

## 옥시테트라사이클린을 處理한 대추나무 빗자루病 감염木의 病態解剖學的 研究

任桐彬 · 羅瑤俊 · 林雄圭 · 張卓重 · 申載斗 · 李淳炯\*

서울大學校 農科大學

\* 農村振興廳 農業技術研究所 病理科

## Histopathological Studies of Witches' Broom Infected Jujube Trees Treated by Oxytetracycline

Hyong Bin Im, Yong Joon La, Ung Kyu Lim, Tag Jung Chang,  
Jai Doo Shin and Soon Hyung Lee\*

College of Agriculture, Seoul National University, Suweon, 170, Korea

\* Department of Plant Pathology, Institute of Agricultural Sciences, Suweon, 170, Korea

### 要 約

마이코플라스마(MLO)에 의한 빗자루病에 感染된 대추나무에 Oxytetracycline HCl (OTC)을 樹幹注入했을 때 일어나는 病態解剖學的 變化를 光學顯微鏡, 螢光顯微鏡 및 電子顯微鏡 技法을 利用하여 調查하였다. 健全葉에서와는 달리 罹病葉의 主脈에서는 腹, 背部의 維管束鞘伸長部가 잘 발달되어 있는 반면 葉肉細胞들은 매우 작고 드물었으며 壞死되어 있었다. 또한 罹病葉에서는 節部가 과도하게 형성되어 있는 반면, 木部의 分化는 억제되어 있었으며, polyphenol이 集積되어 있었다. 2,000ppm의 OTC용액 500ml를 樹幹注入한 대추나무는 약제주입부위의 상부에서 外觀上 病徵이 완전히 억제된 것으로 보였으나 維管束鞘伸長部に 있는 세포들이 비대해져 있었으며 主脈의 2期節部에서는 節筵이 壞死되어 있었다. MLO特異的 螢光은 OTC 處理 感染木의 試料에서는 관찰되지 않은 반면, 無處理 MLO感染대추나무에서는 상당량의 MLO特異的 螢光이 관찰되었다. 전자현미경 관찰에서는 감염목의 체관 및 伴細胞들이 파괴되어 있었으며 柔組織細胞들은 커다란 澱粉粒이 들어있는 原形質體를 갖고 있었고, OTC처리조직들은 건전조직에 비해 비정상적인 전분축적을 나타냈다. 마이코플라스마는 감염조직의 성숙한 체관에서만 관찰되었으며 OTC 處理木의 체관에서 전혀 관찰되지 않았다.

### ABSTRACT

Histopathological changes in the witches'-broom mycoplasma (MLO) infected jujube trees after trunk injection of oxytetracycline HCl (OTC) solution were investigated by using light microscope, fluorescence microscope and electron microscope. In contrast to the healthy leaves, adaxial and abaxial bundle sheath extensions in the major veins of diseased leaves were highly developed, but mesophyll cells were very small, loose and

\* 이 논문은 1984년도 문교부 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

necrosed. In the diseased leaves, excessive phloem was formed, xylem differentiation was suppressed and polyphenols were accumulated. Jujube trees treated with 500ml of 2000ppm solution of OTC showed complete remission of witches'-broom symptoms above the injection site, but cells in the sheath extension were hypertrophied and sieve tube necrosis occurred in the secondary phloem of major veins. MLO-specific fluorescence was not observed in the samples of diseased jujube trees treated with OTC, while those from non-treated infected trees distinctly showed a moderate amount of MLO-specific fluorescence. In the observation under the electron microscope, sieve element of diseased tissues and its associated companion cells were found to have collapsed. Parenchymas cells contained many large starch filled plastids and most samples of diseased and OTC-treated tissues showed an abnormal accumulation of starch compared to the healthy controls. Mycoplasma-like organisms were observed only within mature sieve elements in diseased tissues, but never in OTC-treated tissues.

**Key words:** witches'-broom mycoplasma, oxytetracycline, histology.

## 緒 論

대추나무·빛자루病은 韓國, 中國大陸 및 印度 등지에 分布하는 대추나무(*Zizyphus jujuba* Mill.)의 치명적인 病으로서 일단 發病하면 열매가 열리지 않을 뿐만 아니라 2~3年內에 나무가 죽게됨으로 대추나무 재배의 가장 큰 障害要因이 되고 있다.

