

Evaluación no Destructiva de la Patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

José Jaime Bañuelos-Balandrán, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Agropecuarias, Av. Universidad 940, Bosques del Prado Sur, Aguascalientes, Aguascalientes, México CP 20100; y **Netzahualcóyotl Mayek-Pérez**, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Blvd. del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas, México CP 88710. Correspondencia: nmayek@ipn.mx

(Recibido: Agosto 30, 2007 Aceptado: Noviembre 29, 2007)

Bañuelos-Balandrán, J.J. y Mayek-Pérez, N. 2008. Evaluación no destructiva de la patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 26:71-75.

Resumen. El mejoramiento genético para la obtención de variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) resistentes a la pudrición carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), debe contar con metodologías para evaluar los daños de manera económica, confiable y rápida, y también conservar el material segregante de interés. En este trabajo se evaluó la expresión de la infección por *M. phaseolina* en dos variedades (BAT 477 y Pinto UI-114) de frijol con reacción contrastante al hongo, utilizando tres métodos de inoculación de “hoja desprendida” *in vitro*: discos de hoja de 1 cm de diámetro, hojas simples o cotiledonales y foliolos de hojas trifoliadas. Los métodos se compararon con datos de infección derivados de dos métodos “convencionales”: inoculación de plántulas en invernadero con semilla de arroz infestada y cultivo de semillas *in vitro* en PDA colonizado por el hongo. Los tres métodos de hoja desprendida provocaron los síntomas de la enfermedad y discriminaron entre reacciones de resistencia y de susceptibilidad a *M. phaseolina*. Debido a su sencillez, rapidez y confiabilidad, se recomienda el uso de hojas cotiledonales en pruebas de reacción a *M. phaseolina* en frijol.

Palabras clave adicionales: Hoja desprendida, inoculación *in vitro*, pudrición carbonosa.

Abstract. Genetic improvement to obtain common bean (*Phaseolus vulgaris*) resistant cultivars to charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) must have methodologies which allow to evaluate disease damage in a cheap, reliable, and fast way. In this work, the expression of infection by *M. phaseolina* was evaluated in two common bean cultivars (BAT 477 and Pinto UI-114) with contrasting reactions to the fungus, using three “detached leaf” *in vitro* inoculation methods: one cm diameter leaf discs, simple or cotyledonal

leaves, and folioles from trifoliated leaves. Methods were compared with infection data derived from two “conventional” methods: seedling inoculation with infested rice seeds in greenhouse and *in vitro* seed culture in PDA colonized with the fungus. The three methods of detached leaf produced disease symptoms and discriminated between resistance and susceptibility reactions to *M. phaseolina*. The use of cotyledonal leaves is recommended to assess the reaction to *M. phaseolina* in beans, because the method is simple, fast, and reliable.

Additional keywords: Detached leaf, *in vitro* inoculation, charcoal rot.

El desarrollo de germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) con resistencia durable a enfermedades es una alternativa eficaz para estabilizar los rendimientos en áreas de secano o temporal con problemas de pudrición carbonosa *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en México (Mayek-Pérez *et al.*, 2001b). Una limitante para la obtención de germoplasma resistente a la pudrición carbonosa son los pocos estudios relativos al análisis de la herencia de la resistencia genética a dicho fitopatógeno. Esto ha sido difícil debido a que los procedimientos tradicionales de inoculación utilizados y el efecto de diversos factores ambientales durante el desarrollo de la enfermedad en el hospedante enmascaran la respuesta de la planta al patógeno; situación que conduce a errores en la caracterización del germoplasma segregante (Olaya *et al.*, 1996). Otra limitante consiste en que generalmente las evaluaciones de la respuesta del frijol a la pudrición carbonosa implican la destrucción de plantas para la medición de los daños, de modo que en el caso de poblaciones segregantes debe eliminarse parte de la población que podría ser útil dentro del programa de selección y mejoramiento. Esta limitante es mayor cuando se piensa en la ejecución de estudios de mapeo genético de genes o caracteres de loci cuantitativos asociados o ligados con la resistencia a la pudrición carbonosa. Por ello, el proceso de

