

ANÁLISE GENÉTICA DE PROTEÍNAS EM COELHO-BRAVO (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS* L.) DA ILHA TERCEIRA

A. FONSECA¹, G. F. CARVALHO¹, A. CRUZ², M. CARDOSO¹ & P. MANTUA¹

¹Universidade dos Açores, Dept. de Biologia, PT-9500 Ponta Delgada (Açores), Portugal.

²Escola Superior de Tecnologia da Saúde, PT-4000 Porto, Portugal.

RESUMO

A introdução do coelho-bravo *Oryctolagus cuniculus* L., 1758, na ilha Terceira data do Século XV.

Este trabalho pretendeu caracterizar geneticamente a população de coelho-bravo existente na ilha Terceira.

Foram analisados 14 *loci* (ADA, AK, AMY2, CAI, CAII, DIA, GUK, HBA, HBB, NP, PGD, PGP, PSP e TF), tendo-se encontrado polimorfismo em 7 deles (ADA, AK, AMY2, HBA, NP, PGD e TF). As restantes proteínas (CAI, CAII, DIA, GUK, HBB, PGP e PSP) não apresentaram qualquer variação na população terceirense.

Determinaram-se as frequências alélicas dos *loci* polimórficos e compararam-se com outras populações açorianas já estudadas e com populações continentais portuguesas. As evidências apontam para uma origem das populações de coelho-bravo dos Açores a partir de populações selvagens continentais e, neste caso, as populações açorianas, tal como as populações continentais portuguesas, derivaram da subespécie *O. cuniculus algirus*.

ABSTRACT

The wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* L., 1758, was introduced in Terceira island on 15th century.

This work intends to characterise genetically the wild rabbit population from Terceira island.

Fourteen *loci* were analysed (ADA, AK, AMY2, CAI, CAII, DIA, GUK, HBA, HBB, NP, PGD, PGP, PSP and TF), and polymorphism was found in 7 *loci* (ADA, AK, AMY2, HBA, NP, PGD and TF). The other proteins (CAI, CAII, DIA, GUK, HBB, PGP and PSP) didn't present any variation in the Terceira wild rabbit population.

The allele frequencies from polymorphic *loci* were determined and compared with other studied populations from Açores isles and with populations from Mainland Portugal. The evidence shows that the origin of the wild rabbit populations in the Açores comes from the populations of portuguese mainland; therefore, the azorean populations as well as the populations from Mainland Portugal belong to the subspecies *O. cuniculus algirus*.

INTRODUÇÃO

Até há 3000 anos o coelho europeu (*Oryctolagus cuniculus* L., 1758) estava confinado à Península Ibérica. Desde então distribuiu-se por toda a Europa, Norte de África, América do Sul, Austrália, Nova Zelândia e ainda por mais de 800 ilhas em todo o mundo (Flux, 1994), incluindo o arquipélago dos Açores. Os registos fósseis apontam precisamente para uma origem ibérica do coelho-bravo, estando datado de 0,9 milhões de anos o mais antigo fóssil achado no sul da Península.

O coelho é um dos mamíferos mais característico de todo Arquipélago. A sua introdução nos Açores ocorreu muito provavelmente durante a época dos descobrimentos pelos navegadores portugueses e, por não ter encontrado grandes obstáculos à sua dispersão, facilmente colonizou, e com grande sucesso, quase todas as ilhas dos Açores.

A primeira referência há existência do coelho nas ilhas dos Açores é de Gaspar Frutuoso, historiador

do século XVI. Este autor ao descrever a fauna da ilha Terceira refere-se à abundância de coelhos existente nessa ilha na época do povoamento (Frutuoso, 1978).

Posteriormente, outros autores descreveram o coelho-bravo dos Açores, e todos eles referem-no como sendo um dos mamíferos mais antigo presente nos Açores (Morelet, 1860; Drouet, 1861; Godman, 1870; Chaves, 1911; Ulfstrand, 1961).

Atendendo à origem do coelho-bravo e à sua introdução nos Açores, foi objectivo principal do presente trabalho a caracterização genética da população selvagem de coelho da ilha Terceira.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material Biológico

Locais de amostragem

Nas colheitas de coelho-bravo procurou-se amostrar aleatoriamente toda a ilha, tendo sido

efectuadas as colheitas nos períodos crepusculares e nocturnos.