대추나무·빛자루病에 관한 研究로서는 1960年代에 洪(7,8)과 金(9,10) 등이 健全木과 感染木의 생육정도와 葉數 및 잎의 크기 등에 관한 外部形態學의 特徵과 權病葉에서의 節部要素의 退化, 背面葉脈 表皮細胞의 불규칙 배열, 柔細胞層에서의 組織壞死 및 多量의 澱粉粒 出現 등의 解剖學的 特徵을 光學顯微鏡으로 관찰하여 보고한 바 있다.

이 病은 病徵이 全身性이고 接木傳染이 잘되는 점 등으로 미루어 오랜동안 바이러스에 의한 病으로 알려져 왔으나 최근에 이르러 이 病의 病原體는 바이러스가 아니고, 마이코플라스마라는 새로운 사실(19)과 마름부늬매미충(*Hishimonus sellatus*) 이 病原體를 매개한다는 것이 밝혀졌다(12). 한편, 1976년에 羅 등(11)은 항생제인 Oxytetracycline·HCl(OTC) 용액을 樹幹에 注入함으로써 빛자루病에 感染된 대추나무를 치료할 수 있다고 보고한 바 있다. 그러나, 지금까지 OTC를 수간 주입하였을 경우의 副作用이 억제된다는 사실만이 보고되었을 뿐, 병징 억제현상에 대한 病態解剖學的 研究는 없다. 따라서 이 研究는 OTC의 수간주입에 따른 빛자루병감염 대추나무의 病態解剖學的 變化를 추구함으로써 보다 效果的인 防除法의 開發에 필요한 基礎資料를 얻음

의 목적으로 실시하였다.

## 材料 및 方法

1984年 6月부터 9月까지 경기도 安城과 水原에서 채집한 健全, 感染 및 OTC處理 感染대추나무의 잎과 一年生가지를 채취하여 試料로 사용하였다.

OTC處理는 1984年 4月 15日 安城에서 빛자루病에 感染된 15~20年生 대추나무 11株를 선발하여 樹幹注入하였다. 수간주입은 羅(11) 등이 사용한 OTC수간주입법으로 하였는데, 이 方法은 길기드린을 이용하여 대추나무의 기부에 서로 반대되는 2개의 구멍(직경 4mm, 깊이 약 3cm)을 뚫고, 2000ppm의 옥시테트라사이클린용액 500ml를 樹幹注入器에 담아 1~1.5m 정도의 높이에 고정시킨후 어둠 약제가 고무관을 통하여 구멍으로 서서히 주입확산 되도록 하였다.

잎과 1년생 가지를 FAA에 고정시킨후 n-butyl alcohol로 탈수를 하여 파라핀으로 包埋하였으며, 切片은 약 12 $\mu$ m의 두께로 절단하고, xylene으로 脫 파라핀한후 Iron-Hematoxylin으로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다(3).

형광 현미경에 의한 관찰은 5% 글루탈알데하이드를 넣은 인산완충액(pH 7.0)으로 시료를 고정시킨후 徒手로 20~30 $\mu$ m 두께의 횡단전편을 만들어 슬라이드글라스위에 놓고, 1 $\mu$ g/ml의 DAPI(4,6-diaminodino-2-phenylindole)를 넣은 인산완충액(pH 7.0)으로 20~30분간 室溫에서 염색하여 검경하였다. 염색전편은 반사광과 exciter filter MNG2 및 barrier filter GG 400+GG 420의 filter 조합을

갖는 Vicker M17 형광현미경하에서 관찰하였다.

또한 전자현미경으로도 관찰하였는데, 잎의 주맥을  $1 \times 3 \text{ mm}$ 로 잘라서 2.5% 글루탈알데하이드 용액을 넣은 0.1 M 인산완충액(pH 7.0)으로 1次固定을 한 후, 2% osmium tetroxide와 5% sucrose를 넣은 0.2 M 인산완충액으로 2次固定을 하였다. 고정된 시료는 에틸알코올로 탈수한 후 Propylene oxide-Epon mixture로 包埋하였다. 包埋한 시료는 초박편질단기로 약 100 nm 두께로 切斷한 후 Uranil acetate 및 Lead citrate로 染色하여 Hitachi Hu-11E형 전자현미경으로 관찰하였다.