evaluación de la reacción de germoplasma segregante a *M. phaseolina* debe considerar métodos no destructivos de evaluación de la severidad que permitan conservar íntegra la población evaluada y que ofrezcan resultados rápidos, confiables y consistentes. En frijol común se utiliza con resultados confiables la técnica de la “hoja desprendida” para medir los daños por hongos como *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. y Magn.) Lams.-Scrib. (Mendoza *et al.*, 2001; Tu, 1986); *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr. (Ragagnin *et al.*, 2005); *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Steadman *et al.*, 1997); *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* (Pers.:Pers.) Unger (Rios *et al.*, 2001); *Rhizoctonia solani* Kühn (Beaver *et al.*, 2002; Muyolo *et al.*, 1993;) y por bacterias como *Xanthomonas axonopodiss* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin, Hoste, Kersters and Swings (Mohamed *et al.*, 1992). El objetivo de este trabajo fue evaluar tres métodos de inoculación de hojas desprendidas de frijol *in vitro* con *M. phaseolina* respecto a su capacidad para reproducir los síntomas de la pudrición carbonosa y discriminar claramente entre reacciones de resistencia y de susceptibilidad a la enfermedad y compararlos con dos métodos de inoculación “convencionales” (inoculación de plántulas y cultivo de semillas en medio de cultivo colonizado).

Semillas de las variedades de frijol BAT 477 (resistente a *M. phaseolina*) y Pinto UI-114 (susceptible) se sembraron en condiciones de invernadero en Aguascalientes, México. De un grupo de plantas de cada variedad se obtuvieron a los 10 días después de la siembra, hojas cotiledonales completamente expandidas y sin daños aparentes por plagas y/o enfermedades; de otro grupo de plantas de cada variedad se obtuvieron a los 20 días después de la siembra, foliolos de hojas trifoliadas completamente expandidos y también aparentemente sanos. Durante su traslado al laboratorio, que duró menos de 30 min, las hojas se mantuvieron en condiciones de alta humedad relativa en cajas Petri con papel secante estéril humedecido con agua destilada estéril. En la campana de flujo laminar, las hojas se desinfestaron con hipoclorito de sodio 2% durante 2 min, se enjuagaron dos veces en agua destilada estéril y se secaron en papel secante esterilizado. En este trabajo se utilizó una cepa de *M. phaseolina* originaria de Los Mochis, Sinaloa, México, altamente patogénica tanto en semillas (Reyes-Franco *et al.*, 2006) como en plántulas de frijol cultivadas en invernadero (Mayek-Pérez *et al.*, 2001a).

Tratamientos de inoculación. Se evaluaron tres técnicas de hoja desprendida *in vitro* para la determinación de la infección de *M. phaseolina* en frijol: 1) hojas cotiledonales o simples; 2) foliolos de hojas trifoliadas; y 3) discos foliares de 1 cm de diámetro obtenidos de hojas cotiledonales. Como testigos se incluyeron los métodos convencionales de inoculación con semilla de arroz (*Oryza sativa* L.) colonizada en plántulas en invernadero (Abawi y Pastor-Corrales, 1990), y el cultivo de semillas en cajas Petri colonizadas con el hongo (Manici *et al.*, 1995), ambos métodos efectivos en frijol como ya se

indicó anteriormente. Todos los tratamientos (variedad de frijol x técnica de inoculación) consistieron de diez repeticiones que se incubaron en oscuridad a 30°C.

Hojas cotiledonales. Las hojas completas desinfectadas como ya se indicó se colocaron individualmente y con el envés hacia arriba en cajas de Petri de 10 cm de diámetro que contenían un disco de papel secante estéril humedecido con agua destilada estéril. En el envés de cada hoja se colocaron dos discos de PDA de 0.5 cm de diámetro con crecimiento de la cepa respectiva de *M. phaseolina* y en ambos extremos de la hoja a partir de la nervadura central. La unidad experimental fue una hoja cotiledonal en una caja Petri.