Obtenção e conservação das amostras

O método utilizado nas colheitas foi o tiro. Os materiais biológicos recolhidos foram sangue, fígado e rim, sendo as amostras de sangue obtidas por punção cardíaca.

O sangue colhido foi transferido para tubos contendo anticoagulante (EDTA a 10%). Efectuou-se depois a separação do plasma e eritrócitos por centrifugação a 5000 r.p.m. durante 10 minutos.

Aos eritrócitos foi adicionado 1 ml de meio de glicerol (Fonseca, 1996) antes de serem conservados à temperatura de -25°C até à sua utilização. As amostras de plasma, de fígado e de rim foram igualmente conservadas a -25°C sem qualquer tratamento.

Preparação das amostras

Para aplicação das amostras em sistemas electroforéticos foram preparados:

- hemolisados a partir dos eritrócitos em meio de glicerol, segundo um processo que implicou centrifugação, sonicação e tratamento com tolueno.
- homogenatos de fígado e de rim, que consistiu na trituração de uma fracção de

tecido em água destilada e centrifugação a 13000 r.p.m. durante 10 minutos.

Na Tabela 1 encontram-se descritos os marcadores genéticos que foram analisados, bem como o material biológico onde estes foram estudados.

As amostras, utilizadas na análise de ADA, AK, DIA, GUK, NP, PGD, PGP e PSP, foram previamente tratadas com uma solução de ditiotreitól 120mM, na proporção de 1:5, e incubadas durante 1 hora a 37°C. A aplicação das amostras no gel foi feita em meio de Sephadex na proporção de 1:1 (Fonseca, 1996).

No estudo das anidrases carbónicas (CAI e CAII) utilizaram-se unicamente hemolisados também tratados com uma solução de ditiotreitól 120mM, na proporção de 1:1, e incubadas durante 1 hora a 37°C. Para o estudo das hemoglobinas (HBA e HBB) as amostras sofreram um tratamento conforme o descrito por Ferrand (1995).

Para o estudo de AMY2 foram utilizadas exclusivamente amostras de plasma sem qualquer tratamento prévio.

No estudo da TF utilizaram-se exclusivamente amostras de plasma tratadas, segundo Ferrand (1990).

Tabela 1. Marcadores genéticos analisados nas amostras de coelho-bravo da Terceira. E.C.- Código enzimático internacional; M.B.- Material biológico: E- Eritrócitos; F - Fígado; R - Rim; P - Plasma.

Marcador genético	Abreviatura	E.C.	M.B.
Desaminase da adenosina	ADA	3.5.4.4	E
Cinase do adenilato	AK	2.7.4.3	E
α-Amilase	AMY2	3.2.1.1	P
Anidrase carbónica I	CAI	4.2.1.1	E
Anidrase carbónica II	CAII	4.2.1.1	E
NADH-Diaforase	DIA	-	E
Cinase do guanilato	GUK	2.7.4.8	E
α-Hemoglobina	HBA	-	E
β-Hemoglobina	HBB	-	E
Fosforilase nucleosídica	NP	2.4.2.1	E/F/R
Desidrogenase do fosfogluconato	PGD	1.1.1.44	E/F/R
Fosfatase do fos foglicolato	PGP	3.1.3.18	E
Fosfatase da fosfoserina	PSP	3.1.3.3	E
Transferrina	TF	-	P

2. Técnicas electroforéticas

Nas determinações fenotípicas dos marcadores genéticos (ADA, AK, AMY2, CAI, CAII, DIA, GUK, NP, PGD, PGP e PSP) foram utilizados sistemas electroforéticos horizontais em gel de amido ou de agarose, conforme descrito por Fonseca (1996).

Na separação electroforética de HBA, HBB e TF foram utilizados sistemas descritos de acordo com Ferrand (1995).

Na Tabela 2 está indicado os tipos de sistemas electroforéticos utilizados na análise dos vários marcadores genéticos.

