

Facultad de Estudios Superiores "Iztacala"

Tesis de Licenciatura en: Biología

CONTROL BIOLÓGICO DE LA "PUDRICIÓN BLANCA" DEL AJO (*Allium sativum* L.), CAUSADA POR *Sclerotium cepivorum* Berk., POR MEDIO DE *Sporidesmium sclerotivorum* Uecker, Ayers y Adams.

AUTOR: René Ortiz Pérez

ASESOR: GARCÍA ESPINOZA, ROBERTO

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

D E D I C A T O R I A

A MIS PADRES: Alberto Ortiz M. y Elisa Pérez de Ortiz,
por su amor y apoyo que siempre me han brindado de
incalculable valor, mi más profundo cariño.

A MIS HERMANOS: Graciela, Alvaro, Rodolfo, Rebeca,
Arcelia y Laura, con respeto y cariño.

A MIS AMIGOS: Chilo, Pancho, Alfre,
J. Carlos, Toño, Isabel, Susy,
Lety, Eli, y mi grupo en gene-
ral, muchas gracias por su
amistad.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Pueblo Mexicano, que mediante el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, hizo posible la realización de este trabajo, en el Centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.

Al Dr. Roberto García E. por sus valiosos y atinados consejos en la realización de mi tesis y por su amistad y apoyo.

A la Biól. y M.C. Magdalena Salgado de H. y Alberto Mendoza H. por su inapreciable ayuda y amistad.

A la Biól. Clarisa Sánchez de Sánchez y el Biól. Julio Sánchez E. por su valioso apoyo y amistad.

A las Bióls. Pilar Rodríguez, Bárbara Hernández y Graciela Segura y M.C. Issac Luna R. por su gran amistad siempre brindada.

A la Dra. Guadalupe Román M., por su amistad y afecto de incalculable valor, mi más sincero agradecimiento.

Al personal del Centro de Fitopatología que de alguna manera contribuyeron en la elaboración del presente trabajo.

C O N T E N I D O

	Pág.
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS-----	vi
RESUMEN -----	ix
I INTRODUCCION Y REVISION DE LITERATURA-----	1
II MATERIALES Y METODOS -----	8
1. Determinación de la densidad de inóculo--	8
2. Producción de esclerocios de <i>Sclerotium</i> <i>cepivorum</i> -----	9
3. Experimento de campo -----	1
3.1. Producción de inoculante del organis <u>m</u> mo antagónico-----	11
3.2. Población de conidios del organismo antagónico -----	11
3.3. Diseño y establecimiento del experi- mento de campo -----	12
3.4. Evaluación del efecto de los trata- mientos experimentales sobre la den- sidad de inóculo de <i>Sclerotium</i> <i>cepivorum</i> -----	14
3.5. Evaluación de los tratam <u>i</u> entos experi- mentales sobre la incidencia de la enfermedad y la producción -----	15

	Pág.
III. RESULTADOS Y DISCUSION-----	16
1. Determinación de la densidad de inóculo y daños causados-----	16
2. Producción de esclerocios de <i>Sclerotium</i> <i>cepivorum</i> -----	17
3. Experimento de campo -----	19
3.1. Efecto de la incorporación de <i>S.</i> <i>sclerotivorum</i> sobre la población de esclerocios de <i>S. cepivorum</i> -----	19
3.2. Evaluación del porcentaje y número promedio de plantas sanas de ajo-----	23
IV CONCLUSIONES-----	37
V LITERATURA CITADA -----	38

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO	Pág.
1 Efecto de distintos sustratos sobre la producción de esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> --	18
2 Número de esclerocios extraídos de muestras de 50 g de suelo, posteriormente a la aplicación de distintas dosis de conidios de <i>Sporidesmium sclerotivorum</i> en 5 fechas de muestreo, previos a la siembra del experimento de ajo, en suelo naturalmente infestado con <i>S. cepivorum</i> -----	21
3 Efecto de los tratamientos de control biológico y químico, sobre el porcentaje de plantas de ajo sanas en la primera fecha de evaluación	24
4 Efecto de los tratamientos de control biológico y químico sobre el porcentaje de plantas de ajo sanas en la segunda fecha de evaluación---	25
5 Análisis de varianza para los datos del número de plantas sanas de la primera fecha de evaluación -----	28
6 Efecto de la incorporación al suelo del antagonista <i>S. sclerotivorum</i> a distintas dosis y de	

	la aplicación de un fungicida, sobre el promedio de plantas sanas para la primera fecha de evaluación-----	30
7	Análisis de varianza para los datos del número de plantas sanas de la segunda fecha de evaluación -----	31
8	Efecto de la incorporación al suelo del antagonista <i>S. sclerotivorum</i> a distintas dosis, y de la aplicación de fungicidas, sobre el promedio de plantas sanas, para la segunda fecha de evaluación -----	32
9	Efecto de los tratamientos de control biológico y químico sobre la producción en kgs de ajo por parcela-----	33
10	Análisis de varianza para los datos de producción en kgs de ajo por parcela, bajo los tratamientos químicos y biológicos -----	34
11	Efecto final de la incorporación al suelo del antagonista <i>S. sclerotivorum</i> a diferentes dosis, y de la aplicación de fungicidas sobre la producción en kgs de ajo por parcela ----	35

- 1 Número de esclerocios extraídos de muestras de 50 g de suelo, después de la aplicación de los tratamientos a diferentes dosis de aplicación de *S. sclerotivorum*, durante 5 fechas de muestreo ----- 22
- 2 Efecto de los tratamientos de *Sporidesmium sclerotivorum* a diferentes dosis de aplicación y de los productos químicos, sobre el porcentaje de plantas sanas ----- 26
- 3 Número promedio de plantas sanas de ajo durante 2 fechas de muestreo, después de la aplicación del control biológico y químico- 27

RESUMEN

La pudrición blanca ocasionada por *Sclerotium cepivorum* Berk. es una enfermedad muy destructiva en los cultivos de ajo y cebolla. Los intentos de control químico hasta la fecha han resultado ineficientes, especialmente cuando se encuentran en el suelo densidades de inóculo de más de un esclerocio por gramo de suelo. En Celaya, Gto., se realizó un muestreo de un suelo infestado naturalmente y se encontró una densidad de inóculo muy alta (3.5 esclerocios/g de suelo), estableciéndose ahí un experimento bajo un diseño de bloques al azar con seis tratamientos y cuatro repeticiones, consistentes en la incorporación de diferentes dosis de conidios del micoparásito *Sporidesmium sclerotivorum* Uecker, Ayers y Adams, por gramo de suelo (50, 100, 300 y 500 conidios/g de suelo). Las parcelas experimentales se mantuvieron en condiciones de alta humedad por un período de 20 semanas, durante las cuales se realizaron 5 muestreos para rastrear las poblaciones de esclerocios, y al final de éstos se cultivó ajo de la variedad Probajio 1 (Pb1). Aunque *Sporidesmium sclerotivorum* ha sido efectivo en el control de *Sclerotinia minor* Jagger, y en la literatura se menciona que también destruye los esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, los resultados de este experimento mostraron

una nula eficiencia del micoparásito para destruir los esclerocios del patógeno y consecuentemente, en la reducción de incidencia de la enfermedad. Por otra parte, los productos químicos aplicados (Vinclozolin y PCNB) tampoco fueron eficientes, debido a que mostraron un 44.9% de plantas muertas.

