

# **Effect van energieniveau en energiesoort van het rantsoen op de energiebalans en lactatiepersistentie bij melkvee na een verkorte of geen droogstand**

R.J. van Hoeij, J. Dijkstra, R.M. Bruckmaier, J.J. Gross, T.J.G.M. Lam, G.J. Remmelink, B. Kemp, en A.T.M. van Knegsel

## **Inleiding**

Het is bekend dat het verkorten of weglaten van de droogstand resulteert in een minder negatieve energiebalans, veroorzaakt door een lagere melkproductie van de koe in de volgende lactatie (De Feu et al., 2009; Rastani et al., 2005; Van Knegsel et al., 2014). De energiebalans van koeien met een verkorte of zonder droogstand is niet alleen positiever in begin lactatie, maar ook in mid en eind lactatie (Chen et al., 2016); met name koeien zonder droogstand kunnen vervetten gedurende de volgende lactatie. Bovendien bleek het lastig om koeien voor een tweede keer een droogstand weg te laten, omdat een gedeelte van de koeien zichzelf droogzet aan het einde van de eerste lactatie (Chen et al., 2016).

De vraag is of rantsoenaanpassingen voor koeien met een verkorte of zonder droogstand de kans op vervetting kunnen verminderen of melkproductie en lactatie persistentie kunnen stimuleren. Van zowel verlagen van het energieniveau in het rantsoen als het voeren van meer lipogene nutriënten, in plaats van glucogene nutriënten, kan verwacht worden dat ze de insulineconcentratie in het bloed verlagen. Een lagere insuline concentratie zal de opslag van energie in het lichaam en vervetting verminderen. Een lagere insuline concentratie zou tevens als gevolg hebben dat de concentratie insulin-like growth factor (IGF-1) in het bloed lager is. IGF-1 heeft een negatief effect op de secretie van groeihormoon door de hypofyse. Daarmee kan verwacht worden de concentratie groeihormoon, welke van nature aanwezig is in het bloed, hoger is bij een verlaging van de plasma insuline concentratie door het lagere energieniveau of meer lipogene rantsoen. Van een hogere groeihormoon concentratie kan verwacht worden dat deze de melkproductie en lactatiepersistentie stimuleert.

Het doel van deze studie was om het effect te bepalen van een verlaagd energieniveau in het rantsoen en het verlagen van de hoeveelheid glucogene nutriënten in het rantsoen voor koeien zonder droogstand op de melkproductie, lactatiepersistentie, energiebalans en vervetting van melkvee in een volledige lactatie.

## **Toepassing in de praktijk?**

Bestaande experimentele studies naar het verkorten of weglaten naar de droogstand zijn uitgevoerd met een gelijk rantsoen voor alle koeien terwijl koeien met een verkorte of weggelaten droogstand minder melk produceren in de volgende lactatie dan koeien met een conventionele droogstand. Deze aanpak is vanuit wetenschappelijk perspectief logisch, maar is minder toepasbaar voor de praktijk aangezien een veehouder bij een verlaging van de melkgift ook het rantsoen zal aanpassen. De vraag is echter wat de

gevolgen zijn van het verlagen van het energieniveau in het rantsoen op de melkproductie van koeien met een verkorte droogstand. Ook is onbekend of een meer lipogeen rantsoen, in plaats van glucogeen rantsoen, vervetting vermindert en lactatiepersistentie stimuleert.

## **Materiaal en methode**

De materiaal en methode staat uitgebreid beschreven in bijbehorend wetenschappelijk manuscript (Van Hoeij et al., Submitted).

