



Original Article

Microarray Data Analysis of as-induced Rice Roots by using Easygo and Mapman Softwares

Nguyen Thi Thuy Quynh^{1,*}, Pham Le Ngoc Han², Vo Khanh Tam²,
Phung Thi Kim Hue², Tsai-Lien Huang³

¹VNU University of Education, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

²Hung Vuong gifted high school, 48 Hung Vuong, Pleiku, Gia Lai, Vietnam

³Departement Life Sciences, National Cheng kung University, Taiwan, ROC

Received 22 January 2019

Revised 17 March 2019; Accepted 26 July 2019

Abstract: Rice is one of the most important crops in Asian countries such as China, Vietnam. Many recent reports indicate that the arsenic content in rice exceeds the threshold and affects human health. Studying of molecular mechanisms and finding the arsenic resistance genes in rice which is extremely important and urgent. In this study, we analyzed the transcriptional changes of arsenic-treated rice root cells during 24 hours by microarray technique. Results showed that a large number of the differentially expressed genes (720 genes). EasyGO and Mapman softwares are powerful tools in analyzing microarray data and classifying functional groups as well as the important metabolic pathways in the cell. Results of microarray analysis using EasyGO showed that 74 down-regulated genes related to cellular component, 200 up-regulated genes involved in catalytic activity, 93 up-regulated genes involved in biological processes as responding to environmental stress, and 64 detoxification-related genes are increased expression such as cytochrome P450, Glutathione-S-transferase and UDP-Glycosyltransferase. Mapman's microarray analysis results also indicate that numerous of arsenic-tolerance genes of rice roots. These results support for searching indicated genes in the selection of As-tolerance rice varieties.

Keywords: Asen, EasyGO, Mapman, microarray, *Oryza sativa* L.

* Corresponding author.

Email address: quynhntt-bio@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4860>



Phân tích số liệu Microarray của rễ cây lúa bị nhiễm Asen bằng phần mềm chuyên dụng Easygo và Mapman

Nguyễn Thị Thúy Quỳnh^{1,*}, Phạm Lê Ngọc Hân², Võ Khánh Tâm²,
Phùng Thị Kim Huệ², Tsai-Lien Huang³

¹*Trường Đại học Giáo dục, ĐHQGHN, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

²*Trường THPT chuyên Hùng Vương, 48 Hùng Vương, Thành phố Pleiku, Gia Lai*

³*Trường Đại học Quốc gia Cheng Kung, 1 Đường University, Tainan, Taiwan*

Nhận ngày 22 tháng 01 năm 2019

Chỉnh sửa ngày 17 tháng 3 năm 2019; Chấp nhận đăng ngày 26 tháng 7 năm 2019

Tóm tắt: Cây lúa là một trong những loại lương thực quan trọng của các nước trong khu vực Châu Á như Trung Quốc, Việt Nam. Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy hàm lượng Asen (As) có trong gạo vượt ngưỡng quy định và điều này gây ảnh hưởng tới sức khỏe của con người. Việc nghiên cứu cơ chế phân tử và tìm ra những gen chống chịu As của cây lúa là điều vô cùng quan trọng và cấp thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích những thay đổi hệ phiên mã của tế bào rễ cây lúa sau 24 giờ xử lý với As bằng kỹ thuật microarray. Kết quả cho thấy một số lượng lớn các gen thay đổi mức độ biểu hiện (720 gen). Phần mềm EasyGO và Mapman là những công cụ đặc lực trong việc phân tích số liệu microarray và phân loại các nhóm gen chức năng cũng như là các con đường trao đổi chất quan trọng trong tế bào. Kết quả phân tích bằng phần mềm EasyGO cho thấy 74 gen điều hòa giảm liên quan đến thành phần tế bào; số lượng các gen điều hòa tăng gồm có: 200 gen liên quan đến hoạt tính xúc tác, 93 gen liên quan đến quá trình sinh học đáp ứng với stress môi trường, và 64 gen liên quan đến khả năng khử độc As như Cytochrome P450, Glutathione-S-transferase và UDP-Glycosyltransferase. Kết quả phân tích microarray bằng phần mềm Mapman cũng cho kết quả sâu hơn về con đường trao đổi chất liên quan đến tính chống chịu của rễ cây lúa với As. Các kết quả này nhằm tìm ra những gen chỉ thị nhằm hỗ trợ trong chọn tạo ra những giống lúa có khả năng chống chịu As.