### 結 果

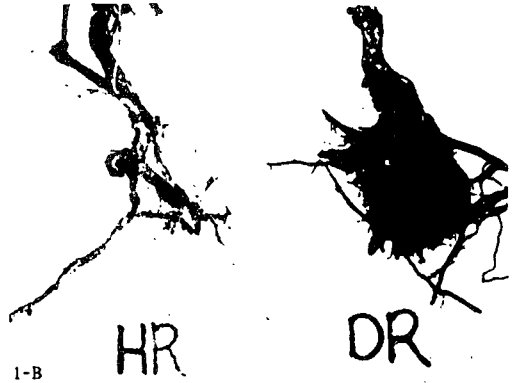
外部病徵. 마이코플라스마에 감염된 대추나무는 가지가 총생하고 건전목에 비해, 잎이 작아지며 花



1-A

Fig. 1-A. Twigs of jujube trees infected with witches'-broom (right) and healthy (left).

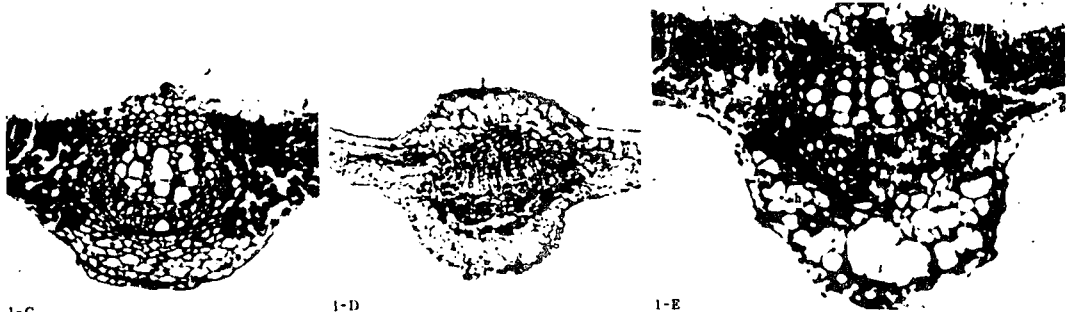
器가 영양기관으로 변태한, 소위 葉狀化(phyllody) 현상을 보이고 빗자루병징을 나타냈다(Fig. 1-A). 또한 感染木의 뿌리에서는 부정근이 叢生하여 지상부에서와 마찬가지로 빗자루병징을 나타냈다(Fig. 1-B).



1-B

Fig. 1-B. Roots of jujube trees; HR, healthy root; DR, diseased root infected with witches'-broom. Adventitious roots were excessively developed.

光學顯微鏡에 의한 관찰. 건전목, 감염목 그리고 OTC處理 감염목의 잎의 주맥을 횡단하여 광학현미경으로 비교관찰하였다. 健全木에 있어서는 成葉의 주맥이 並立維管束인 목부와 사부, 그리고 片壁組織이 이것을 包圍하고 있으며 유관속초 伸長部에 의하여 지지되어 있다(Fig. 1-C). 그런데 감염목의 주맥은 건전목의 것과는 달리 사부가 과도하게 발달되어 있는 반면 목부의 발달이 억제되어 있었으며 腹, 背部의 유관속초 신장부가 건전목보다 더 크게 발달되어 있었다. 그리고 신장부에 있는 세포들의 상당



1-C

1-D

1-E

Fig. 1-C, D, E. Major lateral veins of healthy (C), witches'-broom diseased (D) and oxytetracycline treated (E) jujube leaves. C) Major vein of healthy jujube leaf. D) Adaxial and abaxial sheath extenrtions were extended. Cells in the adaxial sheath extention were hypertrophied (h). Dark staining due to accumulation of polyphenols. Excessive phloem was formed. E) Abaxial sheath extension was largely extended. Cells in abaxial rib were severely hypertrophied (h).

수가 심한 肥大現狀(hypertrophy)을 나타내고 있었다. 또한 染色 결과 사부에 폴리페놀(polyphenol)이 集積되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 1-D). OTC 處理感染木에서는 외관상 거의 健全木의 組織과 비슷하게 회복되어 있음을 보였으나 이들 주맥은 유관속초 신장부에 있는 세포들이 비대하여 신장부가 健全木에 비해 현저히 더 발달되어 있었다. 그러나 木部和 節部에서의 조직학적 病狀은 발견되지 않았다(Fig. 1-E). 健전목의 葉肉組織에서는 柵狀組

織이 조밀하게 잘 발달되어 있고 세포의 크기도 크고 규칙적인 수직배열을 하고 있었다(Fig. 2-A). 그러나, 感染木의 葉肉조직들은 柵狀組織에서나 海綿狀組織에서 그 크기가 매우 작고 細胞間隙이 발달되어 있었으며 세포배열이 흐트러져 있었다(Fig. 2-B). OTC 處理感染木에서는 葉肉細胞들의 크기가 健전목에 비해 다소 작았으나 대체적으로는 健전목의 것에 가까웠다(Fig. 2-C).

