

Molecular Technique as A Vigorous Instrument for Identification and Classification of *Dickeya* on The Ornamental Plants

Noor Febryani^{1*} & Yuichi Takikawa²

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi, Tasikmalaya, Indonesia;

²Graduate School of Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan

Article History

Received : March 16th, 2023

Revised : April 21th, 2023

Accepted : May 24th, 2023

*Corresponding Author:

Noor Febryani,

Universitas Siliwangi,
Agroteknologi, Fakultas
Pertanian, Tasikmalaya,
Indonesia;

Email:

noorfebryani@unsil.ac.id

Abstract: Information on the genetic diversity of pathogenic bacteria causing plant disease is rare to find. This study aims to identify and classify disease-causing pathogens in several ornamental plants molecularly. Sixteen bacterial strains were isolated from carnation, chrysanthemum, and kalanchoe. All strains were grouped in *D. dianthicola* although the carnation strains and kalanchoe strains gave different results from the identified carnation strains. The differences were found in rep-PCR and 16S rDNA. Band patterns produced by rep-ERIC PCR revealed that the carnation strains, chrysanthemum strains, and kalanchoe strains formed slightly different from the identified carnation strains. Meanwhile, sequence analysis of 16S rDNA revealed that the carnation strains and kalanchoe strains were grouped separately from the identified carnation strains. Even though they were positioned independently from the identified carnation strains and other *D. dianthicola* strains, but they have closely related each other thus they are identified as a specific group of *D. dianthicola*. However, based on multilocus sequence analysis (MLSA) of *dnaX*, *recA*, *gyrB* and *rpoD*, all strains were grouped into *D. dianthicola*. Furthermore, the result of pathogenicity test showed that all strains were pathogenic to carnation, potato, and chrysanthemum, but they were not pathogenic to kalanchoe.

Keywords: Identification; *Dickeya dianthicola*; 16S rDNA; rep-PCR; MLSA.

Pendahuluan

Teknik identifikasi penyebab penyakit (patogen) tanaman budidaya melalui pendekatan biologi molekuler telah digunakan secara luas dan masih terus dikembangkan (Suharjo, 2015). Identifikasi secara molekuler diketahui dapat memberikan informasi genetik suatu mikroorganisme untuk kepentingan diagnosis secara akurat dan cepat karena memiliki tingkat kepekaan yang tinggi. Data keragaman genetik suatu patogen dapat membantu suatu proses identifikasi sampai tahap spesies. Selain itu, pendekatan biomolekuler juga dapat membantu dalam penemuan suatu jenis penyakit, misalnya penyakit busuk lunak pada tanaman hias untuk pertama kali yang terjadi di beberapa negara seperti di Denmark, Amerika Serikat, Yunani, dan Jepang (Hellmers, 1958; Dimock, 1958;

Alivizatos, 1979; Saito, 1985). Selanjutnya, patogen penyebab penyakit busuk lunak tersebut diidentifikasi sebagai *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* (Dickey, 1979).

E. chrysanthemi (= *Dickeya* spp.) pertama kali dilaporkan sebagai bakteri patogen penyebab penyakit penting pada padi dengan nama penyakit “bacterial foot rot” (Goto, 1979) dan pada tanaman anyelir dengan nama penyakit “bacterial stunt” (Saito et al., 1985). Selanjutnya, strain *D. dianthicola* (= *E. chrysanthemi* pv. *dianthicola*) telah berhasil diidentifikasi dan diisolasi juga dari begonia (*Begonia intermedia*), cichorii (*Cichorium intybus*), artichoke (*Cynara scolymus*), dahlia (*Dahlia pinnata*), kalanchoe (*Kalanchoe blossfeldiana*), wortel (*Daucus carota*), tomat (*Lycopersicon esculentum*), dan kentang (*Solanum tuberosum*) (Samson et al., 2005) sehingga dapat diartikan bahwa *D. dianthicola*

(=*E. chrysanthemi* pv. *dianthicola*) memiliki spektrum inang yang luas. Melalui studi hibridisasi DNA-DNA, Samson *et al.* (2005) mengklasifikasikan ulang bakteri dalam genus *Dickeya* tersebut sebagai *D. dianthicola*.

