

## Genetische Untersuchungen zur Populationsstruktur von *Calathus erratus* (Carabidae) in gestörten Offenlandbereichen der Niederlausitz

Mareike Güth<sup>1</sup>, Walter Durka<sup>2</sup>, Jadranka Mrzljak

<sup>1</sup>Lehrstuhl Allgemeine Ökologie, Brandenburgische Technische Universität Cottbus,  
<sup>2</sup>Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

**Abstract:** The ground beetle species *Calathus erratus* (SAHLBERG, 1827) was selected to analyze the colonisation process of the post-mining landscape in Lower Lusatia. *Calathus erratus* is a pioneer species appearing in high abundance in open habitats during early stages of succession. Wing dimorphism was detected in this species. Genetic diversity of ground beetle populations of disturbed open landscapes was investigated using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Mining sites of different age (age since dumping) were sampled. Sites in former military training areas were chosen for comparison. It was shown that there is a low genetic differentiation among spatially distinct beetle populations. Consequently, genetic variability resided mostly within populations (97.7% of total genetic variation). Also the genetic distance between sampling sites was low ( $F_{st} = 0.02$ ). No correlation between geographic distance (up to 120 km) and genetic distance of populations was detected. Thus, the influence of genetic drift is negligible relative to gene flow between populations. There was no difference in genetic variability of beetle populations collected in post-mining landscape or in former military training areas. The results show that disturbed open landscapes are colonized from surrounding habitats without genetic bottlenecks. Because of the high numbers of macropterous individuals in young sampling sites, dispersal of beetles over longer distances seems possible. Geographic distance or age since dumping does not play an important role in colonisation of disturbed open landscapes.

**Key words:** colonisation, *Calathus erratus*, post-mining landscape, AFLP

M. Güth, Lehrstuhl Allgemeine Ökologie, Brandenburgische Technische Universität Cottbus, Siemens-Halske-Ring 8, 03046 Cottbus. E-mail: [gueth@tu-cottbus.de](mailto:gueth@tu-cottbus.de)

J. Mrzljak, Hauptstraße 147, 10827 Berlin

W. Durka, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Department Biozönoseforschung, Theodor-Lieser-Straße 4, 06120 Halle

Die Bergbaufolgelandschaft stellt in Mitteleuropa die einzigartige Möglichkeit dar, den Prozess der Primärsukzession großflächig zu beobachten. Hierbei können z.B. Veränderungen in der Artenanzahl, der Artenzusammensetzung oder in der Struktur der Lebensgemeinschaften untersucht werden. Die bergbauliche Inanspruchnahme der Flächen führt zu einer extremen Störung. Nach erfolgter Verkippung des Abraumes können ökologische Prozesse wie Bodenbildung und Sukzession auf den neu entstandenen Flächen jedoch häufig relativ ungestört ablaufen. Um den Prozess der Besiedlung dieser Flächen zu analysieren, wurde die Laufkäferart *Calathus erratus* (SAHLBERG, 1827) als Modellart ausgewählt. Mittels genetischer Methoden wurde die Besiedlung großflächiger gestörter Offenlandbereiche im Landschaftsmaßstab untersucht. Hierzu wurden Tagebaustandorte verschiedenen Alters und Entfernung zum unverritzten Land als Untersuchungsgebiete gewählt. Als Vergleichsstandorte dienten ehemalige Truppenübungsplätze. Die Käferpopulationen der verschiedenen Untersuchungsstandorte wurden hinsichtlich ihrer genetischen Variabilität mittels molekularer Marker untersucht. Von den genetischen Untersuchungen zur Populationsstruktur der Laufkäferart *Calathus erratus* werden Rückschlüsse auf die Entwicklung der genetischen Variabilität in gestörten und fragmentierten Landschaften erwartet.