螢光顯微鏡에 의한 관찰. DAPI로 염색한 잎의

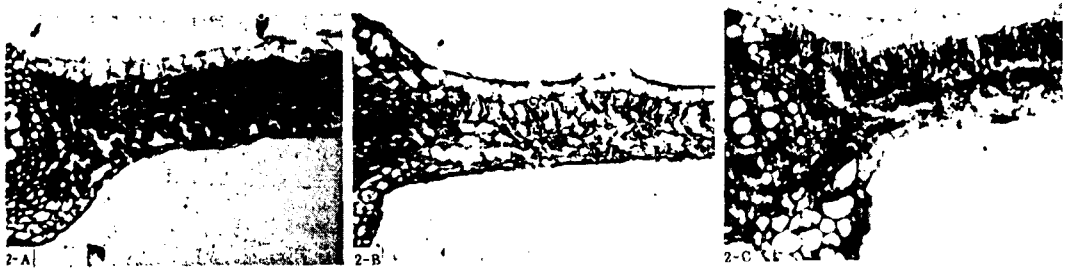


Fig. 2-A, B, C. Mesophyll cells of the healthy (A), diseased (B) and oxytetracycline treated (C) jujube leaves. (X200). B) Mesophyll cells were very small in size, palisade parenchyma cells in the adaxial rib were necrosed and/or lacked developed chloroplasts. C) Mesophyll cells were abnormal. Parenchyma cells in the abaxial rib were loosed and lacked developed chloroplasts.

中肋 및 일년생가지의 줄기내에 있는 節部要素를 형광현미경으로 관찰한 결과 健全木의 葉肉에서는 MLO의 특이적 螢光反應이 발견되지 않은 반면(Fig. 2-D, 3-A), 感染木의 葉肉에서는 뚜렷한 형광반응을 볼 수 있었다(Fig. 2-E, 3-B). 그러나 OTC 處理感染木의 葉肉에서는 MLO-특이적 형광을 전혀 발견할 수 없었다(Fig. 2-F, 3-C). 이것은 마이크로플라스마가 피사분해 되었음을 의미하는 것이다.

電子顯微鏡에 의한 관찰. 주로 健전목, 感染木 및 OTC 處理感染木의 잎의 中肋 유관속을 관찰하였다. 健전목의 주맥의 사부에는 일반적으로 柔組織細胞내

에서 보는 핵, 미토콘드리아, 색소체 및 小胞體 등 세포기관이 正常的으로 배치되어 있었으며 (Fig. 3-D) 傳移細胞(transfer cell)에서는 세포벽의 內陷이 보였다.(Fig. 3-D). 伴細胞에는 原形質이 충만하였고 사부요소에는 사부단백질(P-단백질)이 세포질내에 축적된 세포가 있었다(Fig. 3-E).

감염목의 中肋에 있는 1기 葉肉에서는 단위막으로 되어 있는 多形性의 MLO가 관찰되었으며, MLO의 영향으로 細胞벽이 비후되어 있고, 葉肉이 붕괴되어 있었다(6-E), 또한 사부유조직세포 및 伴細胞도 붕괴되어 있었다(Fig. 4-A, 4-B). 感染木

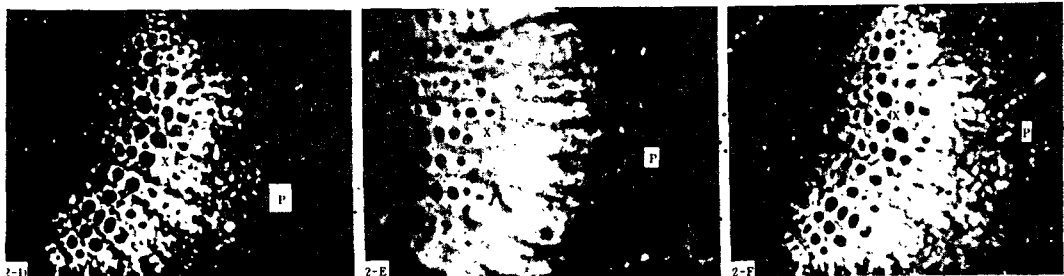


Fig. 2-D, E, F. Transverse sections of midvein of jujube leaves stained with DAPI (X125). D) healthy, E) diseased, F) oxytetracycline treated. The fluorescence spots are visible in the phloem of the diseased. P: phloem, X: xylem.

