



Acta Scientiarum. Agronomy

ISSN: 1679-9275

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá

Brasil

Vagner Valentim Martins, Marlon; Silveira, Silvaldo Felipe; Mussi-Dias, Vicente; Duarte Vieira, Henrique

Efeito da temperatura e umidade do substrato na viabilidade de *Sclerotium rolfsii*

Acta Scientiarum. Agronomy, vol. 32, núm. 2, 2010, pp. 217-222

Universidade Estadual de Maringá

Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303026591013>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Efeito da temperatura e umidade do substrato na viabilidade de *Sclerotium rolfsii*

**Marlon Vagner Valentim Martins<sup>1\*</sup>, Silvaldo Felipe Silveira<sup>2</sup>, Vicente Mussi-Dias<sup>2</sup> e Henrique Duarte Vieira<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Drº Sara Mesquita, 2270, Fortaleza, Ceará, Brasil. <sup>2</sup>Laboratório de Entomologia e Fitopatologia, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro", Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: valentim@cnpat.embrapa.br

**RESUMO.** Avaliou-se a erradicação de escleródios de *Sclerotium rolfsii* em diferentes temperaturas e umidades do substrato. Testaram-se umidades de 5, 6, 9 e 11 (equivalentes a -5, -3, -1 e -1/3 Bar) e mais 0 e 18% de umidade. As temperaturas testadas foram 40, 48, 52 e 58°C, no tempo de 30 min., seguidos de resfriamento em balcão, em condições de laboratório. Avaliou-se a germinação em meio BDA salino. A 0% de umidade do substrato, nenhuma temperatura foi eficiente na inativação dos escleródios. Para todas as outras umidades testadas, porém, os escleródios foram erradicados em temperaturas acima de 52°C. De todas as quatro temperaturas testadas, apenas a menor (40°C) não inativou os escleródios do patógeno. A 48°C, a erradicação dos escleródios variou entre 80 e 100% para os níveis de umidade de 5 a 18%. O calor úmido foi eficiente na erradicação de escleródios de *S. rolfsii*.

**Palavras-chave:** escleródio, solarização do solo, erradicação.

**ABSTRACT.** Effect of the temperature and substrate moisture on the viability of *Sclerotium rolfsii*. Thermal eradication of *Sclerotium rolfsii* in vitro was evaluated under different substrate temperatures and humidity. Humidity levels of 5, 6, 9 and 11% (equivalent to -5, -3, -1 and -1/3 Bar) and 0 and 18% were tested. Temperatures tested were 40, 48, 52 and 58°C. After substrate treatment, germination in saline BDA medium was evaluated. At 0% humidity, the temperature was not efficient in sclerotia eradication. For all other values of humidity tested, sclerotia were eradicated in temperatures over 52 °C. From all temperatures tested, only the lowest (40°C) did not eradicate pathogen sclerotia. Soil treatment at 40°C/30 min. stimulated sclerotia germination as the level of substrate humidity was increased. At temperatures of 52 and 58 °C, and at humidity levels of 5, 6, 9, 11 and 18%, a 30 min. treatment was efficient for eradication of the pathogen. At 48°C, sclerotia eradication reached 80 to 100% for humidity levels of 5 to 18%. *S. rolfsii* was eradicated with humidity heat.

**Key words:** sclerotia, soil solarization, eradication.

## Introdução

A Podridão-de-Escleródio ou Murcha-de-Escleródio, causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc., é uma doença que afeta uma vasta lista de espécies de plantas hospedeiras, incluindo dicotiledôneas e monocotiledôneas (PUNJA, 1985; PUNJA; RAHE, 1993). O patógeno pode causar tombamento de mudas e podridão do coletor e raízes resultando em murcha, o que, na maioria das vezes, culmina com a morte da planta. O fungo produz escleródios que infectam as plantas em condições favoráveis ao estabelecimento da doença. De difícil controle, os escleródios são estruturas de resistência para a sobrevivência do fungo na ausência do hospedeiro.