Foliolos de hojas trifoliadas. El tratamiento del material fue similar a lo descrito para el caso de hojas cotiledonales, salvo que de cada una de diez hojas trifoliadas se obtuvo un foliollo que se colocó en una caja Petri de plástico de 10 cm de diámetro. La unidad experimental fue un foliollo en una caja Petri.

Discos de hoja. Cinco discos de 1 cm de diámetro se obtuvieron de una hoja cotiledonal completamente expandida de 10 días de edad con un sacabocados estéril. Los discos se sometieron al mismo tratamiento de desinfección ya descrito y se colocaron en una caja Petri con el haz en contacto con medio de cultivo agar-agua. Luego se colocó un disco de 1 cm de diámetro de crecimiento fungoso de la cepa respectiva de *M. phaseolina* cubriendo aproximadamente una quinta parte de la superficie de cada disco foliar (Pederson *et al.*, 2000). La unidad experimental fueron cinco discos foliares en una caja Petri.

Inoculación de plántulas con semilla de arroz colonizada. Las semillas de frijol se sembraron en charolas de plástico con sustrato tipo peat-moss. El sustrato se inoculó a la siembra al 5% peso/peso con semilla de arroz colonizada con *M. phaseolina* y preparada de acuerdo con el protocolo de Abawi y Pastor-Corrales (1990). La unidad experimental fueron cinco semillas o plántulas.

Inoculación de semillas *in vitro*. La semilla de cada genotipo se desinfectó con NaOCl 2% durante 2 min, se enjuagó con agua destilada estéril y se secó con papel secante estéril. Posteriormente, se colocó en cajas de Petri con PDA colonizado con *M. phaseolina* y con cinco días de edad. Las cajas Petri se sellaron y se incubaron por cinco días a 30°C en oscuridad. La unidad experimental fueron cinco semillas por caja Petri.

Variables medidas. En el tratamiento con discos de hoja se midió la severidad de la pudrición carbonosa a los siete días en incubación con la escala descrita por Pratt *et al.* (1998); en las hojas cotiledonales y foliolos de hojas trifoliadas se midió la longitud de la lesión (en cm) causada por el hongo a los cinco días en incubación. La severidad de la pudrición carbonosa en semilla se realizó al quinto día en incubación con la escala de daños de Manici *et al.* (1995), mientras que en plántulas se registró la severidad de la pudrición carbonosa a los 28 días después de la siembra con base en la escala descrita de Abawi y Pastor-Corrales (1990) (Cuadro 1).

Análisis estadístico. Los datos registrados se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro y Wilk ($p < 0.05$) (Ramírez y López, 1993). Los datos de longitud de lesión causada por *M. phaseolina* en las hojas cotiledonales y de foliolos de hojas trifoliadas cumplieron el supuesto de normalidad, y por tanto, se compararon con base en la prueba t de Student para muestras independientes ($p < 0.05$). Los datos registrados en las pruebas en semilla, plántula y discos de hoja no cumplieron el supuesto de normalidad debido a que se utilizaron escalas de intervalo, y por tanto, la comparación entre las dos variedades se realizó con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney o prueba de Wilcoxon para muestras independientes ($p < 0.05$) (Ramírez y López, 1993). Además, se calcularon los coeficientes de correlación simples de Pearson ($p < 0.05$) entre medias de tratamientos para cada método de inoculación. El análisis estadístico se realizó con el programa de cómputo Statistica versión 5 (Statsoft Inc., 1997; Tulsa, EUA). El ensayo se repitió dos veces con resultados similares.

Los tres métodos de inoculación de hoja desprendida reprodujeron los síntomas de la pudrición carbonosa en hojas de frijol (Fig. 1) y discriminaron entre la reacción de resistencia en BAT 477 y la de susceptibilidad de Pinto UI-114 (Cuadro 2) como ya se había reportado previamente en estudios de