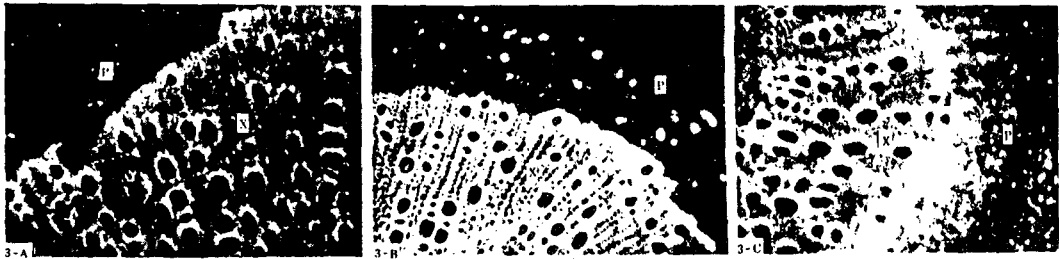


Fig. 3-A, B, C. Transverse sections of jujube stems stained with DAPI (X125). A) healthy, B) diseased. C) oxy-tetracycline treated. The fluorescence is visible in the phloem of the diseased. P: phloem, X: xylem.

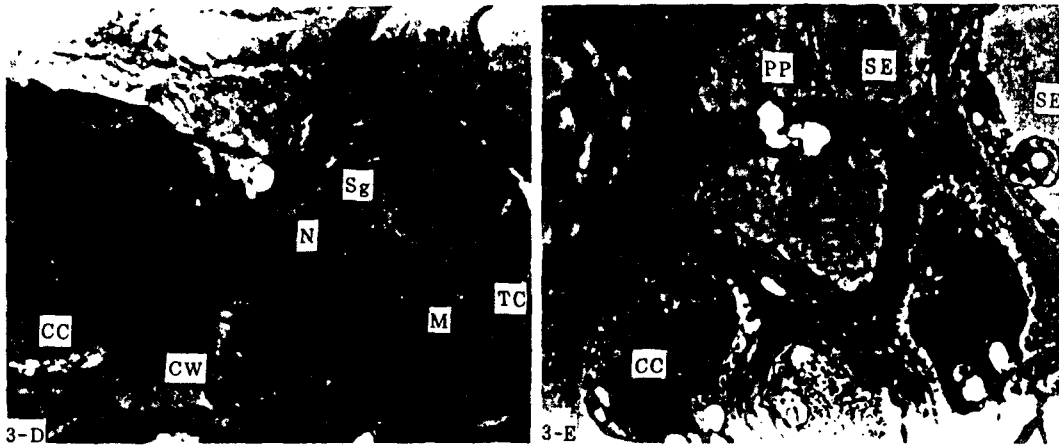


Fig. 3-D, E. Normal cells of jujube trees. D) Transfer cells (TC) from major vein of healthy jujube; Sg, starch grain; M, mitochondria; N, nucleus (X5000). E) Cross section of sieve element (SE) and companion cell (CC); CW, cell wall; PP, phloem protein plug (X5000).

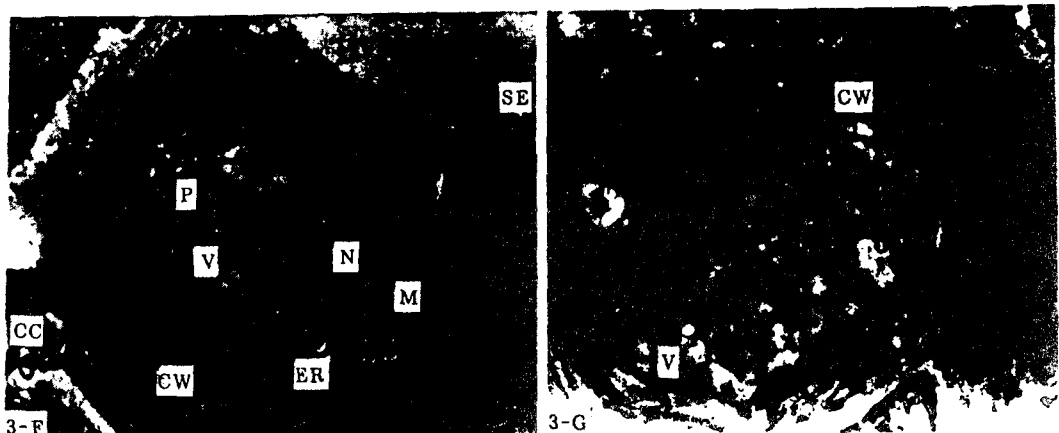


Fig. 3-F, G. Cross sections of secondary phloem in diseased (F) and OTC-treated (G) jujube. F) Sieve element (SE) and parenchyma cell (P); Parenchyma cell wall was thickened; companion cell was necrosed; CW, cell wall; N, nucleus; M, mitochondrion; ER, endoplasmic reticulum (X7700). G) Sieve element (SE); sieve element wall was thickened; V, vacuole, PP, P-protein (X6400).

