

USO DE *Trichoderma harzianum* Rifaii PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Sclerotium rolfsii* Sacc. EN EL CULTIVO DE ZÁBILA (*Aloe vera* L.)

Ing. Mary González Canelo

canelom@hotmail.com .

Universidad Nacional Experimental “Francisco de Miranda”
Venezuela

Ing. Ana Puertas Arias. MSc.

apuertas@udg.co.cu

Ing. María Caridad Jiménez Arteaga. MSc.

cjimeneza@udg.co.cu

Ing. Leonides Danger Hechavarría. MSc.

ldangerh@udg.co.cu.

Ing. Sandra López Álvarez. MSc.

sandra@udg.co.cu.

UNIVERSIDAD DE GRANMA.

Cuba

RESUMEN

En las plantaciones de zábila *Aloe vera* L. del estado Falcón - Venezuela, se han observado, problemas fitosanitarios, ocasionados por hongos y bacterias, entre estos fitosanitarios se destaca *Sclerotium rolfsii* Sacc. Se investigó a nivel *in vitro* la capacidad inhibitoria de tres aislamientos nativos de *Trichoderma harzianum*, Rifaii en zábila sobre *S. rolfsii*, usando la técnica de enfrentamiento dual en placas Petri, sobre un diseño completamente aleatorizado. Se emplearon 4 tratamientos y 5 réplicas, los tratamientos fueron: *S. rolfsii* vs Th4, *S. rolfsii* vs Th57, *S. rolfsii* vs Th59 y un control, *S. rolfsii* vs *S. rolfsii* vs disco de agar estéril. Se comprobó que los tres aislamientos presentaron buena capacidad antagónica para inhibir el crecimiento micelial del patógeno (50-90%), y de inhibición de la formación de esclerocios (86%), ubicándose en la escala 2 (agresiva) Los resultados indican que estos aislamientos poseen potencialidades para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Rifaii.

Palabras clave: Zábila, *Trichoderma harzianum*, *Sclerotium rolfsii*, Control biológico.

USE OF *Trichoderma harzianum* Rifaii FOR BIOLOGICAL CONTROL OF *Sclerotium rolfsii* Sacc. IN ZABILA (*Aloe vera* L.).

ABSTRACT

In the plantations of Falcon state have been observed phytosanitary problems caused by fungi and bacteria, among these phytopathogens, *Sclerotium rolfsii* is relevant. The inhibitory capability of three native isolates of *Trichoderma harzianum* against *S. rolfsii* was investigated at in vitro conditions, using the dual facing technique in Petri dishes, following a totally randomized design. Four treatments and 5 replications were used. The treatments were *S. rolfsii* vs Th4, *S. rolfsii* vs Th57, *S. rolfsii* vs Th59 and a control treatment, *S. rolfsii* vs sterilized agar dish. The three isolates showed good antagonistic capability for inhibiting micelial growing of the pathogen, about 50 to 90% and inhibition of sclerotios formation, about 86%. Besides, the isolates were considered in the scale 2 of aggressively. The results indicate that the isolates have potentialities for the biological control of *Sclerotium rolfsii* Rifaii.

Key words: Zabila, *Trichoderma harzianum*, *Sclerotium rolfsii*, biological control.

INTRODUCCIÓN

La zábila *Aloe vera* L. es una planta suculenta de múltiples aplicaciones terapéuticas y de importancia socioeconómica para las regiones áridas y semiáridas de Venezuela, esta especie cuenta con características particulares que hacen que sea un cultivo productivo en condiciones donde prevalecen la baja fertilidad y escasez de agua, de allí que surgen nuevas propuestas para el logro sustentable y eficiente de dicho rubro en el estado Falcón.

En base a lo anterior surgió la iniciativa del “Proyecto Bolivariano de Producción y Procesamiento de Zábila”, enmarcado en el convenio China- Venezuela para el año 2009, el cual generó un aumento de la superficie sembrada, encontrándose para ese año una superficie de 5200 ha, (Piña *et al*, 2009) y para el año 2012, se incrementó en 10.000 ha, según estadísticas del último Censo Agrícola (2012).