Từ khóa: Asen, EasyGO, Mapman, microarray, *Oryza sativa* L.

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: quynhntt-bio@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4860>

1. Mở đầu

Asen (As, hay còn gọi là thạch tín) là một trong những chất cực độc gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người. Nhiều nghiên cứu cho thấy sự ô nhiễm As trong nguồn nước tiềm ẩn rất nhiều mối nguy hại do việc tiêu thụ các sản phẩm nông nghiệp được trồng trong những khu vực nhiễm As. As^{3+} là một dạng vô cơ của As và là chất cực độc đối với tế bào thực vật gây ức chế chức năng nội bào, phá hủy các quá trình trao đổi chất và gây chết tế bào [1]. Nguy hiểm hơn cả là As trong nước ngầm được sử dụng cho tưới tiêu sẽ đi vào chuỗi thức ăn thông qua sự hấp thu của động vật và thực vật. Lúa là một trong những lương thực quan trọng của nhiều nước Châu Á như Trung Quốc, Đài loan, Việt Nam... Tuy vậy, nhiều báo cáo đã chỉ ra rằng hàm lượng As tích lũy trong rom rạ làm thức ăn cho gia súc, sau đó đi vào cơ thể người thông qua chuỗi thức ăn [2]. Do đó, việc nghiên cứu cơ chế phân tử và tìm ra những gen chống chịu As của cây lúa là điều vô cùng quan trọng và cấp thiết. Nhiều báo cáo đã nghiên cứu và xác định được vai trò khử độc kim loại của một số gen trong không bào thực vật liên quan đến Cytochrome P450, Glutathione-S-transferase và UDP-Glycosyltransferase [3, 4].

Trong thập kỷ gần đây, kỹ thuật microarray là một công cụ hữu ích cho phép nghiên cứu đồng thời mức độ biểu hiện của hàng nghìn gen trong các mẫu đáp ứng với những biến đổi của môi trường. Nhiều bài báo đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của As lên hệ gen biểu hiện của thực vật ở nồng độ cao [5]. Tuy nhiên rất ít các tài liệu công bố về đáp ứng sớm của hệ gen biểu hiện của thực vật dưới ảnh hưởng của As ở nồng độ thấp. Vì vậy, nhằm tìm hiểu cơ chế phân tử của cây lúa dưới tác động sớm của As^{3+} (trong 24 giờ xử lý) với nồng độ thấp ($5 \mu M$), chúng tôi tiến hành phân tích hệ gen biểu hiện của cây lúa bằng kỹ thuật cDNA microarray với kích thước lên tới 44 k gen. Đồng thời, nhằm phân tích các nhóm gen chức năng có vai trò quan trọng trong quá trình khử độc As của rễ cây lúa, chúng tôi tiến hành sử dụng phần mềm EasyGO và Mapman. Hai phần mềm này được sử dụng phổ

biến giúp các nhà nghiên cứu dễ dàng phát hiện ra những kiến thức sinh học quan trọng và giải quyết các vấn đề nghiên cứu đặt ra [6]. EasyGO được xem là phương tiện ưu việt trong việc xác định các nhóm gen chức năng có vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất ở thực vật. Hệ thống ghi chú Ontology Gene (GO) cung cấp một cách hệ thống các thuật ngữ chuyên môn về mô tả các đối tượng sinh học và tập trung vào ba nhóm chính là: quá trình sinh học (biological process), thành phần tế bào (cellular component), và chức năng phân tử (molecular function). Phần mềm Mapman là một công cụ đắc lực và được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu về hệ gen biểu hiện, cho phép người sử dụng có thể phân loại và quan sát được mức độ biểu hiện của các nhóm gen tham gia vào các quá trình sinh học khác nhau trong tế bào thực vật.

Nghiên cứu này cung cấp những bằng chứng về mức độ phân tử của hệ rễ cây lúa chịu ảnh hưởng của As^{3+} và là cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn nhằm tìm kiếm những gen liên quan đến quá trình chống chịu As ở cây lúa nói riêng và thực vật nói chung.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Giống lúa *Oryza sativa* L.cv. TN-67 được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử thực vật, Trường đại học Quốc gia Thành Công, Đài Loan.