Estratégias de manejo integrado da doença reduzem a população do fungo no solo e as fontes de inóculo de *S. rolfsii*. O controle químico do fungo tende a ser inviável economicamente, sobretudo para culturas com baixo valor econômico (RISTAINO et al., 1991). A rotação de cultura, a sanitização e a aração profunda do solo são práticas culturais importantes no manejo da doença (GARREN, 1961).

Além do controle biológico pelo uso de fungos e bactérias antagonistas (PAPAVIZAS; COLLINS, 1990; GAMLIEL; KATAN, 1993; ALIPPI; MÓNACO, 1994; RISTAINO et al., 1994; LEWIS; FRAVEL, 1996), a solarização do solo se constitui numa estratégia de controle para o manejo de *S.*

*rolfsii* em condições de campo (RISTAINO et al., 1991; 1996; CHELLEMI et al., 1994; 1997; STAPLETON; DUNCAN, 1998). A solarização do solo por seis semanas nos períodos mais quentes do ano apresenta-se como uma alternativa de manejo de *S. rolfsii* (RISTAINO et al., 1991). Além do controle de *S. rolfsii*, esta técnica tem sido utilizada no controle de outros patógenos de solo, incluindo bactéria e nematoides (CHELLEMI et al., 1994; 1997; STAPLETON; DUNCAN, 1998). O tratamento do solo por meio de coletores solares (aparelhos que absorvem energia solar e promovem o aquecimento da massa do solo existente dentro de tubulações de ferro galvanizado) tem sido utilizado para controle de *S. rolfsii* em substratos para a produção de mudas (GHINI; BETTIOL, 1991; GHINI, 1993; MARTINS et al., 2003).

A solarização do solo é uma técnica viável em regiões de clima quente e com níveis adequados de precipitação. Os componentes físicos, químicos e biológicos estão envolvidos na eficiência da técnica (KATAN, 1980) e o calor úmido tem se mostrado mais eficiente que o calor seco no controle de patógenos de solo via solarização do solo (KATAN et al., 1976). Além disso, o tratamento do solo úmido tem sido determinante nas alterações estruturais e fisiológicas importantes no controle de fungos de solo (KATAN, 1980; NOLING; BECKER, 1994). Portanto, este trabalho objetivou verificar o efeito de diferentes temperaturas e umidades do solo na viabilidade de escleródios de *S. rolfsii* em condições controladas, visando subsidiar trabalhos de solarização do solo em regiões produtoras de hortaliças.

## Material e métodos

Utilizou-se o isolado Sr1, proveniente da cultura do tomateiro, coletado na Área Experimental da UENF, em Itaocara, Estado do Rio de Janeiro. O fungo foi cultivado em meio de aveia autoclavado (100 g de grãos de aveia, 50 mL de água destilada, 100 mL de água destilada + 1,5 g de agar-água), em placas de Petri, e incubado a 27°C por oito dias. Ao término deste período, a amostra micelial obtida foi colocada junto com o meio sobre camada de 100 g de solo peneirado (latossolo com 46% areia, 6% silte e 48% argila) não-esterilizado, em recipiente gerbox, e incubada a 30°C, por duas semanas (PUNJA; GROGAN, 1981).

Os escleródios produzidos foram recuperados do solo pelo método do peneiramento úmido (PUNJA et al., 1985 apud PUNJA; RAHE, 1993), secos em

papel toalha e armazenados em tubos de 50 mL com tampa, contendo 1 g de sílica gel.