Es importante destacar, que la zábila es un cultivo que a pesar de poseer ciertas ventajas en comparación a otros cultivos por su gran adaptabilidad a condiciones de

sequias no escapa de las enfermedades graves que producen los microorganismos (Pelczar *et al.* 1997).

Con la incorporación de estas nuevas áreas de siembra se ha incrementado el ataque de microorganismos fitopatógenos que pasaron a ser una limitante de relevante importancia para la producción de dicho cultivo en esta zona. La problemática no solo afecta el rendimiento y la permanencia de las plantas en campo, además es una limitante para extender sus áreas de siembra y también los ingresos para los productores, que son seriamente afectados (Romero *et al.*, 2004)

Es de enfatizar, las pocas referencias y disponibilidad de investigaciones acerca del control sobre los microorganismos fitopatógenos en el cultivo de zábila. Así como también, las fallas en la utilización de los métodos de control eficientes y que además le permitan al productor tener alternativas de manejo (Romero *et al.*, 2004, Gutiérrez, 2009).

Las enfermedades que tiene mayor incidencia en el cultivo de zábila es causada por el hongo patógeno del suelo *Sclerotium rolfsii* Sacc., el cual ocasiona pudriciones del tallo y raíces, que pueden producir la pérdida total de la planta. La supervivencia del patógeno en el suelo es de extrema importancia epidemiológica y está relacionada a la formación de esclerocios, que permanecen viables por varios años, en condiciones de baja humedad con amplio rango de pH y temperatura (Polanco y Castro, 2005).

Una alternativa de control para este hongo del suelo es el uso del método biológico, con la aplicación de hongos antagonistas como lo sugiere Anzola (2008).

Un biocontrolador ampliamente utilizado en la agricultura es el hongo *Trichoderma harzianum* Rifaii, es un eficiente controlador biológico que está siendo ampliamente utilizado en la agricultura como agente de biocontrol debido a su habilidad para colonizar sustratos rápidamente, inducir resistencia sistémica adquirida en plantas, promover el crecimiento vegetal y poseer actividad antagonista contra un amplio rango de hongos patógenos. El efecto inhibitorio de sus antibióticos y la degradación de componentes de la pared celular de patógenos de plantas, es citado como aspecto importante de su actividad antagonista (Tovar, 2008, citado por Rojas, 2012).

En la actualidad el control biológico de las enfermedades de plantas causadas por hongos del suelo ha tomado una trascendental importancia, esto debido a la limitante en cuanto a la utilización de productos químicos que tiene efectos sobre la salud de aplicadores y consumidores, y contaminación de los recursos ambientales como agua, suelo y atmosfera que alteran la estructura de muchas plantas; en este particular, se prohíbe su aplicación en el rubro de la zabila ya que altera la estructura molecular de la misma.

En respuesta a esto se ha limitado el uso de plaguicidas y se están desarrollando programas de manejo integrado de las enfermedades en los que se da prioridad a uso de métodos de control no contaminante (Duran y López, 2001).

En este sentido, el objetivo de la presente investigación fue comprobar en condiciones *in vitro* la capacidad inhibitoria de tres cepas nativas de *T. harzianum* sobre *S. rolfsii*.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación y Servicios de Sanidad Vegetal (LINYSSAV) del Área de Cs del Agro y del Mar de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda.

Para evaluar el control biológico del hongo Fitopatógeno a nivel *in vitro*, se utilizaron tres aislamientos de *T. harzianum*, codificadas como Th4, Th57 y Th59 conservados en el LINYSSAV, estudios realizados han mostrado que estos aislamiento tienen mayor actividad inhibitoria para hongos de suelo.

En la tabla 1, se muestra parte de la colección de hongos antagonistas, que aparecen identificados con su código, procedencia y hospedantes.

