

С.І. КОМАРНИЦЬКИЙ, І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
НАН України, Київ

РЕСТРИКТНІ ВАРІАЦІЇ АМПЛІФІКОВАНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ХЛОРОПЛАСТНОЇ ДНК РОДУ *NICOTIANA*



Посидання полімеразно-ланцюгової реакції з рестриктним аналізом ампліфікованих ділянок хлоропластної ДНК дозволило встановити походження цитоплазми деяких природних диплоїдів та амфіплоїдів роду *Nicotiana*. Пластом *N. bigelovii* і *N. clevelandii* походить від *N. corymbosa* або сучасних видів секції *Trigonophyllae*, поді як *N. arensii* успадкувала його від *N. undulata*. Пластом видів секції *Repandae* і *Nudicaules* походить від не існуючих на сьогодні видів, близьких до секції *Trigonophyllae*.

© С.І. КОМАРНИЦЬКИЙ, І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ, 2003

Вступ. Хлоропластна ДНК (хлДНК) вищих рослин існує в кільцевій формі розміром від 120 до 160 т.п.н. [1]. *N. tabacum* має 155 939 п.н. [2]. Взагалі молекула хлДНК містить інвертований повтор, який ділить її на велику і малу ініціальні копії. При рестриктному аналізі хлДНК виявлено три типи мутацій: точкові, мутації по довжині та інверсії [3]. Їх детекція була використана для філогенетичної реконструкції тютюнів [4–6]. Більш ефективною і інформативною виявилась ампліфікація окремих ділянок хлДНК з наступним їх прямим секвенуванням [7] чи рестриктним аналізом [8–11].

Біля 70 видів роду *Nicotiana* згідно з класичними дослідженнями [12] розподілені по трьох підродах — *Rustica*, *Tabacum* і *Petunioides*. Місцем виникнення роду вважається центральна частина Південної Америки, де ареали представників всіх трьох підродів перекриваються. На думку Гудспіда [12], рід *Nicotiana* виник близько 60 млн років тому, коли попередники трьох сучасних родів родини пасльонових — *Cestrum*, *Petunia* та *Nicotiana* — сформували єдиний генетичний резервуар. Тому види підроду *Tabacum* і *Rustica* несуть риси цестроїдного комплексу, від якого вони і походять, в той час як представники третього підроду еволюційно ближчі до петуніоїдного комплексу. Обидва американські континенти є батьківщиною 44 видів роду, решта поширені в Австралії, Африці та деяких островах Тихого океану. Базовим хромосомним числом роду вважається $x = 6$ [12, 13], проте сучасні види роду *Nicotiana* розподілені по двох хромосомних рівнях — 12- та 24-парні види, а також два анеуплоїдні ряди ($n = 9, 10$ та $n = 16–23$), що вказує на інтенсивну міжвидову гібридизацію з наступними інтрогресіями та зворотними гібридизаціями в процесі їх становлення. Незважаючи на те, що рід *Nicotiana* інтенсивно вивчався як класичними морфологами [12, 13], так і молекулярними біологами [3–5], на сьогоднішній день не з'ясоване походження пластома багатьох природних диплоїдів і амфіплоїдів. В даному повідомленні на основі рестриктного аналізу ампліфікованих послідовностей хлДНК ми обґрунтували походження цитоплазми деяких видів роду *Nicotiana*.

Матеріали і методи. Використовували насіння видів роду *Nicotiana* (табл. 1).

Загальну ДНК виділяли з 50–100 мг проростків згідно з [14]. Полімеразно-ланцюгову реакцію проводили, як описано раніше [11]. Після завершення реакції 1,5–2 мкл ампліфікованого