3. Métodos de revelação.

Após a electroforese todos os marcadores genéticos foram detectados por métodos de revelação específica, à excepção da CAI, HBA, HBB e TF que

foram detectadas por coloração geral de proteínas (Fonseca, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 14 proteínas estudadas nas amostras de coelho-bravo da Terceira 7 são polimórficas (ADA, AK, AMY2, HBA, NP, PGD e TF) e nas restantes (CAI, CAII, DIA, GUK, HBB, PGP e PSP) não se verificou variação genética.

Na Tabela 3 estão registadas as frequências alélicas dos *loci* polimórficos analisados na população de coelho-bravo da Terceira.

Desaminase da adenosina

O alelo mais comum encontrado na população da Terceira é o alelo ADA*2, o mesmo verificado

Tabela 2. Técnica electroforética utilizada na análise efectuada. AGE - Electroforese horizontal em gel de agarose; SGE - Electroforese horizontal em gel de amido.

Marcador	Técnica	Marcador	Técnica
ADA	SGE	HBA	SGE
AK	SGE	HBB	SGE
AMY2	AGE	NP	SGE
CAI	AGE	PGD	SGE
CAII	AGE	PGP	SGE
DIA	SGE	PSP	SGE
GUK	SGE	TF	AGE

Tabela 3. Frequências alélicas dos *loci* analisados. N = Número de indivíduos analisados.

<i>Locus</i>	N	Frequências alélicas
ADA	75	ADA*1=0,23 ADA*2=0,7
AK	62	AK*1=0,94 AK*2=0,02
AMY2	89	AMY2*1=0,93 AMY2*2=0,07
HBA	29	HBA*2=0,59 HBA*3=0,41
NP	75	NP*1=0,62 NP*2=0,38
PGD	61	PGD*A=0,47 PGD*C=0,53
TF	31	TF*A=0,77 TF*B=0,18 TF*C=0,05

noutras populações açorianas já estudadas (Carvalho *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 1994; Fonseca, 1996). Este alelo é também encontrado com grande frequência em populações portuguesas continentais (Ferrand, 1995), com excepção da população de Bragança em que o alelo ADA*1 é o mais comum (Vieira, 1993).

Contudo, na população do Faial a frequência de ADA*2 é muito mais elevada do que nas restantes populações açorianas, e na população de S. Jorge este alelo encontra-se fixado (Tabela 4).

Cinase do adenilato

O estudo de AK na população da Terceira revelou a existência de variação genética, o que já acontecia em outras populações açorianas (Faial, S. Jorge e Pico), com excepção das populações de S. Miguel e Flores (Fonseca, 1996).

A AK nunca foi estudada em populações continentais portuguesas, tendo sido descrita em outros trabalhos como monomórfica (Vergnes *et al.*, 1974; Richardson *et al.*, 1980; Zaragoza *et al.*, 1985; Hartl & Hoger, 1986; Hartl, 1987; Zaragoza *et al.*, 1987; Arana *et al.*, 1989; Peterka & Hartl, 1992). Na Tabela 5 estão representadas as frequências génicas de AK.

α - Amilase

A AMY2 estudada pela primeira vez no coelho, revelou-se polimórfica nas populações açorianas, com a excepção das Flores.

O alelo mais comum na população da Terceira é o alelo AMY2*1, que se encontra fixado na população das Flores.

Na Tabela 6 estão indicadas as frequências alélicas estimadas nas populações açorianas.

Tabela 4. Frequências alélicas de ADA em diferentes populações. N - Número de indivíduos analisados.

POPULAÇÃO	N	ADA*	ADA*	ADA*	ADA*	REFERÊNCIA
		1	2	5	6	
São Miguel	33	0,32	0,68	-	-	Fonseca, 1996
Flores	41	0,26	0,74	-	-	"
Faial	38	0,03	0,97	-	-	Carvalho <i>et al.</i> , 1994
São Jorge	50	-	1,00	-	-	Carvalho <i>et al.</i> , 1993
Pico	70	0,24	0,75	0,01	-	Fonseca, 1996
Terceira	75	0,23	0,77	-	-	Este trabalho
Santarém	89	0,26	0,74	-	-	Ferrand, 1995
Proença-a-Velha	22	0,31	0,69	-	-	"
Vila Viçosa	36	0,20	0,76	-	0,04	"
Bragança	19	0,66	0,34	-	-	Vieira, 1993

Tabela 5 - Frequências alélicas de AK. N - Número de indivíduos analisados.