Tabla 1. Identificación de los aislamientos estudiados.

| Código | Procedencia de los aislamientos | Localidad |
|--------|--|---|
| Th 4 | Aislado de la rizosfera de <i>A. vera</i> . (Colección de hongos antagonista del LINYSSAV. | Sector Las Ventosas Municipio Colina Estado Falcón. |
| Th57 | Aislado de la rizosfera de <i>A. vera</i> . (Colección de hongos antagonista del LINYSSAV. | Sector Tórrales parroquia Guzmán Guillermo del Municipio Miranda Estado Falcón. |
| Th 59 | Aislado de la rizosfera de <i>A. vera</i> . (Colección de hongos antagonista del LINYSSAV. | Sector El Trigal Municipio Colina Estado Falcón. |

La determinación de la capacidad antagónica de *T. harzianum* hacia *S. rolfsii*, se realizó de acuerdo a la metodología del cultivo dual empleada por Rojas (2012), Velázquez (1996) y Montealegre y Henríquez (1990). Para la confrontación dual se emplearon placas Petri (9 cm) con medio de cultivo agar-papa-dextrosa (PDA), en las que se colocaron discos de agar de 10 mm de diámetro, uno con el aislamiento de *S. rolfsii* y otro con el aislamiento de *T. harzianum*, los que fueron tomados de la periferia de colonias de 7 días de crecimiento. Los discos se colocaron distanciados a 6 cm, y en forma simultánea.

Los tratamientos se conformaron de la siguiente manera: 1. *S. rolfsii* vs Th4, 2. *S. rolfsii* vs Th57, 3. *S. rolfsii* vs Th59 y 4. Control (*S. rolfsii* vs disco de agar estéril), bajo un

diseño completamente aleatorizado con 5 réplicas. Las placas se incubaron a una temperatura de 28-30°C. Las mediciones de las variables objeto de estudio se realizaron a partir de los 4 días hasta los 21 días.

Las variables estudiadas fueron: Inhibición del crecimiento micelial, Inhibición de la formación de esclerocios de *S. rolfsii*, cuantificando la cantidad producida por cápsulas de Petri. Agresividad de los aislamientos de *Trichoderma* frente a *S. rolfsii*.

Inhibición del crecimiento micelial.

Para evaluar el grado de antagonismo, se midió el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial siguiendo la misma metodología realizada por Velázquez (1996) Grimán (2002), Martínez (2009) y Rojas (2012). El procedimiento fue el siguiente:

En el cultivo dual *Sclerotium -Trichoderma*, se consideró como 100% la formación de esclerocios en el tratamiento testigo. Para medir el crecimiento micelial del hongo se utilizó una regla milimetrada, con los valores obtenidos se procedió a calcular el porcentaje de inhibición aplicando la siguiente fórmula:

$$IC = 100 (CTo - CTn) / CTo$$

Donde:

IC = % de inhibición del crecimiento

CTo = Crecimiento del tratamiento testigo

CTn = Crecimiento del tratamiento con la cepa del hongo control.

El porcentaje de inhibición se medirá a los 4, 6 y 9 días de confrontación.

Inhibición de la formación de esclerocios de *S. rolfsii*, cuantificando la cantidad producida por cápsulas de Petri.

Para el cálculo de la inhibición de la formación de esclerocios de *S.rolfsii*, se considero como 100% la formación de esclerocios en el tratamiento testigo. Con la lupa estereoscópica se cuantifico las estructuras de resistencia y se calculo la cantidad promedio formados por cápsula petri, esta formación de esclerocios se calculó

trascurrido los 21 días y con los valores obtenidos se procedió a determinar el porcentaje de inhibición, a través, de la siguiente fórmula:

$$IFE = 100 (ET_o - ET_n) / ET_o$$

Donde:

IFE = % de Inhibición de la formación de esclerocios

ET_o = Esclerocios formados en el tratamiento testigo.

ET_n = Esclerocios formados en el tratamiento con la cepa del Antagonista

Agresividad de los aislamientos de *Trichoderma* frente a *S. rolfsii*.

Se estudió la velocidad y capacidad de los aislamientos de *Trichoderma* de sobrepasar el área de contacto entre los hongos, colonizar y eliminar el micelio de la colonia de *S. rolfsii* en la cápsula de Petri. Se determinó por medio de la escala de Bell modificada.