продукту гідролізували рестриктазами (*AluI*, *BglI*, *BglII*, *BamHI*, *BinI*, *ClaI*, *Ecl136*, *EcoRI*, *EcoRV*, *EcoRV*, *Eco47I*, *DraI*, *HaeIII*, *HincII*, *HindIII*, *HhaI*, *HpaI*, *HpaII*, *MnlI*, *MvaI*, *NdeI*, *NcoI*, *PaeI*, *PvuII*, *RsaI*, *SspI*, *StyI*, *XbaI*) в загальному об'ємі 20 мкл. Рестриктні фрагменти фракціонували в агарозному гелі в трис-боратній буферній системі. Пару праймерів використали для ампліфікації ділянки *trnK* між першим і другим екзонами гена *trnK*, що кодує тРНК лізину [8]. Ділянку *atpA-atpH* ампліфікували парою праймерів (табл. 2). Вона містить спейсер між другим екзоном гена *atpA* (кодує альфа-субодиницю, АТФаза) і 5'-кінцем гена *atpH*, що кодує III субодиницю АТФази. Некодуюча ділянка *atpH-atpI*, ампліфікована парою праймерів [8], містить міжгенний спейсер між 3'-кінцем *atpH* і 5'-кінцем *atpI*, останній ген кодує IV субодиницю АТФази. Ділянку між геном *trnS* (кодує тРНК серину) і *trnFM* (кодує тРНК формілметіоніну) ампліфікували парою

праймерів згідно з [15]. Для ампліфікації ділянки *trnG-atpA* (1929 п.н.) між першим екзоном гена *trnG* (кодує тРНК гліцину) і першим екзоном *atpA* підібрана пара праймерів, яка ампліфікувала послідовність близько 520 п.н. Для ампліфікації послідовності між *trnV* і *rps7* ми використали пару праймерів, які запропонував проф. Кооп з Мюнхенського університету. Інша пара праймерів ампліфікувала ділянку між 3' *16S* рДНК і 5' *trnA*. Послідовність форвардного праймера на гені *16S* рДНК, що кодує *16S* рРНК, взято з роботи [16]. Реверсний праймер на 5' *trnA* підібраний нами на основі первинної структури хлДНК *N. tabacum*.

Результати досліджень та їх обговорення. Ампліфіковано сім ділянок хлДНК тютюнів, п'ять з яких знаходяться у великій унікальній копії, а дві — в інвертованих повторах. Ампліфіковані ділянки були ідентичними за розміром у всіх без винятку видів роду. Ділянку *atpA-atpH* гідролізували 12 рестриктазами *ClaI*, *Ecl136*, *EcoRV*,

Таблиця 1

Види роду *Nicotiana*

Підрід, секція, вид	Кількість хромосом, <i>n</i>	Підрід, секція, вид	Кількість хромосом, <i>n</i>	Підрід, секція, вид	Кількість хромосом, <i>n</i>
<i>Rustica</i>		<i>Alatae</i>		<i>Nudicaules</i>	
<i>Paniculatae</i>		<i>N. alata</i>	9	<i>N. nudicaulis</i>	24
<i>N. benavidesii</i>	12	<i>N. bonariensis</i>	9	<i>Suaveolentes</i>	
<i>N. cordifolia</i>	12	<i>N. forgetiana</i>	9	<i>N. africana</i>	23
<i>N. glauca</i>	12	<i>N. langsdorffii</i>	9	<i>N. amplexicaulis</i>	18
<i>N. paniculata</i>	12	<i>N. longiflora</i>	10	<i>N. benthamiana</i>	19
<i>N. knightiana</i>	12	<i>N. plumbaginifolia</i>	10	<i>N. cavicola</i>	23
<i>N. raimondii</i>	12	<i>N. sanderae</i>	9	<i>N. debneyi</i>	24
<i>N. solanifolia</i>	12	<i>N. sylvestris</i>	9	<i>N. eastii</i>	32
<i>Rusticae</i>		<i>Repandae</i>		<i>N. excelsior</i>	19
<i>N. rustica</i>	24	<i>N. nesophila</i>	24	<i>N. exigua</i>	16
<i>Tabacum</i>		<i>N. repanda</i>	24	<i>N. fragrans</i>	24
<i>Tomentosae</i>		<i>N. stocktonii</i>	24	<i>N. goodspeedii</i>	20
<i>N. glutinosa</i>	12	<i>Noctiflorae</i>		<i>N. gossei</i>	18
<i>N. kawakamii</i>	12	<i>N. acaulis</i>	12	<i>N. hesperis</i>	21
<i>N. otophora</i>	12	<i>N. noctiflora</i>	12	<i>N. ingulba</i>	20
<i>N. setchellii</i>	12	<i>N. petunioides</i>	12	<i>N. maritima</i>	16
<i>N. tomentosa</i>	12	<i>Acuminatae</i>		<i>N. megalosiphon</i>	20
<i>N. tomentosiformis</i>	12	<i>N. acuminata</i>	12	<i>N. occidentalis</i>	21
<i>Genuinae</i>	12	<i>N. attenuata</i>	12	<i>N. rosulata</i>	20
<i>N. tabacum</i>		<i>N. corymbosa</i>	12	<i>N. rotundifolia</i>	22
<i>Petunioides</i>	24	<i>N. linearis</i>	12	<i>N. simulans</i>	20
<i>Undulatae</i>		<i>N. miersii</i>	12	<i>N. suaveolens</i>	16
<i>N. undulata</i>	12	<i>N. pauciflora</i>	12	<i>N. umbratica</i>	23
<i>N. wigandioides</i>	12	<i>N. spegazzinii</i>	12	<i>N. velutina</i>	16
<i>N. arentsii</i>	24	<i>Bigelovianae</i>			
<i>Trigonophyllae</i>		<i>N. bigelovii</i>	24		
<i>N. trigonophylla</i>	12	<i>N. clevelandii</i>	24		
<i>N. palmeri</i>	12				