### Material und Methoden

Die Laufkäferart *Calathus erratus* ist eine Pionierart, die in gestörten Offenlandgebieten auftritt (LINDROTH 1945, 1985, 1986, BARNDT et al. 1991). Nach SCHEFFLER et al. (1999) tritt *Calathus erratus* häufig in Sandtrockenrasen auf, wird aber auch in anderen Habitaten, wie Ruderalfluren, Ackerunkrautfluren und Sandmagerrasen nachgewiesen. Im Untersuchungsgebiet besiedelt *C. erratus* junge Bergbaufolgelandschaften, wenn die Vegetation noch schütter ist (BRUNK in prep.) und verbleibt dort während der Sukzession, bis der Boden dicht mit Vegetation bedeckt ist (z.B. NEUMANN 1971). Für diese Käferart wird eine Generationszeit von einem Jahr angenommen. Die Larven entwickeln sich im Winter und beginnenden Frühjahr, die jungen Käfer schlüpfen im Juli und starten schnell mit der Reproduktion (DEN BOER & DEN BOER-DAANJE 1990, THIELE 1977, BARNDT et al. 1990). Bei *C. erratus* wurde ein Flügeldimorphismus nachgewiesen (DEN BOER et al. 1980). Macroptere Individuen können potentiell fliegen (GEIPEL & KEGEL 1989). Geflügelte Käfer sind in Zentraleuropa selten, in Deutschland wurden bisher nur wenige geflügelte Individuen nachgewiesen (DEN BOER et al. 1980).

Tab. 1: Übersicht über die Untersuchungsstandorte, ihr Alter (Zeit seit Verkippung) und die Gen-Diversität der Käferpopulation des Untersuchungsstandortes

Untersuchungsgebiet	Standort	Zeit seit Verkippung [Jahre]	Entfernung von zP [km]	Gen-Diversität (He) nach NEI (1987)
<b>Bergbaufolgelandschaften</b>				
<b>Schlabendorf-Süd</b>	Zentraler Punkt (zP)	13	0	0,349
	NO	13	1	0,368
	SO	13	1	0,384
	NW	13	1	0,384
	SW	13	1	0,358
	Dorf	13	5	0,354
	See	13	5	0,337
<b>Schlabendorf Nord</b>	Weis	13	5	0,365
	Nord	26	10	0,335
<b>Plessa</b>	Ple	55	33	0,376
<b>Ehemalige Truppenübungsplätze</b>				
<b>Lieberose</b>	Lieb	unverkippt	50	0,340
	Holz	unverkippt	51	0,392
<b>Döberitz</b>	Wü	unverkippt	95	0,364

Das Gebiet der Niederlausitz ist im Südosten Brandenburgs im Norddeutschen Flachland gelegen und wurde durch die Saale- und Weichseleiszeit geformt. Die meisten glazialen Ablagerungen bestehen aus Sand. Großflächige Tagebaue werden seit den 1950er Jahren in der Niederlausitz betrieben. Viele Tagebaue wurden zu Beginn der 1990er Jahre geschlossen und verkippt. Die vorliegende Studie untersucht verkippte Standorte mit spontaner Vegetationsentwicklung (Bergbaufolgelandschaft, Primärsukzession) und stark gestörte unverkippte Standorte auf ehemaligen Truppenübungsplätzen (Sekundärsukzession). Zur Untersuchung der räumlichen Populationsstruktur wurden 13 Standorte im Sommer 2002 beprobt (Tab. 1). Die geographischen Entfernungen zwischen benachbarten Standorten betragen zwischen 1 und 125 km. Die Untersuchungsstandorte in der Bergbaufolgelandschaft unterschieden sich zusätzlich in ihrem Alter (Zeit nach Verkippung). Am jüngsten Untersuchungsstandort in der Bergbaufolgelandschaft Schlabendorf-Süd (13 Jahre nach Verkippung) wurden die Käfer in verschiedenen Entfernungen (1 km und 5 km) ausgehend von einem zentralen Punkt (zP) gesammelt. Weitere Untersuchungsstandorte befanden sich in der älteren Bergbaufolgelandschaft Schlabendorf-Nord (25 Jahre) und Koyne/Plessa (55 Jahre), ebenso wie auf den ehemaligen Truppenübungsplätzen Lieberose und Döberitz.