### *Experimentele opzet*

Holstein-Friesian melkkoeien (N=110) zijn geselecteerd op het proefbedrijf van de Dairy Campus in Lelystad (Wageningen Livestock Research). Vóór het droogzetten zijn koeien geblokt voor pariteit, verwachte kalfdatum, en melkproductie in de voorgaande lactatie en random verdeeld over drie behandelingen. Behandelingen bestonden uit een droogstand van 30 (30-d(STD)) of 0 dagen, waarbij in geen geval droogzetantibiotica zijn gebruikt. Binnen de groep koeien met een 0-dagen droogstand zijn koeien random toegewezen aan een rantsoen met standaard energieniveau (0-d(STD)) of een laag energieniveau (0-d(laag)). Het standaard (STD) energieniveau is gebaseerd op de verwachte melkproductie van koeien met een droogstand van 30 dagen. Het lage energieniveau is gebaseerd op de verwachte melkproductie van koeien met een droogstand van 0 dagen (Van Knegsel et al., 2014). Vanaf dag 49 na afkalven werden koeien random verdeeld over 2 lactatierantsoenen, of wel hoofdzakelijk lipogeen rantsoen, of wel een hoofdzakelijk glucogeen rantsoen. Koeien waren gehuisvest in een loopstal met roostervloer en ligboxen. Gedurende de lactatie werden de koeien tweemaal daags gemolken. De koeien met een droogstand van 30 dagen zijn drooggezet door ze 7 dagen voor droogzetten het droogstandsrantsoen te voeren en de laatste 4 dagen voor droogzetten eenmaal daags te melken. Op de dag van droogzetten zijn de koeien niet behandeld met een droogzetter of teatsealer. Koeien die waren ingedeeld zonder droogstand, maar zichzelf spontaan droogzetten, werden verwijderd uit de dataset. In dit rapport worden resultaten weergegeven van vanaf afkalven tot 44 weken na afkalven.

### *Rantsoenen*

Voor afkalven kregen koeien met een 30 dagen droogstand een droogstandsrantsoen en koeien die lacteerden een lactatierantsoen. Vanaf tien dagen voor afkalven kregen alle koeien 1 kg/d krachtvoer verstrekt. Na afkalven (pp.) werd het aandeel krachtvoer in het rantsoen stapsgewijs met 0,3 kg/d opgevoerd van 1 kg/d tot 8,5 kg/d op dag 28 pp voor koeien met een standaard energieniveau of tot 6,7 kg/d op dag 22 pp. voor koeien met een laag energieniveau. Het aandeel krachtvoer in het rantsoen werd stapsgewijs afgebouwd met 0,5 kg/wk, beginnend in week 15 van de lactatie naar 0 kg/d in week 31 van de lactatie voor koeien met het standaard energieniveau. Tijdens lactatie kregen koeien in de melkstal 1

kg/d lokbrok. Proefrantsoenen werden uit dezelfde ruwvoerpartijen samengesteld en werden onbeperkt verstrekt. Het basisrantsoen voor droogstaande koeien bestond uit graskuil, maiskuil, raapzaadschroot, tarwestro, ureum, en vitamines en mineralen in de verhouding 47:18:8:24:1:1 (DS basis) (5.4 MJ netto energie (NE)/kg DS; 780 VEM/kg DS). Het basisrantsoen voor lacterende koeien bestond tot dag 49 uit graskuil, maiskuil, sojaschroot, suikerbietenpulp, tarwestro, en ureum, vitamines en mineralen in de verhouding 44:34:8:10:2:2 (DS basis) (6.4 MJ NE/kg DS; 928 VEM/ kg DS). Rantsoenen waren geoptimaliseerd met als doel een verschil te creëren van 12% NE opname tussen het standaard rantsoen en het rantsoen met laag energieniveau. Vanaf dag 49 na afkalven kregen koeien ofwel en hoofdzakelijk glucogeen, ofwel hoofdzakelijk lipogeen basisrantsoen verstrekt. Het glucogene basisrantsoen, met standaard energieniveau, bestond uit graskuil, maiskuil, sojaschroot, tarwestro, en ureum, vitamines en mineralen in de verhouding 18:62:14:5:2 (DS basis) (6.5 MJ NE/kg DS; 942 VEM/ kg DS). Het lipogene basisrantsoen, met standaard energieniveau, bestond uit graskuil, suikerbietenpulp, sojaschroot, tarwestro, en ureum, vitamines en mineralen in de verhouding 62:29:7:1:2 (DS basis) (6.5 MJ NE/kg DS; 942 VEM/ kg DS). Voor de koeien met het lage energieniveau werden het glucogene en lipogene basisrantsoen verdund met stro. Het glucogene basisrantsoen, met laag energieniveau, bestond uit graskuil, maiskuil, sojaschroot, tarwestro, en ureum, vitamines en mineralen in de verhouding 16:52:15:15:2 (DS basis) (6.1 MJ NE/kg DS; 884 VEM/ kg DS). Het lipogene basisrantsoen, met laag energieniveau, bestond uit graskuil, suikerbietenpulp, sojaschroot, tarwestro, ureum en vitamines en mineralen in de verhouding 57:27:6:8:2 (DS basis) (6.3 MJ NE/kg DS; 913 VEM/ kg DS). Ingrediënt en berekende chemische samenstelling van de krachtvoerders en chemische samenstelling van de rantsoenen staat beschreven in het wetenschappelijk manuscript (Van Hoeij et al., Submitted).