Праймери для ампліфікації ділянок хлДНК *Nicotiana*

Ділянка хлДНК	Послідовність праймерів 5'–3'	Позиції на хлДНК	Температура гібридизації	Розмір ампліфікованої ділянки, п.н.	Кількість використаних рестриктаз
<i>16S rDNA</i>	CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC	103753–103774	59	2417	22
<i>trnA</i>	TAAGCGGACTCGAACTGCTGA	106149–106169			
<i>trnV</i>	CAGGCTCGAACTGATGACTTC	140104–140126	57	2728	20
<i>rps7</i>	GCAATACGTGGACTAACTCCC	142811–142831			
<i>trnK</i>	AACCCGGAAGTAGTCGGATG	1828–1847	60	2564	12
<i>trnK</i>	TCAATGGTAGAGTACTCGGC	4377–4396			
<i>trnG</i>	AGCCTTCCAAGCTAACGAGA	10217–10234	55	1929	4
<i>atpA</i>	GTAACCATTCGAGCTGACGA	12126–12145			
<i>atpA</i>	CGTCAGCTCGAATGGTTACCA	12127–12148	50	1951	12
<i>atpH</i>	CTTCCGTTATTGCTGCTGGA	14058–14077			
<i>atpH</i>	TTGACCAACTCCAGGTCCAA	14016–14045	60	1282	10
<i>atpI</i>	CCGCAGCTTATATAGGCGAA	15278–15297			
<i>trnS</i>	GAGAGAGAGGGATTTCGAACC	37142–37161	60	1254	10
<i>trnM</i>	CATAACCTTGAGGTCACGGG	38376–38395			