Avaliou-se, *in vitro*, o efeito de diferentes temperaturas e teores de umidade do substrato. O substrato constituiu-se de mistura (2:1) de solo (latossolo com 46% areia, 6% silte e 48% argila) e areia (3% fina, 54% média, 40% grossa, 1% silte e 2% pedregulho). As umidades empregadas foram 11, 9, 6 e 5% (mL água 100 g<sup>-1</sup> de solo), correspondentes aos potenciais mátricos ( $\psi$ m) de -1/3, -1, -3, -5 Bar de tensão de água no solo, respectivamente. Além destas, testaram-se também as umidades de 18% (início de encharcamento e acima da capacidade de campo) e 0% (solo seco e abaixo do ponto de murcha permanente). Cada parcela constituiu-se de 140 g do substrato, acondicionado em cápsulas fechadas de alumínio de 100 mL. O substrato foi umedecido, com auxílio de proveta de 50 mL, e homogeneizado com espátula, de acordo com os teores de umidade indicada pela curva de retenção de água do solo. Armações em arame com aproximadamente 10 cm<sup>3</sup>, revestidas por tela de náilon, foram introduzidas nas cápsulas de alumínio junto à pequena quantidade de substrato e mais 45 escleródios. As cápsulas fechadas foram, então, submetidas ao aquecimento em estufa de circulação forçada de ar, com temperaturas de 40, 48, 52 e 58°C, por 30 min. Como testemunha, foram utilizados escleródios recuperados do solo a 18% de umidade, mas não submetidos ao aquecimento.

Após 14 a 18h dos tratamentos, os escleródios foram recuperados do solo por peneiramento úmido (água de torneira e peneira de 200 meshes) e secos em dessecadores contendo sílica gel, por 72h. Em seguida, os escleródios foram plaqueados em meio BDA-salino-cloranfenicol (BDASC: composto de BDA-Sigma® (pH= 5,8), NaCl a 0,08% e cloranfenicol a 250 µg mL<sup>-1</sup>) e, após oito dias de incubação a 27°C, avaliou-se a sua germinação (crescimento de hifas).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, analisado em esquema fatorial 6 x 4 (equivalente a seis umidades e quatro temperaturas), com quatro repetições. Efetuou-se análise de variância ( $p \leq 0,05$ ) de escleródios não-germinados em meio BDASC; com as médias obtidas foram construídos gráficos em função da umidade e da temperatura do substrato.