INTRODUCCION Y REVISION DE LA LITERATURA

La pudrición blanca ocasiona serias pérdidas económicas a los países que cultivan ajo y cebolla, existiendo casos extremos como el de Estados Unidos en donde se han reportado pérdidas del 80 al 90% (Johnston, 1983). La enfermedad ha sido reportada en Inglaterra, Canadá, Estados Unidos, Australia, Finlandia y otros países mas; en México se encuentra en los Estados de Puebla, Tlaxcala, Morelos y Guanajuato, aunque aún no se tienen datos precisos de las pérdidas ocasionadas por la enfermedad ni una mayor información sobre su distribución (García, 1967).

Nuestro país se encuentra entre los diez países de mayor producción de ajo en el mundo, particularmente en los Distritos de Cortazar y Apaseo el Grande de Celaya, Gto., que son los de mayor producción, pues se siembran aproximadamente 3,500 hectáreas, que representan el 60% de la superficie nacional dedicada a este cultivo (Hernández, 1980).

El daño tan fuerte que causa la pudrición blanca a los cultivos de ajo y cebolla se debe en gran medida a la capacidad biológica que tiene *Sclerotium cepivorum* para

sobrevivir en el suelo, debido a que forma esclerocios que son las estructuras de supervivencia de este patógeno y son capaces de vivir en el suelo en estado dormante por más de 4 años en ausencia del hospedante (Coley-Smith, 1960; Crowe, et al., 1980), de tal manera que al sembrar ajo, el hongo inicia el ataque al germinar los esclerocios debido a exudados radicales que emiten estas plantas como producto de su metabolismo y que estimulan tal germinación (Entwistle et al., 1981), así las hifas surgidas de los esclerocios, invaden intra e intercelularmente los tejidos del hospedante (Crowe, et al., 1980), posteriormente se forma un micelio blanco algodonoso que cubre completamente los bulbos del ajo; después las hifas se anastomosan y comienzan a formarse los esclerocios que al madurar completamente quedan como estructuras esféricas de color negro y de un diámetro aproximado de 0.3-0.6 mm. (Crowe, et al., 1980; Coley-Smith, 1960). Finalmente el hospedante se colapsa y muere quedando una gran cantidad de esclerocios en el suelo, listos para atacar a un nuevo cultivo.

Dentro de las condiciones edáficas que influyen en el desarrollo de la enfermedad, destacan el contenido de humedad, la temperatura y el pH. La humedad del suelo influye sobre la germinación de los esclerocios, y fluctúa entre un potencial de agua de -45 a -3 bars (Crowe-Hall,

1980). Lucke (1967) menciona que la enfermedad se presenta bajo un amplio rango de temperatura del suelo que va de 5 a 30°C. y bajo condiciones de pH en un intervalo de 6.3 a 8.4 (Coley-Smith, 1960).

A *Sclerotium cepivorum* se le clasifica dentro de la clase Deuteromycetes (hongos imperfectos) y hasta el momento no se le conoce la fase sexual, solamente la asexual representada por los esclerocios. La densidad de inóculo natural encontrada al muestrear diferentes suelos de acuerdo con Papavizas (1972), es de alrededor de 0.08 esclerocios/g de suelo, sin embargo, de acuerdo a Crowe, et al., (1980) al muestrear otros suelos se encontró una densidad de inóculo de 0.3 esclerocios/g de suelo; la densidad de inóculo es importante debido a que al aumentar ésta se incrementa la incidencia de la enfermedad y por tanto el porcentaje de plantas muertas (Crowe, et al., 1980).

El control de esta enfermedad es muy difícil y los intentos de control químico han resultado con frecuencia ineficientes y de un elevado costo económico y ecológico. Los productos químicos que se han utilizado son: Calomel y Bicloriguero de mercurio (Scott, 1956), Iprodione, Vinclozolin, Pentacloronitrobenceno, Benomyl y Thiabendazol (Greathead, et al., 1983; Johnston, 1983; Entwistle 1983), sin embargo,

los resultados de control no han sido satisfactorios debido a que algunos de estos fungicidas presentan poca efectividad, quizás porque algunos de ellos son de baja estabilidad en el suelo, o son absorbidos por los componentes del suelo (Sarasola, 1975). También los productos químicos llegan a ser metabolizados por la microbiota del suelo, pues los microorganismos adquieren resistencia a éstos como lo menciona Dekker (1969), Bollen y Scholten (1971) y Dekker, (1971). Es posible que esta ineffectividad se deba al hecho de que *Sclerotium cepivorum* se ha vuelto resistente a ciertos fungicidas (Garibaldi y Lodovica, 1983; Littlely y Rahe, 1983). Por otra parte los compuestos mercuriales y otros con capacidad de persistencia en el ambiente representan un grave peligro no solo por la contaminación de los alimentos sino también por su diseminación a lugares alejados, en donde provocan toxicidad en poblaciones animales, vegetales y al hombre mismo (Albert, 1983).

Dadas las dificultades para el control adecuado de esta enfermedad, es necesario buscar otras alternativas, una de estas es el control biológico, sobre el cual en el primer symposium para el estudio y manejo de las enfermedades radicales celebrado en Berkeley en 1965 y que reunió a fitopatólogos, microbiólogos de suelo y edafólogos, se condenó al control biológico con la metáfora "nacerá después

de un largo y penoso embarazo el bebé muerto del enlace de la fitopatología y la microbiología de suelos al que llamarán control biológico". Largo y penoso ha sido el período de espera, pero el fruto ha sido bueno y son abundantes los reportes de control biológico exitoso de enfermedades.

Merecen mención especial los trabajos de Rishbeth (1963), que han fomentado el entusiasmo por este enfoque, dado el éxito contundente que logró al controlar *Fomes annosus* mediante *Peniophora gigantea*, control que se ha desarrollado comercialmente y para el cual se aplican los conidios del antagonista (*Peniophora gigantea*), en el aceite lubricante de la cadena de las motosierras con que cortan los árboles, previniendo con esto, el ataque y colonización de *F. annosus*.

Existen muchos otros ejemplos de control biológico exitoso sobre los cuales pueden encontrarse detalles en los fascinantes tratados sobre control biológico de Baker y Cook (1973), y de Cook y Baker (1983). Los trabajos de control biológico contra la pudrición blanca del ajo han sido pocos, sólo se encontraron reportes sobre los siguientes organismos antagónicos a *S. cepivorum*: (Abd-El Moity y Shatla, 1981); Papavizas, et al., (1982), *Penicillium nigricans*

(Graffar 1969), *Bacillus subtilis*, (Utkhede y Rahe, 1983), *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp. (Leyva M. y García E. R., 1980), y el más reciente *Sporidesmium sclerotivorum* (Uecker et al., 1980), (J.R. Coley-Smith, 1983). De los organismos antagónicos mencionados uno de los más efectivos y promisorios es *Sporidesmium sclerotivorum*, hongo Dematiaceo de la clase Hyphomycetes que fue descubierto por Uecker, Ayers y Adams en 1978, y que mostró ser un micoparásito de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor* y *Sclerotium cepivorum*; *Sporidesmium sclerotivorum* parasita y destruye los esclerocios en el suelo en un tiempo de 10 semanas (Adams y Ayers, 1982), bajo condiciones ambientales de 15-25°C de temperatura, y a un pH de 5.5-7.5 y con potenciales de agua de -8 bars o mayores (Barnett y Ayers, 1981).

