

---

研究資料 Research Notes

---

ナラ菌 (*Raffaelea quercivora*) に感染したコナラ樹幹の傷害心材  
形成におけるエチレン, ジャスモン酸, およびサリチル酸の役割

モウンスリムアンディ ブーンティダ・森脇広行・中山正規・西垣眞太郎・山本福壽

**Roles of ethylene, jasmonic acid, and salicylates in traumatic heartwood formation  
of *Quercus serrata* infected with *Raffaelea quercivora***

Boontida Moungrimuangdee, Hiroyuki Moriwaki, Masanori Nakayama,  
Shintaro Nishigaki, and Fukuju Yamamoto

広葉樹研究 第14号 別冊

平成23年3月

鳥取大学農学部

広葉樹開発実験室

Reprinted from

HARDWOOD RESEARCH

No. 14

March, 2011

Hardwood Laboratory

Faculty of Agriculture, Tottori University

Tottori, 680-8553 Japan

## 研究資料 Research Notes

ナラ菌 (*Raffaelea quercivora*) に感染したコナラ樹幹の傷害心材形成におけるエチレン, ジャスモン酸, およびサリチル酸の役割モウンスリムアンディ ブーンティダ<sup>1</sup>・森脇広行<sup>2</sup>・中山正規<sup>2</sup>・西垣眞太郎<sup>3</sup>・山本福壽<sup>2</sup>Roles of ethylene, jasmonic acid, and salicylates in traumatic heartwood formation of *Quercus serrata* infected with *Raffaelea quercivora*Boontida Moungrimuangdee<sup>1</sup>, Hiroyuki Moriwaki<sup>2</sup>, Masanori Nakayama<sup>2</sup>, Shintaro Nishigaki<sup>3</sup>, and Fukuju Yamamoto<sup>2</sup><sup>1</sup> 鳥取大学大学院連合農学研究科 (〒680-8553 鳥取市湖山町南 4-101)

The United Graduated School of Agricultural Science, Tottori University, Minami 4-101, Koyama, Tottori 680-8553, Japan

<sup>2</sup> 鳥取大学農学部 (〒680-8553 鳥取市湖山町南 4-101)

Faculty of Agriculture, Tottori University, Minami 4-101, Koyama, Tottori 680-8553, Japan

<sup>3</sup> 鳥取県林業試験場 (〒680-1203 鳥取市河原町稲常 103)

Tottori Prefectural Agriculture and Forest Research Institute, Inatsune 113, Kawahara, Tottori 680-1203, Japan

## 要 旨

日本海側を中心として拡大しているナラ類集団枯死の被害木では, 傷害心材, もしくは病理的心材と称される顕著な木部の着色現象が観察される. 本稿では, 最近発表された Moungrimuangdee ら (2011) による研究成果をもとに, ナラ菌の感染によって形成された傷害心材過程におけるエチレン, ジャスモン酸, およびサリチル酸の役割を考察した.

## I. はじめに

樹幹に生じた傷害は, 病原性微生物の侵入による木部腐朽を引き起こす要因の一つである. 一方, 樹幹には, 微生物の侵入を防ぐ機構が備わっている. 例えば Shigo & Marx (1977) の提唱した CODIT (Compartmentalization of Decay in Trees, 樹木の腐朽の区画化) モデルでは, 木部細胞内にフェノール性物質が集積してできる防御壁と新生細胞のスペリニ化によって, 病原菌は侵入部位の範囲内に封じ込められる. フェノール性物質は抗菌効果を持つため, 病原菌が木部内部に広範囲に侵入するのを阻害することができる.

ナラ類集団枯死 (以下, ナラ枯れ) の被害木では顕著な木部の着色現象が観察される (黒田 1999). カシノナガキクイムシ (以下, カシナガ) の集団加害を受けたナラ類の幹では, 穿孔された孔道内がカ

シナガによって運び込まれた *Raffaelea quercivora* (以下, ナラ菌) に感染したのち, 辺材部に拡大していく (高畑ら 2008). 多くの樹木の幹では, 木部での病傷害に対する防御反応の結果として正常な心材に類似した傷害心材 (もしくは病理的心材) が形成される. ナラ菌の感染もまた, きわめて特徴的な傷害心材の形成を引き起こす. 傷害心材の形成には放射柔細胞や軸方向柔細胞でフェノール性物質やテルペン類などの二次代謝産物の生産が活発となり, 細胞外に浸潤して形成される. 一般的には, この傷害心材に含まれるフェノール性物質によって病原菌の活動は阻害されると考えられている. しかしながらナラ菌の感染を受けたコナラ属の樹木は, 明確な傷害心材形成を示すにも関わらず, かなりの数の個体が枯死にいたる.