2.2. Phương pháp

Xử lý hạt lúa bằng As

Hạt lúa *Oryza sativa* L.cv. TN-67 được khử trùng trong 15 phút bằng Sodium hypochlorite 2.5% (v/v), rửa lại 3 lần bằng nước cất, và đặt trong tối ở $37^{\circ}C$. Sau 3 ngày khi hạt lúa đã nảy mầm thì chuyển 15 hạt sang đĩa petri mới với 20 ml nước cất, và đặt trong tối ở $26^{\circ}C$ trong 3 ngày. Khi rễ của cây lúa 6 ngày tuổi đạt chiều dài 3-4 cm thì được chuyển sang đĩa petri mới với 20 ml As^{3+} $5 \mu M$ ($NaAsO_2$; Sigma, USA), và mẫu đối chứng được chuyển sang đĩa petri với 20 ml

nước cất. Sau 24h xử lý, đầu rễ cây lúa (khoảng 1 cm) được cắt và thu lại cho các thí nghiệm tiếp theo. Thí nghiệm được tiến hành độc lập và lặp lại 3 lần.

Tách chiết RNA tổng số và cDNA

100 mg mẫu rễ lúa (mẫu đối chứng và mẫu được gây nhiễm với $5 \mu\text{M As}^{3+}$ trong 24 h) được thu hoạch. RNA tổng số được tách chiết bằng kit RNAeasy Plant Mini (QIAGEN, Đức) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Nồng độ ARN tổng số được định lượng bằng máy NanodropND 2000 (Nanodrop Technologies, USA) với độ tinh sạch cao (OD260/280 and OD260/230 >2).

cDNA được thực hiện từ 1 μg ARN tổng số bằng ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, WI, USA) với mỗi oligo (dT)₁₅. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 42°C trong 60 phút và được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR khuếch đại các gen nghiên cứu.

Kỹ thuật microarray và phân tích số liệu microarray

Rễ cây lúa 6 ngày tuổi được xử lý với $5 \mu\text{M As}^{3+}$ trong 24 h được thu hoạch và tách chiết RNA tổng số. Kỹ thuật microarray được thực hiện tại phòng thí nghiệm ADN microarray, Viện Sinh học - Taiwan với chip ADN là Agilent Rice Oligo microarray (44 K Agilent Technologies, USA). Lai mẫu dò microarray được tiến hành lặp lại 3 lần theo hướng dẫn của nhà cung cấp. 0,8 μg cDNA tổng số được khuếch đại bằng kit Fluorescent Linear Amplification (Agilent Technologies, USA), trong đó mẫu đối chứng được đánh dấu với Cy3-CTP, và mẫu thí nghiệm được đánh dấu với Cy5-CTP (CyDye, PerkinElmer, USA) trong 30 phút 60°C . Các mẫu này được lai với chip microarray Rice Oligo DNA Microarray 44K RAP-DB (G2519F#15241; Agilent Technologies, USA) trong 17 giờ với nhiệt độ 60°C . Sau đó, chip microarray được làm khô và được quét bằng máy quét (Agilent Technologies, USA) ở bước sóng 535 nm đối với Cy3 và bước sóng 625 nm đối với Cy5. Hình ảnh được quét và phân tích bằng phần mềm xử lý ảnh khai thác tính năng 9.5.3

(Feature Extraction 9.5.3, Agilent Technologies, USA).

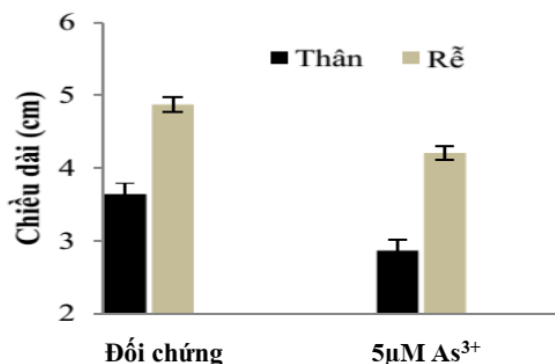
Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm GeneSpringGX11 (Agilent Technologies) và Rank Products. Các mô tả về gen của cây lúa dưới tác động của As được chú thích theo RAP-DB (Rice Annotation Project Data Base: <http://rapdb.lab.nig.ac.jp>) và theo TIGR Rice Genome Annotation Resource: <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/index.shtml>. Các nhóm gen đáp ứng với As^{3+} được phân loại nhóm chức năng và các con đường trao đổi chất bằng phần mềm EasyGO và Mapman.