### *Metingen en analyses*

Lichaamsconditie werd 4-wekelijks gescoord. Lichaamsgewicht werd bij droge koeien wekelijks gemeten, en bij lacterende koeien dagelijks en vervolgens gemiddeld per week. Melkproductie en voeropname (Insentec, Nederland) werden dagelijks gemeten en gemiddeld per week. Energiebalans werd berekend volgens het Nederlandse netto energiesysteem voor melkvee (VEM systeem; Van Es, 1975, Centraal Veevoederbureau, 2005). Melkmonsters voor vet, eiwit, lactose en celgetal (SCC) bepaling (ISO 9622, Qlip, Zutphen, Nederland) werden viermaal per week verzameld (dinsdagmiddag, woensdagmorgen, woensdagmiddag en donderdagmorgen) en gemiddeld per week. Productie van vet- en eiwit-gecorrigeerde melk (FPCM) werd als volgt berekend:

$$\text{FPCM} = (0.337 + 0.116 \times \text{vet \%} + 0.06 \times \text{eiwit \%}) \times \text{melkproductie (CVB, 2011)}.$$

Bloedmonsters zijn wekelijks genomen uit de staartvene op donderdagmorgen vanaf afkalven tot week 7 na afkalven. Bloedmonsters zijn tweewekelijks genomen uit de staartvene op donderdagmorgen van week 8 tot week 44 na afkalven. Bloedmonsters zijn gecentrifugeerd (20 min, 3000 × g) en plasma is

opgeslagen (-20°C) voor analyse. Plasmamonsters zijn geanalyseerd op insuline, IGF-1 en groeihormoon.

Gegevens zijn geanalyseerd met een herhaalde waarnemingen model (PROC MIXED (Littell et al., 1996) SAS® VERSIE 9.1; SAS Institute, Inc., Cary, NC) met koe als het herhaalde onderwerp. Behandelingsgroep (0-d(laag), 0-d(STD) of 30-d(STD)), lactatierantsoen (lipogeen of glucogeen), week (1, 2, 3,..44 pp), pariteit (2 of  $\geq 3$ ) en de relevante interactietermen zijn opgenomen in het model als fixed effecten.

## **Resultaten**

Het gerealiseerde aantal dagen droog was  $30 \pm 1$  dagen voor koeien met een korte droogstand.

### *Melkproductie en persistentie*

Effecten van droogstandslengte. Het weglaten van de droogstand verminderde de melkproductie (figuur 1a) en FPCM productie in de volledige volgende lactatie vergeleken met een droogstand van 30 d (tabel 1). Zowel het vet –als het eiwitpercentage waren hoger voor koeien zonder droogstand in vergelijking met koeien met een droogstand. De totale FPCM productie gedurende de eerste 44 weken van de lactatie was 8197 kg ( $\pm 203$ ) voor koeien zonder droogstand en 9741 kg ( $\pm 268$ ) voor koeien met een droogstand van 30 dagen. De lactatiepersistentie was beter voor koeien met een droogstand van 30 dagen in vergelijking met koeien met een droogstand van 0 dagen (relatieve afname in melkproductie per dag na piekproductie: 0.0023 vs. 0.0034 kg/d voor 30 vs. 0 dgn droog)

Effecten van verlaging van het energieniveau in het rantsoen. Het verlagen van het energieniveau in het rantsoen voor koeien zonder droogstand had geen effect op de melkproductie, FPCM productie of melksamenstelling gedurende de volledige volgende lactatie. Lactatiepersistentie werd niet beïnvloed door energieniveau in het rantsoen.