campo, invernadero y laboratorio (Mayek-Pérez *et al.*, 1997, 2001a, 2001b; Reyes-Franco *et al.*, 2006). Los foliolos de hojas trifoliadas mostraron mayores valores de longitud de lesión causada por *M. phaseolina* que las hojas simples. Lo anterior concuerda con lo reportado por St. Amand y Wehner (1995) quienes observaron que *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm ocasionó mayores en hojas más viejas tanto de plantas cultivadas en invernadero como en hojas desprendidas de pepino (*Cucumis sativus L.*). Aparentemente, la reacción a *M. phaseolina* está influenciada en mayor medida por factores tales como la humedad del filoplano o la nutrición de la hoja, más que por características de la hoja misma que se inocula con el hongo y que parecerían estar positivamente asociadas con la mayor tasa de infección por *M. phaseolina*, como la densidad de estomas, pues por ejemplo, BAT 477 muestra mayores índice estomático y densidad de células epidérmicas en el envés de las hojas (Mayek-Pérez *et al.*, 2002). El análisis de correlación de los valores de severidad de la pudrición carbonosa en las dos variedades de frijol indicó alta y significativa asociación entre las cinco técnicas de inoculación evaluadas, aunque los valores de correlación menores o iguales a 0.80 se observaron con la técnica que utiliza foliolos de hojas trifoliadas (Cuadro 3). Al respecto, la utilización de técnicas de inoculación de hongos en plantas ofrece

Cuadro 1. Escalas de medición de daños causados por *Macrophomina phaseolina* en frijol.

Escala	Valores
Discos foliares (Pratt <i>et al.</i> , 1998)	0 = disco con cero necrosis, 1 al 7 = disco completamente necrótico al séptimo hasta el primer día en incubación, respectivamente.
Semillas (Manici <i>et al.</i> , 1995)	0 = semilla sana, 1 = decoloración de la parte de la semilla en contacto con el micelio, 2 = tegumentos de la semilla invadidos por micelio y esclerocitos por semilla sana, 3 = tegumentos de la semilla libre del hongo por plántula infectada, 4 = tegumento de la semilla y plántula infectada, 5 = semilla infectada y no germinada.
Plántulas (Abawi y Pastor-Corrales, 1990)	1 = sin síntomas visibles, 3 = máximo de 10% de hipocótilo y raíces con lesiones, 5 = aproximadamente 25% de hipocótilo y raíces con lesiones y ligero decaimiento de la raíz, 7 = aproximadamente 50% de hipocótilo y raíces con lesiones y considerable decaimiento de la raíz y estructuras visibles del hongo, 9 = 75% o más del hipocótilo y raíces con lesiones, avanzado decaimiento de la raíz y crecimiento extenso del hongo.
Hojas cotiledonales	Longitud de lesión (cm).
Foliolos de hojas trifoliadas	Longitud de lesión (cm).

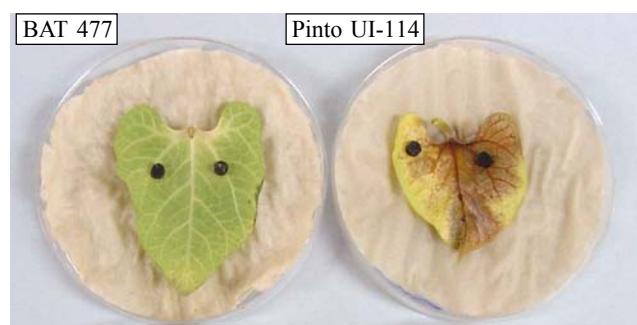


Fig. 1. Reacción de hojas cotiledonales de dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) a *Macrophomina phaseolina* a los cinco días en incubación a 30°C en oscuridad.

resultados contrastantes. Higuera (1991) no recomienda la evaluación de la resistencia a *M. phaseolina* en condiciones controladas pues observa baja asociación con los resultados de campo, y algo similar reportan Muyolo *et al.* (1993) quienes inocularon *R. solani* en frijol; en ambos trabajos se indica que dichas discrepancias se deben principalmente al efecto del ambiente, así como al uso de volúmenes reducidos de suelo en macetas (Higuera, 1991), o a los patrones de infección diferentes que ocurren con el cultivo de semillas en agar colonizado o en raíces e hipocótilos en contacto con el inóculo mezclado en el sustrato del suelo (Muyolo *et al.*, 1993). Por su parte, St. Amand y Wehner (1995) indicaron que las pruebas con hojas desprendidas son convenientes para evaluar la reacción a hongos del pepino como *D. bryoniae*,

Cuadro 2. Severidad de daño por *Macrophomina phaseolina* en dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) con base en cinco métodos de inoculación.