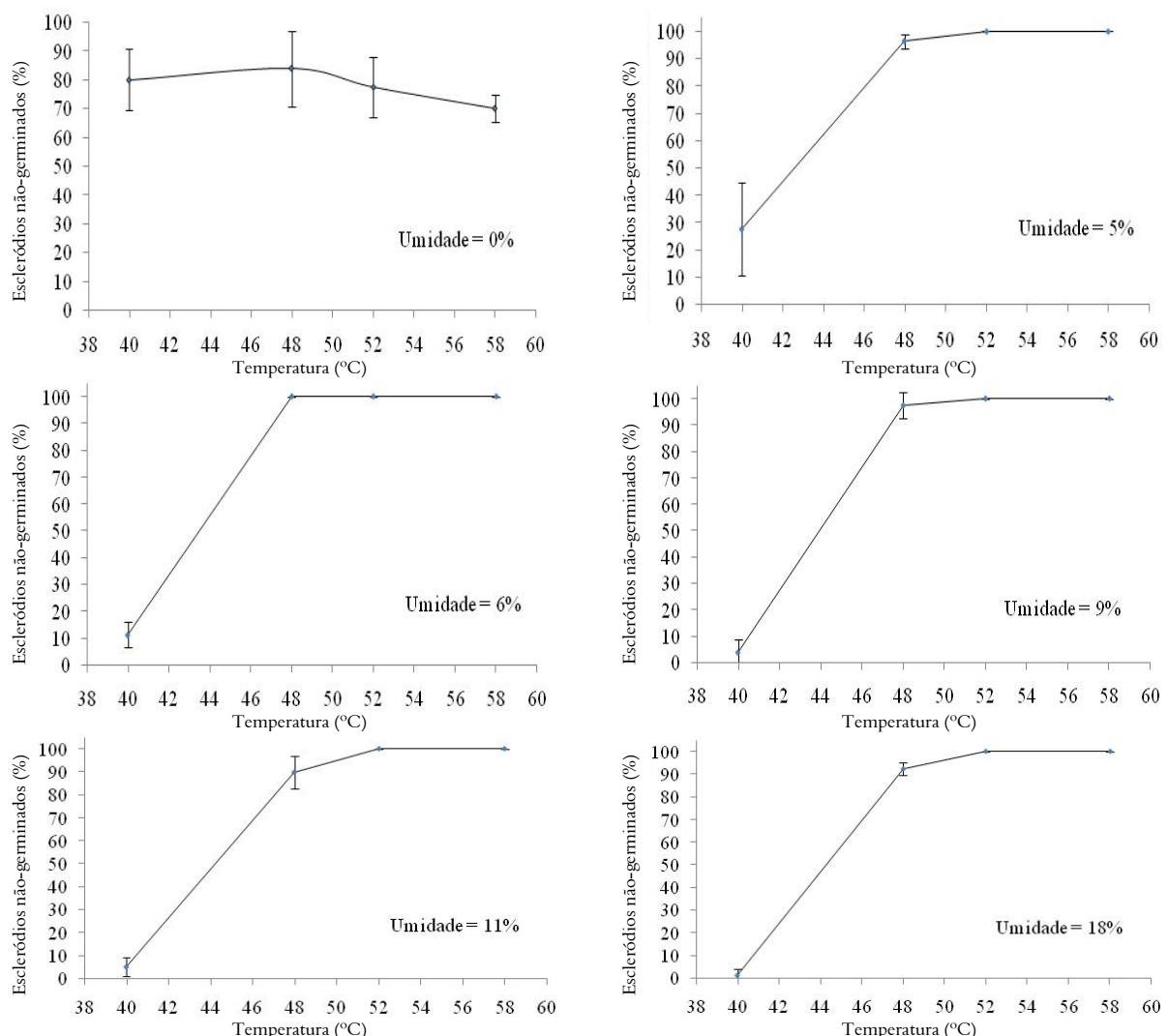
## Resultados e discussão

A temperatura e a umidade do substrato podem interagir na viabilidade dos escleródios de *S. rolfsii*. A porcentagem dos escleródios não-germinados elevou-se com o aumento da temperatura e da

umidade do substrato. Os escleródios não germinaram em meio de BDASC, quando submetidos às temperaturas de 52 e 58°C, nas umidades de 5, 6, 9, 11 e 18%. Nas temperaturas de 48, 52 e 58°C, observou-se menor efeito na erradicação dos escleródios na umidade de 0%, quando comparados com as outras umidades. A 48°C, o tempo de 30 min. não foi suficiente para a erradicação completa dos escleródios de *S. rolfsii* nas umidades de 0, 5, 9, 11 e 18%. A 40°C, a porcentagem de escleródios não-germinados diminuiu à medida que se elevou a umidade. Para as outras temperaturas, porém, a porcentagem de escleródios erradicados aumentou com a elevação da umidade do substrato (Figura 1).

Quando testados diferentes níveis de umidade do substrato e temperaturas de aquecimento para a

erradicação dos escleródios de *S. rolfsii*, a eficiência do tratamento pelo calor foi alta, exceto quando se empregou substrato seco (0% de umidade). No substrato seco, não houve eficiente erradicação dos escleródios do patógeno, à medida que se procedeu ao aquecimento. À temperatura de 40°C e na umidade 0%, cerca de 80% dos escleródios não germinaram. Por outro lado, nas demais umidades a porcentagem de escleródios não-germinados foi inferior a 30%. Nestes estudos, o efeito da umidade do substrato provavelmente tende a estimular a germinação dos escleródios, fato não constatado no solo seco. Possivelmente, em solo seco não houve sinalização para a germinação dos escleródios à temperatura de 40°C. Mathre e Johnston (1975) observaram redução na esporulação e no crescimento micelial de *Cephalosporium gramineum* a -5 bar.