Effecten van energiesoort in het rantsoen. Het voeren van een meer lipogeen, in plaats van glucogeen, rantsoen verlaagde de melkproductie (figuur 1b), maar niet de FPCM productie gedurende week 1 tot en met 44 van de lactatie. Het lipogene rantsoen resulteerde in een hoger melkvetgehalte, in vergelijking met het glucogene rantsoen. Melkeiwitgehalte, lactosegehalte, en lactatiepersistentie werden niet beïnvloed door energiesoort in het rantsoen.

### *Energiebalans en vervetting*

Effecten van droogstandslengte. Het weglaten van de droogstand resulteerde in een lagere energieopname, een hogere energiebalans en de neiging tot een lagere drogestofopname, in vergelijking met een droogstand van 30 dagen. Koeien zonder droogstand waren gedurende week 1 tot en met 44

van de volgende lactatie zwaarder (figuur 2a) en hadden een hogere lichaamsconditiescore (BCS), dan koeien met een droogstand van 30 dagen.

Effecten van verlaging van het energieniveau in het rantsoen. Het verlagen van het energieniveau in het rantsoen voor koeien zonder droogstand had geen effect op de drogestofopname, maar resulteerde in een lagere krachtvoeropname (3,6 vs. 4,2 kg DS/d), lagere energieopname (990 vs. 1039 kJ/kg<sup>0.75</sup>\*d) en lagere energiebalans gedurende week 1 tot en met 44 van de lactatie. Het gemiddelde lichaamsgewicht of lichaamsconditiescore waren echter niet verschillend tussen koeien zonder droogstand met een laag of standaard energieniveau. Waarschijnlijk door toeval waren koeien met het standaard energieniveau direct na afkalven lichter dan koeien met een laag energieniveau. Koeien met het standaard energieniveau hadden wel een grotere gewichtstoename gedurende week 1 tot 44 van de lactatie dan koeien met het lage energieniveau.

Effecten van energiesoort in het rantsoen. Het voeren van een meer lipogeen rantsoen, in plaats van een glucogeen rantsoen, verlaagde de drogestofopname en energieopname, maar had geen gevolgen voor de energiebalans of het lichaamsgewicht van de koeien. Voor koeien zonder droogstand met het standaard energieniveau verhoogde het glucogene rantsoen de lichaamsconditiescore, in vergelijking met het lipogene rantsoen (interactie tussen droogstandslengte en lactatierantsoen:  $P < 0,01$ ).

#### *Lactogene hormonen*

Het weglaten van de droogstand resulteerde in een hogere plasma insuline en IGF-1 concentratie en in een lagere groeihormoonconcentratie in het bloed, in vergelijking met een korte droogstand. Het verlagen van het energieniveau in het rantsoen voor koeien zonder droogstand had geen effect op de concentratie insuline, IGF-1 en groeihormoon in het bloed. Het lipogene rantsoen verlaagde de insuline concentratie in het bloed van koeien zonder droogstand en een standaard energieniveau. Het lipogene rantsoen verhoogde de groeihormoon concentratie in het bloed van koeien met een standaard energieniveau, zowel na een droogstand van 30 dagen als zonder droogstand, maar niet bij koeien met een laag energieniveau.

#### *Vruchtbaarheid*

Koeien zonder droogstand met een laag energieniveau in het rantsoen werden eerder drachtig dan koeien met een hoog energieniveau in het rantsoen zonder droogstand of met een droogstand van 30 dagen (84 vs. 113 vs. 114 dagen voor 0-d (laag) vs. 0-d (STD) vs. 30-d (STD)). Het lipogene rantsoen verhoogde het aantal dagen tot dracht voor koeien met een droogstand van 30 dagen (139 vs. 87 voor het lipogene en glucogene rantsoen). Maar het lipogene rantsoen verlaagde het aantal dagen tot dracht voor koeien zonder droogstand en een standaard energieniveau in het rantsoen (98 vs. 130 voor het lipogene en glucogene rantsoen).