Escala de Bell:

Clase 1- *Trichoderma* cubre más de dos (2) tercios de la superficie del medio antes del contacto hifal y crece sobre el patógeno hasta colonizar casi toda la placa.

Clase 2- *Trichoderma* cubre al menos de dos (2) tercios de la superficie del medio antes del contacto hifal y crece sobre el patógeno.

Clase 3- *Trichoderma* coloniza el 50 % o más del medio antes del contacto hifal pero no crece sobre el patógeno.

Clase 4- El patógeno coloniza al menos, del 50 % y ningún organismo aparece dominando al otro.

Clase 5- El patógeno crece sobre el antagonista.

Bell *et al* (1982) considera un aislamiento antagonista si se encuentran en las clases menor o igual a 2 y no antagonista si está en las clases igual 3 ó mayor a 3.

La medición se realizó hasta los 21 días y se considera como un aislamiento antagonista muy agresivo si se encuentra en la clase 1, antagonista agresivo si está en

la clase 2, antagonista poco agresivo si es en la clase 3, antagonista no agresivo si está ubicado en la clase 4 y no antagonista en la clase 5.

Para comparar los tratamientos en cuanto a las variables estudiadas se realizaron Análisis de varianzas clasificación simple y la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan, a través del programa estadístico SAS (2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. 1 se presentan los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial (ICM) para los días 4, 6 y 9. El valor más alto de ICM, para el noveno día se presentó en el aislamiento Th57 (82,9%), seguido por Th59 (79,6%); sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los diferentes aislamientos.

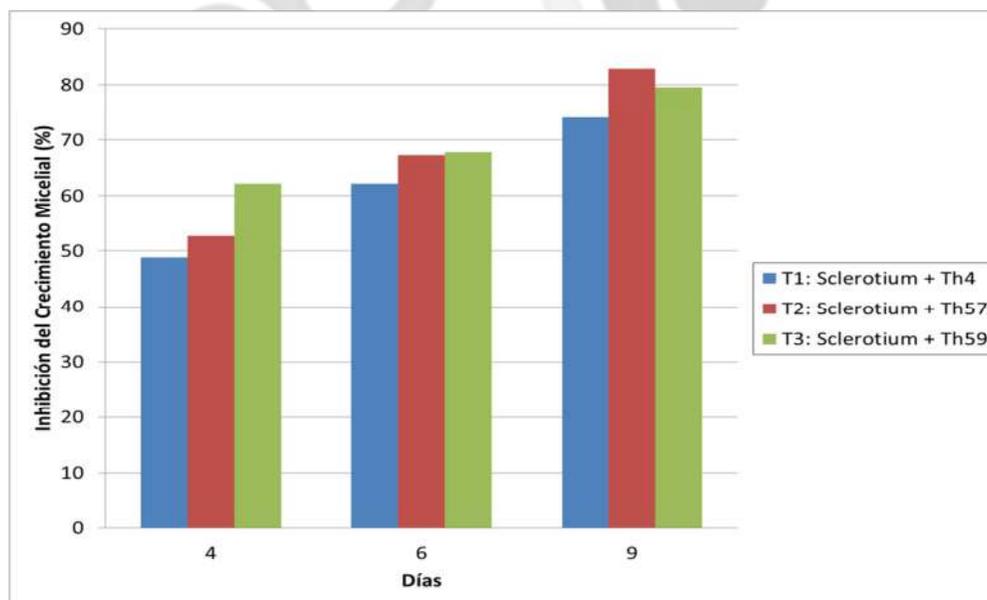


Figura 1. Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelial de *S. rolfsii*, durante los tres días de medición.

Los aislamientos no presentaron una evidencia clara de antagonismo por antibiosis, debido a que no se mostró una zona de inhibición antes del contacto de las hifas entre los dos microorganismos en enfrentamiento; sin embargo, manifestaron actividad parasítica, ya que una vez que se dio el contacto hifal entre los dos hongos, el antagonista fue quien logró colonizar y destruir hifas del hongo fitopatógeno. Esto fue

reportado por primera vez en por Weinding (1932), quien destaca las habilidades micoparasitas de este hongo, donde el antagonista localiza al patógeno y se enrolla alrededor de las hifas de este provocando su muerte. Referencia que ha servido como antecedente para realizar investigaciones del *Trichoderma* como controlador de enfermedades fungosas (Cook y Baker, 1989).