**Figura 1.** Porcentagem de escleródios de *S. rolfsii* não-germinados em meio de BDASC, após serem submetidos ao aquecimento do substrato em estufa, por 30 min., nas temperaturas 40, 48, 52 e 58°C, seguido por resfriamento lento, em função das umidades do substrato de 0, 5, 6, 9, 11 e 18%. Barras representam  $\pm$  desvio-padrão

De acordo com os resultados deste estudo, a ausência de umidade pode ter efeito fungistático sobre os escleródios de *S. rolfsii*. Segundo Lockwood (1977), fungistase geralmente é expressada em solos úmidos. Neste trabalho, no entanto, verificou-se que o substrato úmido não teve efeito na inibição da germinação dos escleródios do fungo à temperatura de 40°C e a expressão da fungistase pode ocorrer em substrato seco.

Níveis de umidade acima de 5% (-5 bar) foram considerados satisfatórios para o aquecimento do substrato, visando à erradicação do fungo. À temperatura de 52°C 30 min.<sup>-1</sup>, todos os níveis de umidades do substrato testados acima de 5% apresentaram a mesma eficiência na erradicação do fungo. Segundo Beute e Rodríguez-Kabana (1981), a sobrevivência dos escleródios de *S. rolfsii* foi baixa em solos úmidos com temperatura acima de 20°C. Os autores relataram ainda que o micélio do fungo rapidamente morre na presença de umidade do solo. Segundo Shelvin et al. (2003), o aquecimento úmido foi mais efetivo no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* e *S. rolfsii*. Esta consideração é um indicativo de que o aquecimento do solo úmido tem maior possibilidade de erradicar os escleródios do fungo, fato constatado neste trabalho. Em tratamento com substrato seco, nenhum efeito deletério aos escleródios foi observado com o aumento da temperatura. Isto indica que, durante a técnica da solarização para o controle de *S. rolfsii*, o solo deve ser umidecido a um mínimo de 5% para a eficiência do processo.

Além dos efeitos da temperatura e umidade do solo, deve-se também considerar o tempo de exposição dos escleródios do fungo durante o tratamento físico. Segundo Mihail e Alcorn (1984), o tempo de tratamento com o calor tem influência na erradicação do fungo. Estes autores concluíram que os escleródios de *S. rolfsii* foram mortos em meio de ágar, quando incubados a 12h a 45°C ou a 3h a 50°C. No presente ensaio, verificou-se que o aquecimento do substrato por 30 min., em temperaturas acima de 52°C, erradicou totalmente os escleródios do patógeno. De acordo com Martins et al. (2003), o aquecimento do solo úmido em coletores solares foi eficiente na erradicação de escleródios de *S. Rolfsii*, durante 7h de tratamento, em temperaturas acima de 50°C. De acordo com Eshel et al. (2000), *S. rolfsii* exposto a 48°C por 1h não foi erradicado nas condições avaliadas. Estes autores ainda verificaram que os escleródios do fungo permaneceram viáveis mesmo expostos a 45°C por 2h. Em ambos os experimentos realizados por Eshel et al. (2000), os escleródios foram colocados em solo contendo de 1 a 1,8% (v v<sup>-1</sup>) de

água. No experimento ora apresentado, verificou-se que a temperatura de 48°C foi muito eficiente na erradicação dos escleródios do fungo para umidades acima de 5%. Provavelmente, o conteúdo de umidade utilizado por Eshel et al. (2000) não foi suficiente para induzir calor úmido e erradicar os escleródios de *S. Rolfsii*, ou existiram diferenças na sensibilidade de isolados do fungo ao aquecimento úmido.