## **Conclusie**

Weglaten van de droogstand resulteerde in minder melk, minder lactatie persistentie, een hogere energiebalans, zwaardere koeien met een hogere lichaamsconditiescore gedurende de volledige lactatie, in vergelijking met een droogstand van 30 dagen. Het verlagen van het energieniveau in het rantsoen bij koeien zonder droogstand zorgde wel voor een lagere energieopname, minder positieve energiebalans, minder gewichtstoename, maar had geen effect op de melkproductie. Ondanks dat het voeren van een meer lipogeen rantsoen wel de insuline concentratie verlaagde en de, van nature aanwezige, groeihormoon concentratie verhoogde, zorgde dit niet voor een verbetering van de persistentie of verhoging van de melkproductie. Een meer glucogeen rantsoen lijkt gunstig voor de vruchtbaarheid wanneer koeien energie tekort komen (zoals na een droogstand van 30 dagen), maar juist niet wanneer de energievoorziening al ruim is (zoals bij een 0 dagen droogstand op een standaard energieniveau).

**Tabel 1.** Melkproductie, melksamenstelling, voeropname en energiebalans na afkalven<sup>1</sup> van koeien met een droogstand van 0 of 30 dagen (30-d(STD)).

Koeien met een droogstand van 0 dagen kregen na afkalven een rantsoen gevoerd met een laag aandeel krachtvoer (0-d(laag)) of standaard aandeel krachtvoer (0-d(STD)). Vanaf 7 weken na afkalven kregen koeien ofwel een hoofdzakelijk glucogeen (G), ofwel een hoofdzakelijk lipogeen (L) rantsoen gevoerd. (LSMEANS ± SEM).

	Droogstandsbehandeling <sup>2</sup>				Lactatierantsoen			P-waarden <sup>3</sup>				
	0-d (laag)	0-d (STD)	30-d (STD)	SEM	G	L	SEM	Droogstand	Lactatie rantsoen	Pariteit	Tijd <sup>4</sup>	D × LR
Koeien, n	36	34	40		53	57						
Melkproductie, kg/d	24,2 <sup>a</sup>	24,7 <sup>a</sup>	30,3 <sup>b</sup>	0,9	27,7	25,1	0,7	<0,01	0,02	0,06	<0,01	0,62
FPCM <sup>5</sup> , kg/d	27,1 <sup>a</sup>	27,4 <sup>a</sup>	32,3 <sup>b</sup>	1,0	29,8	28,1	0,8	<0,01	0,13	0,21	<0,01	0,45
Lactose, %	4,48	4,46	4,55	0,03	4,52	4,47	0,05	0,05	0,14	0,01	<0,01	0,03
Vet, %	4,83 <sup>a</sup>	4,76 <sup>a</sup>	4,54 <sup>b</sup>	0,06	4,57	4,86	0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Eiwit, %	4,02 <sup>a</sup>	3,99 <sup>a</sup>	3,72 <sup>b</sup>	0,06	3,86	3,96	0,05	<0,01	0,18	0,01	<0,01	0,54
Voeropname, kg DS/d	20,8	20,9	21,3	0,2	21,7	20,4	0,1	0,08	<0,01	<0,01	<0,01	0,04
Energieopname, kJ/kg <sup>0,75</sup> *d	990 <sup>a</sup>	1039 <sup>a</sup>	1094 <sup>b</sup>	11	1061	1021	11	<0,01	<0,01	0,18	<0,01	0,18
Energiebalans <sup>6</sup> , kJ/kg <sup>0,75</sup> *d	51 <sup>a</sup>	92 <sup>b</sup>	4 <sup>c</sup>	12	50	48	10	<0,01	0,89	0,56	<0,01	0,98
Lichaamsgewicht, kg	699 <sup>a</sup>	699 <sup>a</sup>	665 <sup>b</sup>	10	692	683	8	0,02	0,44	<0,01	<0,01	0,96
Gewichtstoename, kg/wk	1,93 <sup>a</sup>	2,61 <sup>b</sup>	0,97 <sup>c</sup>	0,18	1,92	1,75	0,15	<0,01	0,44	<0,01	<0,01	0,40
BCS <sup>7</sup>	3,0	3,0	2,8	0,1	3,0	2,9	0,1	<0,01	0,01	0,79	<0,01	<0,01
Insuline (μU/ml)	23,5 <sup>a</sup>	25,5 <sup>a</sup>	18,0 <sup>b</sup>	1,2	23,9	20,6	1,0	<0,01	0,01	0,79	<0,01	<0,01
IGF-1 <sup>8</sup> (ng/ml)	159,7 <sup>a</sup>	170,7 <sup>a</sup>	142,9 <sup>b</sup>	6,2	164,5	150,7	5,1	<0,01	0,05	<0,01	<0,01	0,13
Groeihormoon (μg/L)	3,62 <sup>a,b</sup>	3,23 <sup>a</sup>	4,01 <sup>b</sup>	0,14	3,47	3,77	0,11	<0,01	0,06	0,30	<0,01	<0,01