Método de inoculación	Variedad		
	BAT 477	Pinto UI-114	Pz
Semillas	4.1	5.0	**
Plántulas	3.4	6.8	**
Discos de hoja	2.4	3.5	**
Hojas cotiledonales	2.8	4.2	**
Foliolos de hojas trifoliadas	3.9	4.4	**

^zDiferencias estadísticas significativas entre variedades ($P < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Mann-Whitney (métodos de inoculación con semillas, plántulas y discos de hoja), y la prueba t de Student (hojas cotiledonales y foliolos de hojas trifoliadas).

Cuadro 3. Coeficientes de correlación (r) simple de Pearson entre valores de patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* en frijol (*Phaseolus vulgaris*) registrados con cinco técnicas de inoculación.

Técnica de inoculación	Plántula	Discos de hoja	Hojas cotiledonales	Foliolos de hojas trifoliadas
Semilla	0.92**	0.91**	0.92**	0.80**
Plántula		0.92**	0.94**	0.77**
Discos de hoja			0.90**	0.79**
Hojas cotiledonales				0.77**

*Significativo ($p < 0.05$).

debido a que muestran menores coeficientes de variación que las pruebas en invernadero, aunque no muestran alta correlación con los resultados de las pruebas de campo. Lo anterior se debe posiblemente a que en la técnica de la hoja desprendida se lava la hoja y con ello se remueven tanto organismos contaminantes como los exudados participantes en el proceso infectivo. Los resultados de este trabajo indican que todas las técnicas evaluadas son confiables para la correcta discriminación entre germoplasma resistente y susceptible a *M. phaseolina*. Dado que la obtención de los discos de hoja implica más trabajo y cuidados en el procesamiento e inoculación de la muestra, así como mayor cantidad de material de laboratorio (medio de cultivo, sacabocados), y la técnica de foliolos de hojas trifoliadas demora más tiempo para su obtención, se sugiere que la utilización de hojas simples o cotiledonales de frijol común para la inoculación *in vitro* es una estrategia sencilla, económica y confiable para la medición del daño causado por cepas o aislamientos del hongo *M. phaseolina*.

CONCLUSIONES

Los tres métodos de inoculación de *M. phaseolina* de hoja desprendida provocaron los síntomas de la enfermedad en frijol común y discriminaron entre reacciones de resistencia y de susceptibilidad a *M. phaseolina* como se observa con el uso de métodos de inoculación convencionales en plántulas y semillas. Debido a su sencillez, rapidez y confiabilidad, se

recomienda el uso de hojas cotiledonales en pruebas de reacción a *M. phaseolina* en frijol.

Agradecimientos. Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) el apoyo económico para el desarrollo de este trabajo a través de los proyectos de investigación J33785B y 48457-Z, así como al Fondo Mixto-Gobierno del Estado de Tamaulipas (TAMPS-2005-C08-02). Los autores agradecen al Dr. Jorge Acosta-Gallegos (INIFAP) de Celaya, México, el haber donado la semilla de frijol utilizada en este estudio.

LITERATURACITADA

- Abawi, G.S., and Pastor-Corrales, M.A. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies, and management strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 114 p.
- Beaver, J.S., Godoy, G., Rosas, J.C. y Steadman, J. 2002. Estrategias para seleccionar frijol común con mayor resistencia a mustia hilachosa. Agronomía Mesoamericana 13:67-72.
- Higuera, A. 1991. Métodos de inoculación para la detección de germoplasma de frijol resistente a la pudrición carbonosa del tallo *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid.). Revista de Agronomía (LUZ) 8:73-85.
- Manici, L.M., Caputo, F., and Cerato, C. 1995. Temperature