Die Käfer wurden lebendig mit in den Boden eingegrabenen Blumenkästen gefangen. Die Fallen wurden einmal pro Woche von Juni bis September geleert. Nach dem Fang wurden die Käfer in flüssigem Stickstoff

aufbewahrt. Nach der DNA-Extraktion wurde der Beflügelungsstatus der Käfertorsi dokumentiert. Untersuchungen zum Zustand der Flugmuskulatur wurden nicht durchgeführt.

Als molekulare Marker wurden AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, VOS et al. 1995) eingesetzt, ein dominantes Markersystem, das sich aufgrund seiner hohen Polymorphie gut für die Analyse der genetischen Diversität von Käfern und anderer Organismen eignet (z.B. TAKAMI et al. 2004 bei Schmetterlingen, TERO et al. 2003 und JACQUEMYN et al. 2004 bei Pflanzen). Um Kontaminationen des DNA-Materials der zoophagen Käfer zu vermeiden, wurden für die DNA-Extraktion nur Beine und Köpfe der Käfer verwendet. Das Gewebe wurde mit einem Mikropistill homogenisiert und die DNA mittels eines DNeasy Kits (Qiagen) unter Nutzung eines modifizierten Protokolls für Insekten extrahiert. Die Herstellung von Fragmenten zur Untersuchung der Fragmentlängenpolymorphismen gliedert sich in vier Schritte. Zuerst erfolgte ein Restriktionsverdau der genomischen DNA unter Nutzung der Restriktionsenzyme Eco RI und Mse I. Die darauf folgende Ligation wurde mit einer T4-Ligase und Eco RI-, bzw. Mse I-Adaptoren ausgeführt. Als dritter Schritt erfolgte die preselektive PCR-Reaktion mit Eco RI und Mse I preselektiven Primern und einer Taq-Polymerase. Zwei verschiedene Primerkombinationen (EcoRI-ACT-MseI CAC, EcoRI-ACG-MseI CAC) wurden für die abschließende selektive PCR-Reaktion ausgewählt. Für die Fragmentanalyse kam ein ABI Prism 310 (Applied Biosystems) mit Windows NT System zum Einsatz.

Mit den beiden eingesetzten Primerkombinationen wurden 82 polymorphe Banden bei insgesamt 90 *Calathus erratus*-Individuen von 13 Standorten ausgewertet. Als Maß für die genetische Variabilität der Käfer auf Populationsebene wurde die Gen-Diversität (äquivalent zur erwarteten Heterozygotie,  $H_e$ ) nach NEI (1987) angewandt. Zur Quantifizierung der genetischen Variabilität zwischen den Populationen wurde der Fixations-Index  $F_{st}$  genutzt. Die Analyse der räumlichen Struktur der Populationen erfolgte anhand einer hierarchischen Analyse der molekularen Varianz (AMOVA) (EXCOFFIER et al. 1992) mit dem Programm Arlequin ver. 2.0 (SCHNEIDER et al. 2000).

**Ergebnisse und Diskussion**

**Variabilität innerhalb der untersuchten Käferpopulationen:** Alle 90 untersuchten Individuen wiesen unterschiedliche Haplotypen auf. Die genetische Variabilität der Populationen erbrachte Werte zwischen  $H_e = 0,335$  und  $0,392$  (Standardabweichung =  $0,019$ , Tab. 1). Somit wurden nur geringe Unterschiede in der genetischen Variabilität der Käferpopulationen nachgewiesen. Auch die verkippten Standorte unterschieden sich auf der Ebene der genetischen Variabilität nicht von den unverkippten Standorten der ehemaligen Truppenübungsplätze ( $p = 0,735$ ). Ebenfalls wurden keine Unterschiede zwischen jungen Standorten in der Bergbaufolgelandschaft und älteren Bergbaufolgelandschaftsflächen ( $p = 0,557$ ) oder von unverkippten Standorten festgestellt ( $p = 0,705$ ).

**Genetische Populationsstruktur:** Die Analyse der molekularen Varianz zeigte eine geringe, auf die räumliche Struktur zurückzuführende Differenzierung zwischen den Populationen: 97,71% der genetischen Variabilität wurde innerhalb der Populationen gemessen. Der Fixierungs-Index  $F_{st}$ , ein Maß für die genetische Distanz zwischen Populationen, lag bei  $0,023$  ( $p = 0,004$ ). Dies lässt auf eine niedrige aber signifikante Differenzierung der Populationen schließen.