Para la producción de *S. sclerotivorum* es necesario producir esclerocios de *S. minor* en grandes cantidades, pero no es muy fácil debido a que el material que se utiliza resulta costoso por lo que se debe realizar investigación para producir más esclerocios a costos más bajos, utilizándose por ejemplo sustratos tales como rastrojos de maíz, alfalfa, frijol y otros.

La población de esclerocios de *Sclerotinia minor* se redujo en un 95% al incorporar *S. sclerotivorum* en suelos

infestados por el patógeno (Adams y Ayers, 1981). Recientemente, Salgado, (1984), utilizó este micoparásito contra *Sclerotinia minor* Jagger, causante del apagamiento de la lechuga y redujo fuertemente la población de esclerocios de *S. minor*, así como las pérdidas de plantas.

Considerando los reportes que existen del ataque de *Sporidesmium sclerotivorum* a *S. cepivorum*. (Adams y Ayers, 1980, 1981, 1982; Barnett y Ayers, 1981), los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes: 1.- Determinar la densidad de inóculo del patógeno en el terreno donde se han observado daños hasta del 100%. 2.- Buscar sustratos adecuados para la producción de esclerocios del patógeno sobre los cuales eventualmente reproducir al antagonista. 3.- Evaluar la eficiencia en el control de la pudrición blanca del ajo, con la incorporación de *Sporidesmium sclerotivorum* a suelo fuertemente infestado de *Sclerotium cepivorum*.

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el Rancho el Colorado, Municipio de Cortazar, Celaya, Gto. situado a 10 kms de la carretera Celaya-Irapuato, ésta es una zona importante en la producción de ajo para exportación y se siembran de 200 a 300 has de ajo. En este lugar la enfermedad ("pudrición blanca") se manifestó desde 1981 en pequeñas áreas, siendo la más grande de 30 m de diámetro y en donde la enfermedad fue muy severa en el año de 1982 pues destruyó casi en su totalidad al cultivo de ajo, el 27 de julio de 1983 se estableció el experimento de control biológico sobre el área infestada por el patógeno.

1. Determinación de la densidad de inoculo

Para determinar la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* en una área donde en 1982 se tuvieron pérdidas totales, se extrajeron 32 muestras con una barrena metálica, sacando corazones de suelo de 3 cm de diámetro a una profundidad de 10 cm; cada muestra se colocó en una bolsa de plástico con su correspondiente etiqueta. En el laboratorio se homogenizó cada muestra y se tomaron 50 g de suelo que se colocaron en tamices de 20 y 60 mallas ha-

ciendo pasar agua corriente por ellos, de tal manera, que los esclerocios y otras partículas del suelo del mismo tamaño quedaron en el tamíz de 60 mallas.

Los esclerocios obtenidos se colocaron en una probeta de 100 ml y se separaron de las partículas del suelo por flotación, es decir las partículas más pesadas se precipitan al fondo de la probeta y las partículas más ligeras se quedan flotando en la parte superficial; este sobrenadante que contiene los esclerocios se vació en un pequeño tamiz de 100 mallas donde se capturaron todos los esclerocios, que finalmente se contaron usando pinzas entomológicas, separándolos del suelo bajo el microscopio estereoscópico; y colocándolos en cajas de Petri con papel filtro humedecido. Los datos se presentan como número promedio de esclerocios en 32 muestras de 50 g de suelo, en una sola fecha de muestreo, al inicio del estudio, el 16 de junio de 1983.

2. Producción de esclerocios de *Sclerotium*

cepivorum

Este patógeno fue aislado a partir de plantas de ajo infectadas por el hongo. El micelio se transfirió a cajas de Petri con medio de cultivo de papa dextrosa agar (PDA) y se dejaron en una cámara de incubación a 24°C, du-

rante una semana. Al desarrollarse el micelio completamente, este se volvió a transferir bajo condiciones asépticas a frascos conserveros estériles conteniendo 100 g de distintos sustratos, finamente picados como son cebolla, rastrojo de maíz, frijol y alfalfa; y estos a su vez se combinaron para probar su eficacia en la producción de esclerocios dando como resultado las siguientes combinaciones: cebolla-maíz, cebolla-alfalfa, alfalfa-frijol, maíz-frijol, alfalfa-maíz, a una proporción del 50% de cada elemento, es decir 50% de cebolla y 50% de maíz de una relación p/p.

Estos frascos fueron esterilizados en autoclave, después se inocularon y se mantuvieron un tiempo aproximado de 4 semanas a una temperatura de 23 a 25°C en obscuridad. Para evaluar la producción de esclerocios en los sustratos, se tomó una escala cualitativa arbitraria, en la que se estimó la producción en base al mayor número de esclerocios, debido a que fue muy difícil separar los esclerocios de algunos sustratos, tales como cebolla-maíz, cebolla-alfalfa, alfalfa-frijol.

3. Experimento de campo

3.1. Producción de inoculante del organismo antagónico

Este hongo antagónico (*S. sclerotivorum*) se cultivó en una mezcla al 1% de esclerocios de *Sclerotinia minor* y arena. Esta mezcla se realizó en charolas de plástico, posteriormente se inoculó con *Sporidesmium sclerotivorum* que se tenía desarrollando en un medio similar. Los conidios inoculados, se mezclaron de tal manera que se distribuyeron en la charola lo mejor posible, finalmente las charolas se envolvieron en bolsas de plástico para evitar que el agua con que se humedeció el medio se evaporara y se mantuvieron a 25°C por un tiempo de 10 semanas.

3.2. Población de conidios del organismo antagónico

Para estimar el número de macroconidios y de *Sporidesmium sclerotivorum* producidos en charolas después de homogenizar la arena, se tomaron muestras de 1 g y se diluyeron en un tubo de ensaye con 9 ml de agua, posteriormente se le agregaron 3 gotas de tergitol (dispersante) para disgregar los macroconidios de las partículas de arena y luego se agitó el tubo de ensaye en un Vortex durante 4 minutos; después se tomó una muestra de la dilución con una pipeta Pasteur con la que se llenó la cámara de Neubauer,

para el conteo de células. La cámara se observó en el microscopio óptico para contar el número de macroconidios encontrados en cada campo de la cámara, finalmente se estimó el número de conidios por muestra, por medio de la fórmula: No. de conidios por muestra = No. de conidios x 2000 x 10 ml de dilución.

3.3. Diseño y establecimiento del experimento de campo

El experimento se estableció en una área donde el cultivo fue totalmente destruido en 1982 y después de evaluar la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum*, el terreno fue arado y rastreado con el propósito de homogenizar el inóculo del patógeno y de esta forma trazar las parcelas experimentales. El terreno para el experimento fue un cuadro de 30 x 30 m en el que se trazaron 24 parcelas de 2.4 x 5, arregladas bajo un diseño experimental de bloques al azar, consistente de 6 tratamientos y 4 repeticiones. A continuación se enlistan los tratamientos establecidos:

T R A T A M I E N T O S

- | | | |
|---|-------|---------------------------------------------------|
| 1 | _____ | Testigo (sin tratamiento) |
| 2 | _____ | Químico (Vinclozolin y Pentacloronitrobenceno) |
| 3 | _____ | 50 conidios/g de suelo de <i>S. sclerotivorum</i> |

- 4 _____ 100 conidios/g de suelo de *S. sclerotivorum*
- 5 _____ 300 conidios/g de suelo de *S. sclerotivorum*
- 6 _____ 500 conidios/g de suelo de *S. sclerotivorum*

El tratamiento químico consistió en la desinfección de la semilla con Vinclozolin a una dosis de aplicación de 4 kg/ton de semilla, y una aplicación quincenal de Pentacloronitrobenceno 25 kg/ha durante tres quincenas, después de emergidas las plántulas de ajo.