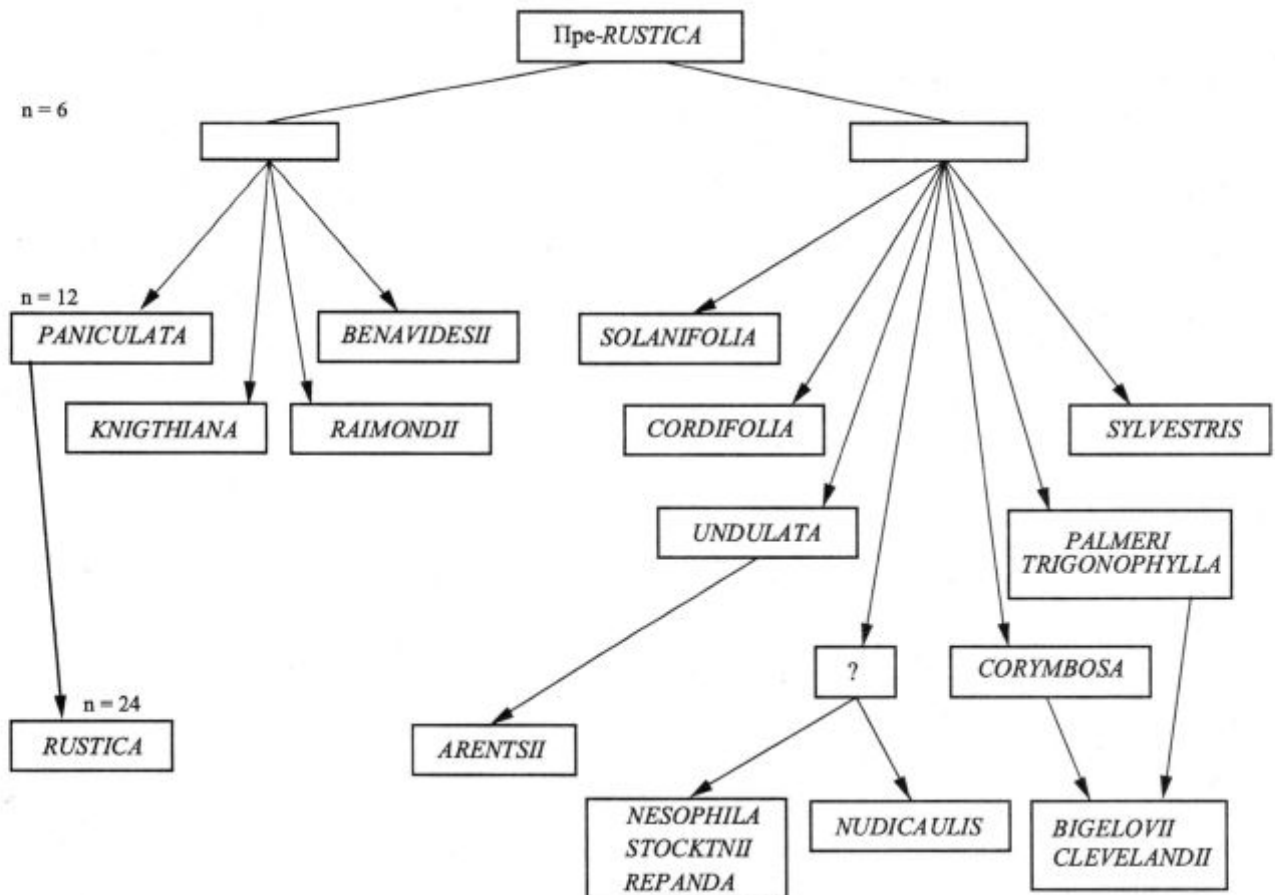
Eco47I, *HaeIII*, *HindIII*, *HpaII*, *MvaI*, *PvuII*, *SspI*, *StyI* і *XbaI*. *Clal* гідролізує спейсер хлДНК *N. tabacum* між *atpA* і *atpH* на два фрагменти — 886 і 1065 п.н. Таку кількість фрагментів мають ще 13 видів. До цієї групи належать два види з секції *Paniculatae* (*N. solanifolia* і *N. cordifolia*), всі види секції *Repandae*, обидва види секції *Trigonophyllae* і *Bigelovianae*, по одному виду з *Alatae* (*N. sylvestris*), *Suaveolentes* (*N. africana*), *Acuminatae* (*N. corymbosa*) та єдиний представник секції *Nudicaulis*. Інтригуючим є те, що до даної групи потрапив вид *N. corymbosa*. Згідно з Гудспідом [12], види секції *Acuminatae*, до яких належить *N. corymbosa*, походять лише від попередників петуноїдного комплексу. З іншого боку, *N. solanifolia* і *N. cordifolia* походять лише від попередників цистроїдного комплексу. Решта видів даної групи несуть в собі обидва елементи як цистроїдного, так і петуноїдного комплексів. Види, що належать до другої групи, мають додатковий сайт у фрагменті 1065 п.н. (135+930). Гідроліз даної ділянки хлДНК *HpaII* і *MvaI* також вказує на подібність хлДНК видів секції *Trigonophyllae*,

