

利用酶联免疫反应鉴定芜菁 *SP11* 基因甲基化率的新方法

张治平, 张盼盼, 王春雷*

(扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009)

摘要: DNA 甲基化是调控基因表达的一个重要方式, 是表观遗传学研究的重点内容。目前测定某一基因 DNA 甲基化程度主要是先通过重亚硫酸盐转化, PCR 扩增, 再通过克隆、测序, 检测 PCR 产物中胞嘧啶 (C) 转化为胸腺嘧啶 (T) 的比例。基于这种原理, 建立了酶联免疫反应检测 PCR 产物中胞嘧啶转化为胸腺嘧啶的比例, 计算出 DNA 甲基化率的新方法, 并成功利用该方法测定了芜菁 (*Brassica rapa* L. ssp. *rapiferu* Metzg) 纯合子和杂合子植株中隐性 *SP11* 基因启动子区域 DNA 甲基化程度。与原有克隆测序方法相比, 该方法更加经济、省时。

关键词: 芜菁; DNA 甲基化; *SP11* 基因; 重亚硫酸盐转化; 酶联免疫反应

中图分类号: S 631.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 03-0575-06

Detecting *SP11* Genes DNA Methylation Rate of *Brassica rapa* by PCR-ELISA

ZHANG Zhiping, ZHANG Panpan, and WANG Chunlei*

(School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: DNA methylation is an important way to regulate gene expression, which is a main content of epigenetic research field. The way to determinating DNA methylation rate of a gene is mainly by bisulfite conversion, then amplifying the converted DNA sequence by PCR, and cloning and sequencing the PCR production to measure the rate of cytosine converted into the thymine in the sequence. Based on this method, we developed anenzyme linked immunosorbent assays (ELISA) instead of cloning and sequencing to measure the rate of cytosine converted into the thymine in DNA sequence. We used this improved method to detecting the methylation rate of promotor region sequence of recessive *SP11* in the heterozygote plants containing one dominate *SP11* and one recessive *SP11* of *Brassica rapa* L. ssp. *rapiferu* Metzg. Compared with the original method, the method reported here is more economical and time saving.

Keywords: *Brassica rapa*; DNA methylation; *SP11* gene; bisulfite conversion; ELISA

DNA 甲基化是指 S-腺苷甲硫氨酸上的甲基在甲基化转移酶的作用下转移到 DNA 胞嘧啶或腺嘌呤上, 从而对 DNA 进行修饰, 进而发生一系列的表观修饰 (Finnegan & Korac, 2000)。DNA 甲

收稿日期: 2017-01-16; 修回日期: 2017-03-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31401856); 江苏省自然科学基金项目 (BK20140482)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wangcl@yzu.edu.cn)

基化是表观遗传学的重要组成部分，普遍存在于生物界中，是目前研究的热点之一。植物细胞中，DNA 甲基化主要发生在 CpG, CpNpG 和 CpNpN 等 3 种核苷酸序列中胞嘧啶上 (Gener et al., 1999)。

对全基因组甲基化测序，可以利用二代测序技术，将样本 DNA 分成两份，一份用重亚硫酸盐转化，一份不作处理，处理的 DNA 中未发生甲基化的胞嘧啶 (C) 转化为尿嘧啶 (U)；对两份 DNA 分别测序，比较二者的 C 含量，就可以计算基因组相关位置甲基化率。而测定某一基因 DNA 甲基化率也是利用重亚硫酸盐转化将序列中的未发生甲基化的 C 转化为 U，再通过 PCR 循环扩增，U 位点变成 T，再将 PCR 产物进行克隆，测定每个克隆序列中 C 位点转化 T 的比例，计算出每个 C 发生甲基化的比例。由于该方法需要对大量克隆进行测序，所以成本较高；又由于需要克隆转化，所以耗时较长，存在改进的空间。