Los resultados obtenidos son similares a los informados por otros autores, como Montealegre *et al.* (1990), Velázquez (1996), Grimán (2002), Martínez (2009) y más recientemente Rojas (2012), quienes destacan que los aislamientos que estudiaron de *T. harzianum*, no presentaron una evidencia clara de antibiosis antes de que se diera el contacto entre las hifas, ya que no se llegó a reducir el diámetro de la colonia de *S. rolfsii* ni se marcó una zona clara de inhibición, y que por el contrario, al darse el contacto hifal fue que se demostró este mecanismo, tanto por competencia como hiperparasitismo. De este modo, se sustenta la capacidad de los aislamientos estudiados de *T. harzianum* para parasitar y destruir exitosamente hifas del hongo *S. rolfsii*.

Transcurrido los 21 días de confrontación de los diferentes aislamientos con el hongo fitopatógeno, se observó la formación de esclerocios, el tratamiento control desarrolló un número promedio de 200 esclerocios, y en el caso de Th59 fue de 34 esclerocios, 32 esclerocios Th4 y 28 esclerocios en Th57.

Estos resultados permitieron calcular el porcentaje de inhibición de formación de esclerocios que se refleja en la Tabla 3, donde se evidencia que los aislamientos de *Trichoderma* obtuvieron resultados satisfactorios, ya que el nivel de esta variable estuvo entre 83 a 86% de inhibición, y no presentaron diferencias significativas entre sí. *S. rolfsii* solo logró un porcentaje de formación de estructuras de resistencia de 14-17%, quedando demostrado el nivel de efectividad de *T. harzianum* para inhibir la formación y desarrollo de los esclerocios.

Tabla 3. *Inhibición de la formación de esclerocios de S. rolfsii por T. harzianum.*

| Tratamientos | Formación de esclerocios | Inhibición de formación de esclerocios (%) |
|--|---------------------------------|---|
| <i>S. rolfsii</i> vs Th4 | 32 | 84 a |
| <i>S. rolfsii</i> vs Th57 | 26 | 86 a |
| <i>S. rolfsii</i> vs Th59 | 34 | 83 a |
| <i>S. rolfsii</i> vs disco de agar estéril | 200 | - |

Medias con letras iguales en las columnas, no presentan diferencias para $p \leq 0,05$

El nivel de efectividad de *T. harzianum* para inhibir la formación y desarrollo de los esclerocios fue exitoso, resultados que se relacionan con los obtenidos en otras investigaciones, tal es el caso de, Jiménez (2004), Flores et al. (1999), Martínez (2009) y Rojas (2012), donde los aislamientos en estudios arrojaron datos de gran importancia, puesto que el porcentaje de inhibición de estas estructuras de resistencia fue positivo, ya que estuvieron cerca de los valores deseables, es decir el 100% de inhibición.

Es válido enfatizar, que estas estructuras de resistencia, por parte de los patógenos, traen consigo pérdidas considerables a nivel de producción y dificultan su control. La capacidad de estas estructuras de permanecer latentes en el suelo por mucho tiempo les permite la sobrevivencia en condiciones adversas, durante largos periodos; brindándole así, condiciones favorables para que germinen e infecten los tallos a nivel del suelo o formen apotecios, cuyas ascosporas al ser dispersadas pueden llegar a producir infecciones en la parte aérea de la planta (Cundon *et al.*, 2000).

En la figura 2. se presentan los resultados de la determinación de la agresividad de los aislamientos de *T. harzianum*, similares a los obtenidos por Martínez (2009) y Rojas (2012), donde los aislamientos se ubicaron en la clase 2 de la escala de Bell, es decir, aislamientos agresivos al ser enfrentadas con el patógeno.