<sup>1</sup> Week 1, 2, ...44 ten opzichte van afkalven;

<sup>2</sup> Waarden binnen droogstandsbehandeling in dezelfde rij met verschillende superscripten zijn verschillend ( $P < 0.05$ );

<sup>3</sup> D: Droogstandsbehandeling; LR: Lactatierantsoen; P: Pariteit; T: Tijd; In het model waren ook de interacties LR×P, D×P LR×T, D×T en P×T opgenomen

<sup>4</sup> Week ten opzichte van afkalven of maand ten opzichte van afkalven (voor BCS);

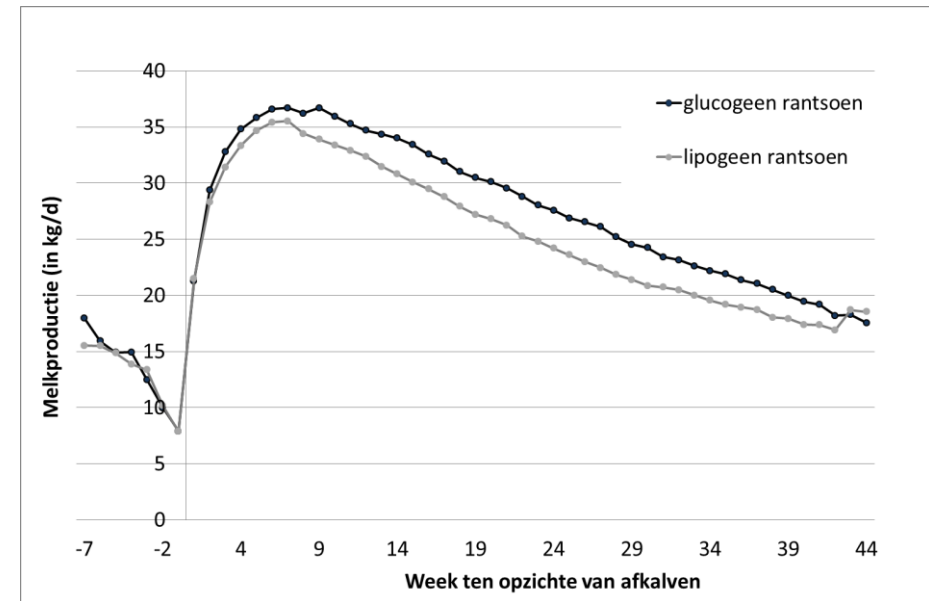
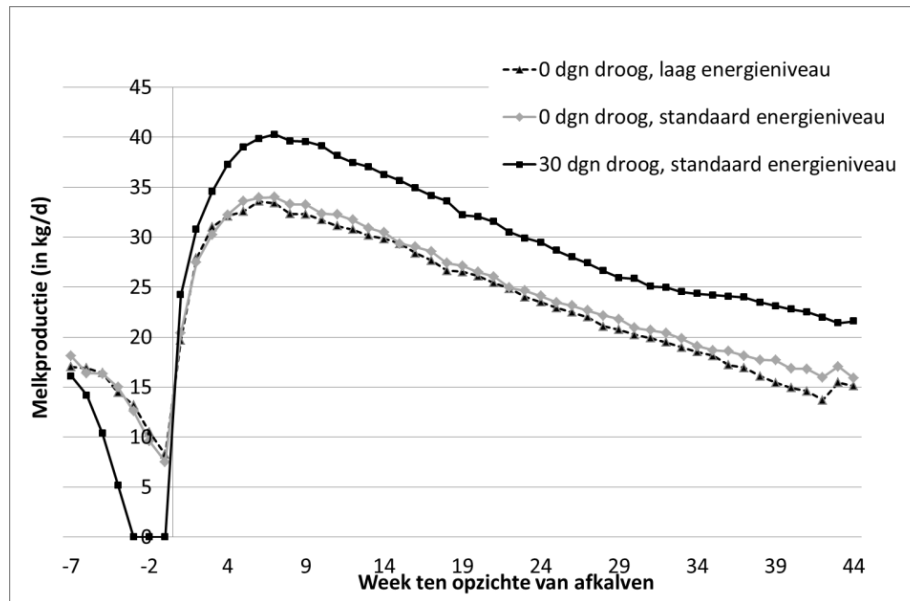
<sup>5</sup> Vet- en eiwit gecorrigeerde melk;