SP11 是控制芸薹属自交不亲和性花粉决定因子 (Schopfer et al., 1999)，在绒毡层特异表达，植株携带的一对复等位基因 *SP11* 存在显隐性关系 (Thompson & Taylor, 1966)。根据 *SP11* 等位基因显隐性关系，可以把 *SP11* 基因分成两类：花粉显性 *S* 基因型 (Class I) 和花粉隐性 *S* 基因型 (Class II)。一般情况下，Class I 基因相对 Class II 基因表现为显性 (Hatakeyama et al., 1998)。在同时携带 Class I 和 Class II *SP11* 杂合子植株中，被抑制表达 Class II *SP11* 基因启动子区域在绒毡层细胞中也发生高度甲基化，并且 Class I *S* 位点 *SMI* 序列能够形成一个 sRNA，该 sRNA 负责调控该序列甲基化的发生，并且该 sRNA 序列与 Class II *SCR/SP11* 基因启动子区域一段 DNA 序列高度同源 (Tarutaniy et al., 2010)。利用开发的新技术，检测 Class I 和 Class II *SP11* 杂合子植株中 Class II *SP11* 启动子区域 sRNA 同源序列的甲基化情况，确认该方法可靠、快速、可行。

1 材料与方法

1.1 材料

试验在扬州大学进行。试验材料为日本东北大学 Takeshi Nishio 教授赠与的已知 *S* 基因型的芜菁 (*Brassica rapa* L. ssp. *rapiferu* Metzg.) 植株，包含 *S* 基因型分别为 *S*₂₁/*S*₄₄、*S*₂₁/*S*₆₀、*S*₂₁/*S*₄₀、*S*₂₁/*S*₂₉、*S*₃₅/*S*₄₄、*S*₃₅/*S*₆₀、*S*₃₅/*S*₄₀ 和 *S*₃₅/*S*₂₉ 的 8 个杂合子植株，以及基因型为 *S*₄₄/*S*₄₄、*S*₆₀/*S*₆₀、*S*₄₀/*S*₄₀ 和 *S*₂₉/*S*₂₉ 的 4 个纯合子植株。植株栽培于花盆中。2015 年 3 月 25 日开始，采集各植株开花前 1 d 的花蕾，用镊子人工收集花药，利用酶解法收集绒毡层组织 (非完整)，保存于 -70 °C 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与引物和探针制备

从 -70 °C 冰箱中取出绒毡层，采用 CTAB 法提取 DNA，并用核酸仪检测 DNA 浓度，4 °C 冰箱保存备用。

用于扩增隐性基因的引物如表 1 所示。所有正向引物经生物素 (biotin) 标记，扩增获得的产物

表 1 试验所用引物序列
 Table 1 The sequences of primers

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
<i>S</i> ₄₄ - <i>SP11</i>	GTTATTTTGTATTGGTTATTATG	ATTCAACAACACCTTTAAAAACATT
<i>S</i> ₆₀ - <i>SP11</i>	AGGAAAAGAAGAATTGGATGAGGAAGTTA	CTCCACATCTARTRCTTTAAATTAACAAA
<i>S</i> ₄₀ - <i>SP11</i>	TTTATTAATTAATAATTTAAAGTGATTT	AATCCTAAATCCTCAACAAAAAAA
<i>S</i> ₂₉ - <i>SP11</i>	TGTGAAATTATTTTAAATGTTATTTTGT	AAACAATTCCTAACTCCACATCTA

大小在 450 bp 左右, 该产物包含 Class II *SP11* 启动子区域与 sRNA 同源的序列区域。

检测胞嘧啶位点发生甲基化与否的探针如表 2 所示。S₄₄-*SP11*, S₄₀-*SP11* 和 S₂₉-*SP11* 探针序列相同。检测甲基化胞嘧啶时, 检测探针为甲基化探针, 该探针需要地高辛 (Digoxin) 标记, 非甲基化探针作为竞争探针, 没有地高辛标记; 检测未发生甲基化胞嘧啶时, 非甲基化探针作为检测探针并用地高辛标记, 甲基化探针作为竞争探针, 没有地高辛标记。探针作用原理如图 1 所示。