Artikel ini bertujuan untuk mengidentifikasi penyebab penyakit busuk lunak pada beberapa tanaman hias dengan menggunakan metode biomolekuler berbasis Asam Deoksiribonukleat (DNA) dan lebih menyoroti penggunaan teknologi biomolekuler dalam penelitian penyakit pada tanaman hias. Adapun beberapa teknik identifikasi yang telah digunakan terhadap patogen tanaman dan berhasil mengidentifikasi dari genus *Dickeya*, yaitu Repetitive (Rep) PCR Genomic fingerprinting, PCR Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), penggunaan primer spesifik dan sequencing dari beberapa jenis gen (Suharjo *et al.*, 2014).

D. dianthicola merupakan patogen yang berhasil diisolasi dari beberapa jenis tanaman hias, seperti anyelir, krisan, dan kalanchoe yang terjangkit penyakit busuk lunak serta memiliki kisaran inang yang luas (Suharjo *et al.*, 2014). Keragaman genetik dari *D. dianthicola* menarik untuk dilakukan studi lebih lanjut baik mengidentifikasi maupun mengklasifikasikan patogen tersebut sebagai dasar untuk menentukan pengendalian yang tepat sesuai dengan prinsip pengendalian penyakit terpadu.

Bahan dan Metode

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tempat dan waktu yang berbeda, yaitu di Laboratorium Fitopatologi, Fakultas Pertanian, Shizuoka University untuk proses isolasi dan identifikasi patogen (pengujian PCR, sekuensing, dan patogenisitas) dan di Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi untuk proses analisis ulang terhadap konstruksi filogenetik bakteri patogen yang telah diujikan.

Bakteri Sampel

Sebanyak 16 isolat bakteri yang diisolasi dari anyelir, krisan, dan kalanchoe telah diujikan dalam penelitian ini (Tabel 1). Isolat-isolat tersebut ditumbuhkan pada media YP (*yeast peptone*) dan PPGA (*potato peptone glucose*

agar) serta diinkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam. Biakan tersebut ditumbuhkan di dalam 5 ml YP broth yang diinkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam. Selanjutnya, DNA genom diekstraksi sesuai dengan protokol dari Ausubel *et al.* (1995).

Tabel 1. Daftar Strain Bakteri, Inang, dan Nomor Aksesori yang telah dideposit pada GenBank DDBJ

No	Kode Strain	Inang Asal	Nomor Aksesori
1.	SUPP 216	<i>D. caryophyllus</i>	LC043150
2.	SUPP 217	<i>D. caryophyllus</i>	LC043151
3.	SUPP 2526	<i>D. caryophyllus</i>	LC043152
4.	SUPP 2527	<i>D. caryophyllus</i>	LC043151
5.	SUPP 2542	<i>D. caryophyllus</i>	LC043154
6.	SUPP 2543	<i>D. caryophyllus</i>	LC043155
7.	SUPP 2544	<i>D. caryophyllus</i>	LC043156
8.	SUPP 2545	<i>D. caryophyllus</i>	LC043157
9.	SUPP 2546	<i>D. caryophyllus</i>	LC043158
10.	MAFF 311553	<i>D. caryophyllus</i>	LC043159
11.	MAFF 311554	<i>D. caryophyllus</i>	LC043160
12.	MAFF 311555	<i>D. caryophyllus</i>	LC043161
13.	MAFF 311556	<i>D. caryophyllus</i>	LC043162
14.	MAFF 311044	<i>Chrysanthemum</i> sp.	LC043164
15.	MAFF 311124	<i>Chrysanthemum</i> sp.	LC043165
16.	MAFF 311150	<i>Kalanchoe</i> sp.	LC043166

PCR dan Sekuensing

Amplifikasi PCR 16S rDNA, *dnaX*, *recA*, *gyrB*, dan *rpoD* dilakukan dengan menggunakan 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems. Setiap campuran sampel berkapasitas 100 µL dipersiapkan untuk sekuensing langsung yang mengandung 0,8 µL DNA, 2 µL buffer TE, 1 µM dari masing-masing primer, 1 × ex taq buffer, 0,2 mM campuran dNTP, 0,02 µ/µl Ex Taq dan 61,6

µl air suling. Deskripsi primer PCR yang digunakan telah dijelaskan secara rinci oleh Suharjo et al. (2014). Produk PCR teramplifikasi pada 535 bp, 764 bp, 940 bp, dan 843 bp untuk masing-masing *dnaX*, *recA*, *gyrB*, dan *rpoD*. DNA dideteksi dengan elektroforesis dalam gel agarosa 0,7% dan diwarnai dengan etidium bromida. Sekuensing dilakukan secara langsung dari gen target produk PCR tersebut atau fragmen yang dikloning.