Los tratamientos que involucraron la aplicación del antagonista *Sporidesmium sclerotivorum* consistieron de 2 kg de arena con antagonista equivalente a una proporción de 500 conidios/g de suelo de la parcela a tratar, 1.2 kg de arena que equivale a 300 conidios/g de suelo, 400 g de arena equivalente a 100 conidios/g de suelo y 200 g de arena consistente en 50 conidios/g de suelo; estas cantidades de arena se aplicaron a cada parcela experimental para el control biológico de *S. cepivorum*, y cada cantidad fue calculada para inocular cada gramo de la parcela experimental, basándose en el volumen de suelo contenido en éstas. El terreno se sembró con ajo de la variedad Pbl (probajio 1)

20 semanas después de establecidos los tratamientos, sembrándose 180 dientes/parcela.

3.4. Evaluación del efecto de los tratamientos experimentales sobre la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum*.

Durante el período comprendido entre la inoculación del antagonista al suelo y la siembra del cultivo de ajo (20 semanas) se estableció un programa de muestreo para conocer el efecto de los tratamientos sobre la densidad de inóculo del patógeno, de manera que en total se realizaron 5 muestreos por parcela y cada muestreo consistió de 8 corazones de suelo extraídos a 10 cm de profundidad con una barrena metálica de 3 cm de diámetro.

En el laboratorio el suelo de cada muestra se agitó con una batidora eléctrica para homogeneizar el inóculo del patógeno y se tomaron 3 submuestras de 50 g de cada una. Posteriormente mediante flotación se extrajeron los esclerocios de las muestras y se colocaron en cajas de Petri con papel filtro humedecido, los esclerocios se observaron durante un tiempo de 2 a 3 semanas para verificar si el micoparásito había infectado a los esclerocios, ya que a partir de esclerocios infectados el micoparásito emite abundantes hifas de color verde olivo con conidióforos y conidios. Los

datos obtenidos se graficaron como número de esclerocios por 50 g de suelo para cada una de las 5 fechas de muestreo y para cada tratamiento.

3.5. Evaluación de los tratamientos experimentales sobre la incidencia de la enfermedad y la producción

Para cada parcela se contó el número de plantas sanas y se evaluó la producción en kg/parcela. Los datos del número de plantas sanas se transformaron a logaritmo y se sometieron a análisis de varianza y los tratamientos se compararon mediante la prueba de separación de medias de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Determinación de la densidad de inóculo y daños causados

La densidad de inóculo encontrada es muy elevada ya que equivale a 1.4 esclerocios/g de suelo, rebasando los niveles encontrados en otros países que van de 0.08-0.16 esclerocios/g de suelo (Papavizas, 1972) o hasta 0.3 esclerocios/g de suelo (Crowe, et al., 1980). La densidad de inóculo observada es muy peligrosa para el cultivo del ajo, puesto que se ha observado (en este terreno en 1982) pérdidas de hasta un 100%, lo cual concuerda con lo descrito por Crowe, et al., (1980). Este resultado evidencia lo grave y peligroso de la enfermedad para la región productora de ajo de Celaya. Grave por los daños tan fuertes que ocasiona al cultivo, porque se puede diseminar a otros terrenos cercanos por medio de la misma maquinaria utilizada, por el uso excesivo de productos químicos que inducen resistencia al patógeno y contaminan el ambiente; por el peligro de que se apliquen a México cuarentenas internacionales, medida que se debe considerar para evitar la diseminación del patógeno.

2. Producción de esclerocios de *Sclerotium* *cepivorum*

Para multiplicar al organismo antagónico (*Sporidesmium sclerotivorum*) es necesario producir esclerocios del organismo patógeno *S. cepivorum* puesto que el antagonista se multiplica a partir del parasitismo y destrucción de éstos. Por tal razón se probaron distintos sustratos para producir esclerocios de *Sclerotium cepivorum*.

Según el Cuadro 1, el sustrato de cebolla presentó una mayor producción de esclerocios, seguido de la combinación de cebolla con maíz y cebolla con alfalfa.

En los sustratos de alfalfa con frijol y frijol solo, la producción de esclerocios fue moderada, pero mejor que en los sustratos de maíz con frijol, alfalfa con maíz y alfalfa sola.

En los resultados obtenidos se observó claramente que la cebolla es el mejor sustrato para producir esclerocios, pues es el hospedante de *S. cepivorum* y en ella se encuentran los requerimientos nutricionales para el hongo. Aunque en los sustratos que contenían cebolla mezclada con maíz, frijol y alfalfa el crecimiento fue menor, es posible que en tales

Cuadro 1. Efecto de distintos sustratos sobre la producción de esclerocios de *Sclerocium cepivorum*.

Sustrato	Abundancia relativa de esclerocios, después de 7 semanas*
Cebolla	+ + + + +
Cebolla-Maíz	+ + + +
Cebolla-Alfalfa	+ + + +
Alfalfa-Frijol	+ + +
Frijol	+ + +
Maíz-Frijol	+ +
Alfalfa-Maíz	+ +
Alfalfa	+ +
Maíz	+

* Los símbolos denotan la abundancia relativa de esclerocios, después de 7 semanas de crecimiento. Muy abundante = +++++; abundante = ++++; moderado = +++; escaso = ++; casi nulo = +.

combinaciones se hayan formado sustancias que posiblemente inhibieron el crecimiento de *S. cepivorum*, también se sabe que *S. cepivorum* posee la capacidad de utilizar un amplio espectro de compuestos de carbono y nitrógeno (Papavizas, 1970). Es claro entonces que para producir esclerocios es mejor la cebolla y para los rastrojos de frijol, maíz y alfalfa es posible que se requiera de algún nutrimento adicional.

3. Experimento de campo

3.1. Efecto de la incorporación de *S. sclerotivorum* sobre la población de esclerocios de *S. cepivorum*

Los resultados obtenidos parecen indicar que *S. sclerotivorum* no logró abatir las poblaciones de esclerocios de *S. cepivorum*, ya que los resultados muestran que el tratamiento de 500 conidios/g de suelo, que es la dosis más alta, la población esclerocial aumentó a través de las fechas de muestreo, particularmente en la última. En los tratamientos de 100 y 300 conidios/g de suelo, desde la 1a. hasta la 3a. fecha de muestreo, sus poblaciones esclerociales son similares, pero en la última fecha de muestreo la población esclerocial del tratamiento de 300 conidios/g de

suelo aumenta ligeramente, y en el tratamiento de 100 conidios/g de suelo disminuye (Cuadro 2 y Gráfica 1). El tratamiento de 50 conidios/g de suelo muestra que su población de esclerocios es más baja que todos los tratamientos. Para el testigo (sin tratamiento) en la 3a fecha de muestreo se observó una población esclerocial mayor que en todos los tratamientos, aunque en la 4a y 5a evaluación la población decrece siendo menor que los tratamientos de control biológico.