<sup>6</sup> Energiebalans; berekend met het VEM systeem (Van Es, 1975);

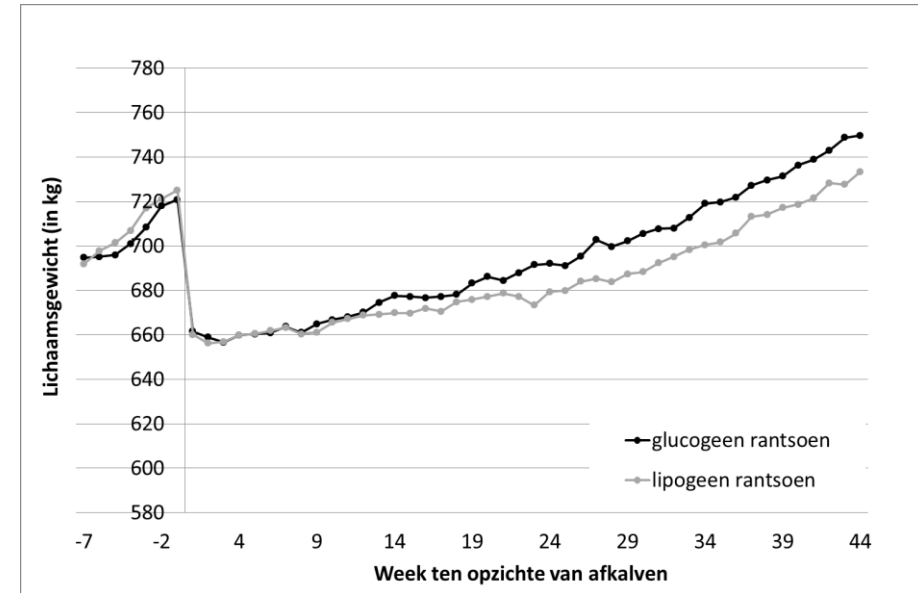
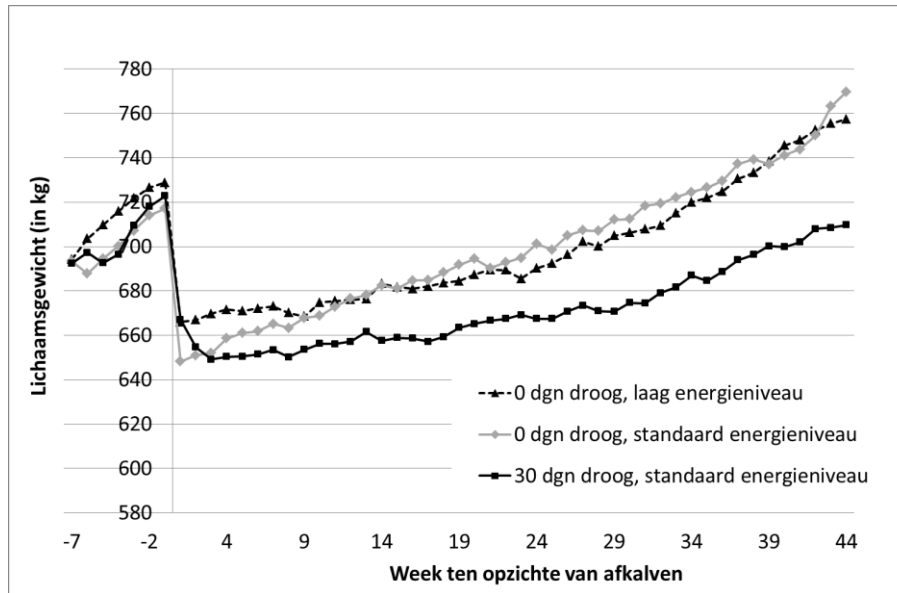
<sup>7</sup> Lichaamsconditiescore op een schaal van 1 – 5;