Kloning dan Sekuensing DNA dari *dnaX*, *recA*, *gyrB* dan *rpoD*

Plasmid *Escherichia coli* diperoleh dari DNA murni yang dikloning ke kit pGEM[®]-T Easy Vector System, kemudian untuk memverifikasi sisipan dengan ukuran yang diharapkan, klon yang dimurnikan dipotong dengan *EcoRI*. Fragmen tersebut dianalisis dengan gel agarosa 0,7% dan divisualisasikan di bawah sinar UV setelah diwarnai dengan etidium bromida. Klon untuk masing-masing gen disekuensing setelah diukur menggunakan spektrofotometer Nano dropTM1000.

Rep-PCR

DNA thermal cycler digunakan untuk analisis PCR. Dua jenis sidik jari genomik, yaitu Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) dan BOX digunakan dengan mengikuti Rademaker et al., (1998). Amplifikasi PCR dilakukan dengan volume total 20 µl yang mengandung 1 µl template DNA, 4 µl 5 × gitschier buffer, 0,32 µl 10 mg/ml BSA (Biolab Inc, New England), 2 µL DMSO, 1,6 µl 2,5 mM dNTP Mix, 0,1 µl primer BOX, ERIC, dan REP, 0,2 µl Gen taq, dan 10,68 µL air suling steril. Kondisi PCR lainnya mengacu pada protokol laboratorium yang dijelaskan oleh Suharjo et al. (2014).

Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik dilakukan untuk membuat pohon filogenetik dan untuk mengetahui evolusi molekuler strain bakteri tersebut. Seluruh data DNA strain bakteri yang telah disekuensing lalu dideposit pada GenBank DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) yang dapat diakses pada situs berikut: <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>. Selanjutnya, urutan data sekuens 16S rDNA, *dnaX*, *recA*, *gyrB*, dan *rpoD* dianalisis,

dikonstruksi, dan dibandingkan filogenetiknya dengan beberapa strain bakteri lain yang sudah teridentifikasi dan terdeposit pada GenBank menggunakan metode *neighbor-joining* (Model Jukes-Cantor) menggunakan *software* MEGA versi 4 (Tamura et al., 2007).

Uji Patogenisitas

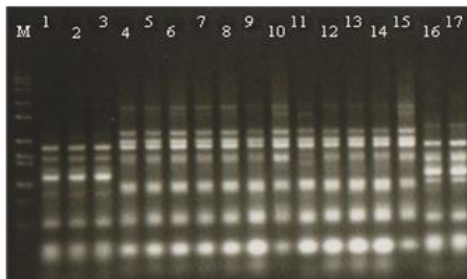
Empat jenis tanaman budidaya telah digunakan untuk uji patogenisitas, yaitu pada tanaman anyelir (*D. caryophyllus* cv. snap), krisan (*C. morifolium*), kalanchoe (*K. daigremontiana*), dan kentang (*S. tuberosum*). Bagian batang anyelir ditusuk dengan suspensi bakteri (106 sel ml⁻¹) dari biakan yang telah diinkubasi selama 24 jam pada media PPGA dan disuspensikan dalam air suling steril. Tanaman yang telah diinokulasi oleh suspensi bakteri kemudian diinkubasi pada ruangan lembab (suhu 28 °C) selama 48 jam, lalu dipindahkan ke rumah kaca, dan diamati hingga 2 bulan. Sedangkan inokulasi pada kentang dilakukan dengan cara menusuk bagian pangkal batang pada masing-masing tanaman dengan suspensi bakteri yang sama. Inokulasi pada kalanchoe dan anyelir dilakukan sebanyak dua kali, akan tetapi inokulasi pada bunga krisan hanya dilakukan sekali. Mula-mula anyelir diinokulasi dengan cara ditusuk pada pangkal batang, sedangkan kalanchoe diinokulasi dengan cara ditusuk pada bagian daun. Sementara, tanaman kontrol diinokulasi dengan air suling steril.