의 유조직 세포내에는 健全木에서 보다 많은 양의 전분립이 축적되어 있었으며 전분립의 모양도 불규칙하였다(Fig. 4-B).

OTC處理感染木에서는 체관에서 MLO가 관찰되

지 않았고(Fig. 4-B) 健全木에 가까운 모양을 하고 있었으며 붕괴현상도 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 3-G, 4-B). 그러나 전분립이 사부요소내에 不定形으로 축적되어 있는 特異的 현상을 관찰 할 수 있

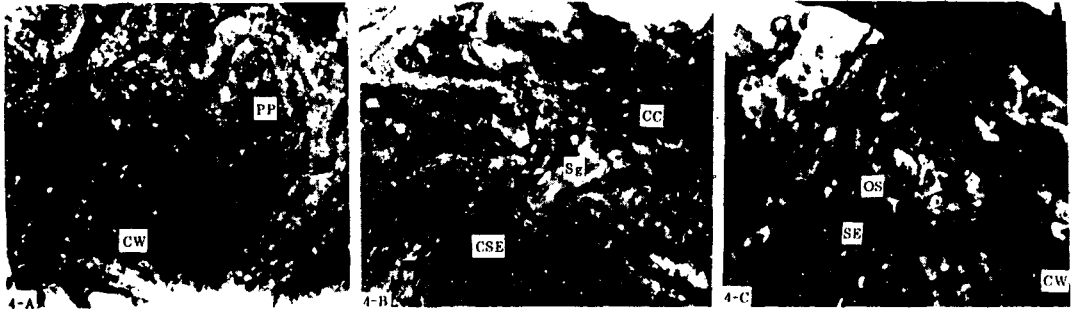


Fig. 4-A, B, C. Cross section of secondary phloem in diseased (A, B) and OTC-treated (C) jujube. A) Crushed sieve element (CSE); PP, P-protein (X8800). B) Crushed sieve element (CSE) and companion cell (CC); protein crystal and starch grain contained in companion cell; Sg, starch grain (X5000). C) Sieve element containing protein crystal and round-grain of sieve element starch; CW, cell wall; SE, sieve element; Sg, starch grain; OS, osmiophilic substance (X6400).

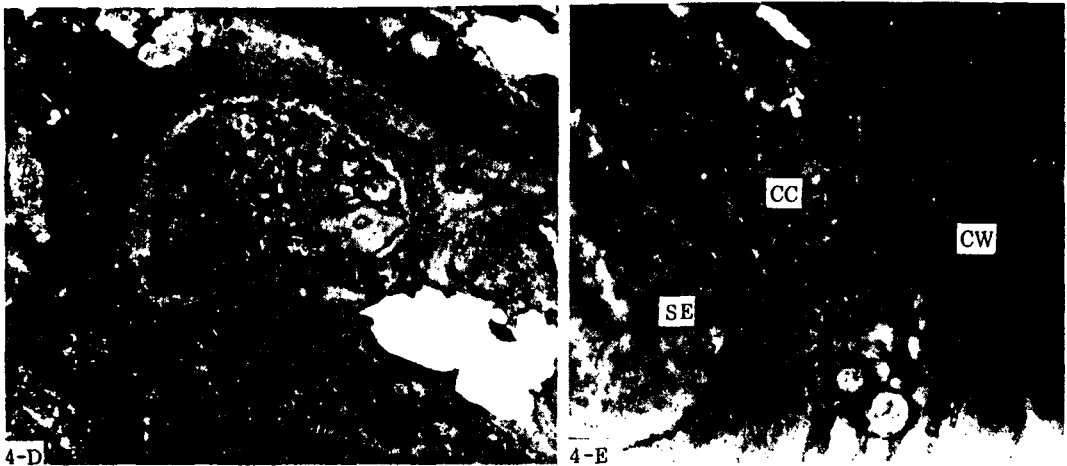


Fig. 4-D, E. Cross section of sieve element in diseased (D) and OTC-treated (E) jujube. D) Mass of MLO in sieve element showing various forms (X12000). E) Sieve element in OTC-treated jujube; MLO were not observed; SE, sieve element; CC, companion cell; CW, cell wall (X6400).

