2-302 ;用 SalI 和 XbaI 酶解 pColBam 302 经 Klenow 大片断聚合酶补平后分离大片段 ,连接后得到缺失到 -447bp 的 pd3-302 ;用 SalI 酶解 ,Klenow 片段补平后再用 EcoRV 完全酶解分离大片断 DNA ,连接后即得到缺失到 -232bp 的启动子亚克隆 pd4-302 ;用 HindIII 完全酶解后分离大片段 ,连接后即得到 pd5-302 ,在 pd5-302 中 CoYMV 启动子被缺失到 -44bp。通过 PUC19 reverse 引物 ,利用

T7 DNA 测序盒对以上获得的缺失启动子亚克隆进行了序列分析 ,证实了如图 1 所标出的每种缺失的确切位置(序列资料略)。

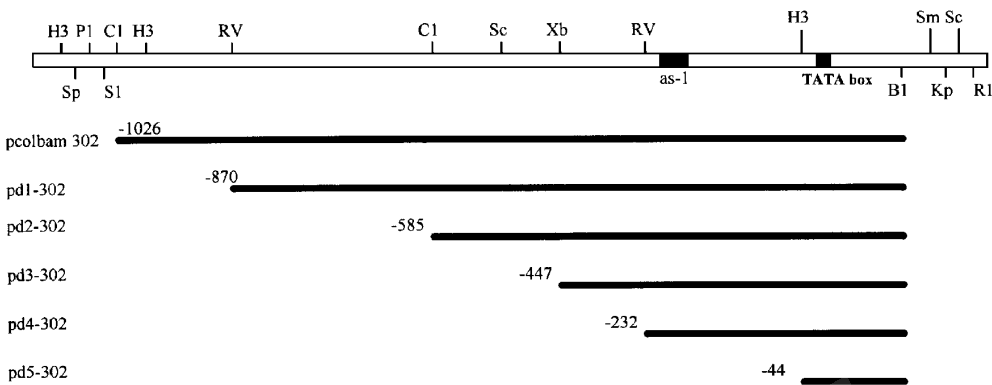


图 1 CoYMV 启动子的缺失分析

Fig. 1 Deletion analysis of CoYMV promoter

Abbr. B1 BamHI C1 Cla1 H3 HindIII Kp KpnI P1 PstI RV EcoR V ;
S1 SalI Sc SacI Sm SmaI Sp SphI Xb XbaI.

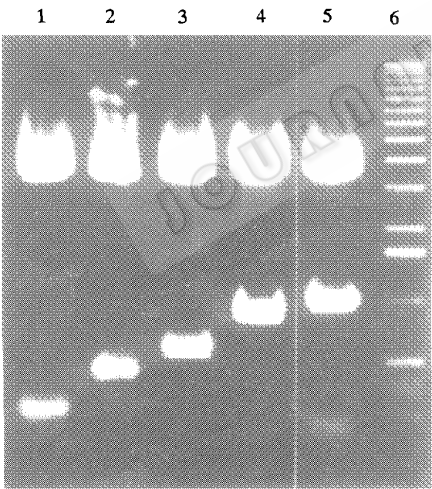


图 2 不同长度 CoYMV 启动子亚克隆质粒的 Hind III 酶解图谱

Fig. 2 Hind III digestion of vectors harboring different CoYMV promoter fragments
lane1 ~6 represent pd4-302 ,
pd3-302 ,pd2-302 ,pd1-302 ,
pColBam302 and 1kb
DNA ladder respectively.

2.1.2 CoYMV-GUS 嵌合基因表达载体的构建 利用 HindIII 酶解 pBI121 ,T4 DNA 聚合酶补齐后再用 BamHI 酶解 ,分离大片段并与 SalI 酶解 ,T4 DNA 聚合酶补齐 ,BamHI 酶解 pCol-Bam-302 后分离的全长 CoYMV 启动子片段连接后得到 pBcoGUS 质粒。在对缺失启动子进行功能分析中 ,该质粒将作为各个缺失启动子的对照。

在构建启动子亚克隆(图 1)中由于 5'端只用了 SalI 或 SalI 下游酶切位点 ,所以在 CoYMV 启动子 5'端上游质粒多克隆位点中 HindIII 仍保存下来 ,所以在每个亚克隆中都存在两个 HindIII 位点。HindIII 可将 TATA box 上游不同长度的启动子片段切出(图 2) ,证明了缺失的正确性。为了在 pBI121 基础上构建各缺失 CoYMV-GUS 基因表达载体 ,除最短的 CoYMV 启动子表达载体 pBcopd5-GUS 外都必须按本文 1.2.3 中所述方法通过 HindIII 部分酶解 ,BamHI 酶解来分离不同长度的启动子片段与 HindIII 和 BamHI 酶解的 pBI121 连接后构建成如图 3 所示的不同长度 CoYMV 启动子