傷害心材の形成過程におけるフェノール性物質の集積 (着色) には, 植物ホルモン等の刺激伝達物質

の生理作用が関与している可能性が高い。傷害や病害に応答して生合成される植物ホルモンはエチレンおよびジャスモン酸である。またサリチル酸は病害応答に関係する物質である。昆虫や草食動物の摂食によって生じる物理的な傷害に対しては、ジャスモン酸とエチレンが生合成され、過剰な摂食を抑える物質や、病原菌の二次的な感染を防ぐ物質を生産する。ジャスモン酸は $\alpha$ -リノレン酸を前駆体として傷害部位で形成され、傷害刺激のシグナル伝達物質として働く。これによって病原体や昆虫などの多くの外敵への抵抗性が全身的に誘導される。エチレンは病傷害の刺激によってメチオニンを経由して、アミノシクロプロパンカルボン酸 (ACC) を経て生合成される。この植物ホルモンもまたジャスモン酸と同様に病害や傷害の応答に関与している。一方サリチル酸は、アポトーシスの原因となる過敏反応を誘導する働きを持ち、アポトーシスによって感染部位の拡大が抑制される (仲下 2006)。しかしながらカシノナガキクイムシの加害とナラ菌の感染による傷害心材の形成機構にかかわるこれらの刺激伝達物質の役割については、これまでほとんど明らかにされてこなかった。そこで本稿では、最近発表された Moungrimuangdee ら (2011) による研究成果をもとに、ナラ菌の感染によって形成された傷害心材過程におけるエチレン, ジャスモン酸, およびサリチル酸の役割を考察した。

なお、この稿を取りまとめには平成 22 年度科学研究費補助金 (基盤研究 B, 22380085) の一部を用いた。

## II. 研究方法

### 1. 処理実験

実験は、2008 年に鳥取大学教育研究林『蒜山の森』の平均 46 年生のコナラ成木 28 本を任意に選んで行った。処理薬剤は、サリチル酸ナトリウム 1% (SA-Na), サリチル酸メチル 1% (SA-Me), ジャスモン酸メチル 1% (JA-Me), 及びエチレンの発生剤であるエスレル 1% (Et) であり、これらをさまざまな組み合わせで処理している。各薬剤は脱水ラノリンで希釈し、ペーストとして用いた。薬剤の処理は 2008 年 7 月 6 日に行った。まず、コナラ立木に地際から 60 cm, 140 cm, および 220 cm の高さに、電気ドリルによって各 3 箇所の水平の孔 (径 4 mm, 深さ 5 cm) を穿った。この孔に注射器を用いて各薬剤ペーストを注入した。注入後、各処理孔はガムテープで封じた。各処理区で、2 本の立木を用いている。

ナラ菌の接種には鳥取県林業試験場で培養したナラ菌 (Na-T1) を用いた。7 月 14 日に無菌の接種源を、7 月 15 日に Na-T1 の接種源を接種した。コナラ立木に地際から 60 cm, 140 cm, 220 cm の高さに各 3 箇所の水平孔 (直径 3 mm, 深さ 5 cm) を穿ち、無菌または菌を感染させた爪楊枝を孔に挿入し、余剰部分は、熱殺菌した剪定ばさみで切除した。さらに滅菌水をしみこませたガーゼで孔を塞いだのち、パラフィルム, ガムテープで覆われた。各接種で 2 本の立木を用いている。

処理木は 11 月 2, 3, 5, 7 日に伐採し、処理部と処理部から上下約 20 cm を鋸断し、サンプルとした。さらに、軸方向の着色を計測するために処理部を通る軸方向の面に沿ってサンプルを縦断した。