Phân tích số liệu

Các số liệu được ghi nhận và xử lý bằng phần mềm thống kê sinh học Minitab với sự sai khác có ý nghĩa ($p\text{-value} \leq 0.05$).

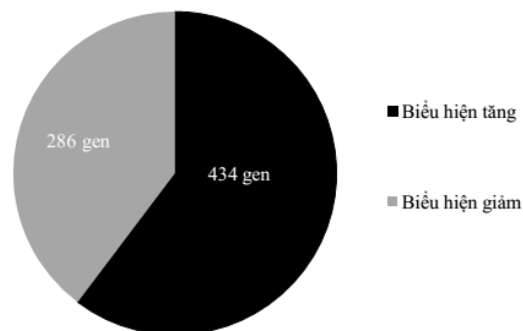
3. Kết quả và thảo luận

Trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi, độc tính của As^{3+} lên sự sinh trưởng của cây lúa 6 ngày tuổi đã được xác định với các nồng độ là 5, 10, 15, 20, 25 và $50 \mu\text{M}$. Kết quả cho thấy tại nồng độ $5 \mu\text{M As}^{3+}$ chiều dài của rễ cây lúa giảm gần 40% so với cây đối chứng, và cây lúa không phát triển được ở nồng độ từ 15 - $50 \mu\text{M}$. Do đó, chúng tôi đã lựa chọn nồng độ của As^{3+} là $5 \mu\text{M}$ cho các nghiên cứu sâu hơn. Trong nghiên cứu này nhằm xác định độc tính của As^{3+} với cây lúa, chúng tôi tiến hành đánh giá sự phát triển của thân và rễ cây lúa bị xử lý với As^{3+} ở nồng độ $5 \mu\text{M}$ trong 24 giờ. Kết quả cho thấy chiều dài của thân và rễ cây lúa bị xử lý với As^{3+} đều bị giảm đáng kể (2,87 cm và 4,21 cm) so với cây đối chứng (3,64 cm và 4,88 cm) (Hình 1). Hình thái của thân và rễ cây lúa cho thấy khi bị gây nhiễm với As^{3+} đều bị còi cọc và phát triển kém thon so với cây lúa đối chứng. Kết quả này chứng tỏ khả năng gây độc của As đối với cây lúa. Nhiều kết quả nghiên cứu cũng cho thấy sự phát triển của thực vật bị suy giảm hoặc bị chết dưới tác động của As [7, 8].



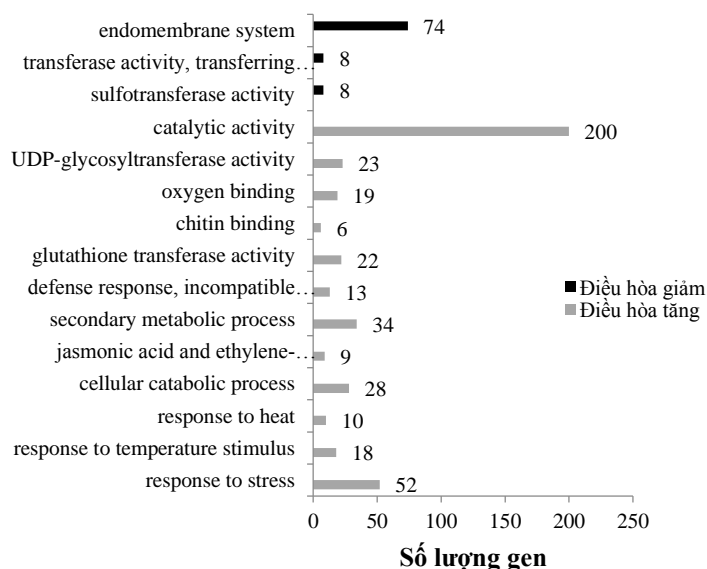
Hình 1. Chiều dài của thân và rễ cây lúa dưới tác dụng của As³⁺ sau 24 giờ.

Với mong muốn hiểu rõ cơ chế phân tử và các quá trình trao đổi chất của cây lúa đáp ứng với As³⁺ trong 24 giờ, chúng tôi đã tiến hành sử dụng kỹ thuật cDNA microarray 44 k và phân tích hệ gen biểu hiện của cây lúa dưới tác động của As³⁺. Kết quả cho thấy một số lượng lớn các gen thay đổi mức độ biểu hiện (434 gen biểu hiện tăng và 286 gen biểu hiện giảm) (Hình 2). Kết quả nghiên cứu của Huang và cs. cũng cho thấy hệ gen biểu hiện của cây lúa dưới tác động của As thay đổi rất nhiều [5].