表 2 试验所用探针序列
Table 2 The sequences of probes

基因名称 Gene name	检测用途 Purpose	位点 1 探针 Probe of loci 1	位点 2 探针 Probe of loci 2
S ₄₄ - <i>SP11</i>	甲基化 Methylated	CCTATTTACACGTAACATT	CACTTAATTGCCTATTTACAC
	非甲基化 Non-methylated	CCTATTTACACATAAACATT	CACTTAATTACCTATTTACAC
S ₆₀ - <i>SP11</i>	甲基化 Methylated	CCTATTTTACACGTAACAATTC	CACTTAATTGCCTATTTTACAC
	非甲基化 Non-methylated	CCTATTTTACACATAAACATTC	CACTTAATTACCTATTTTACAC
S ₄₀ - <i>SP11</i>	甲基化 Methylated	CCTATTTACACGTAACATT	CACTTAATTGCCTATTTACAC
	非甲基化 Non-methylated	CCTATTTACACATAAACATT	CACTTAATTACCTATTTACAC
S ₂₉ - <i>SP11</i>	甲基化 Methylated	CCTATTTACACGTAACATT	CACTTAATTGCCTATTTACAC
	非甲基化 Non-methylated	CCTATTTACACATAAACATT	CACTTAATTACCTATTTACAC

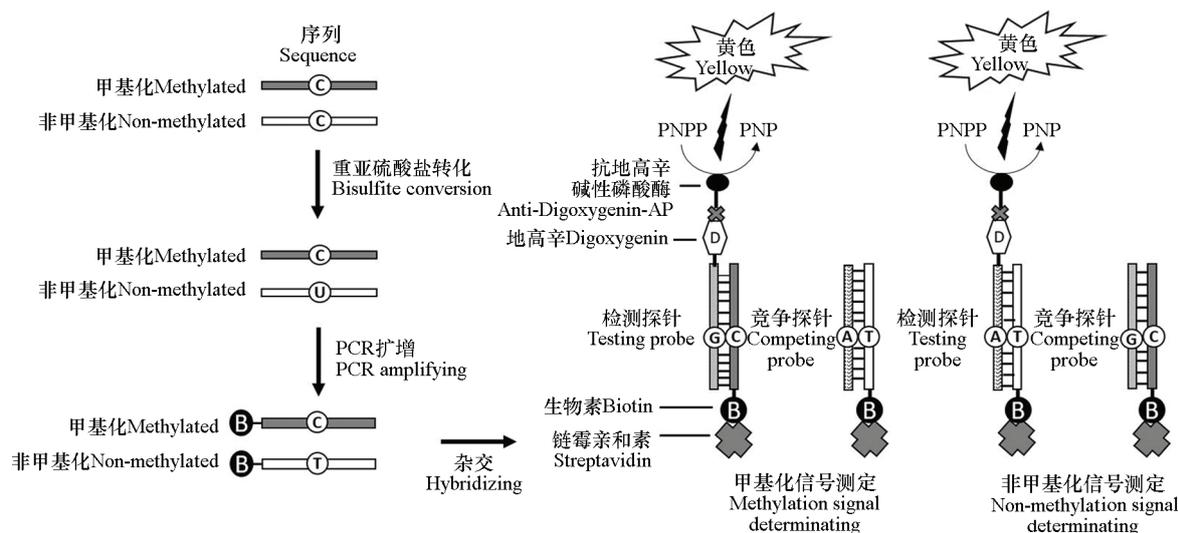


图 1 甲基化和非甲基化胞嘧啶检测流程示意图

Fig. 1 Schemes of DNA methylation rate determination by ELISA

1.2.2 酶联免疫法检测甲基化和非甲基化胞嘧啶

取 500 μg 基因组 DNA 与限制性内切酶反应 8 ~ 16 h, 剪切 DNA; 利用 2.5 倍 100%酒精沉淀 30 min, 离心; 再用 70%酒精沉淀两次, 回收酶切后的 DNA; 加入 3 mol · L⁻¹ NaOH 在 37 °C 反应 30 min, 解 DNA 双链; 加入尿素/亚硫酸氢钠和对二苯酚, 利用 PCR 仪转化, 转化程序为 95 °C 30 s, 55 °C 15 min, 循环 30 次, 然后 55 °C 15 h; 利用 DNA 回收试剂盒回收 DNA; 回收后的 DNA 加入 3 mol · L⁻¹ NaOH, 37 °C 反应 15 min 去除剩余的重亚硫酸盐; 加入 1 μL 糖原, 然后加入酒精清洗两遍, 溶于 0.1 倍 TE 缓冲液。

利用上述得到的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系为: DNA 5 μL; 正向引物 (10 pmol · μL⁻¹) 2.5 μL; 反向引物 (10 pmol · μL⁻¹) 2.5 μL; Promega master mix 25 μL; 无酶水: 15 μL。扩增体系为: 94 °C 2 min, 然后 94 °C 20 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 40 个循环。