### 2. 着色長測定

着色範囲は、接線方向, および上下の軸方向への広がり計測した。接線方向の測定は、処理部の樹皮付近, 心材付近, それらの中央で測定し、さらに、処理部を上下に横断しているため、上部と下部の値を平均し、接線方向の着色の広がりとした。軸方向については、上方と下方に分けて測定した。処理部を軸方向で 2 つに分断しているため、それらの着色の最大値を測定後、平均値を算出した。

軸方向の着色面積を測るために、スキャナーを用いて画像データを取り込んだ。次に画像データを Excel ファイル『lenaraf220』を用いて着色部の面積を測定した。更に、各サンプルの辺材の幅が個体によって異なっていたため、処理部切断面の辺材の幅を測定し、着色面積を辺材の幅で除した。よって得られたデータは単位幅当たりの面積である。

### 3. 組織化学的解析

薬剤およびナラ菌接種によって着色した辺材部から小片 (2 × 2 × 2 cm) を採取し、組織に含まれる成分の組織化学的解析を行った。木部片からマイクロームによって切片を作成し、脂質の観察にはスダンブラック B, スダンⅢ, およびナイルブルーを、フェノール類の観察には塩化第二鉄を用いて染色し、光学顕微鏡で観察した。

## III. 結果

### (1) 接線方向の着色長

薬剤処理では、接線方向の着色長はジャスモン酸とサリチル酸を混合したものを処理した場合、大きくなる傾向があったが、全体的に変化量は少なかった。

た。菌接種区では値がやや大きくなった。

#### (2) 軸方向の着色長

薬剤処理の効果については、エスレルにサリチル酸ナトリウムまたは、ジャスモン酸メチルを混合したもので対照区と比べて有意な差が認められた。しかし、サリチル酸メチルとエスレルを混合したものではありません。さらに、3種類の薬剤を混合したものでは対照区と比べて有意な差は認められなかった。また、上方と下方の着色長を比較すると上方で値が大きくなる傾向があった。それに対して菌接種では着色長が大きくなったが、上方、下方の差はなかった。

#### (3) 軸方向の着色面積

ジャスモン酸メチル処理区以外では、薬剤が1種類のものでは、対照区と比べて有意な差が認められなかった。上部と下部の着色両方を見ると、エスレル、サリチル酸ナトリウム、ジャスモン酸メチルを2種及び3種混合した処理区で着色面積が大きくなっていた。サリチル酸メチルを含む混合処理でも有意な差が認められたが、サリチル酸ナトリウムよりも値は小さかった。また、上下での反応を比較すると、上方で全体的に値が大きくなる傾向があった。菌接種では着色面積が大きくなったが、上下での反応の差は小さかった。

#### (4) 縦断面の観察

縦断面の観察により、着色が促進された処理区ほど樹皮付近から心材に向けて着色域が広がる傾向が認められた。また、エスレルとジャスモン酸メチルの混合処理の約半数で辺材から心材にいたる移行材の部位で著しい着色の促進が認められた。なお、処理部位の位置（高さ）や樹幹のサイズと処理効果との関係はほとんどなかった。

#### (5) 組織化学的観察

薬剤および菌接種により着色した木部では、放射組織の柔細胞中に黄褐色の沈着物を認め、着色状況から脂質およびフェノールの沈着を確認した。さらに道管内腔のクロースの形成も確認した。

## IV. 考 察

木部の異常着色、すなわち傷害心材の形成は昆虫の摂食、傷害、微生物の感染あるいは植物ホルモンなどの刺激伝達物質によって生じる (Shain 1995)。傷害心材の形成は、樹幹内での微生物の繁殖と感染の拡大を一定範囲に封じ込める「腐朽の区画化」として機能していると考えられる (Shigo & Marx 1977)。Mounsrimumangdeeら (2011) の研