Tab. 2: Analyse der räumlichen Struktur der Käferpopulationen mit einer AMOVA  
90 Käfer aus 13 Populationen, 82 polymorphe AFLP Banden

Genetische Variation	Varianzbestandteile	Prozentuale Variation
Zwischen den Populationen	0,349	2,29
Innerhalb der Populationen	14,879	97,71
Insgesamt	15,228	
$F_{st}$ -Wert	$F_{st}: 0,023$ ( $p=0,004$ )	

Ein Test auf räumliche Autokorrelation der Untersuchungsstandorte mit geographischen Entfernungen bis 125 km erbrachte keine Abhängigkeit. Auch ein Mantel-Test zeigte keine Korrelation zwischen genetischer Distanz und geographischer Distanz (Manteltest:  $p = 0,79$ ). Unterschiede zwischen unverkippten Unter-

suchungsflächen und Bergbaufolgelandschafts-Flächen wurden anhand einer Analyse der molekularen Varianz verglichen, um mögliche Einflüsse auf die genetische Diversität der Käferpopulationen festzustellen. Hierbei wurde nur 0,20% der Varianz zwischen den Gruppen (Bergbaufolgelandschaft, Truppenübungsplätze) erklärt, 97,6% Variabilität trat wieder innerhalb der Populationen auf.

Weiterhin wurden auf den jungen Untersuchungsstandorten der Bergbaufolgelandschaft Schlabendorf-Süd bis zu 30% macroptere (geflügelte) Individuen von *Calathus erratus* nachgewiesen. Von insgesamt 318 gefangenen Käfern (alle Standorte) waren 29 macropter. An allen anderen Untersuchungsstandorten wurden keine geflügelten Käfer gefunden.

### Diskussion

Im Ergebnis zeigt sich, dass zwischen den Käferpopulationen nur eine sehr geringe, auf die räumliche Struktur zurückführbare genetische Differenzierung nachgewiesen werden konnte. Anhand eines Mantel-Testes konnte keine Korrelation zwischen Entfernung (max. 120 km) und genetischer Distanz festgestellt werden. Der Genfluss zwischen den Populationen scheint höher zu sein als die genetische Drift (HUTCHINSON & TEMPLETON 1999). Der Genaustausch mit in der Umgebung der Bergbaufolgelandschaften lebenden Individuen ist möglich. *Calathus erratus* ist eine hochmobile Käferart. Die Besiedlung von gestörten Gebieten scheint relativ schnell aus den umgebenden Biotopen zu erfolgen, aber auch größerer Entfernungen können überbrückt werden. Dies kann durch Laufen, Fliegen oder Windverdriftung geschehen. *Calathus erratus* kommt in geringeren Abundanz in der Umgebung der gestörten Offenlandbereiche z.B. in Habitaten wie Ruderalfluren oder Ackerunkrautfluren (SCHEFFLER et al. 1999) vor.