POPULAÇÃO	N	AK*1	AK*2	REFERÊNCIA
São Miguel	29	1,00	-	Fonseca, 1996
Flores	40	1,00	-	"
Faial	54	0,97	0,03	"
São Jorge	57	0,94	0,06	"
Pico	63	0,98	0,02	"
Terceira	62	0,94	0,06	Este trabalho

Tabela 6. Frequências alélicas de AMY2 estimadas em populações açorianas. N - Número de indivíduos analisados

POPULAÇÃO	N	AMY2*	AMY2*	REFERÊNCIA
		1	2	
São Miguel	38	0,79	0,21	Fonseca, 1996
Flores	41	1,00	-	“
Faial	61	0,97	0,03	“
São Jorge	58	0,96	0,04	“
Pico	74	0,99	0,01	“
Terceira	89	0,93	0,07	Este trabalho

α-Hemoglobina

A HBA revelou-se polimórfica na população da Terceira. O polimorfismo deste *locus* já tinha sido verificado em outras populações açorianas (S. Jorge e Flores) por Ferrand (1995).

O alelo encontrado com maior frequência nas populações açorianas é o alelo HBA*2, sendo este também o alelo mais vulgar nas populações portuguesas continentais (Ferrand, 1995).

Na Tabela 7 encontram-se indicados as frequências alélicas de HBA, determinadas em diferentes populações estudadas.

Fosforilase nucleosídica

Na Tabela 8 estão indicadas as frequências alélicas de NP estimadas em várias populações.

Na população da Terceira, assim como em outras populações açorianas, o alelo mais frequente é o alelo NP*1. No entanto, na população das Flores

verifica-se exactamente o inverso, o alelo mais frequente é o NP*2.

Comparando estes resultados com os obtidos em populações continentais, verifica-se que o alelo NP*1 apresenta nestas populações uma frequência elevada (Vieira, 1993; Ferrand, 1995).

Desidrogenase do fosfogluconato

O estudo deste *locus* na população da Terceira revelou a existência de 2 alelos (PGD*A e PGD*C), ambos com uma frequência relativa muito próxima. Estes mesmos alelos são detectados em outras populações açorianas e continentais.

No entanto, verifica-se que, ao contrário da maioria das outras populações estudadas, na população da Terceira o alelo PGD*C apresenta uma frequência mais elevada do que o alelo PGD*A.

Na Tabela 9 são apresentadas as frequências alélicas estimadas na população da Terceira bem como, em outras populações.

Tabela 7. Frequências alélicas de HBA estimadas para populações selvagens de coelho. N- Número de indivíduos analisados.

POPULAÇÃO	N	HBA*2	HBA*3	HBA*4	REFERÊNCIA
São Miguel	28	0,54	0,46	-	Cardoso, não publicados
Flores	46	0,89	0,11	-	Ferrand, 1995
São Jorge	55	0,55	0,45	-	“
Terceira	29	0,59	0,41	-	Este trabalho
Santarém	62	0,68	0,26	0,06	Ferrand, 1995
Proença-a-Velha	21	0,33	0,67	-	“
Vila Viçosa	36	0,79	0,21	-	“

Tabela 8. Frequências alélicas de NP em diferentes populações. N - Número de indivíduos analisados.

POPULAÇÃO	N	NP*1	NP*2	NP*3	REFERÊNCIA
São Miguel	37	0,74	0,26	-	Fonseca, 1996
Flores	41	0,32,	0,68	-	"
Faial	58	0,79	0,21	-	Carvalho <i>et al.</i> , 1994
São Jorge	47	0,77	0,23	-	Carvalho <i>et al.</i> , 1993
Pico	72	0,76	0,24	-	Fonseca, 1996
Terceira	75	0,62	0,38	-	Este trabalho
Santarém	257	0,84	0,13	0,03	Ferrand, 1995
Proença-a-Velha	23	0,98	0,02	-	"
Vila Viçosa	36	0,76	0,24	-	"
Bragança	19	0,95	-	0,05	Vieira, 1993

Tabela 9. Frequências alélicas de PGD estimadas em diferentes populações. N - Número de indivíduos analisados.