Hình 2. Số lượng các gen điều hòa tăng và giảm ở rễ cây lúa bị ảnh hưởng bởi As³⁺.

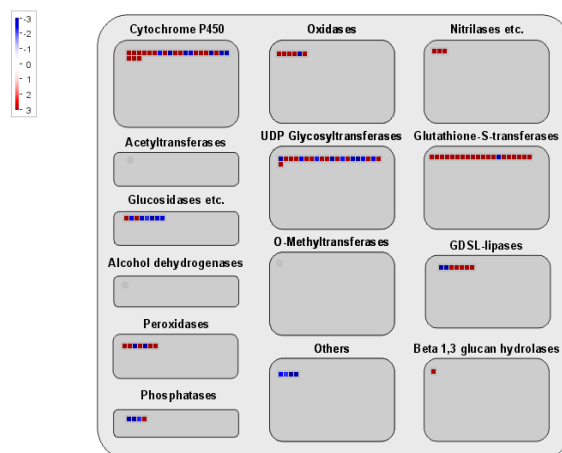
Kết quả phân tích số liệu microarray bằng phần mềm EasyGO cho thấy các nhóm gen có biểu hiện giảm thuộc các nhóm chức năng phân tử như hoạt tính sulfotransferase và hoạt tính transferase; và các nhóm gen liên quan đến thành phần tế bào (endomembrane system) chiếm ưu thế hơn cả (74 gen). Trong khi đó, các gen có biểu hiện tăng thuộc nhóm gen liên quan đến quá trình sinh học như các gen đáp ứng với stress phi sinh học (93 gen), và nhóm chức năng phân tử gồm nhiều các gen liên quan đến hoạt tính khử độc As như: glutathione transferase (22 gen), UDP-glycosyltransferase (23 gen), và Cytochrome P450 (19); và hoạt tính xúc tác (200 gen) (Hình 3).



Hình 3. Mức độ biểu hiện điều hòa tăng và giảm của các gen liên quan đến quá trình sinh học.

Kết quả phân tích về chức năng của các gen rễ cây lúa dưới tác dụng của As bằng phần mềm Mapman cho thấy các gen có biểu hiện giảm là các gen liên quan đến quá trình trao đổi thứ cấp. Các gen này có vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật, trực tiếp liên quan đến quá trình sinh tổng hợp flavonoid như phenylpropanoid và lignin [9, 10]. Kết quả này có thể lý giải sự suy giảm tốc độ phát triển chiều dài của thân và rễ cây lúa dưới tác động của As^{3+} (như kết quả đã trình bày ở Hình 1). Trong khi đó, phần lớn các gen như Cytochrome P450, Glutathione-S-transferase, UDP Glycosyltransferase có mức độ biểu hiện tăng (Hình 4). Rất nhiều các báo cáo đã chỉ ra rằng, Glutathione-S-transferase (GST) có vai trò quan trọng trong các phản ứng oxy hóa khử như khử độc kim loại nặng [7, 8]. Điều này được lý giải là ngay khi As hấp thu vào thực vật thì hàm lượng GST sẽ được sản sinh ra thông qua sự tạo thành phytochelatin (PCs) và dẫn đến sự thay đổi nồng độ các gốc oxy hóa và các enzyme chống oxy hóa trong tế bào thực vật. Bên cạnh đó, quá trình khử độc trong tế bào thực vật còn có sự tham gia của Cytochrome P450 monooxygenases (CYPs) and UDP-glycosyltransferases (UTGs). Marrs và cs. đã chứng minh GST là enzyme có khả năng xúc tác cho phản ứng kết hợp các độc tố với glutathione và chuyển những hợp chất này tới không bào thực vật [3]. Do đó, chúng tôi có thể khẳng định vai trò khử độc từ rất sớm (24 giờ) của CYPs, UGTs và GST khi tế bào rễ cây lúa bị tác động bởi As^{3+} . Kết quả này cũng thống nhất với nhiều kết quả nghiên cứu khác đã công bố trên thế giới [5, 11, 12].