Ähnliche Resultate bei genetischen Untersuchungen wurden an anderen Käferarten erzielt. So stellte ROSLIN (2001) an dem Dungkäfer *Aphodius fossor* einen hohen "population-turnover" fest. Seine Ergebnisse belegen, dass die gesamte Festlandspopulation von *Aphodius fossor* besser als eine große „patchy population“ mit hohen Austauschraten zwischen den lokalen Populationen zu beschreiben ist. KELLER & LARGIADER (2002) wiesen an *Carabus violaceus* mit Mikrosatelliten keine signifikante Korrelation zwischen genetischer und geographischer Distanz der Populationen nach. Die höchsten Variationen wurden auch hier innerhalb der Populationen erzielt. BROUAT et al. (2003) konnten signifikante genotypische Differenzierungen zwischen Populationen bei den beiden *Carabus*-Arten *C. nemoralis* und *C. punctatoauratus* mit Mikrosatelliten nachweisen. SANDER (2004) stellt bei ihren Untersuchungen an *Carabus auronitens* mit AFLP-Markern fest, dass die genetische Distanz zwischen Populationen nicht zwangsläufig mit der geographischen Entfernung ansteigt. Dafür, dass *Calathus erratus* auch größere Entfernungen überwinden kann, spricht der hohe Anteil macropterer Individuen, der ausschließlich in den jungen Untersuchungsstandorten in Schlabendorf-Süd nachgewiesen wurde. LINDROTH (1949), DEN BOER et al. (1980) und BRANDMAYR (1983) postulieren hierzu, dass je stabiler die besiedelten Habitate sind, desto mehr wird die relative Flügelgröße reduziert, genauso wie die Fähigkeit Flugmuskeln zu entwickeln. Dies könnte zu einem Rückgang der geflügelten Individuen auf älteren Untersuchungsflächen führen. Der Fund macropterer Individuen auf den jungen Untersuchungsflächen in Schlabendorf-Süd könnte so als Immigrationeffekt in ein „instabiles“ Habitat gewertet werden. Andererseits könnten die vorherrschenden suboptimalen Umweltbedingungen am jungen Untersuchungsstandort Schlabendorf-Süd die Käfer zur Ausbildung der Flugmuskulatur stimulieren, was auf Emigrationseffekte aus der Fläche schließen lassen würde. Nach AUKEMA (1990) findet die Ausbildung der Flugmuskulatur erst spät in einer der letzten Larvalphasen oder bei der frischen Imago statt. AUKEMA (1990) zeigt an den beiden *Calathus*-Arten *C. cinctus* und *C. melanocephalus* auf, dass der Flügelmorphismus genetisch determiniert ist und die Expression von langflügeligen Genotypen durch Umweltfaktoren, wie Temperatur und Nahrungsangebot beeinflusst wird.

Ob es sich bei den Habitaten, in denen die Käfer leben, um Bergbaufolgelandschaften oder um gestörte Offenlandbereiche auf gewachsenem Land handelt, ist nach den vorliegenden Untersuchungen für die genetische Variabilität der Käferpopulationen von eher untergeordneter Bedeutung. Die hohe Mobilität der Tiere ermöglicht es ihnen offensichtlich, in neu entstehenden Habitaten individuenreiche und genetische variable Populationen aufzubauen, ohne dass demographische oder genetische Falschenhalseffekte auftreten.

### Literatur:

AUKEMA, B. (1990): Wing-length determination in two wing-dimorphic *Calathus* species (Coleoptera: Carabidae). – Hereditas 113: 189-202.