POPULAÇÃO	N	PGD* A	PGD* C	PGD* D	REFERÊNCIA
São Miguel	37	0,66	0,34	-	Fonseca, 1996
Flores	36	0,57	0,43	-	"
Faial	55	0,55	0,45	-	Carvalho <i>et al.</i> , 1994
São Jorge	43	0,59	0,45	-	Carvalho <i>et al.</i> , 1993
Pico	64	0,47	0,53	-	Fonseca, 1996
Terceira	61	0,47	0,53	-	Este trabalho
Santarém	236	0,34	0,63	0,03	Ferrand, 1995
Proença-a-Velha	21	0,71	0,29	-	"
Vila Viçosa	36	0,36	0,64	-	"
Bragança	19	0,0,79	0,21	-	Vieira, 1993

Transferrina

O estudo do *locus* de TF na população da Terceira levou à confirmação do polimorfismo desta proteína, já detectada em outras populações açorianas - S. Jorge (Carvalho *et al.*, 1993) e Flores (Ferrand, 1995; Cardoso, não publicados), onde se detectou os dois alelos mais comuns nas populações continentais: TF*A e TF*B.

Contudo, na população da Terceira verificou-se a existência de mais um alelo além dos anteriores, TF*C, com uma frequência muito baixa. Este alelo é descrito pela primeira vez para esta ilha, já que Ferrand (1995) não o detectou quando estudou esta população.

O alelo encontrado com maior frequência na população terceirense é o alelo TF*A, sendo este alelo também o mais frequente na maioria das populações já estudadas.

Cardoso (resultados não publicados) ao estudar uma amostra populacional da ilha de S. Miguel, verificou que o alelo TF*2 se encontra fixado para esta ilha, o que vem confirmar os resultados já obtidos por Ferrand (1990) quando estudou uma população desta ilha.

Na Tabela 10 encontram-se descritas as frequências alélicas obtidas para populações açorianas e continentais.

Tabela 10. Frequências alélicas de TF em diferentes populações. N - Número de indivíduos analisados.

POPULAÇÃO	N	TF*A	TF*B	TF*C	TF*D	TF*F	REFERÊNCIA
São Miguel	30	1,00	-	-	-	-	Cardoso, não publicados
Flores	37	0,62	0,38	-	-	-	"
São Jorge	58	0,63	0,37	-	-	-	Carvalho <i>et al.</i> , 1993
São Miguel	59	1,00	-	-	-	-	Ferrand, 1990
Terceira	31	0,77	0,18	0,05	-	-	Este trabalho
Flores	48	0,65	0,35	-	-	-	Ferrand, 1995
Proença-a-Velha	21	0,64	0,05	-	0,07	0,24	"
Vila Viçosa	36	0,60	0,40	-	-	-	"

CONCLUSÕES

A população estudada permitiu confirmar o polimorfismo de *loci* já estudados em outras populações selvagens de coelho dos Açores.

A caracterização genética da população de coelho-bravo da Terceira permitiu também verificar que esta população não é muito diferente geneticamente das outras populações açorianas.

A estrutura genética da população terceirense, bem como das restantes populações do arquipélago já estudadas, apontam para uma origem a partir da subespécie *O. cuniculus algirus*, muito provavelmente das populações portuguesas de coelho-bravo.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam o seu agradecimento à Secretaria Regional da Agricultura e Pescas, pelo apoio financeiro necessário à realização dos trabalhos de investigação, bem como aos alunos Carla Simões, Susana Silva, Rui Ámen e Nuno Álvaro, pela colaboração nas colheitas.