究で取り扱われたエチレン、ジャスモン酸、サリチル酸の3種の物質は、これまでも植物の防御反応にかかわる重要な刺激伝達物質として認識されている (Savidge 1988; Kozlowski *et al.* 1999; Nürnberger & Scheel 2001)。例えば病害抵抗性にかかわるさまざまな現象の中でも、エチレンによる耐病性の増加や罹患にともなうエチレンの生成については多くの研究事例がある (Stahmann *et al.* 1966; Chappell *et al.* 1984)。サツマイモでの研究例では、黒斑病菌 (*Ceratocystis fimbriata*) 接種の前にエチレンを処理すると、病害抵抗性が増加することが確かめられている (Stahmann *et al.* 1966)。さらにこの病原菌の感染部位ではエチレン生成が増加するが、寒天培地で培養した菌自体はエチレン生成を示さない。これらの結果は、エチレンは菌の感染したサツマイモ内部で生成され、これによって病害抵抗性や酵素活性の増加が誘導されることを示すものである。Chappell *et al.* (1984) もまた、パセリ (*Petroselinum hortense*) を茎疫病菌 (*Phytophthora megasperma*) の細胞壁から採取した病害抵抗反応誘導物質 (エリシター) で処理したところ、急速にエチレンが生成されることを見出している。キクイムシ類が媒介する菌の *Ophiostoma spp.* に感染したスラッシュマツ (*Pinus elliottii*) やテーダマツ (*P. taeda*) でも急速なエチレンの生成が観察されている (Popp *et al.* 1995)。

ジャスモン酸メチルもまた、針葉樹の樹幹に昆虫や微生物の加害に対する防御反応を引き起こすシグナル機構に関与することが知られる (Hudgins *et al.* 2003)。Zeneli *et al.* (2006) や Krokene *et al.* (2008) の研究では、ジャスモン酸メチルをオウシュウトウヒ (*Picea abies*) に処理すると、トウヒキクイムシが媒介する青色染色菌 (*Ceratocystis polonica*) に対する抵抗性が増加することが確かめられている。Mounsrimumangdeeら (2011) もまた、エチレンやジャスモン酸の処理が傷害心材の形成に関与するが、特にジャスモン酸メチルとエスレルの混合処理による顕著な促進効果を認めた。Xu *et al.* (1994) は、タバコの病害抵抗性にかかわる遺伝子発現はエセフォン (エチレン発生剤) とジャスモン酸メチルの混合処理で促進されることを報告している。Hudgins & Franceschi (2004) は、エチレンが関与するヨーロッパトウヒの病害抵抗性が究極的にはジャスモン酸メチルの処理によって誘導されることを突き止め、防御機構がジャスモン酸メチルとエチレンの相互作用によって構築されることを論じている。

Mounsrimumangdeeら (2011) は、ジャスモン酸

メチルとサリチル酸メチル, もしくはサリチル酸ナトリウムを組み合わせた投与は, それぞれの単独処理よりも着色を促進する傾向を認めた. この結果は, タバコを用いた研究で, ジャスモン酸メチルとサリチル酸の同時処理が防御反応に関与する遺伝子発現に対して強い相互効果を持つという結果と類似している (Xu *et al.* 1994). シロイヌナズナ (*Arabidopsis*) の実験では, エチレンの関与する抵抗性がサリチル酸の濃度状況と密接にかかわる, つまり低濃度のサリチル酸にエチレンが加わることで, サリチル酸に対する反応性が増幅されることが確かめられている (Lawton *et al.* 1994).

Mounsrimuangdee ら (2011) の実験では, サリチル酸ナトリウムのみがエチレンと一定の相互効果を示したが, サリチル酸メチルは効果がないか, もしくはやや抑制的であった. 同様にジャスモン酸とエスレルにサリチル酸メチル, あるいはサリチル酸ナトリウムを混和した処理では, かえってコナラの防御反応を抑制するような結果となった. これらのことから, 植物の防御反応に関わる物質の相互作用についてはなお不明な点が多く, 最適濃度もふくめて精度の高い研究情報が必要であろう.

コナラ属の樹木は, カシノナガキクイムシ (*Platypus quercivorus*) をベクターとするナラ菌 (*Raffaella quercivora*) の感染によって木部道管の通水機能が停止し, 急速な枯死にいたる (Kuroda 2001; Kubono & Ito 2002; Murata *et al.* 2005). 木部の着色現象, すなわち傷害心材の形成は, コナラのナラ菌の感染に対する防御反応であるが, 解剖学的には菌の侵入によって木部繊維や小道管に起こる着色成分の沈着である (Kuroda 2001). Mounsrimuangdee ら (2011) の研究でも, コナラに対するナラ菌の接種は多くの先行研究 (Yamada *et al.* 2003; Murata *et al.* 2007) と同様に, 辺材部の着色を顕著に増加させた. さらに, 傷害やナラ菌の人為的な接種によるコナラ辺材部の着色は, 接線方向よりも軸方向に進行することを認めた.