-GUS 嵌合基因的表达载体。pBcopd5-GUS 是通过 HindIII 完全酶解 pBcopd1-GUS 然后将载体部分自连而形成的。通过 HindIII 酶解各表达载体 DNA 证明无误后再按 1.2.3 所述方法转化根癌农杆菌(资料略)。

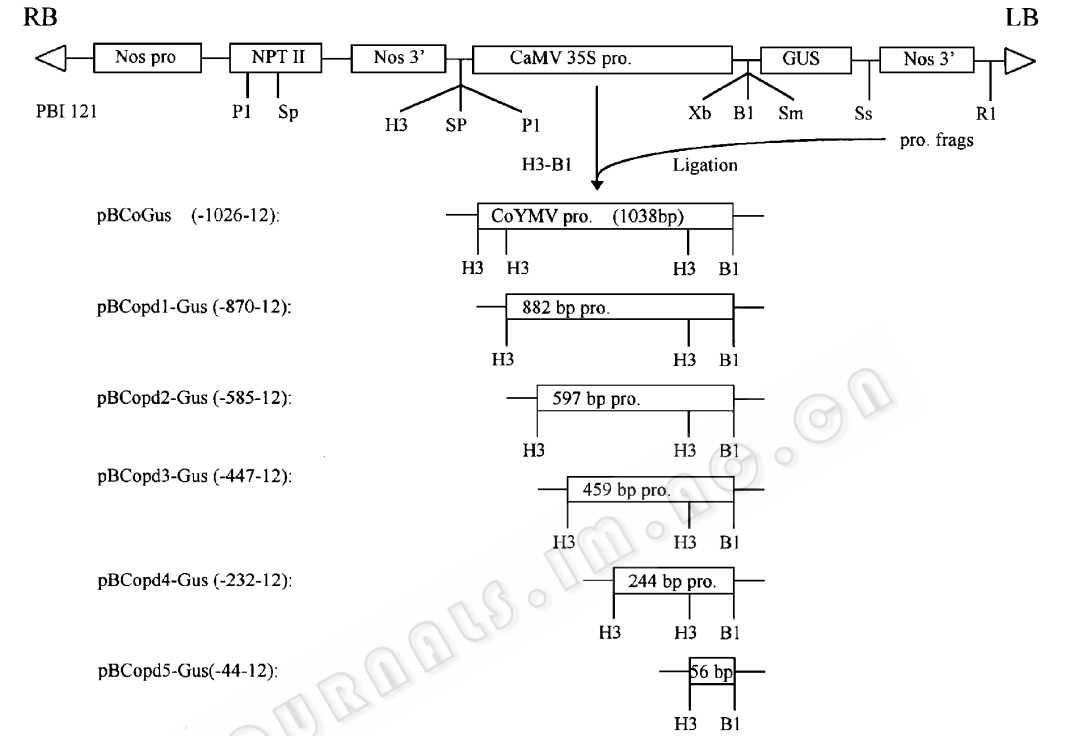


图 3 不同长度 CoYMV 启动子-GUS 嵌合基因中间表达载体的构建

Fig.3 Construction of intermediate vectors for CoYMV promoter-GUS chimeric gene

Abbr. B1 :BamHI H3 :HindIII P1 :Pst I R1 :EcoR I S1 :Sal I Sm :Sma I ;

Sp :Sph I Xb :Xba I frags , fragment pro. promoter.

2.1.3 转基因烟草的分析 (1)转基因烟草的 PCR 检测 :用含不同长度 CoYMV 启动子-GUS 嵌合基因的农杆菌转化烟草后每一种结构都获得了一批转化再生植株。为了有目的地进行 GUS 活性检测,首先用 PCR 方法选择转基因植株。由于 CoP 引物位于 CoYMV 启动子的 265~285,所以该引物与 GUS 引物一起只可用于 pBCoGUS pBCopd1-GUS pBCopd2-GUS 和 pBCopd3-GUS 转化再生植株的 PCR 分析,PCR 产物长度应在 580bp,而 pBCop-d4-GUS 和 pBCop-d5-GUS 转化再生植株的检测则需要用 Nos 正链引物和 GUS 引物(负链),预期产物分别为 540bp 和 350bp。对 pBI121 转化的植株,我们用 35S 正链引物和 GUS 引物进行 PCR 选择其转基因植株(PCR 产物应为 380bp),对六种不同嵌合基因结构的转化再生植株进行 PCR 分析后,每种结构最少选到 5 株转基因植株,最多选到 9 株(资料略)。(2)转基因烟草植株的 GUS 活性 组织化学检测 :按材料与方法所述对 PCR 反应阳性植株的根、茎、叶柄和叶片组织或组织切片进行了 GUS 活性的染色检测。图版 1-a、b、c、d、e、f 和 g、h、I 三组图片分别为 pBI121、pBCopd4-GUS 转基因烟草