Bigelovianae і *N. corymbosa*. Аналогічний результат отриманий нами при гідролізі ділянки *trnS-trnM* рестриктазою *PaeI*, ділянки *atpH-atpI* рестриктазами *AluI*, *HaeIII*, *HpaII*, *MnlI*, *NdeI*, *RsaI*, *SspI*, *StyI* і ділянки *trnK* рестриктазою *SspI*. Раніше на основі поліморфізму довжин рестриктних фрагментів [17] і секвенування ділянки 3'трл2-5'трл22 [7] показана подібність хлДНК диплоїду *N. palmeri* і амфідиплоїду *N. bigelovii*.

Види секції *Repandae* мають унікальні *HaeIII* фрагменти на ділянці *atpH-atpI*. Дану ділянку і рестриктазу *HpaII* можна використати для розпізнавання американських і австралійських видів. *HpaII* гідролізує *atpH-atpI* американських видів на чотири фрагменти (4 + 642 + 584 + + 1339), тоді як австралійські мають додатковий сайт у 1339 (1256+83). За результатами рестриктного аналізу ампліфікованих ділянок хлДНК природного амфідиплоїду *N. nudicaulis* доходимо до висновку, що його пластом не може походити від сучасних видів секції *Acuminatae* або *Trigonophyllae*, які згідно з [12] є попередниками *N. nudicaulis*. На основі проведеного аналізу ми

пов'язуємо походження пластоми *N. nudicaulis* з попередниками секції *Paniculatae*, через не існуючі нині види, які близькі до секції *Trigonophyllae*. Останні також могли бути донором пластоми сучасних видів секції *Repandae*, які, як стверджує Гудспід [12], походять від *Trigonophyllae* і *Alatae*. Два інших амфідиплоїди — *N. clevelandii* і *N. bigelovii* — походять від *Alatae* і *Acuminatae* [12]. На основі нашого аналізу їх пластом може походити від диплоїду *N. corymbosa* з секції *Acuminatae* або видів секції *Trigonophyllae* (рисунок). Отже, види секції *Bigelovianae* мають ідентичний пластом, але різні послідовності внутрішнього транскрибуючого спейсера (ВТС) ядерної рибосомальної ДНК. У *N. bigelovii* ВТС фіксується від видів, близьких до секції *Trigonophyllae*, тоді як *N. clevelandii* — від видів секції *Acuminatae* [18]. Гідроліз *trnS-trnfM HpaII* (47 + 13 + 133 + 650 + 21 + 390) дозволив ідентифікувати цитоплазму природ-

ного амфідиплоїду *N. arentsii*, який виник в результаті гібридизації між *N. wigandioides* з *N. undulata* [12]. У *N. wigandioides* відсутній сайт між 133 і 650, тому цитоплазма *N. arentsii* може походити лише від *N. undulata*, а не *N. wigandioides*. Аналогічний результат ми отримали, гідролізуючи ділянку *trnG-atpA HpaII* (75 + 43 + 317 + 85) і *HhaI* (104+416). В першому випадку у *N. wigandioides* відсутній *HpaII* сайт між 317 і 85, тоді як в другому немає *HhaI* сайту у *trnG-atpA*. Гідроліз ділянки *trnK EcoRI* (431 + 1930 + 208), *atpH-atpI Eco47I* (14 + 1268) і *HaeIII* (37 + 340 + 3 + 39 + 534 + 32) також вказує на походження пластоми *N. arentsii* від *N. undulata*, а не *N. wigandioides*. *N. arentsii* і *N. undulata* мають в *trnK* додатковий *EcoRI* сайт в 431 (76+355). У *N. wigandioides* в *atpH-atpI* є додатковий *Eco47I* сайт в 1256 (362+906) і відсутній *HaeIII* сайт між 340 і 339. Пластом іншого природного амфідиплоїду *N. rustica*, який є



Походження пластоми деяких видів роду *Nicotiana*

природним гібридом між *N. paniculata* і *N. undulata* [12], не відрізняється рестриктними фрагментами від своїх попередників. Раніше виконаний нами рестриктний аналіз мітохондріальної ДНК цих видів показав, що цитоплазма *N. rustica* походить від *N. paniculata*, а не *N. undulata* [19].