将 PCR 产物进行杂交, 每 5 μL PCR 产物添加 100 μL PBST 缓冲液和 50 μg 链酶亲和素包裹的磁力球 (Roche, Germany), 94 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。加入 50 μL 变性溶液 (包含 0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA)。PBST 缓冲液清洗, 200 μL 杂交缓冲液 (包含 5 \times SCC 缓冲液, 0.3% Tween-20, 10 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 检测探针, 100 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的竞争探针, 检测探针地高辛标记), 50 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 2 h。

含 1% 抗地高辛碱性磷酸酶的 PBST 缓冲液室温孵育 30 min。PBST 清洗 2 次后, 再与 PNPP 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h。3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 终止反应。利用酶标仪在 405 nm 检测反应颜色浓度, 根据甲基化和非甲基化检测浓度比值, 计算出 DNA 甲基化百分比。该方法原理如图 1 所示。

1.2.3 克隆测序法检测甲基化和非甲基化胞嘧啶

取 500 μg 基因组 DNA 与限制性内切酶反应 8 ~ 16 h, 剪切 DNA; 利用 2.5 倍 100% 酒精沉淀 30 min, 离心; 再用 70% 酒精沉淀两次, 回收酶切后的 DNA; 用 3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 解 DNA 双链; 加入尿素/亚硫酸氢钠和对二苯酚, 利用 PCR 仪转化, 将上述 PCR 扩增产物克隆, 每个样本挑选 30 个以上克隆测序, 根据测序结果, 确定相关位点甲基化比率。

转化程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 循环 30 次, 然后 55 $^{\circ}\text{C}$ 15 h; 利用 DNA 回收试剂盒回收 DNA; 回收的 DNA 加入 3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min 去除剩余的重亚硫酸盐; 加入 1 μL 糖原, 然后加入酒精清洗两遍, 溶于 0.1 倍 TE 缓冲液。

利用上述得到的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为: DNA 5 μL ; 正向引物 (10 $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 2.5 μL ; 反向引物 (10 $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 2.5 μL ; Promega master mix 25 μL ; 无酶水: 15 μL 。扩增体系为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 40 个循环。

将 PCR 产物转入 promega 公司 pGEM-T Easy 载体, 按试剂盒说明操作, 挑选 30 个以上克隆测序, 计算 DNA 序列中 C 未变成 T 所占比率, 即该位点甲基化率。

2 结果与分析

所用的材料中, $S_{44}\text{-SP11}$ 、 $S_{60}\text{-SP11}$ 、 $S_{40}\text{-SP11}$ 和 $S_{29}\text{-SP11}$ 属于 Class II, 即隐性基因, $S_{21}\text{-SP11}$ 、 $S_{35}\text{-SP11}$ 属于 Class I, 即显性基因 (Watanabe et al, 2000; Shiba et al., 2002)。因此, 在杂合子材料中, 4 个 Class II *SP11* 基因表达被抑制, 启动子区域存在甲基化 (Shiba et al., 2006)。

利用开发的新方法对 8 个杂合子和 4 个纯合子植株中 Class II *SP11* 启动子区域受 *SMI* 调控序列中第 1 个和第 2 个胞嘧啶甲基化率进行测定 (表 3, 位点 1 和位点 2), $S_{44}\text{-SP11}$ 基因两个位点甲基化率在纯合子中为 6.68% 和 14.40%, 比例较低; 在两个杂合子中都在 50% 左右, 最高为 58.72%, 最低为 46.33%。 $S_{60}\text{-SP11}$ 基因两个位点甲基化率在纯合子中都低于 10%; 在两个杂合子中在 60% 以上, 最低 62.26%, 最高 80.17%, 位点 2 的甲基化率高于位点 1。 $S_{40}\text{-SP11}$ 两个位点甲基化率在纯合子中依然低于 10%; 在 S_{21}/S_{40} 杂合子中分别为 73.86% 和 79.72%, 在 S_{35}/S_{40} 杂合子中分别为 66.18% 和 58.27%。 $S_{29}\text{-SP11}$ 两个位点甲基化率在纯合子中都保持较低水平, 在 10% 左右; 在两个杂合子中, 第 1 位点甲基化率在 65% 左右, 第 2 位点甲基化率在 70% 左右。