及非转基因烟草的叶片、叶柄及茎的横切面的染色结果。比 244bp(pBCopd4-GUS)更长的 CoYMV 启动子结构的转基因烟草都显示了与 pBCopd4-GUS 一样的韧皮部特异染色结果,而 pBCopd5-GUS 的转基因烟草(资料略)及非转基因对照烟草未给出明显可见的 GUS 活性染色。pBI121 转基因烟草与 CoYMV 启动子-GUS 的转基因烟草明显不同的是 35S 启动子-GUS 基因的组成型表达特点,35S 启动子介导 GUS 基因在所有被测组织的不同细胞中都有明显的表达,而 CoYMV-GUS 仅限于在维管组织中表达。以上结果还表明 CoYMV 启动子 - 232bp 上游与转录活性有关,而 - 232bp 下游则与韧皮部特异表达有关。这一结果与 Medberry 和 Olszewski^[3]的结果相符,他们通过对 - 230bp 下游序列的缺失分析发现 - 230 ~ - 220bp 与 CaMV35S 启动子的 as-1 启动子元件有相似性,对启动子的活性有激活作用, - 159bp ~ - 84bp 之间的序列是维管组织表达所必需的。放大的茎横切片 GUS 染色结果表明在维管组织中 GUS 活性主要表现在内外韧皮部组织,在木质部和髓部无 GUS 活性表达。根部的 GUS 染色也得到了类似结果,即 GUS 基因特异地 在根的维管组织表达(资料略)。所以 CoYMV 启动子在烟草的主要组织中都表现了韧皮部特异表达的特点。(3)转基因烟草 GUS 活性的测定:虽然 - 232bp 上游序列与 CoYMV 启动子活性有关,但不同长度缺失后对启动子活性有多大影响则需要对每个 CoYMV 缺失启动子-GUS 基因的转基因烟草进行 GUS 活性的定量测定。我们用转基因烟草叶片总蛋白进行 GUS 活性测定的结果表明,CoYMV-GUS 与 pBI121 转基因烟草的 GUS 活性

相差近 10 倍,即前者仅为后者的 1/10 左右,而用 CoYMV-GUS 烟草叶总蛋白和叶脉总蛋白进行 GUS 活性测定结果表明,叶脉蛋白中 GUS 活性是叶总蛋白中 GUS 活性的 5 倍左右(资料略)这种差异主要是由于 CoYMV 启动子组织特异性表达造成的。为了更准确地反映并比较各种长度的 CoYMV 启动子的活性,我们从各个启动子-GUS 组合的转基因烟草中各取 5 株 PCR 阳性植株提取其叶脉(主脉和大的侧脉)总蛋白后进行 GUS 活性测定,结果如图 4 所示。图 4 结果表明与 35S 启动子相比,CoYMV 启动子 (- 870bp)仅为前者的 70% 左右(比较 121 与 P1),但考虑到韧皮部细胞占叶脉总细胞量的比例不超过 10%,所以在韧皮部 CoYMV 启动的 GUS 活性可能会与 35S-GUS 的活性相当或更高,CoYMV 启动子在韧皮部应是一个强启动子。缺失到 - 870bp 的启动子

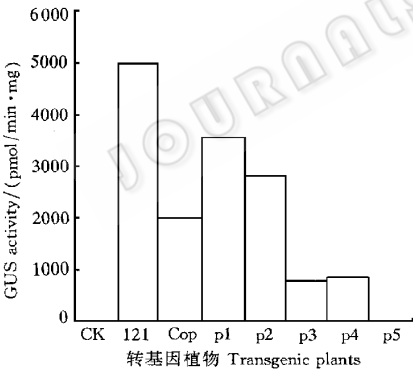


图 4 转基因烟草的 GUS 活性的比较

Fig. 4 Comparison of GUS activity of transgenic tobacco plants containing different CoYMV pomoter GUS constructs

CK, 121, Cop, p1, p2, p3, p4 and p5 present plants from non-transformed control, transformed with pBI121, pBCoGUS, pBCopd1-GUS, pBCopd2-GUS, pBCopd3-GUS, pBCopd4-GUS and pBCopd5-GUS respectively. The GUS activity for each group of plants is an average of 5 activities from transgenic plants.