Hasil dan Pembahasan

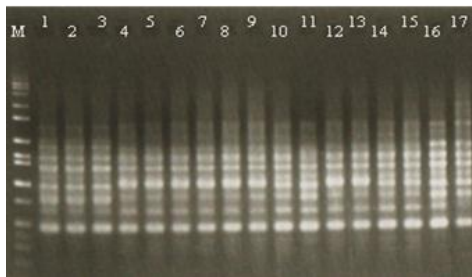
Rep-PCR

Pola band yang teramplifikasi melalui PCR dengan menggunakan primer ERIC dan BOX (Gambar 1 dan Gambar 2) memperlihatkan hasil yang berbeda. Rep-BOX (Gambar 2) menunjukkan bahwa strain-strain bakteri yang diisolasi dari tanaman anyelir (nomor 1 s.d. nomor 13), krisan (nomor 14 dan nomor 15), dan kalanchoe (nomor 16) menyerupai dengan pola band *D. dianthicola* (nomor 17) yang telah dijelaskan oleh Saito (1985). Sedangkan hasil yang berbeda ditunjukkan pada Rep-ERIC (Gambar 1). Strain-strain bakteri yang diisolasi dari tanaman kalanchoe (nomor 1), anyelir (nomor 2 dan nomor 3), dan krisan (nomor 16 dan nomor 17) memperlihatkan pola band yang berbeda dengan strain yang dijelaskan oleh Saito

(1985), *D. dianthicola* (nomor 4). Adapun sebagian strain bakteri yang diisolasi dari tanaman anyelir lainnya (nomor 5 s.d. nomor 15) memperlihatkan pola band yang menyerupai dengan pola band dari strain yang dijelaskan oleh Saito (1985), *D. dianthicola* (nomor 4). Rep-PCR mengungkapkan perbedaan antara strain Dickeya “*typical*” dan strain Dickeya “*atypical*”. Adapun penyebutan “*atypical*” ini digunakan untuk golongan bakteri yang belum diketahui secara jelas identitasnya (Toth *et al.*, 2011). Oleh karena itu, strain Dickeya “*atypical*” yang diisolasi dari anyelir harus diidentifikasi sebagai kelompok spesifik dari *D. dianthicola*.



Gambar 1. Rep-ERIC

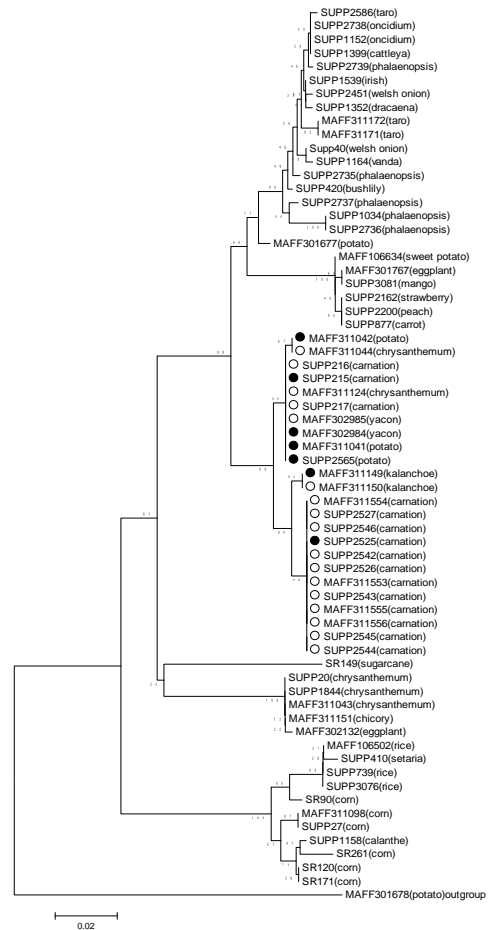


Gambar 2. Rep-BOX

Analisis Filogenetik

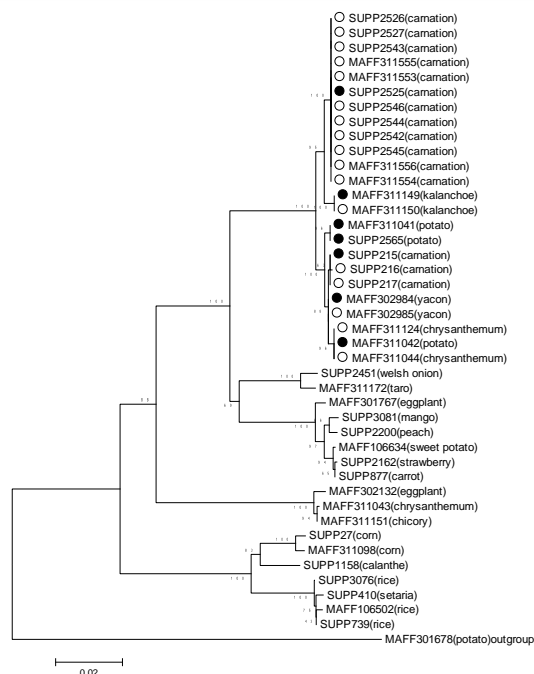
Analisis sekuensing berdasarkan 16S rDNA (Gambar 3) menunjukkan bahwa kelompok strain bakteri yang diisolasi dari anyelir (2526, 2527, 2542, 2543, 2544, 2545, 2546, 311553, 311554, 311555, dan 311556) bersama dengan strain bakteri yang diisolasi dari kalanchoe (311150) berada pada kelompok yang berbeda dari kelompok strain bakteri yang diisolasi dari anyelir (215, 216 dan 217) dan kelompok strain bakteri yang diisolasi dari krisan (31044 dan 311124). Adapun SUPP 215 merupakan strain bakteri yang diisolasi dari krisan oleh Saito *et al.* (1985), yaitu *D. dianthicola*. Oleh karena itu, kelompok strain yang terpisah dari kelompok *D. dianthicola* tersebut