为了验证新方法的可靠性, 进一步利用克隆测序法鉴定相同位点甲基化率, 结果 (表 4) 显示, 克隆测序法对相同位点测定值与酶联免疫法 (ELISA) 测定值比较接近, 例如, 含有 Class II *SP11* 纯合子植株, 其相关位点甲基化率均在 10% 左右; 而 Class II *SP11* 不能表达的杂合子中, 相关位点甲基化率均较高。在 $S_{35}\text{-SP11}$ 和 $S_{44}\text{-SP11}$ 基因杂合子中, $S_{44}\text{-SP11}$ 检测位点甲基化率为 48.38% 和 45.16%, 为所测杂合子中甲基化率最低样本, 与 ELSIA 法测定结果相近, 都低于 50%。在 $S_{21}\text{-SP11}$

和 S_{40} -*SP11* 基因杂合子中, S_{40} -*SP11* 检测位点甲基化率为 70.59%和 82.35%, 为所测位点甲基化率最高样本, 与 ELSIA 法测定结果一致。利用相关分析发现两组数据存在显著相关关系, 决定系数 $r^2 = 0.9823$ 。

表 3 利用酶联免疫反应测定 class II *SP11* 基因两位点甲基化率结果
Table 3 The methylation rate of class II *SP11* genes detected by ELISA

基因名称 Gene name	植株 <i>S</i> 基因型 <i>S</i> genotype of plant	位点 1 Loci 1			位点 2 Loci 2		
		克隆数 Clone number		甲基化率/% Methylation rate	克隆数 Clone number		甲基化率/% Methylation rate
		甲基化 Methylated	非甲基化 Non-methylated		甲基化 Methylated	非甲基化 Non-methylated	
S_{44} - <i>SP11</i>	$S_{44}S_{44}$	3	30	9.09	4	29	12.12
	$S_{24}S_{44}$	20	12	62.50	17	16	51.52
	$S_{35}S_{44}$	15	16	48.38	14	17	45.16
S_{60} - <i>SP11</i>	$S_{60}S_{60}$	2	30	6.25	3	29	9.38
	$S_{24}S_{60}$	23	9	71.88	20	12	62.50
	$S_{35}S_{60}$	29	8	78.37	30	7	81.10
S_{40} - <i>SP11</i>	$S_{40}S_{40}$	2	32	5.88	3	31	8.82
	$S_{24}S_{40}$	24	10	70.59	28	6	82.35
	$S_{35}S_{40}$	22	12	64.70	21	13	61.76
S_{29} - <i>SP11</i>	$S_{29}S_{29}$	4	31	11.43	3	32	8.57
	$S_{24}S_{29}$	24	11	68.57	25	10	71.42
	$S_{35}S_{29}$	21	13	61.76	23	11	67.65

表 4 利用克隆测序法测定 class II *SP11* 基因两位点甲基化率结果
Table 4 The methylation rate of class II *SP11* genes detected by ELISA

基因名称 Gene name	植株 <i>S</i> 基因型 <i>S</i> genotype of plant	位点 1 Loci 1			位点 2 Loci 2		
		吸收值 Absorption value		甲基化率/% Methylation rate	吸收值 Absorption value		甲基化率/% Methylation rate
		甲基化 Methylated	非甲基化 Non-methylated		甲基化 Methylated	非甲基化 Non-methylated	
S_{44} - <i>SP11</i>	$S_{44}S_{44}$	0.044	0.615	6.68	0.052	0.309	14.40
	$S_{24}S_{44}$	0.856	0.696	55.15	0.791	0.556	58.72
	$S_{35}S_{44}$	0.752	0.871	46.33	0.712	0.761	48.34
S_{60} - <i>SP11</i>	$S_{60}S_{60}$	0.072	1.460	4.70	0.083	0.789	9.52
	$S_{24}S_{60}$	1.031	0.625	62.26	1.074	0.466	69.74
	$S_{35}S_{60}$	1.142	0.349	76.58	1.217	0.301	80.17
S_{40} - <i>SP11</i>	$S_{40}S_{40}$	0.064	1.102	5.49	0.095	0.925	9.31
	$S_{24}S_{40}$	1.226	0.434	73.86	1.211	0.308	79.72
	$S_{35}S_{40}$	1.088	0.556	66.18	0.976	0.699	58.27
S_{29} - <i>SP11</i>	$S_{29}S_{29}$	0.068	0.633	9.70	0.054	0.561	8.78
	$S_{24}S_{29}$	0.925	0.495	65.14	1.314	0.499	72.48
	$S_{35}S_{29}$	0.884	0.521	62.92	1.168	0.493	70.32