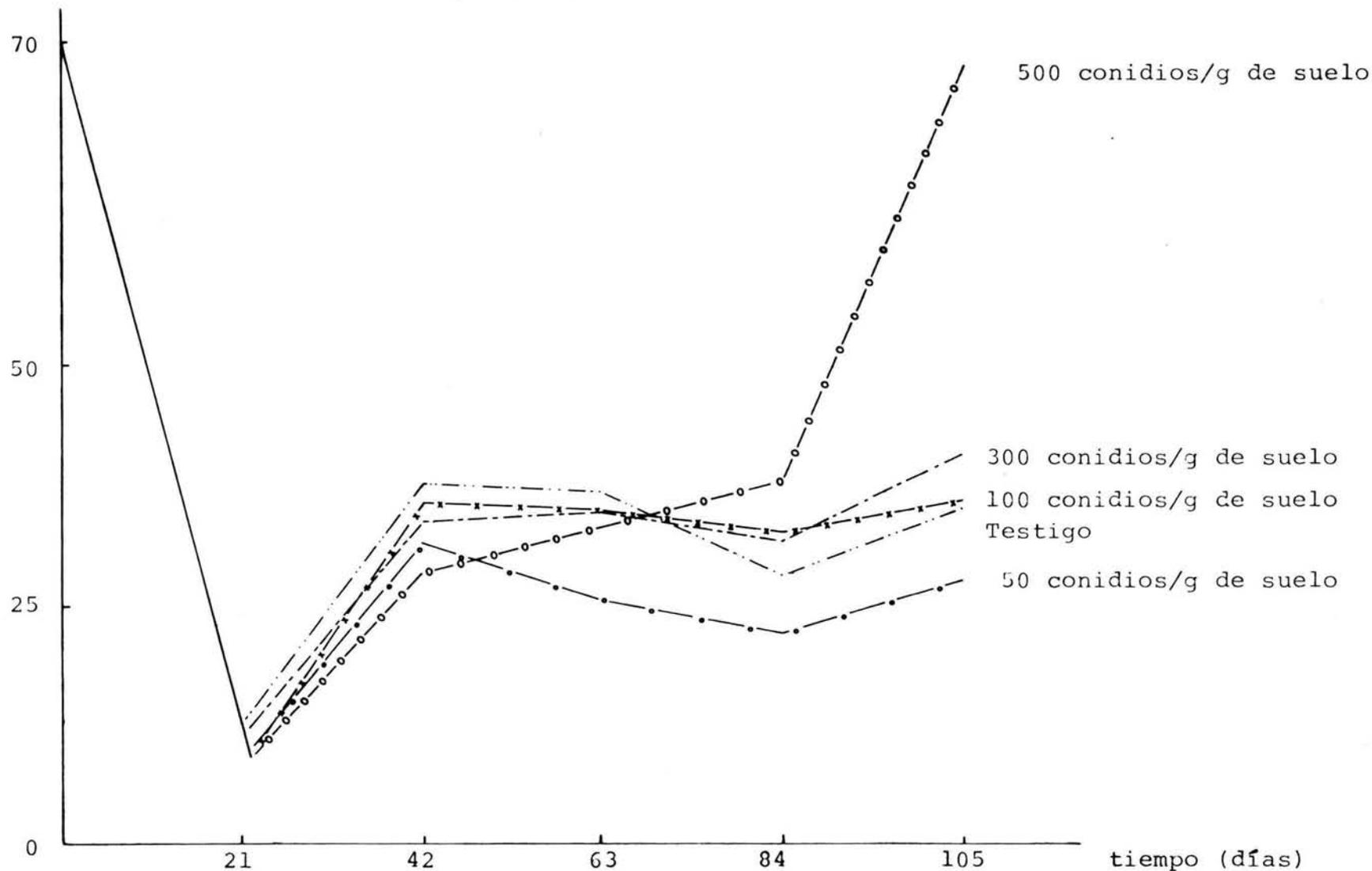
Evidentemente los trabajos de control biológico representan una área muy interesante además de importante para el control de enfermedades de plantas, aunque en ocasiones no se obtengan resultados satisfactorios de control. La pudrición blanca es una enfermedad de muy difícil control en especial en el terreno donde se estableció este experimento debido a la elevada densidad de inóculo de *S. cepivorum*. La población introducida de *S. sclerotivorum* al suelo problema, aparentemente no se acopló con la población del patógeno (*S. cepivorum*), por lo que no se logró establecer la relación depredador-presa para controlar la pudrición blanca. La población introducida del antagonista se produjo sobre una población de esclerocios de *S. minor* con la cual si existe acoplamiento en otras palabras, la población empleada del antagonista parece haber sido objeto de presión de selección,

Cuadro 2. Número de esclrocios de *S. cepivorum* extraídos de muestras de 50 grs. de suelo, posteriormente a la aplicación de distintas dosis de conidios de *Sporidesmium sclerotivorum* en 5 fechas de muestreo, previos a la siembra del experimento de ajo, en suelo naturalmente infestado con *S. cepivorum*.

Tratamiento	Fecha 1 (21 días)	Fecha 2 (42 días)	Fecha 3 (63 días)	Fecha 4 (84 días)	Fecha 5 (105 días)
Testigo (T ₁)	9.8	31.3	30.7	23.4	29.5
Químico (T ₂)	12.1	34.4	30.3	25.5	38.1
50 con. */g de suelo (T ₃)	7.8	26.0	20.9	18.1	23.0
100 con./g de suelo (T ₄)	7.7	29.4	27.9	27.3	29.5
300 con./g de suelo (T ₅)	10.2	28.0	28.6	27.0	33.9
500 con./g de suelo (T ₆)	9.1	24.3	27.8	31.7	69.0

*con = conidios

Número de esclerocios/50 g de suelo



Gráfica 1. Número de esclerocios extraídos de muestras de 50 g de suelo, después de la aplicación de los tratamientos de *S. sclerotivorum* a diferentes dosis de aplicación, durante 5 fechas de muestreo.

donde la inmensa mayoría de los individuos de la población del antagonista serán capaces de destruir a *S. minor* pero tal vez sólo una fracción de esa población tendrá la capacidad de destruir esclerocios de *S. cepivorum*, por lo que quizá para observar el acoplamiento poblacional que culmine en la reducción de la población de *S. cepivorum* se hubiera requerido de mayor tiempo, o de haber hecho selección de cepas capaces de atacar a este patógeno y su multiplicación previa para ser empleadas en este trabajo. Recientemente en comunicación personal con el Dr. Pete Adams, se logró establecer que la cepa de *S. sclerotivorum* (CS5) es específicamente agresiva contra los esclerocios de *S. minor*, pero no contra los esclerocios de *S. cepivorum*; esto respalda a lo anteriormente expuesto.

3.2. Evaluación del porcentaje y número promedio de plantas sanas de ajo

El tratamiento químico fue el que tuvo un mayor número y porcentaje de plantas sanas durante las evaluaciones realizadas, con respecto a los tratamientos de control biológico (Cuadro 3 y 4 y Gráficas 2 y 3). El análisis de varianza para los datos del primer muestreo del promedio de plantas sanas (Cuadro 5) mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos. La prueba de separación de me

Cuadro 3. Efecto de los tratamientos de control biológico y químico, sobre el porcentaje de plantas de ajo sanas en la primera fecha de evaluación.