O substrato hidratado, quando submetido a aquecimento, gera calor úmido que, por sua vez, possui maior penetração nas estruturas dos fungos e aumenta a sensibilidade térmica destes (NOLING; BECKER, 1994), levando-os à morte. O calor também pode induzir distúrbios fisiológicos no patógeno, tornando-o mais suscetível ao ataque de antagonistas do solo (KATAN, 1980). Lifshitz et al. (1983) relataram que o aquecimento subletal enfraquece os escleródios do fungo tornando-os vulneráveis ao ataque de antagonistas do solo. Martins et al. (2003), trabalhando com coletores solares na região norte-fluminense, Estado do Rio de Janeiro, observaram que *S. rolfsii* foi erradicado em temperatura máxima de 45°C e que os escleródios em meio de cultura foram 100% colonizados por bactérias durante o período de incubação. Como verificado neste experimento, a temperatura de 40°C não foi eficiente na erradicação total do fungo para todas as umidades testadas. Porém, a essa temperatura, o aquecimento subletal pode favorecer o crescimento de micro-organismos antagônicos à germinação dos escleródios de *S. rolfsii*.

Em condições secas, os micro-organismos são menos afetados pelo aquecimento do solo. Na presença de água, menos energia é requerida para promover a desnaturação de proteínas, o que compromete a resistência dos micro-organismos (KATAN, 1981). O aquecimento seco é menos efetivo na inativação térmica de patógenos que o aquecimento úmido (SHELVIN et al., 2003). Neste experimento, o conteúdo de umidade do substrato parece ser fator limitante no aquecimento e na erradicação de escleródios de *S. rolfsii*.

O efeito mais pronunciado do aumento da temperatura na morte dos escleródios, em detrimento do aumento da umidade, permitiu inferir que a sensibilidade do fungo é profundamente alterada com as temperaturas crescentes. Por outro lado, qualquer nível de umidade presente durante o aquecimento do substrato aumentou a sensibilidade térmica dos escleródios do patógeno, levando-os à morte.

O conhecimento da interação da temperatura e da umidade do solo sobre a viabilidade de

escleródios de *S. rolfsii* pode contribuir com práticas de controle físico do fungo, principalmente pelo uso da solarização do solo.

### Conclusão

Os escleródios de *S. rolfsii* são totalmente erradicados a temperaturas acima de 52°C por 30 min., em todos os níveis de umidade do substrato acima de 5% (-5 Bar).