3 讨论

基因序列甲基化修饰是控制基因表达的重要方式。目前测定某一基因甲基化率主要是通过重亚硫酸盐转化后利用 PCR 扩增, 再克隆, 然后对每个克隆进行测序, 确定每一克隆 C 位点变化情况, 为了提高试验准确性, 一般要求测序克隆数量不少于 30 个。由于克隆耗时长, 对多个克隆测序费用较高。因此, 这里提出一种改进方法, 利用酶联免疫法 (ELISA) 直接测定 PCR 产物序列中 C 位点未发生转化的比例, 取代原技术中的克隆和测序步骤。利用该方法成功测定了 8 个杂合子和 4 个纯

合子植物的隐性 *SP11* 基因甲基化情况, 结果显示在纯合子植株中, 测定的两个 C 位点甲基化程度较低, 而杂合子植株中, 同一基因的不同位点却表现出高甲基化。这些结果与前人报道一样。在纯合子植株中, class II *SP11* 基因能够正常表达, 因此其甲基化率较低; 在杂合子中, class II *SP11* 基因表达被抑制, 抑制原因就是其启动子区域发生甲基化。此外, ELISA 测定结果与克隆测序法所获结果相近, 说明本方法的可靠性。

在本方法中, 利用探针杂交时, 杂交液中包括检测探针和竞争探针。这是因为甲基化序列与非甲基化序列只有一个位点差异, 利用竞争探针避免非特异性结合, 提高结果的可靠性。这种检测探针和竞争探针同时杂交的方法也被用于检测单核苷酸多态性 (Tonosaki et al., 2013)。

本方法与现有方法相比, 能够更加快速、经济测定基因 DNA 序列位点甲基化程度, 对于研究、分析 DNA 甲基化形成和调控具有重要意义。

References

- Finnegan E J, Kovac K A. 2000. Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol*, 43: 189 - 201.
- Gener R K, Kovac K A, Dennis E S. 1999. Multiple DNA methyltransferase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 41: 269 - 278.
- Hatakeyama K, Watanabe M, Takasaki T, Ojima K, Hinata K. 1998. Dominance relationships between *S*-allele in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Heredity*, 80: 241 - 247.
- Schopfer C R, Nasrallah M E, Nasrallah J B. 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*, 286: 1697 - 1700.
- Shiba H, Iwano M, Entani T, Ishimoto K, Shimosato H, Chea F, Sattab Yoko, Ito A, Takada Y, Watanabe M, Isogai A, Takayama S. 2002. The dominance of alleles controlling self-incompatibility in *Brassica* pollen is regulated at the RNA level. *Plant Cell*, 14 (2): 491 - 504.
- Shiba H, Kakizaki T, Iwano M, Tarutani Y, Watanabe M, Isogai A, Takayama S. 2006. Dominance relationships between self-incompatibility alleles controlled by DNA methylation. *Nature Genetics*, 38 (3): 297 - 299.
- Tarutani Y, Shiba H, Iwano M, Kakizaki T, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Takayama S. 2010. Trans-acting small RNA determines dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility. *Nature*, 466: 983 - 987.
- Thompson K F, Taylor J P. 1966. Non-linear dominance relationships between *S* alleles. *Heredity*, 21: 345 - 362.
- Tonosaki K, Kudo J, Kitashiba H, Nishio T. 2013. Allele-specific hybridization using streptavidin-coated magnetic beads for species identification, *S* genotyping, and SNP analysis in plants. *Mol Breeding*, 31 (2): 419 - 428.
- Watanabe M, Ito A, Takada Y, Chie Ninomiya, Kakizaki T, Takahata Y, Hatakeyama K, Hinata K, Suzuki G, Takasaki T, Satta Yoko, Shiba Hiroshi, Takayama S, Isogai. 2000. Highly divergent sequences of the pollen self-incompatibility (*S*) gene in class-I *S* haplotypes of *Brassica campestris* (syn. *rapa*) L. *Febs Letters*, 473 (2): 139 - 144.