Kuroda (2001) は, ナラ菌の感染によって生じる着色部の広がり, 接線方向や放射方向よりも軸方向に進行することから, 菌糸が細胞壁や有縁壁孔を貫通・透過するよりも道管の内腔に沿って展開していく可能性を述べている. このような結果は, ユーカリ属の *Eucalyptus globulus* や *E. nitens* でも観察されており, 枝打ち, 傷つけ処理, あるいは白色腐朽菌の接種によって生じる着色や腐朽はもっぱら軸方向に進行する (Deflorio *et al.* 2007). 薬剤処理では, 接線方向の着色長は軸方向に比べてやや異

なっていたが, これはコナラの木部内における薬剤の転流や移動は接線方向にはきわめて困難であることに起因するのかもしれない.

コナラの着色木部内の物質沈着についての組織化学的な観察では, 菌接種実験, 薬剤処理実験とも, 脂質やフェノール性物質を観察した. 同様の物質は, ミズナラ (*Q. crispula*) にナラ菌を接種した実験でも観察されている (Yamada *et al.* 2003). インドセンダン (*Azadirachta indica*) では, 幹が人為的な傷害を受けるとフェノール性物質の組成に変化が生じ, 菌の感染に対して防御機能を持つフェノール類が増加してくる (Rajput *et al.* 2009). しかしながら木部の着色における生化学的な変化は複雑であり, 侵入微生物の作用によるアルカロイドの代謝に関連するさまざまな化合物が含まれる (Hillis 1987). Mounsrimuangdee ら (2011) の研究における組織化学的な変化は, 傷害や菌の感染に対する化学的防御特性の一端を示すものであろう.

本稿で紹介した研究結果は, 外から与えた反応誘導物質がコナラ樹幹でも病傷害に対する防御反応を引き起こすことができることを明らかにしたものである. 今後はこの結果をベースとして, ナラ枯れ現象解明のためのより精度の高い解析が必要であろう.

## 引用文献

- Chappell, J., K. Hahlbrock & T. Boller. 1984. Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia-lyase. *Planta*. 161: 475-480.
- Deflorio, G., K.M. Barry, C. Johnson & L.C. Mohammed. 2007. The influence of wound location on decay extent in plantation-grown *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. *Forest Ecology and Management* 242: 353-362.
- Hillis, W.E. 1987. *Heartwood and tree exudates*. Springer-Verlag, Berlin.
- Hudgins, J.W., E. Christiansen & V.R. Franceschi. 2003. Methyl jasmonate induces changes mimicking anatomical defenses in diverse members of the Pinaceae. *Tree Physiol.* 23: 361-371.
- Hudgins, J.W. & V.R. Franceschi. 2004. Methyl jasmonate-induced ethylene production is responsible for conifer phloem defense responses and reprogramming of stem cambial zone for traumatic resin duct formation. *Plant Physiol.*