었다(Fig. 4-C).

### 考 察

Davey & Staden(3)은 마이크로플라스미에 감염되어 엽상화와 황녹색화(virescence)를 나타낸 *Catharanthus roseus*의 꽃과 잎에서 cytokinin과 같은 세포분열촉진호르몬의 함량이 높은 수준으로 변화됨을 보고하고 있다.

사이토키닌은 엽복제의 발달과 엽복소의 파괴를 방지하는데 중요한 역할을 하는 식물호르몬으로써 보통 전진한 식물에서는 뿌리에서 생산되어 줄기로 올라간다. 그러나 현재로서는 생산된 사이토키닌을 마이크로플라스미 자신이 이용하는지의 이유에 대해서는 잘 알지 못하며 식물체내에서 사이토키닌의 합성능력을 크게 증대시키는 것으로 알려져 있다. 최근에는 auxin과 사이토키닌, 특히 kinetin과 같은 식물호르몬의 길항작용에 의하여 빛자루病徴의 형성기

작을 설명할 수 있게 되었다. 속 빛자루병 형성은 본질적으로 정아에서 생산되는 auxin에 의한 頂芽優勢現象이 마이코플라스마의 기생에 의한 kinetin 過生産으로 頂芽말의 휴면아의 성장억제가 완전히 제거되기 때문에 가지가 총생됨으로서 일어나는 현상이라고 했다(2, 3, 5, 18).

Schneider(16)는 Pear decline에서 지나친 사부의 발달과 목부의 발달억제, 그리고 폴리케놀과 전분의 축적이 유관속초 유조직에 나타났다고 했다. 본 연구의 결과도 이들 결과와 비슷하나 대추나무에서는 체관에 폴리케놀의 축적이 많았다(1, 14, 15). 병에 감염된 葉脈의 abaxial rib에서 이상비대(hypertropy)가 보였고, 또한 과도한 사부의 형성에 이어 새관의 피사가 일어났고 이상비대의 영향으로 유관속초 신장부가 발달되어 있었다. Schneider(15)는 복숭아의 buckskin病과 감자의 잎마름病은 세 1차적인 현상으로 피사가 일어나고 그 다음으로 사관부의 구조에 변화가 일어난다고 하였으나, 이와는 달리 빛자루병의 증상은 1차적인 현상으로 조직의 분화에 이상이 생기고 2차적인 증상으로 피사가 일어나는 Blm의 사부피사와 그 증상이 비슷했다(7). 피사, 이상비대 그리고 이상증식(hyperplasia) 현상들은 건진식물의 생리치 또는 생화학적 과정이 아니며 病原體에 대한 기주식물자체의 반응이라고 생각된다.

Schneider(16)는 감염식물내에서 마이코플라스마의 기생으로 기주식물에 의해 생산된 toxin이 엽맥으로부터 세 2기 사부로 옮기게 유조직의 피사를 일으키고 또한 유관속초와 그 주변 조직으로 이동하여 병징을 나타낸다고 했다(15).

Schaper(14)는 사과나무와 배나무의 줄기 사부에서 형광현미경으로 마이코플라스마를 관찰했으며 줄기내의 마이코플라스마는 여름부터 가을까지 최대로 增加한다고 했다. 이것으로 미루어, 본연구에서 새싹이 7월에 이루어졌으므로 줄기에서 가장 많은 병징이 관찰되었다고 생각된다(17).

Fig. 4-1)에서 보면 마이코플라스마가 막에 둘러싸여 있는데 마이코플라스마와 관련된 몇가지 식물의 병에서는 마이코플라스마는 단위막에 둘러싸여 있으며 그 막은 전자밀층(electron dense layer)이고 그 사이에는 투명한 층이 있다는 보고가 있다(13). 또한 Fig. 4-1)에 나타난 작은 알갱이는 마이코플라스마 번식과정에 생기는 elementary body와 관련이 있다고 생각된다.

Fig 3-D와 F는 엽맥의 사부내에 있는 전이세포(transfer cell)이며 엽록체, 미토콘드리아, 액포 등의 기관이 고르게 발달한 것을 볼 수 있다. 세포벽의 주름은 전이세포가 内殖(ingrowth)한 것이다.