Tratamiento	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Promedios
Testigo (T ₁)	26.1	25.5	26.1	54.4	33%
Químico (T ₂)	66.6	64.4	59.4	57.7	62%
50 con.*/g de suelo (T ₃)	26.6	25.5	43.8	47.2	35.7%
100 con./g de suelo (T ₄)	26.6	31.1	37.2	47.2	35.5%
300 con./g de suelo (T ₅)	22.7	25.5	31.6	50.5	32.5%
500 con./g de suelo (T ₆)	24.4	35.5	48.3	51.6	39.9%

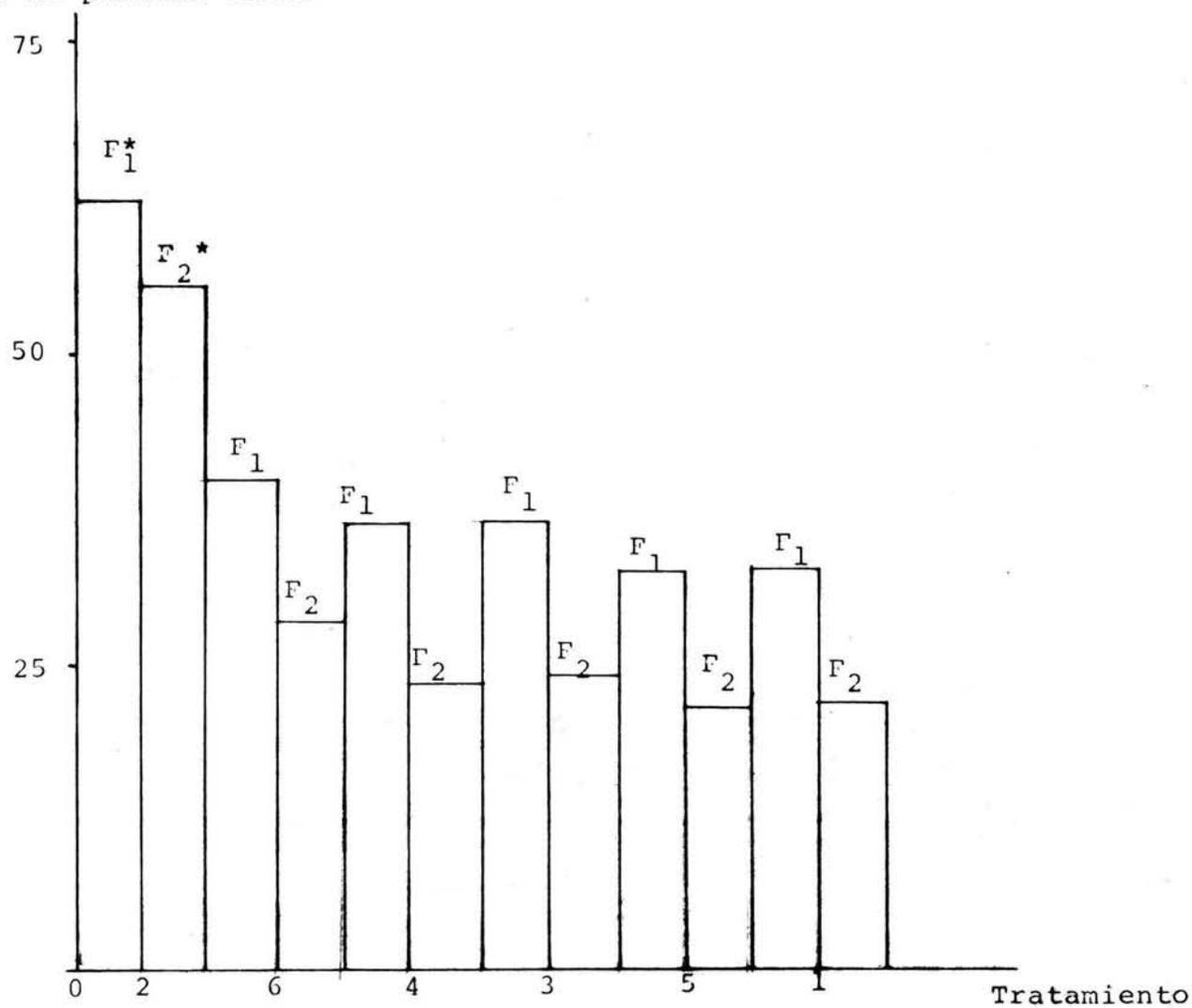
* con = conidios

Cuadro 4. Efecto de los tratamientos de control biológico y químico sobre el porcentaje de plantas de ajo sanas en la segunda fecha de evaluación.

Tratamiento	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Promedios
Testigo (T ₁)	15	18.3	19.4	35	21.9%
Químico (T ₂)	59.4	60.5	52.2	48.3	55.1%
50 con.*/g de suelo (T ₃)	19.4	16.1	37.7	23.8	24.2%
100 con./g de suelo (T ₄)	13.8	23.3	26.6	30	23.4%
300 con./g de suelo (T ₅)	14.4	16.1	25	29.4	21.2%
500 con./g de suelo (T ₆)	18.3	25	41.1	27.7	28 %