dapat dikategorikan sebagai Dickeya “*atypical*” dan merupakan kelompok spesifik dari *D. dianthicola*.



Gambar 3. Pohon filogenetik berdasarkan sekuensing 16S rDNA

Di sisi lain, analisis urutan multilokus (MLSA) yang menggabungkan hasil sekuensing dari *dnaX*, *recA*, *rpoD* dan *gyrB*. (Gambar 4) mengungkapkan bahwa seluruh strain bakteri uji berada di dalam satu kluster, yaitu pada kluster SUPP 215, *D. dianthicola* Saito (1985). Analisis filogenetik dari keempat sekuen gen menunjukkan bahwa strain yang digunakan dalam penelitian ini yang teridentifikasi sebagai *D. dianthicola* termasuk dalam satu kelompok besar (Gambar 4). Adapun sebagian besar strain bakteri yang diisolasi dari anyelir merupakan kelompok yang sama dengan strain bakteri yang diisolasi dari kalanchoe karena membentuk subkultur yang independen.



Gambar 4. Pohon filogenetik sekuensing MLSA

Uji Patogenisitas

Hasil patogenisitas tercantum pada Tabel 2. Empat jenis tanaman budidaya telah dipilih untuk dilakukan uji patogenisitas berdasarkan tanaman inang *D. dianthicola*.

Tabel 2. Daftar Hasil Uji Patogenisitas

No	Kode Strain	I	II	III	IV
1.	SUPP 216	+	+	+	-
2.	SUPP 217	+	+	+	-
3.	SUPP 2526	+	+	+	-
4.	SUPP 2527	+	+	+	-
5.	SUPP 2542	+	+	+	-
6.	SUPP 2543	+	+	T	-
7.	SUPP 2544	+	+	+	-
8.	SUPP 2545	+	+	+	-
9.	SUPP 2546	T	T	T	T
10.	MAFF 311553	T	T	T	T
11.	MAFF 311554	T	T	T	T
12.	MAFF 311555	T	T	T	T
13.	MAFF 311556	T	T	T	T
14.	MAFF 311044	+	++	++	-
15.	MAFF 311124	+	T	++	-
16.	MAFF 311150	+	T	+	++

- I. *D. caryophyllus*; II. *S. tuberosum*, III. *Chrysanthemum* sp., IV. *Kalanchoe* sp.
- T: Tidak dilakukan uji patogenisitas; - negatif; +rendah; ++sedang; +++tinggi

Uji Patogenisitas pada Anyelir

Gejala pertama muncul setelah dua minggu inokulasi pada batang, yaitu berupa luka basah akibat penusukan dan penyuntikan. Gejala yang diamati berupa layu dari keseluruhan tanaman, nekrosis, dan retakan batang pada titik inokulasi. Strain anyelir (SUPP 216, SUPP 217, SUPP 2526, SUPP 2527, SUPP 2542, SUPP 2543, SUPP 2544, SUPP 2545) bersifat patogen terhadap tanaman anyelir, termasuk strain krisan (MAFF 311044 dan MAFF 311124) dan strain kalanchoe (MAFF 311150).