AluI чітко відрізняє ділянку *trnK* (386 + 111 + 2072) видів секції *Acuminatae* (за виключенням *N. corymbosa*) від більшості видів роду (386+111+195+1573+304). Вказана ділянка австралійських тютюнів відрізняється *EcoRI* фрагментами (2361 + 208) від переважної більшості американських видів (431+1930+208), за виключенням чотирьох базових видів секції *N. tomentosiformis*, *N. otophora*, *N. tomentosa* і *N. kawakamii*. Ідентичність *EcoRI* фрагментів на ділянці *trnK* австралійських і чотирьох американських видів зумовлена незалежною втратою сайту між 1930 і 208, чи їх спільним походженням. Останнє заперечує Гудспід [12], констатує відсутність томентосоїдних елементів у австралійських видів. В результаті гідролізу ділянки *trnK AluI* австралійські види можна поділити на дві групи. До першої належать 10 видів, в тому числі попередники сучасних мігрантів (*N. debneyi*, *N. suaveolens* і *N. fragrans*), які потрапили в Австралію 10 млн років тому в результаті дрейфу континентів [12]. До даної групи належить і *N. noctiflora* з півдня Південної Америки. Всі вони мають додатковий *AluI* сайт у фрагменті 386 (25 + 361). Австралійські види і *N. noctiflora* з секції *Noctiflorae* на ділянці *trnK* мають також ідентичні *RsaI* фрагменти. Крім *N. noctiflora*, до секції *Noctiflorae* відносять *N. petunioides* і *N. acaulis*. Їхні *AluI* і *RsaI* фрагменти *trnK* ділянки подібні до американських, а не до австралійських видів. Це дає нам підставу вважати, що хлДНК австралійських видів може походити від неіснуючих видів, близьких до одного з попередників сучасного диплоїду *N. noctiflora*.

Отже, поєднання полімеразно-ланцюгової реакції на невеликих ділянках хлДНК з їх подальшим рестриктним гідролізом дозволяє слідкувати за рухом цитоплазми тютюнів в процесі їх формування як видів. Підбір таких ділянок необхідно здійснювати лише за межами інвертованих повторів хлДНК. Нами показано, що дві ампліфіковані некодуєчі ділянки хлДНК (*3'I6S rDNA-5'trnA* і *trnV-rps7*), які знаходяться в інвертованому повторі, при гідролізі рестриктазами давали у всіх

видів ідентичні рестриктні фрагменти. Цей результат вказує на консервативну структуру інвертованого повтору і на те, що вони не придатні для такого аналізу.

SUMMARY. Restriction analysis of amplified chloroplast DNA fragments has allowed us to determine the source of cytoplasm for several natural diploids and amphidiploids of the genus *Nicotiana*. *N. corymbosa* or species of *Trygonophyllae* section donated cytoplasm to *N. bigelovii* and *N. clevelandii*, while *N. arentsii* inherited cytoplasm from *N. undulata* during the evolution of the genus. Plastomes of *Repandae* and *Nudicaules* species originated from now extinct species of *Trygonophyllae* section.