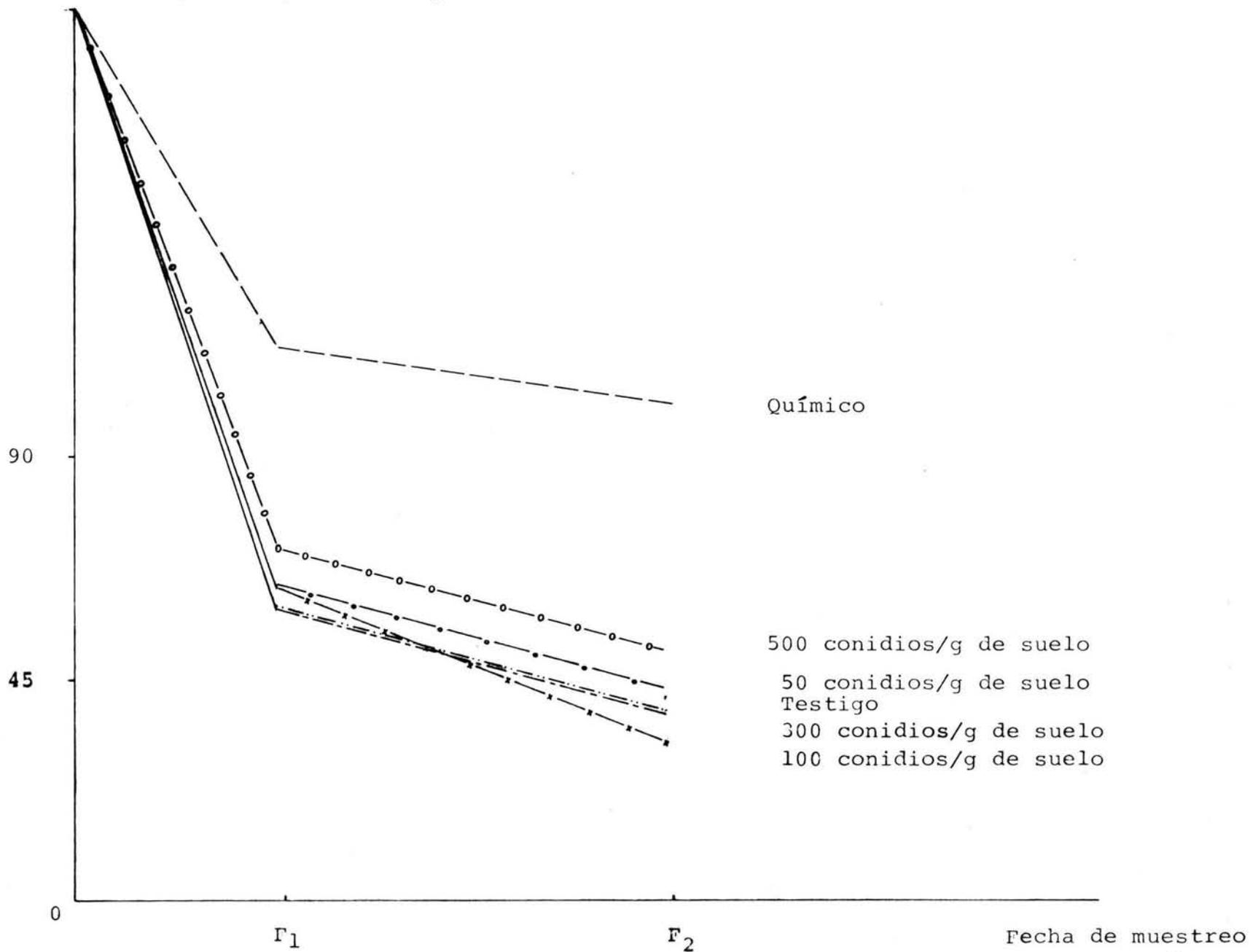
* con = conidios

% de plantas sanas



Gráfica 2. Efecto de los tratamientos de *Sporidesmium sclerotivorum* a diferentes dosis de aplicación y de los productos químicos, sobre el porcentaje de plantas sanas.

F₁^{*} Primera fecha de evaluación
F₂^{*} Segunda fecha de evaluación



Gráfica 3. Número promedio de plantas sanas de ajo durante 2 fechas de muestreo, después de la aplicación del control biológico y químico

Cuadro 5. Análisis de varianza para los datos del número de plantas sanas de la primera fecha de evaluación.

Fuente de variación FV	Grados de libertad GL	Suma de cuadrados SC	Cuadrado medio CM	Valor de F
Modelo	5	2097.05208333	419.41041667	12.67
Error	90	2978.18750000	33.09097222	PR>F
Total	95	5075.23958333		0.0001

dias de Duncan ($P = 0.05$) para ver el efecto de la incorporación al suelo de *S. sclerotivorum* y la aplicación de los fungicidas (Vinclozlin y PCNB) sobre el promedio de plantas sanas, mostró que estadísticamente sólo el tratamiento químico es diferente con respecto a los tratamientos de control biológico (Cuadro 6); los mismos resultados se obtuvieron para la segunda evaluación (Cuadro 7 y 8).

El análisis de varianza de los datos de producción mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos. El análisis de separación de medias de Tukey mostró que sólo el tratamiento químico fue distinto a los demás ($P = 0.05$) (Cuadros 9, 10 y 11).

Aunque la incidencia y daños de la enfermedad fueron significativamente menores en el tratamiento químico, estos resultados sólo confirman lo inadecuado de este método de control, pues a pesar de haber desinfectado la semilla de ajo y realizar tres aplicaciones de fungicida durante el ciclo del cultivo, la enfermedad se manifestó en una manera severa causando la muerte de hasta un 44.9% de plantas. Con relación a los tratamientos de control biológico, se observa que en el de 500 conidios/g de suelo es en el que la producción fue ligeramente mayor, aunque no estadísticamente distinta a la del testigo. Tal vez aplicaciones con dosis más

Cuadro 6. Efecto de la incorporación al suelo del antagonista *S. sclerotivorum* a distintas dosis y de la aplicación de los fungicidas, sobre el promedio de plantas sanas, para la primera fecha de evaluación.

Tratamiento	Medias	Significancia estadística*
2 Químico	29.937500	a
6 (500 con.*/g de suelo)	18.00000	b
4 (100 con./g de suelo)	16.00000	b
3 (50 con./g de suelo)	15.625000	b
1 (testigo)	14.875000	b
5 (300 con./g de suelo)	14.375000	b

* Los tratamientos seguidos por una misma letra son iguales, (P = 0.05) en base a la prueba de Duncan.

* con = conidios

Cuadro 7. Análisis de varianza para los datos del número de plantas sanas de la segunda fecha de evaluación.

Fuente de variación FV	Grados de libertad GL	Suma de cuadrados SC	Cuadrado medio CM	Valor de F
Modelo	23	3.67982574	0.15999242	8.59
Error	72	1.34086575	0.01862312	PR>F
Total	95	5.02069194		0.0001

Cuadro 8. Efecto de la incorporación al suelo del antagonista *S. sclerotivorum* a distintas dosis, y de la aplicación de fungicidas, sobre el promedio de plantas sanas, para la segunda fecha de evaluación.

Tratamiento	Medias	Significancia estadística*
2 Químico	1.3866	a
6 (500 con.*/g de suelo)	1.0454	b
3 (50 con./g de suelo)	0.9964	b
4 (100 con./g de suelo)	0.9905	b
1 (testigo)	0.9674	b
5 (300 con./g de suelo)	0.9482	b

* Los tratamientos seguidos por una misma letra son iguales, (P = 0.005) en base a la prueba de Tukey.

*con = conidios

Cuadro 9. Efecto de los tratamientos de control biológico y químico sobre la producción en Kgs de ajo por parcela.

Tratamiento	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Σ^1 (Kgs)	\bar{x}^2 (kgs)
Testigo (1)	0.825	0.177	0.440	1.550	2.992	0.748
Químico (2)	2.475	2.775	1.975	1.925	9.150	2.2875
50 con.*/g de suelo (3)	0.750	0.575	1.325	0.900	3.550	0.8875
100 con./g de suelo (4)	0.200	0.750	0.850	1.275	3.075	0.7687
300 con./g de suelo (5)	0.575	0.400	0.875	1.275	3.125	0.78125
500 con./g de suelo (6)	0.425	0.850	1.800	1.000	4.075	1.018

* con = conidios

Σ^1 = Suma total de kgs. de c/tratamiento

\bar{x}^2 = Promedio de kgs de c/tratamiento

Cuadro 10. Análisis de varianza para los datos de producción en kgs. de ajo, por parcela, bajo los tratamientos químicos y biológicos.

Fuente de variación FV	Grados de libertad GL	Suma de cuadrados SC	Cuadrado medio CM	Valor de F
Modelo	8	8.45380817	1.05672602	2.66
Error	15	5.96846879	0.39789765	PR>F
Total	23	14.42227296		0.0490

Cuadro 11. Efecto final de la incorporación al suelo del antagonista *S. sclerotivorum* a diferentes dosis, y de la aplicación de fungicidas, sobre la producción en kgs de ajo por parcela.

Tratamientos	Medias	Significancia estadística*
2 Químico	2.2875	a
1 Testigo	1.1085	b
6 (500 con.*/g de suelo)	1.0187	b
3 (50 con./g de suelo)	0.8875	b
5 (300 con./g de suelo)	0.7812	b
4 (100 con./g de suelo)	0.7687	b

* Los tratamientos seguidos por una misma letra son iguales (P = 0.05) en base a la prueba de Tukey

* con = conidios

altas de conidios por gramo de suelo del antagonista y con cepas producidas sobre los esclerocios de *S. cepivorum* se puedan obtener resultados más promisorios.

Está claro que el pretender controlar la pudrición blanca por medio de productos químicos no es la solución adecuada, por lo que es necesario enfocar el control de la enfermedad a través de la interacción de diversas estrategias de control, de manera integrada.