- responses of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different climate regions of sunflower production in Italy. Plant Disease 79:834-838.
- Mayek-Pérez, N., López-Castañeda, C. y Acosta-Gallegos, J.A. 1997. Variación en características culturales *in vitro* de aislamientos de *Macrophomina phaseolina* y su virulencia en frijol. Agrociencia 31:187-195.
- Mayek-Pérez, N., López-Castañeda, C., González-Chavira, M.M., García-Espinosa, R., Acosta-Gallegos, J.A., Martínez de la Vega, O., and Simpson, J. 2001a. Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. Physiological and Molecular Plant Pathology 59:257-264.
- Mayek-Pérez, N., López-Castañeda, C., López-Salinas, E., Cumplán-Gutiérrez, J. y Acosta-Gallegos, J.A. 2001b. Resistencia a *Macrophomina phaseolina* en frijol común bajo condiciones de campo en México. Agrociencia 35:649-661.
- Mayek-Pérez, N., Padilla-Ramírez, J.S., Acosta-Gallegos, J.A., and López-Castañeda, C. 2002. Leaf morphology and growth of *Macrophomina phaseolina* resistant and susceptible common bean cultivars in response to drought stress. Scientiae Naturae 4:33-44.
- Mendoza, A., Hernández, F., Hernández, S., Ruiz, D., Martínez de la Vega, O., Mora, G., Acosta, J., and Simpson, J. 2001. Identification of *Co-1* anthracnose resistance and linked molecular markers in common beans line A193. Plant Disease 85:252-255.
- Mohamed, M.F., Arnaud-Santana, E., and Coyne, D.P. 1992. Rooting of bean leaves and use in germplasm evaluation for common bacterial blight resistance. Euphytica 65:161-166.
- Muyolo, N.G., Lipps, P.E., and Schmitthenner, F. 1993. Reactions of dry bean, lima bean, and soybean cultivars to *Rhizoctonia* root and hypocotyl rot and web blight. Plant Disease 77:234-238.
- Olaya, G., Abawi, G.S., and Weeden, N.F. 1996. Inheritance of the resistance to *Macrophomina phaseolina* and identification of RAPD markers linked to resistance genes in beans. Phytopathology 86:674-679.
- Pederson, G.A., Pratt, R.G., and Brink, G.E. 2000. Response to leaf inoculations with *Macrophomina phaseolina* in white clover. Crop Science 40:687-692.
- Pratt, R.G., McLaughlin, M.R., Pederson, G.A., and Rowe, D.E. 1998. Pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* to mature plant tissues of alfalfa and white clover. Plant Disease 82:1033-1038.
- Ramírez, M.E. y López, Q. 1993. Métodos Estadísticos no Paramétricos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 223 p.
- Ragagnin, V., Sanglard, D., de Souza, T.L., Costa, M., Moreira, M., and Barros, E. 2005. A new inoculation procedure to evaluate angular leaf spot disease in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) for breeding purposes. Bean Improvement Cooperative 48:90-91.
- Reyes-Franco, M.C., Hernández-Delgado, S., Beas-Fernández, R., Medina-Fernández, M., Simpson, J., and Mayek-Pérez, N. 2006. Pathogenic and Genetic variability within *Macrophomina phaseolina* from Mexico and other countries. Journal of Phytopathology 154: 447-453.
- Rios, G.P., Andrade, E.M., and Costa, J.L.S. 2001. Use of detached leaves to evaluate dry bean rust resistance. Fitopatología Brasileira 26:128-133.
- St. Amand, P.C., and Wehner, T.C. 1995. Greenhouse, detached-leaf, and field testing methods to determine cucumber resistance to gummy stem blight. Journal of the American Society for Horticultural Science 120:673-680.
- STATSOFT Inc. 1997. Statistica for Windows (Computer Program Manual). Release 5.1. Tulsa, OK, USA.
- Steadman, J.R., Powers, K., and Higgins, B. 1997. Screening common beans for white mold resistance using detached leaves. Bean Improvement Cooperative 40:140-141.
- Tu, J.C. 1986. A detached leaf technique for screening beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *in vitro* against anthracnose *Colletotrichum lindemuthianum*. Canadian Journal of Plant Science 66:805-809.