<sup>8</sup> Insulin-like-growth-factor.





**Figuur 1. a.** Melkproductie (kg/d) van koeien na een droogstand van 0 of 30 dagen (30-d(STD)). Koeien met een droogstand van 0 dagen kregen na afkalven een rantsoen gevoerd met een laag aandeel krachtvoer (0-d(laag)) of standaard aandeel krachtvoer (0-d(STD)); **b.** Melkproductie (kg/d) van koeien op een hoofdzakelijk glucogeen of lipogeen rantsoen.



**Figuur 2. a.** Lichaamsgewicht (kg) van koeien na een droogstand van 0 of 30 dagen (30-d(STD)). Koeien met een droogstand van 0 dagen kregen na afkalven een rantsoen gevoerd met een laag aandeel krachtvoer (0-d(laag)) of standaard aandeel krachtvoer (0-d(STD)); **b.** Lichaamsgewicht (kg) van koeien op een hoofdzakelijk glucogeen of lipogeen rantsoen.

## Referenties

- Chen, J., G.J. Rummelink, J.J. Gross, R.M. Bruckmaier, B. Kemp, en A.T.M. van Knegsel. 2016. Effects of dry period length and dietary energy source on milk yield, energy balance, and metabolic status of dairy cows over two subsequent lactations: effects in the second lactation. *J. Dairy Sci.* 99: 4826-4838.
- CVB. 2011. Chemische samenstellingen en nutritionele waarden van voedermiddelen (in Dutch). Productschap Diervoeder, CBV (Centraal Veevoeder Bureau), Den Haag, Nederland.
- De Feu, M. A., A. C. Evans, P. Lonergan, en S. T. Butler. 2009. The effect of dry period duration and dietary energy density on milk production, bioenergetic status, and postpartum ovarian function in Holstein-Friesian dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92: 6011-6022.
- Littell, R.C., G.A. Milliken, W.W. Stroup, en R.D. Wolfinger. 1996. SAS system for mixed models. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Rastani, R.R., R.R. Grummer, S.J. Bertics, A. Gumen, M.C. Wiltbank, D.G. Mashek, en M.C. Schwab. 2005. Reducing dry period length to simplify feeding transition cows: milk production, energy balance, and metabolic profiles. *J. Dairy Sci.* 88: 1004–1014.
- Van Es, A.J.H., 1975. Feed evaluation for dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 4: 95-107.
- Van Hoeij, R.J., J. Dijkstra, R.M. Bruckmaier, J.J. Gross, T.J.G.M. Lam, G.J. Rummelink, B. Kemp, en A.T.M. van Knegsel. Consequences of dietary energy source on energy balance, lactogenic hormones and lactation curve characteristics of cows after a short or omitted dry period. Submitted.
- Van Knegsel, A.T.M., G.J. Rummelink, S. Jorjong, V. Fievez, en B. Kemp. 2014. Effect of dry period length and dietary energy source on energy balance, milk yield and milk composition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97: 1499-1512.