Uji Patogenisitas pada Kentang

Gejala pertama muncul pada tanaman kentang berupa perubahan warna di sekitar titik inokulasi, nekrosis, dan layu setelah seminggu dilakukan inokulasi. Ekspresi gejala tersebut muncul secara cepat saat berada di bawah suhu tinggi dan kelembaban tinggi, yaitu dengan menguningnya ujung daun, kecoklatan gelap hingga menghitamkan lesi batang serta menimbulkan perubahan warna empulur, batang berongga, dan perubahan warna pembuluh darah kuning hingga coklat kemerahan. Semua strain yang diujikan bersifat patogen pada kentang. Sementara strain bakteri krisan (MAFF 311044 dan MAFF 311124) menunjukkan gejala yang lebih kuat dibandingkan strain uji lainnya.

Uji Patogenisitas pada Krisan

Inokulasi dilakukan pada daun muda dan batang krisan dengan cara ditusuk. Gejala yang muncul berupa layu, perubahan warna batang, dan nekrosis pada pucuk dan daun muda. Semua strain yang diujikan bersifat patogen terhadap krisan. Akan tetapi, strain bakteri krisan (MAFF 311044 dan MAFF 311124) lebih bersifat virulen dibanding yang lain.

Uji Patogenisitas pada Kalanchoe

Inokulasi dilakukan pada daun kalanchoe. Gejala pertama muncul pada 10 hari setelah inokulasi. Gejala yang muncul berupa cekungan-cekungan pada titik inokulasi berdiameter 5 mm, kemudian daun pada bagian bagian atas mengalami nekrosis dan jatuh. Hanya strain bakteri kalanchoe (MAFF 311150) yang menunjukkan sifat virulensi tinggi terhadap tanaman kalanchoe.

Kesimpulan

Semua strain bakteri uji yang diisolasi dari anyelir, krisan, dan kalanchoe diidentifikasi sebagai *D. dianthicola*, namun beberapa strain bakteri termasuk pada kelompok spesifik dari *D. dianthicola*. Adapun hasil uji patogenisitas menunjukkan bahwa semua strain bakteri uji bersifat patogen terhadap anyelir, kentang, dan krisan, namun hanya strain bakteri kalanchoe saja yang bersifat patogen terhadap kalanchoe.

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Shizuoka University yang telah memfasilitasi proses identifikasi dalam penelitian ini serta pemerintah Jepang yang telah mendanai secara penuh. Kami menyatakan bahwa penelitian ini tidak memiliki konflik kepentingan dengan pihak manapun.

Referensi

- Alivizatos, A. S. (1979). Bacterial stunt of carnations in Greece. *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki*, 12, 120-137 <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19801368472>
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (1995). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons USA,
- Dickey, R. S. (1979). *Erwinia chrysanthemi*: A comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species. *Phytopathology*, 69, 324-329. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1979Articles/Phyto69n04_324.pdf
- Dimock, A. W. (1958). Reports on carnation disease. *Carnation Craft*, 43, 1-5
- Goto, M. (1979). Bacterial foot rot of rice caused by a strain of *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology*, 69(3), 213-216. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1979Articles/Phyto69n03_213.pdf
- Hellmers, E. (1958). Four wilt diseases of perpetual-flowering carnations in Denmark. *Dansk Botanisk Arkiv*, 18, 1-200
- Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., & de Bruijn, F. J. (1998). Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. [https://www.researchgate.net/profile/Jan-Rademaker/publicationimportant_microbes](https://www.researchgate.net/profile/Jan-Rademaker/publication/publicationimportant_microbes)
- Saito, T. (1985). Bacterial stunt of carnation caused by *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* (in Japanese with English Abstract). *Ann Phytopath Soc Jpn* 51:145-151. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.51.145>
- Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Fischer-Le, S. M., Achouak, W., & Gardan, L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1415-1427. [https://doi:10.1099/ijs.0.02791-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.02791-0)
- Suharjo, R. (2015). Sekilas tentang Klasifikasi dan Teknik Identifikasi *Erwinia chrysanthemi*, *E. carotovora* dan *E. ananas*. *Prosiding Seminar Regional Ilmu Penyakit Tumbuhan, Bandar Lampung*. <http://repository.lppm.unila.ac.id/id/eprint/2838>
- Suharjo, R., Sawada, H., & Takikawa, Y. (2014). Phylogenetic study of Japanese *Dickeya* spp. and development of new rapid identification methods using PCR-RFLP. *J Gen Plant Pathol*, 80, 237-254. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0511-9>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Toth, I. K., van der Wolf, J. M., Saddler, G.,

Lojkowska, E., Helias, V., Pirhonen, M., Tsor (Lahkim), L., & Elphinstone, J. G. (2011). *Dickeya* species: An emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathol*, 60, 385-399. <https://doi.org/10.1111/j.13653059.2011.02427.x>