РЕЗЮМЕ. Совмещение полимеразно-цепной реакции с рестриктным анализом амплифицированных участков хлоропластной ДНК позволило установить происхождение цитоплазмы некоторых природных диплоидов и амфилоидов рода *Nicotiana*. Пластом *N. bigelovii* и *N. clevelandii* происходит от *N. corymbosa* или современных видов секции *Trygonophyllae*, тогда как *N. arentsii* унаследовал его от *N. undulata*. Пластом видов секции *Repandae* и *Nudicaules* происходит от не существующих на сегодня видов, близких к секции *Trygonophyllae*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Palmer J.D. Comparative organization of chloroplast genomes // Ann. Rev. Genet. — 1985. — 19. — P. 325–354.
2. Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayshida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Obokata J., Yamaguchi-Shinozaki K., Ohto C., Torazawa K., Meng B.Y., Sugita M., Deno H., Kamogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kata A., Tohdoh N., Shimada H., Sugiura M. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome // Plant Mol. Biol. Rep. — 1986. — 4. — P. 111–147.
3. Palmer J.D., Stein D.B. Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants // Curr. Genet. — 1986. — 10. — P. 823–833.
4. Kung S.D., Zhu Y.S., Shen G.F. *Nicotiana* chloroplast genome. 3. Chloroplast DNA evolution // Theor. and Appl. Genet. — 1982. — 61. — P. 73–79.
5. Salts Y., Herrmann R.G., Peleg N., Lavi U., Frankel R., Beckmann J.S. Physical mapping of plastid DNA variation among eleven *Nicotiana* species // Theor. and Appl. Genet. — 1984. — 69. — P. 1–14.
6. Комарницький І.К., Самойлов А.М., Глеба Ю.Ю. Рестриктное картирование хлоропластной ДНК пяти видов *Nicotiana* // Биополимеры и клетка. — 1989. — 5. — С. 66–72.
7. Goulding S.H., Olmstead R.G., Morgen C.W., Wolf K.H. Ebb and flow of the chloroplast inverted repeat // Mol. Gen. Genet. — 1996. — 252. — P. 195–206.

8. Tsumura Y., Awahara T., Wickneswari R., Yishimura K. Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes // *Theor. and Appl. Genet.* — 1996. — **93**. — P. 22–29.
9. Parducci L., Szmidt A.E. PCR-RFLP analysis of cpDNA in the genus *Abies* // *Theor. and Appl. Genet.* — 1999. — **98**. — P. 802–808.
10. Parani M., Lakshmi M., Ziegenhagen B., Fladung M., Senthilkumar P., Parida A. Molecular phylogeny of mangroves 7. PCR-RFLP of *trnS-trnC* and *rbcL* gene region in 24 mangrove and mangrove-associate species // *Theor. and Appl. Genet.* — 2000. — **100**. — P. 454–460.
11. Комарницький С.І., Комарницький І.К. Рестриктний поліморфізм ампліфікованих послідовностей хлоропластної ДНК роду *Nicotiana* // *Биополимеры и клетка.* — 2002. — **18**, № 6. — С. 485–488.
12. Goodspeed T.H. *The genus Nicotiana.* — Massachusetts : Waltham, 1954. — 536 p.
13. Kostoff D. *Cytogenetics of the genus Nicotiana.* — Sofia : State Printed House, [1941–43]. — 1071 p.
14. Cheung W.Y., Hubert N., Landry B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses // *PCR Meths. Appl.* — 1993. — **3**. — P. 69–70.
15. Demesure B., Sodzi N., Petit R.J. A set universal primers for amplification of polymorphic non-coding region of mitochondrial and chloroplast DNA in plants // *Mol. Ecol.* — 1995. — **4**. — P. 129–131.
16. Wongkaew P., Hanboonsong Y., Sirithorn P., Choasai C., Boonkrong S., Tinnangwattana T., Kitchareonpanya R., Damak K. Differentiation of phytoplasmas associated with sugarcane and gramineous weed white leaf disease and sugarcane grassy shoot disease by RFLP and sequencing // *Theor. Appl. Genet.* — 1997. — **95**. — P. 660–663.
17. Olmstead R., Palmer J. Chloroplast DNA and systematic of the Solanaceae // *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution.* — Hawkes, Lester, Nee and Estrada, Royal Botanic Garden Kew, 1991. — P.161–168.
18. Комарницький С.І., Комарницький І.К., Кокс А., Пароконний О.С. Еволюція послідовностей внутрішнього транскрибуючого спейсера ядерної рибосомальної ДНК американських видів роду *Nicotiana* // *Цитология и генетика.* — 1998. — **32**, № 3. — С. 69–76.
19. Череп Н.Н., Комарницький І.К. Митохондриальний геном роду *Nicotiana* // *Биополимеры и клетка.* — 1991. — **7**, № 4. — С. 45–50.

Надійшла 31.05.02