### Referências

- ALLIP, A. M.; MÓNACO, C. I. Antagonismo *in vitro* de espécies de *Bacillus* contra *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium solani*. **Revista de La Facultad de Agronomía**, v. 70, [s/n], p. 91-95, 1994.
- BEUTE, M. K.; RODRÍGUEZ-KABANA, R. Effects of soil moisture, temperature, and field environment on survival of *Sclerotium rolfsii* in Alabama and North Carolina. **Phytopathology**, v. 71, n. 12, p. 1293-1296, 1981.
- CHELLEMI, D. O.; OLSON, S. M.; MITCHELL, D. J. Effects of soil solarization and fumigation on survival of soilborne pathogens of tomato in Northern Florida. **Plant Disease**, v. 78, n. 12, p. 1167-1172, 1994.
- CHELLEMI, D. O.; OLSON, S. M.; MITCHELL, D. J.; SECKER, I.; McSORLEY, R. Adaptation of soil solarization to the integrated management of soilborne pest of tomato under humid conditions. **Phytopathology**, v. 87, n. 3, p. 250-258, 1997.
- ESHEL, D.; GAMLIEL, A.; GRINSTEIN, A.; DI PRIMO, P.; KATAN, J. Combined soil treatments and sequence of application in improving the control of soilborne pathogens. **Phytopathology**, v. 90, n. 7, p. 751-757, 2000.
- GAMLIEL, A.; KATAN, J. Suppression of major and minor pathogens by fluorescent pseudomonads in solarized and nosolarized soils. **Phytopathology**, v. 83, n. 1, p. 68-75, 1993.
- GARREN, K. Control of *Sclerotium rolfsii* through cultural practices. **Phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 120-124, 1961.
- GHINI, R. A solar collector for soil disinfections. **Netherland Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 1, p. 45-50, 1993.
- GHINI, R.; BETTIOL, W. Coletor Solar para desinfestação de substratos. **Summa Phytopathologica**, v. 17, n. 3, p. 281-287, 1991.
- KATAN, J. Solar pasteurization of soils for disease control: status and prospects. **Plant Disease**, v. 64, n. 5, p. 450-454, 1980.
- KATAN, J. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. **Annual Review of Phytopathology**, n. 19, p. 211-236, 1981.
- KATAN, J.; GREENBERGER, A.; ALON, H.; GRINSTEIN, A. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soilborne pathogens. **Phytopathology**, v. 66, n. 5, p. 683-688, 1976.
- LEWIS, J. A.; FRAVEL, D. R. Influence of Pyrax/Biomass of biocontrol fungi on snap bean damping-off caused by *Sclerotium rolfsii* in the field and on germination of sclerotia. **Plant Disease**, v. 80, n. 6, p. 655-659, 1996.
- LIFSHITZ, R.; TABACHNIK, M.; KATAN, J.; CHET, I. The effect of sublethal heating on sclerotia of *S. rolfsii*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, n. 12, p. 1607-1610, 1983.
- LOCKWOOD, J. L. Fungistase in soils. **Biological Reviews**, v. 52, n. 1, p. 1-43, 1977.
- MARTINS, M. V. V.; SILVEIRA, S. F.; CARVALHO, A. J. C.; SOUZA, E. F. Erradicação de escleródios de *Sclerotium rolfsii* em substratos tratados em coletores solares em Campos dos Goytacazes-RJ. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 421-424, 2003.
- MATHRE, D. E.; JOHNSTON, R. H. Cephalosporium stripe of winter wheat: infection processes and host response. **Phytopathology**, v. 65, n. 11, p. 1244-1249, 1975.
- MIHAIL, J. D.; ALCORN, S. M. Effects of soil solarization on *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii*. **Plant Disease**, v. 68, n. 2, p. 156-159, 1984.
- NOLING, J. W.; BECKER, J. O. The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. **Journal of Nematology**, v. 26, n. 4S, p. 573-586, 1994.
- PAPAVIZAS, G. C.; COLLINS, D. J. Influence of *Gliocladium virens* on germination and infectivity of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v. 80, n. 7, p. 627-630, 1990.
- PUNJA, Z. K. The Biology, Ecology and Control of *S. rolfsii*. **Annual Review of Phytopathology**, n. 23, p. 97-127, 1985.
- PUNJA, Z. K.; GROGAN, R. G. Eruptive Germination of Sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v. 71, n. 10, p. 1092-1099, 1981.
- PUNJA, Z. K.; RAHE, J. E. *Sclerotium*. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. (Ed.). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: APS Press, 1993. p. 166-170.
- RISTAINO, J. B.; PERRY, K. B.; LUMSDEN, R. D. Effect of solarization and *Gliocladium virens* on sclerotia of *Sclerotium rolfsii*, soil microbiota, and the incidence of Southern Blight of tomato. **Phytopathology**, v. 81, n. 10, p. 1117-1124, 1991.
- RISTAINO, J. B.; LEWIS, J. A.; LUMSDEN, R. D. Influence of isolates of *Gliocladium virens* and delivery systems on biological control of Southern Blight on carrot and tomato in the field. **Plant Disease**, v. 78, n. 2, p. 153-156, 1994.
- RISTAINO, J. B.; PERRY, K. B.; LUMSDEN, R. D. Soil solarization and *Gliocladium virens* reduce the incidence of Southern Blight (*Sclerotium rolfsii*) in Bell

Pepper in the field. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, n. 4, p. 583-593, 1996.

SHELVIN, E.; SAGUY, I. S.; MAHRER, Y.; KATAN, J. Modeling the survival of two soilborne pathogens under dry structural solarization. **Phytopathology**, v. 93, n. 10, p. 1247-1257, 2003.

STAPLETON, J. J.; DUNCAN, R. A. Soil disinfestations with cruciferous amendments and sublethal heating: effects on *Meloidogyne incognita*,

*Sclerotium rolfsii* and *Pythium ultimum*. **Plant Pathology**, v. 47, n. 6, p. 737-742, 1998.

Received on April 15, 2008.

Accepted on November 14, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.