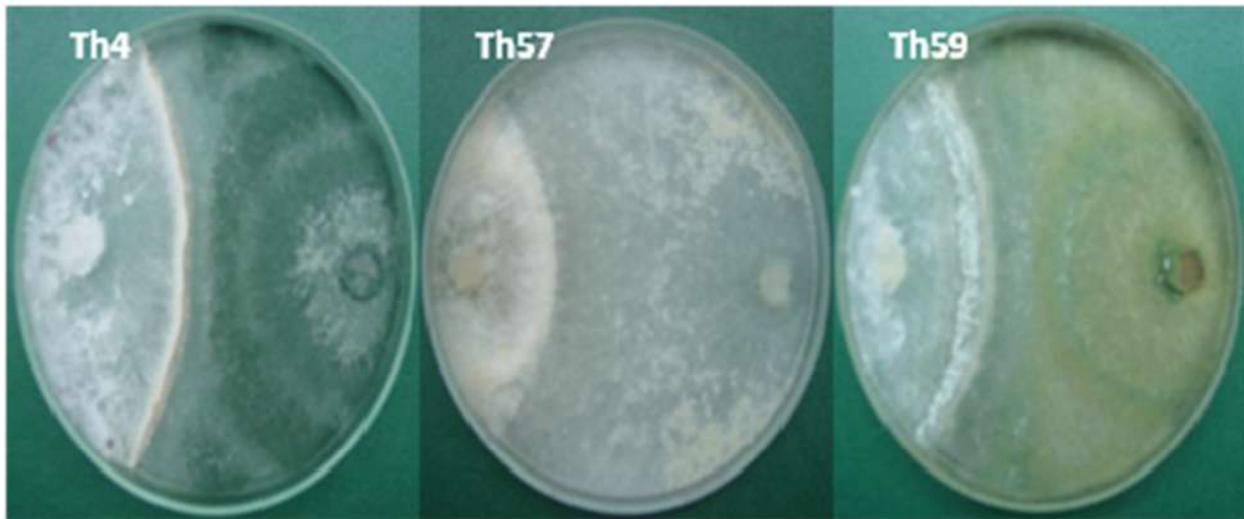


Figura 2. Enfrentamiento dual de los 3 aislamientos de *T. harzianum* frente a *S. rolfsii* a los 9 días.

CONCLUSIONES

Los aislamientos Th4, Th57 y Th59 de *T. harzianum* presentaron buena capacidad antagónica para inhibir el crecimiento micelial del patógeno, alrededor de 50 a 90% e inhibieron la formación de esclerocios, hasta 86%.

Todos los aislamientos se ubicaron en la escala 2 (agresiva), demostrando sus potencialidades para el control biológico de *S. rolfsii* Rifaii.

Por lo tanto, se recomienda realizar estudios a nivel de umbráculo y de campo de los aislamientos de *Trichoderma harzianum* Th4, Th54 y Th59, en el cultivo de zabila, y que permita determinar su efectividad en condiciones no controladas, para dar respuesta a los problemas fitosanitarios que presentan los productores del estado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Anzola, L. (2008). *Índice agropecuario*. 33 ediciones. Aragua - Venezuela.
Bell, D., Wells, H. y Markham, C. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72, pp. 379-382.