Kết quả này là những cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn trong việc tìm kiếm các gen liên quan đến tính chống chịu As ở cây lúa. Từ đó hỗ trợ cho các nhà khoa học trong công tác chọn tạo giống lúa nói riêng và thực vật nói chung có khả năng chống chịu được trong môi trường ô nhiễm As, nhằm tạo ra nguồn lương thực an toàn và nâng cao chất lượng cuộc sống.



Hình 4. Mức độ điều hòa các gen liên quan đến hệ enzyme của rễ lúa bị tác động bởi As^{3+} (màu đỏ và màu xanh thể hiện tương ứng mức độ biểu hiện tăng và giảm của các gen)

4. Kết luận

Kết quả cDNA microarray 44 k đã chỉ ra một số lượng lớn các gen thay đổi mức độ biểu hiện của rễ cây lúa khi xử lý với $5 \mu M As^{3+}$ trong 24 giờ (720 gen).

Ứng dụng phần mềm EasyGO phân tích số liệu microarray cho thấy phần lớn các gen điều hòa giảm liên quan chủ yếu đến thành phần tế bào (74 gen). Các gen điều hòa tăng liên quan đến quá trình sinh học đáp ứng với stress môi trường (93 gen), liên quan đến hoạt tính xúc tác (200 gen) và các gen liên quan đến khử độc As (64 gen) như Glutathione transferase, UDP-glycosyltransferase và Cytochrome P450.

Kết quả phân tích số liệu microarray bằng phần mềm Mapman cũng khẳng định tính chính xác cũng như nghiên cứu sâu hơn về chức năng của các nhóm gen liên quan đến tính chống chịu As của cây lúa.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử thực vật thuộc Khoa Khoa học sự sống, trường Đại học Quốc gia

Cheng Kung, Taiwan; và Phòng thí nghiệm Sinh học - Trường Đại học Giáo dục Hà nội đã tạo điều kiện cơ sở vật chất, trang thiết bị để hoàn thành kết quả nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] S.K. Panda, R.K. Upadhyay, S. Nath, Arsenic stress in plants. *Journal of Agronomy and Crop Science* 196 (2010) 161-174. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2009.00407.x>.
- [2] M.A. Rahman, H. Hasengawa, M.M. Rahman, M.A Miah, A. Tasmin. Arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.): Human exposure through food chain. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69 (2008) 317-324. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.01.005>.
- [3] K.A. Marrs, The function and regulation of Glutathione S-transferase in plants. *Plant Mol Biol* 47 (1996) 127-58. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.127>.
- [4] L.M. DelRazo, B. Quintanilla-Vega, E. Brambila-Colombes, E.S. Calderón-Aranda, M. Manno, A. Albores, Stress proteins induced by Arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology* 177 (2001)132-148. <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9291>.
- [5] T.L. Huang, Q.T.T. Nguyen, S.F. Fu, C.Y. Lin, Y.C. Chen, H.J. Huang, Transcriptomic changes and signalling pathways induced by arsenic stress in rice roots. *Plant Molecular Biology* 80 (2012) 587-608. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11103-012-9969-z>.
- [6] O. Thimm, O. Bläsing, Y. Gibon, A. Nagel, S. Meyer, P. Krüger, J. Selbig, L.A. Müller, S.Y Rhee, M. Stitt, Mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal* 37 (2004) 914-939. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02016.x>.
- [7] J. Hartley-Whitker, G. Ainsworth, A.A. Meharg, Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. *Plant, Cell and Environment* 24 (2001) 713-722. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00721.x>.
- [8] S. Mishara, A.B. Jha, R.S. Dubey, Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. *Protoplasma* 248 (2011) 565-577. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0210-0>.
- [9] M. Chabannes, A. Barakate, C. Lapierre, J.M. Marita, Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants, *The Plant* 28 (2001) 257-270. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01140.x>.
- [10] T. Goujon, V. Ferret, I. Mila, B. Pollet, Down-regulation of the AtCCR1 gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. *Planta* 217 (2003) 218-228. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-0987-6>.
- [11] C. Li, S. Feng, Y. Shoa, L. Jiang, X. Lu, X. Hou, Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. *Journal of Environmental Sciences* 19 (2007) 725-732. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60121-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60121-1).
- [12] A.A. Meharg, J. Harley-Whitaker, Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist* 154 (2002) 29-43. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00363.x>.