- 135: 2134-2149.
- Hudgins, J.W., S.G. Ralph & V.R. Franceschi. 2006. Ethylene in induced conifer defense: cDNA cloning, protein expression, and cellular and subcellular localization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in resin duct and phenolic parenchyma cells. *Planta* 224: 865-877.
- Kozłowski, G., A. Buchala & J.P. Métraux. 1999. Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings against *Pythium ultimum* Trow. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 53-58.
- Krokene, P., N.E. Nagy & H. Solheim. 2008. Methyl jasmonate and oxalic acid treatment of Norway spruce: anatomically based defense responses and increased resistance against fungal infection. *Tree Physiol.* 28: 29-35.
- Kubono, T. & S.I. Ito. 2002. *Raffaelea quercivora* sp. nov. associated with mass mortality of Japanese oak, and the ambrosia beetle (*Platypus quercivorus*). *Mycoscience* 43: 255-260.
- 黒田慶子・鈴木和夫 (編) 1999. 樹木医学 77-79, 214-215 朝倉書店
- Kuroda, K. 2001. Response of *Quercus* sapwood to infection with the pathogenic fungus of a new wilt disease vectored by the ambrosia beetle *Platypus quercivorus*. *J. Wood Sci.* 47: 425-429.
- Lawton, K.A., S.L. Potter, S. Uknes & J. Ryals. 1994. Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *The Plant Cell* 6: 581-588.
- Moungsrimuangdee, B., H. Moriwaki, M. Nakayama, S. Nishigaki and F. Yamamoto. 2011. Effects of injection of Ethrel, methyl jasmonate, and salicylates and *Raffaelea quercivora* inoculation on sapwood discoloration in *Quercus serrata*. *IAWA Journal*, Vol. 32 (1), 41-53.
- Murata, M., T. Yamada & S.I. Ito. 2005. Change in water status in seedlings of six species in the *Fagaceae* after inoculation with *Raffaelea quercivora* Kubono et Shin-Ito. *J. For. Res.* 10: 251-255.
- Murata, M., T. Yamada, Y. Matsuda & S. Ito. 2007. Discoloured and non-conductive sapwood among six *Fagaceae* species inoculated with *Raffaelea quercivora*. *For. Path.* 37: 73-79.
- 仲下英雄・小柴恭一 (編)・神谷勇次 (編)・勝見允行 (編) 2006. 植物ホルモンの分子生物学—成長・分化・環境応答の制御機構 257-267.
- Nürnbergger, T. & D. Scheel. 2001. Signal transmission in the plant immune response. *TRENDS in Plant Science* 6: 372-379.
- Popp, M.P., J.D. Johnson & M.S. Lesney. 1995. Changes in ethylene production and monoterpene concentration in slash pine and loblolly pine following inoculation with bark beetle vectored fungi. *Tree Physiol.* 15: 807-812.
- Rajput, K.S., G.V. Sanghvi, R.D. Koyani & K.S. Rao. 2009. Anatomical changes in the stems of *Azadirachta indica* (Meliaceae) infected by pathogenic fungi. *IAWA J.* 30: 27-36.
- Savidge, R.A. 1988. Auxin and ethylene regulation of diameter growth in trees. *Tree Physiol.* 4: 401-404.
- Shain, L. & W.E. Hillis. 1972. Ethylene production in *Pinus radiata* in response to *Sirex Amylostereum* attack. *Phytopathol.* 62: 1407-1409.
- Shain, L. & W.E. Hillis. 1973. Ethylene production in xylem of *Pinus radiata* in relation to heartwood formation. *Can. J. Bot.* 51: 1331-1335.
- Shain, L. 1995. Stem defense against pathogens. In: B.L. Gartner (ed.), *Plant stems: physiology and functional morphology*: 383-406. Academic Press, Tokyo.
- Shigo, A.L. & H.G. Marx. 1977. Compartmentalization of decay in trees. *USDA Forest Service Agriculture Information Bulletin* 405; USDA Forest Service, Washington DC.
- Stahmann, M.A., B.G. Clare & W. Woodbury. 1966. Increased disease resistance and enzyme activity induced by ethylene and ethylene production by black rot infected sweet potato tissue. *Plant physiol.* 41: 1505-1512.
- 高畑義啓・衣浦晴生・黒田慶子 (編) 2008. ナラ枯れと里山の健康 11-88 林業改良普及協会
- Xu, Y., P.F.L. Chang, D. Liu, M.L. Narasimhan, K.G. Raghothama, P.M. Hasegawa & R.A. Bressan. 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl

jasmonate. *The Plant Cell* 6: 1077-1085.

Yamada, T., Y. Ichihara & K. Hori. 2003. Defense responses of oak trees against the fungus *Raffaelea quercivora* vectored by the ambrosia beetle *Platypus quercivorus*. Proceedings: IUFRO Kanazawa 2003 "Forest Insect Population Dynamics and Host Influences".

Zeneli, G., P. Krokene, E. Christiansen, T. Krekling & J. Gershenzon. 2006. Methyl jasmonate treatment of mature Norway spruce (*Picea abies*) trees increases the accumulation of terpenoid resin components and protects against infection by *Ceratocystis polonica*, a bark beetle-associated fungus. *Tree Physiol.* 26: 977-988.