- Castro, J. (2008). *Evaluación in vitro del efecto inhibitorio de trichoderma harzianum sobre el agente causal de la pudrición del tallo de la Lechosa (Carica Papaya L.)*. (Tesis inédita de grado de Ingeniería Agronómica). Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Falcón-Venezuela.
- Cook, R. & Backer, K. (1989). *The nature and practice of biological control of plant pathogenos*. American phytho pathological Society. 2a edición Minnesota. USA.
- Cundon, M., Mazza, S., Mazzantu, M. & Gutiérrez, S. (2000). *Actividad antagónica in vitro de aislamientos de Trichoderma spp. sobre esclerocios de Sclerotinia sclerotium*. Universidad Nacional del Noreste.
- Duran A. & López, C. (.2001). *Perspectiva el control biológico de enfermedades en plantas*. Recuperado de: [http:// www.encuentros.uma.es/encuentros35/microb35.html](http://www.encuentros.uma.es/encuentros35/microb35.html)
- Fernández, O. & Vega, L. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Revista manejo integrado de plagas*, 59, pp. 62-100.
- Flores, Y., Mujica, Y., & Ortiz, Z. (1999). *Evaluación de la actividad antagónica de dos especies del genero Trichoderma sobre Sclerotium rolfsii aislado de tomate in vitro*. Fundación la Salle, campus Cojedes, San Carlos. UNELLEZ, Guanare. Disponible en: <http://www.redpav.avepagro.org.ve/fitopato/v122/xvi-congreso.html>.
- Griman, M. (2002). *Identificación y control biológico con hongos antagonistas de los hongos fitopatógenos en raíces y tallos en el cultivo de la Zábila (Aloe vera Miller) en el Municipio Colina Estado Falcón*. (Tesis inédita de grado de Ingeniería Agronómica).. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Falcón-Venezuela.
- Gutiérrez, C. (2009). *Diagnóstico de las enfermedades en la zabila (Aloe vera L.)*. En la parroquia Adaure del Municipio Falcón Estado Falcón.
- Jiménez, C. (2004). *Formulación y momento de aplicación de Trichoderma Rifaii para el control de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersi (Sacc) Ziinder & Hansen causante de la marchitez en tomate en el estado Aragua*. (Tesis inédita de grado de Ingeniería Agronómica). Universidad Central de Venezuela.
- Meléndez, M. Velázquez, J. González, M. Sánchez, D. & Sampool, O. (2006). Producción radical en plantas de zábila (*Aloe vera* L.) causadas por *Fusarium solani* (Mart) Sacc. y control biológico in vitro con *Trichoderma harzianum* Rifaii. *Resúmenes I Jornadas LINISSAV-UNEFM*.
- Martínez, M. (2009). *Evaluación de aislamiento y metodologías de producción masiva de Trichoderma harzianum Rifaii para el control de Sclerotium rolfsii Sacc en el cultivo de la zabila (Aloe vera)*. (Tesis inédita de grado de Ingeniería Agronómica). Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Falcón- Venezuela.
- Montealegre, J. & Henríquez J. (1990). Posibilidades de control integrado de *Sclerotium rolfsii* Sacc mediante hongos del género *Trichoderma* y fungicidas. *Fitopatología*, 25 (2), pp. 68-74.
- Pelczar, M., Reid, R. & Chan, E. (1997). *Microbiología*. Segunda edición. México.

- Piña, H. & González. J. (2009). Análisis estratégico de la agroindustria artesanal de la Zábila (*Aloe vera* L) en el Estado Falcón. *Multiciencias*, 10 (1), pp. 13-20.
- Polanco, C. & Castro, L. (2005). Estudios sobre el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. *Agronomi tropical*. 27, pp. 539-547
- Romero, Y., Velázquez, J., González, M., Hernández, R. & Griman, M. (2004). Avance en la investigación sobre enfermedades de la Zábila (*Aloe vera* L) en el estado Falcón. *Jornada de extensión postgrado y jornada de investigación Dr. León Croizat*. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro, Estado Falcón-Venezuela.
- Rojas, J. (2012) *Control biológico de Sclerotium rolfsii Sacc, patógeno de la Zábila (Aloe vera L) con Trichoderma harzianum Rifaii*. (Tesis inédita de grado de Ingeniería Agronómica). Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Falcón- Venezuela.
- S.A.S (2001). "Statistical Analysis System, Release 8.02". SAS Institute Inc, Cary, North Caroline, USA.
- Tovar (2008). *Evaluación de la capacidad antagónica "in vivo" de aislamientos de Trichoderma Spp frente al hongo Rhizoctonia 47 solani*. (Tesis inédita de grado de Microbiología Agrícola). Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá-Colombia.
- Velázquez, J. (1996). *Control biológico de Sclerotium rolfsii Sacc con Trichoderma harzianum Rifaii en siembras comerciales de tabacos Nicotiana tabacum en el estado Portuguesa- Venezuela*. (Tesis inédita de Magister Scientiarum). Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto- Venezuela.
- Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 22, pp. 837-845.