CONCLUSIONES

- a) La densidad de inóculo de *S. cepivorum* fue de 1.4 esclerocios/g de suelo, densidad que rebasa los niveles encontrados en otros países (0.08-0.16 y 0.3 esclerocios/g de suelo). La densidad que se determinó representa un verdadero peligro al cultivo de ajo.
- b) El sustrato de cebolla fue el mejor para la producción de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, y los sustratos de maíz, frijol y alfalfa no funcionaron; sin embargo, el emplear cebolla económicamente no resulta redituable, razón por la que se debe continuar en la búsqueda de sustratos más baratos para producir esclerocios.
- c) Las poblaciones de esclerocios de *S. cepivorum* no fueron abatidas por *S. sclerotivorum* y el porcentaje de plantas sanas fue muy bajo.
- d) El control químico resultó ineficiente pues a pesar de haber desinfectado la semilla de ajo antes de la siembra con Vinclozolin, y de hacer 3 aplicaciones de Pentacloronitrobenceno durante el ciclo del cultivo, la enfermedad se presentó severamente causando la muerte de plantas en un 44.9%.

LITERATURA CITADA

- Abd-El Moity, T.H., G.C. Papavizas, and M.N. Shatla. 1982. Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of white rot of onion. *Phytopathology* 72:396-400.
- Abd-El Moity, T.H., and M.N. Shatla. 1981. Biological control of white disease *Sclerotium cepivorum* of onion by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. *Zeit.* 100:29-35.
- Adams, P.B., and G.C. Papavizas. 1971. The effects of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and some soil environment factors on disease severity. *Phytopathology* 61:1253-1256.
- Adams, P.B., and Ayers, W.A. 1981. *Sporidesmium sclerotivorum*: distribution and function in natural biological control of sclerotial fungi. *Phytopathology* 71:90-93.
- Adams, P.B., and Ayers, W.A., 1982. Biological control of sclerotinia lettuce drop in the field by *Sporidesmium sclerotivorum*. *Phytopathology* 72:485-488.
- Adams, P.B., and Ayers, W.A. 1983. Histological and physiological aspects of infection of sclerotia of *Sclerotinia* species by two mycoparasites. *Phytopathology* 73:1072-1076.
- Albert, A. L. 1983. Plaguicidas, Salud y Ambiente. X Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Xalapa, Veracruz. pp. 10.
- Ayers, W.A., and P.B. Adams, 1981. Mycoparasitism of sclerotial fungi by *Teratosperma oligocladium*. *Can J. Microbiol.* 27:886-892.
- Ayers, W.A., E.A. Barnet and P.B. Adams. 1981. Germination of macroconidia and growth of *Sporidesmium sclerotivorum* *in vitro*. *Can. J. Microbiol.* 27:664-669.
- Baker, K.F. and Cook. J.R. 1973. *Biological Control of Plant Pathogens*. W.H. Freeman and Company. San Francisco U.S.A. p. 433.

- Barnett, E.A., et N.A. Ayers. 1981. Nutritional and environmental factors affecting growth and sporulation of *Sporidesmium sclerotivorum*. Can. J. Microbiol. 27: 685-691.
- Coley-Smith, J.R. 1959. Studies of the Biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. III. Host rang; persistence and viability of sclerotia. Ann. Appl. Biol. 47:511-518.
- Coley-Smith, J.R. 1960. Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. IV. Germination of sclerotia. Ann. Appl. Biol. 48:8-18.
- Coley-Smith, J.R. 1983. Integrated Control of *Sclerotium cepivorum*. In: Adams, P.B., and A.R. Entwistle (Eds.) Proceedings of the second International Workshop on Allium white rot. pp. 31-33.
- Cook, R.J. and Baker, F.K. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society. U.S.A. pp. 318-320, 360, 337.
- Cook, R.J. 1981. Biological Control of Plant Pathogens: Overview. In Papavizas, Beltsville Symposia in Agricultural Research. Biological Control in Crop Production. Allanheld, Osmun Publishers Granada. U.S.A. pp. 23-44.
- Crowe, F.J., D.Hall, A. S. Greathead, and K. G. Baghott. 1980. Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. Phytopathology 70:64-69.
- Crowe, F.J., and D.H. Hall. 1980. Vertical distribution of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and host root systems relative to white rot of onion and garlic. Phytopathology 70:70-73.
- Crowe, F.J., and D.H. Hall. 1980. Soil temperature and moisture effects on *Sclerotium* germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. Phytopathology 70:74-78
- Dekker, J. 1971. Selective Action of Fungicides and Development of Resistance in Fungi to Fungicides. Precc. 6th Br. Insectic. Fungic. Conf. 715-723.
- Entwistle, R.A., et al. 1982. Diallyl-Disulphide to reduce the numbers of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in soil. Soil Biol. Biochem. 14:229-232.

- Entwistle, A.R. 1982. The significance of Iprodione sensitivity in *S. cepivorum*. In: Adams, P.B., and A.R. Entwistle (Eds.) Proceedings of the Second International Workshop on Allium white rot pp. 31-33.
- García Alvarez, Manuel 1967. Enfermedades de las plantas en la República Mexicana. Limusa-Wiley, S.A. pp. 41-42.
- Greathead, A.S., C.H. Hall, and E. Kurtz. 1983. Control of Onion and Garlic in the Salinas Valley and Tulelake Areas of California. In: Adams, P.B., and A.R. Entwistle (Eds.) Proceedings of the Second International Workshop on Allium white rot pp. 35.
- Hernández Delgado, J.E. 1980. Diseño de una planta industrial para la deshidratación del ajo y la cebolla. Tesis de Licenciatura de Ingeniería Bioquímica. I.P.N. México, D.F.
- Johnston, S.A. 1983. Allium White Rot in U.S.A. In: Adams, P.B. and A. R. Entwistle (Eds.) Proceedings of the Second International Workshop on Allium White rot. pp. 5-7.
- Leyva, M.G. y García E.R. 1980. Antagonismo *in vitro* a *Sclerotium cepivorum* de algunos microorganismos y su efectividad en el control biológico en almácigo de la pudrición blanca de la cebolla. Resúmenes del IX Congreso Nacional de Fitopatología. Uruapan, Michoacán. p. 3.
- Papavizas, G.C. 1972. Isolation and enumeration of propagules of *Sclerotium cepivorum* from soil. Phytopathology 62: 545-549.
- Papavizas, G.C. 1970. Carbon and nitrogen nutrition of *Sclerotium cepivorum*. Mycologia 62:1195-1203.
- Rahe, J.E. 1983. Biological Control. Introduction to Session VII. In: Adams, P.B., and A. R. Entwistle (Eds.) Proceedings of the Second International Workshop on Allium White root pp. 71-74.
- Rishbeth, J. 1963. Stump protection against *Fomes annosus*. III. Inoculation with *Penicophora gigantea*. Ann. Apple. Biol. 52:63-77.

- Salgado, S.A.M Magdalena, 1984. Control Biológico del "Apagamiento" de la Lechuga causado por *Sclerotinia minor* Jagger, por medio del micoparásito *Sporidesmium sclerotivorum* Uecker, Ayers y Adams. Tesis de Licenciatura en Biología, U.N.A.M., ENEP. Iztacala, Edo. de México.
- Sarasola, A. Abel y Rocca de Sarasola, María A. 1975. Fitopatología General Control. Hemisferio Sur. Argentina. Tomo I. p. 211-285.
- Scott, M.R. 1956. Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. II. The spread of white rot from plant to plant. Ann. Apple. Biol. 44:584-589.
- Scott, M.R. 1956. Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. I. Growth of mycelium in the soil. Ann. Apple. Biol. 44:576-583.
- Utkhede, R.S., and Rahe, J.E. 1983. Interactions of antagonist and pathogen in biological control of onion white rot. Phytopathology 73:890-893.