BIBLIOGRAFIA

- Arana, A., P. Zaragoza, C. Rodellar & B. Amorena, 1989. Blood biochemical polymorphisms as markers for genetic characteristics of wild spanish and domestic rabbits. *Genetica*, 79:1-9.
- Carvalho, G., N. Ferrand, A. Fonseca, M. Branco, M. Azevedo, R. Mendes, P. Batista & P. Mântua, 1993. Estudo de uma população de coelhos selvagens (*Oryctolagus cuniculus*, L.) na ilha de São Jorge - Açores. *Relatórios e Comunicações do Departamento de Biologia, São Jorge e Topo/92*:8-20.
- Carvalho, G., A. Fonseca, A. Cruz, P. Célio, P. Mântua, C. Simões, S. Silva & G. Arruda,

1994. Estudo preliminar de alguns parâmetros de uma população de coelho selvagem (*Oryctolagus cuniculus*) da ilha do Faial, Açores. *Relatórios e Comunicações do Departamento de Biologia, Faial/93*: 49-60.

- Chaves, F.A. 1911. *Introdução de algumas espécies zoológicas na Ilha de S. Miguel depois da sua descoberta*. Typ. do "Diário dos Açores", Ponta Delgada.
- Drouet, H. 1861. *Éléments de la faune açoréenne*. J.B. Bailliére & Fils, Paris.
- Ferrand, N. 1990. *Polimorfismos electroforéticos em populações domésticas e selvagens de coelho (Oryctolagus cuniculus)*. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- Ferrand, N. 1995. *Varição genética de proteínas em populações (Oryctolagus cuniculus)*. *Análise da diferenciação subespeciação, subestruturação, expansão geográfica e domesticação*. Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- Flux, J.E.C. 1994. World distribution. *in*: Tompson, H.V. & King, C.M. (Eds). *The European rabbit. The history and biology of successful colonizer*. Oxford University Press Inc, New York, p.8-21.
- Fonseca, A. 1996. *Estudo da diversidade genética do coelho (Oryctolagus cuniculus Linnaeus, 1758) no arquipélago dos Açores*. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. Departamento de Biologia da Universidade dos Açores, Ponta Delgada.
- Frutuoso, g. 1978. *Saudades da Terra*, Liv. IV, vol. II. Edição do Instituto Cultural de Ponta Delgada, Ponta Delgada.
- Godman, F.C. 1870. *Natural history of the Azores or Western Islands*. John Van Voorst, Paternoster Row, London.
- Hartl, G.B. 1987. Biochemical differentiation between the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.), the domestic rabbit and the brown hare

- (*Lepus europaeus* Pallas). *Z. zool. Syst. Evolut.-forsch.*, 24:309-316.
- Hartl, G.B. & H. Hoyer, 1986. Biochemical variation in purebred and crossbred strains of domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus* L.). *Genet. Res.*, 48:27-34.
- Morelet, A. 1860. *L'Histoire naturelle des Açores*. J.B. Baillièere et Fils, Paris.
- Peterka, M. & G.B. Hartl, 1992. Biochemical-genetic variation and differentiation in wild and domestic rabbits. On the significance of genetic distances, dendograms and the estimation of divergence times in domestication studies. *Z. zool. Syst. Evolut.-forsch.*, 30:129-141.
- Richardson, B.J., P.M. Rogers & G.M. Hewitt, 1980. Ecological genetics of the wild rabbit in Australia. II. Protein variation in british, french and australian rabbits and the geographical distribution of the variation in Australia. *Aust. J. Biol. Sci.*, 33:371-383.
- Ulfstrand, S. 1961. On the vertebrate fauna of Azores. *Bol. Mus. Mun. Funchal*, XIV:75-86.
- Vergnes, H., A. Puget & C. Gourderes, 1974. Comparative study of red-cell enzyme polymorphism in the pika and the rabbit. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.*, 5:181-188.
- Vieira, J. 1993. *Utilização da marcadores genéticos na caracterização e certificação de populações domésticas e selvagens de coelho (Oryctolagus cuniculus)*. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- Zaragoza, P., A. Arana, I. Zarazaga & B. Amorena, 1985. Polimorfismos bioquímicos sanguíneos en las razas cunícolas Común español y Gigante de España: aportaciones metodológicas y control genético. *Genét. Ibér.*, 37:107-134.
- Zaragoza, P., A. Arana, I. Zarazaga & B. Amorena, 1987. Blood biochemical polymorphisms in rabbits presently bred in Spain: genetic variation and distances amongst populations. *Aust. J. Biol. Sci.*, 40:275-286.