Schneider(16)는 Pear decline증상에서 ① 엽맥의 제 2기 사부의 체관에서 마이코플라스마가 다수 발견되었으며 ② 유관속내의 조직의 손상이 보였고 ③ 제 2기 사부체관의 피사를 관찰했다고 보고 했다. 본 연구에서 다른 빛자루병에 감염된 대추나무 엽맥에서의 전자현미경 관찰에서도 이들 학자들의 결과와 대체로 일치하였다.

그리고 OTC처리 감염목은 외관상 완전히 회복된 것으로 보였으나 조직학적으로 조사한 결과 유관속초 신장부세포의 비대, 진분류의 기형화 및 異常蓄積 등과 같이 세포학적으로는 완전한 건진목처럼 회복이 되지 않았음을 알 수 있었다.

## 參 考 文 獻

1. BRAUN E. J. & SINCLAIR, W. A. (1976). Histopathology of phloem necrosis in *Ulmus americana*. *Phytopathology* 66: 598-607.
2. BURROWS, W. J. (1975). Mechanism of action of cytokinins. *Current Adv. Plant Sci.* 7:837-847.
3. DAVEY, J. E. & STADEN, J. V. (1981). Endogenous cytokinin levels and developments of flower virescence in *Catharanthus roseus* infected with mycoplasmas. *Physiol. Plant Pathol.* 19: 193-200.
4. FEDER, N. & O'BRIEN, T. P. (1968). Plant microtechnique: Some principles and new methods. *Am. J. Bot.* 55(1): 123-142.
5. HALL, R. H. (1973). Cytokinin as a probe of developmental processes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 415-444.
6. HIBINO, H. & SCHNEIDER, H. (1960). Mycoplasma bodies in sieve tubes of pear trees affected with pear decline. *Phytopathology* 60: 499-501.
7. HONG, S. W. & KIM, C. J. (1960). A study of virus disease on chinese date trees (1). On the external and the internal morphological characteristics of disease infected plants.

- Korean J. Bot.* 3(2): 29-34.
8. HONG, S. W. (1960). A study of virus disease on Chinese date trees (2) On the anatomical effects of the shoot cluster disease on the vascular structure of the infected plants. *Korean J. Bot.* 3(2): 29-34.
  9. KIM, C. J. (1965). Witches'-broom of jujube tree (*Zizyphus jujuba* Mill.) (3) Transmission by grafting. *Korean J. Microbiol.* 3:1-6.
  10. KIM, C. J. (1965). Witches'-broom of jujube tree (*Zizyphus jujuba* Mill.) *Research Bull. Choonchun Agricultural College.* No. 2:47-53.
  11. LA, Y. J., BROWN, JR. W. M. & MOON, D. S. (1976). Control of witches'-broom disease of jujube with oxytetracycline injection. *Korean J. Plant Prot.* 15(3): 107-110.
  12. LA, Y. J. & WOO, K. S. (1980). Transmission of jujube witches'-broom mycoplasma by the leafhopper *Hishimonous sellatus* Uhler. *J. Korean Forest Society* 48:29-39.
  13. PLAVSIC-BANJAC, B., HUNT, P., & MARA-MOROSCH, K. (1972). Mycoplasma-like bodies associated with lethal yellowing disease of coconut palms. *Phytopathology.* 62: 298-299.
  14. SCHAPER, U. & SEEMULLER, R. (1982). Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology.* 72: 736-742.
  15. SCHNEIDER, H. (1973). Cytological and histological aberrations in woody plants following infection with viruses, mycoplasmas, rickettsias and flagellates. *Ann. Rev. Phytopath.* 11: 119-146.
  16. SCHNEIDER, H. (1976). Indicator hosts for pear declines, symptomatology, histopathology, and distribution of mycoplasma-like organisms in leaf veins. *Phytopathology* 67: 592-601.
  17. SINHA, R. C. & PETERSON, E. A. (1971). Uptake and persistence of oxytetracycline in aster plants and vector leafhoppers in relation to inhibition of clover phyllody agent. *Phytopathology* 62: 50-56.
  18. SKOOG, F. & ARMSTRONG, D. J. (1970). Cytokinins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21:359-384.
  19. YI, C. K. & LA, Y. J. (1973). Mycoplasma-like bodies found in the phloem elements of jujube trees infected with witches'-broom disease. *Research Report of the Forest Research Institute of Korea.* No. 20:111-114.