比全长启动子转基因植株(比较图 5 中 CoP 与 P1)的 GUS 活性约高 78%, -870bp 比 -585bp 启动子介导的 GUS 活性略高(图 4, P2), 但差别不明显(不超过 13%)。缺失到 -447 或 -232bp 时 GUS 活性与 -870 或 -585bp 相比有明显下降(约降低 75%), 但仍保留了韧皮部特异表达的特性(图版 I)。-44bp 启动子-GUS 转基因植株(图 4, P5)与非转基因对照植株一样(图 4, CK)未能检测出 GUS 活性, 在组织化学染色中也未能表现出 GUS 染色活性。

以上结果表明 -232bp~-44bp 与 CoYMV 启动子的组织特异性表达有关, 而 -232bp 上游区与启动子活性有关。由于 -870bp 启动子比全长启动子活性高约 78%, 我们认为 -870bp 上游可能存在一个负调控序列, 所以 CoYMV 启动子驱动韧皮部特异表达的最佳启动子功能区应在 -870bp 下游。在本研究中 CoYMV 启动子 3' 末端都在转录起始位点下游 12bp 处, 下游其它有关序列对启动子活性及表达特性的影响有待进一步的研究。

致谢 衷心感谢中国科学院遗传研究所王兰岚、陈正华教授及中国科学院微生物研究所田雨清等在显微照相工作中的帮助和支持。

参 考 文 献

- [1] Medberg S, Lockhart B E L, Olszewski N E. *Nucleic Acid Research*, 1990, **18**: 5505~5513.
- [2] Medberg S L, Lockhart B E L, Olszewski N E. *The Plant Cell*, 1992, **4**: 185~192.
- [3] Medberg S L, Olszewski N E. *The Plant Journal*, 1993, **3**: 619~626.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] 贾盘兴, 蔡金科等. 微生物遗传学实验技术. 北京: 科学出版社, 1992. 108~109.
- [6] 田颖川, 秦晓峰, 王桂玲等. 中国科学, 1990, **20**(8): 822~831.
- [7] Zhu L. *Nucleic Acid Research*, 1993, **21**(22): 5279~5280.
- [8] Jefferson R A, Kavanagh T A, Beven M W. *EMBO Journal*, 1987, **6**: 3901~3907.
- [9] Jefferson R A. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, **5**: 387~405.

DELETION ANALYSIS AND FUNCTIONAL STUDIES OF THE PROMOTER FROM COMMELINA YELLOW MOTTLE VIRUS

Wu Biao Pan Ruiqin Lu Rui Tian Yingchuan

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract Commelina Yellow Mottle Virus (CoYMV) is a double-stranded, circular DNA virus and its promoter could direct GUS gene specifically expressing in phloem tissue of transgenic tobacco plants. To determine the optimal promoter sequence for phloem-specific gene expression, CoYMV promoter was deleted from its 5' end to form promoter fragments with 5 different lengths. Chimeric GUS genes were constructed using the promoter deletion based on the binary vector pBI121. Transgenic tobacco plants evidenced by PCR analysis were obtained with each kind of chimeric GUS gene structure by *Agrobacterium* mediated transformation. The results of GUS activity assay and histochemical staining showed that most of the chimeric GUS genes were expressed in transgenic plants.

The GUS activity with the promoter deleted to -870bp was about 78% higher than that of the full length promoter(1040bp) and was a little higher than that of the promoter deleted to -585bp , but the difference is not significant. The GUS activity reduced significantly when the promoter was deleted to -447bp or -232bp , whereas the property of phloem-specific expression pattern was still retained. When the promoter was deleted to -44bp , just upstream adjacent to the TATA box, its tissue-specificity was lost and the activity was reduced to undetectable level. These results suggest that the region between $-870\text{bp}\sim 232\text{bp}$ and downstream of -232bp of CoYMV promoter could be responsible for promoter activity and tissue specific expression, respectively. A negative regulation sequence might exist upstream of -870bp of the CoYMV promoter. Therefore, we recommend that the optional CoYMV promoter sequence for phloem specific expression could be downstream from -870bp or -585bp . In comparison with CaMV 35S promoter, the GUS activity when driven by -870bp CoYMV promoter was about 70% of that when driven by the 35S promoter. Considering the fact that 35S promoter-GUS gene is constitutively expressed, while the CoYMV promoter-GUS gene is expressed only in phloem tissues, the activity of the latter in phloem may be the same with or even higher than that of the 35S promoter.

Key words CoYMV promoter, Deletion analysis, Phloem-specific expression, Transgenic tobacco plant

图 版 说 明

Explanation of plate

转基因烟草的 GUS 组织化学检测

Histochemical assay of GUS activity of transgenic tobacco tissues a b c d e f and g h i show the GUS staining pattern of leaves cross-section of petioles and stems from transgenic plants derived from pBI 121, pBcpd4-GUS and control plants respectively. Magnificaitons a f fold d g, 7 flod others, 10 fold.