- BARNDT, D., S. BRASE, M. GLAUCHE, H. GRUTTKE, B. KEGEL, R. PLATEN & H. WINKELMANN (1991): Die Laufkäferfauna von Berlin (West) mit Kennzeichnung und Auswertung der verschollenen und gefährdeten Arten (Rote Liste, 3. Fassung). – In: Auhagen, A., R. Platen & H. Sukopp (Hrsg.): Rote Listen der gefährdeten Pflanzen und Tiere in Berlin. Landschaftsentwicklung und Umweltforschung, Sonderheft S 6, Berlin: 243-275.
- BRANDMEYER, P. (1983): The main axes of the coenoclineal continuum from macroptery to brachyptery in Carabid communities of the temperate zone. – Report 4th Symp. Carab, Trieste: 147-169.
- BRUNK, I. (in prep.): Diversität und Sukzession von Laufkäferzönosen in gestörten Landschaften der Niederlausitz. – BTU Cottbus, Lehrstuhl Allgemeine Ökologie, Dissertationsvorhaben.
- BROUAT, C., SENNEDOT, F., AUDIOT, P., LEBLOIS, R. & RASPLUS, J.-Y. (2003): Fine-scale genetic structure of two carabid species with contrasted levels of habitat specialization. – *Molecular Ecology* 12: 1731-1745.
- DEN BOER, P.J., VAN HUIZEN, T.H.P., DEN BOER-DAANJE, W., AUKEMA, B. & DEN BIEMAN, C.F.M. (1980): Wing polymorphism and dimorphism in ground beetles as stages in an evolutionary process (Coleoptera: Carabidae). – *Entomologica Generalis* 6(2/4): 107-134.
- DEN BOER, P.J. & W. S. DEN BOER-DAANJE (1990): On life history tactics in carabid beetles: are there only spring and autumn breeders? – In: N. G. Stork (ed.): The role of ground beetles in ecological and environmental studies. Intercept, Andover, Hampshire, United Kingdom: 247-258.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E. & QUATTRO, J.M. (1992) Analysis of molecular variances inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. – *Genetics* 131: 479-491.
- GEIPEL, K.-H. & B. KEGEL (1989): Die Ausbildung der metathoracalen Flugmuskulatur von Laufkäferpopulationen ausgewählter Straßenrandbiotope in Berlin (West). – *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie* 17: 727-732.
- HUTCHINSON, D.W. & A.R. TEMPLETON (1999): Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: Inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. – *Evolution* 53(6): 1898-1914.
- JACQUEMYN, H., HONNAY, O., GALBUSERA, P. & ROLDAN-RUIZ, I. (2004): Genetic structure of the forest herb *Primula elatior* in a changing landscape. – *Molecular Ecology* 13(1): 211-219.
- KELLER, I. & LARGAIADER, C.R. (2002): Recent habitat fragmentation caused by major roads leads to reduction of gene flow and loss of genetic variability in ground beetles. – *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 417-423.
- LINDROTH, C.H. (1945): Die fennoskandischen Carabidae, eine tiergeographische Studie. I. Spezieller Teil. – *Elanders Göteborgs Vetensk. Samh. Handl.* 4 (1): 709 pp.
- LINDROTH, C.H. (1949): Die fennoskandischen Carabidae, eine tiergeographische Studie. III. Allgemeiner Teil. – *Elanders Göteborgs Vetensk. Samh. Handl.* 4 (3): 911 pp.
- LINDROTH, C.H. (1985): The Carabidae (Coleoptera) of Fennoskandia and Denmark. – *Fauna Entomologica Scandinavia*, 15 (1), Brill/Scandinavian Science Press Ltd., Leiden/Copenhagen: 1-232.
- LINDROTH, C.H. (1986): The Carabidae (Coleoptera) of Fennoskandia and Denmark. – *Fauna Entomologica Scandinavia*, 15 (2), Brill/Scandinavian Science Press Ltd., Leiden/Copenhagen: 233-497.
- NEI, M. (1987): *Molecular evolutionary genetics*. – Columbia University Press, New York: 512 pp.
- NEUMANN, U. (1971): Die Sukzession der Bodenfauna (Carabidae, Diplopoda und Isopoda) in den forstlich rekultivierten Gebieten des Rheinischen Braunkohlreviers. – *Pedobiologia* 11: 193-226.
- ROSLIN, T. (2001): Spatial population structure in a patchily distributed beetle. – *Molecular Ecology* 10: 823-837.
- SANDER, A.-C. & WOLTERS, V. (2004): Genetic structure of *Carabus auratus* in a fragmented landscape. – *Verh. Ges. Ökol.* 34: 190.
- SCHEFFLER, I., KIELHORN, K.-H., WRASE, D.W., KORGE, H. & BRAASCH, D. (1999): Rote Liste der Laufkäfer des Landes Brandenburg (Coleoptera: Carabidae). – *Naturschutz und Landschaftspflege in Brandenburg* 8(4): Beilage.
- SCHNEIDER, S., ROESSLI, D. & EXCOFFIER, L. (2000): Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. – Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.

- TAKAMI, Y., KOSHIO, C., ISHII, M., FUJII, H., HIDAHA, T. & SHIMIZU, I. (2004): Genetic diversity and structure of urban populations of *Pieris* butterflies assessed using amplified fragment length polymorphism. – *Molecular Ecology* 12 (2): 245-258.
- TERO, N., ASPI, J., SIIKAMÄKI, P., JÄKÄLÄNIEMI, A. & TUOMI, J. (2003): Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species, *Silene tatarica*. – *Molecular Ecology* 12 (8): 2073-2085 .
- THIELE, H.U. (1977): Carabid beetles in their environments. – Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 369 pp.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. & ZABEAU, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. – *Nucleic Acid Research* 23: 4407-4414.