

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.03.024

晏荣军, 林溪, 胡佳扬, 等. 螺旋藻有效成分超临界萃取与分离研究[J]. 广西植物, 2014, 34(3):414-418

Yan RJ, Lin X, Hu JY, et al. Study on the effective constituents of *Spirulina platensis* with supercritical fluid extraction and separation[J]. *Guihaia*, 2014, 34(3):414-418

螺旋藻有效成分超临界萃取与分离研究

晏荣军, 林溪, 胡佳扬, 裘俊红, 陆向红

(浙江工业大学 化学工程与材料学院, 杭州 310014)

摘要: 使用超临界 CO₂ 萃取技术对钝顶螺旋藻粉进行萃取与分离, 结果表明: 超临界 CO₂ 萃取的最优条件为压力 20 MPa, 夹带剂使用量 100 mL/100 g, 温度 50 °C, 萃取时间 2 h; 利用凯氏定氮法及气相色谱法分别对超临界萃取处理过的螺旋藻中蛋白质和多糖进行研究与分析, 结果表明: 螺旋藻粉中蛋白质含量为 49.39%, 螺旋藻多糖中的单糖含量占多糖粗品的 9.25%, 主要组成为鼠李糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖等。

关键词: 螺旋藻; 超临界 CO₂ 萃取; 蛋白质; 多糖

中图分类号: Q946.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)03-0414-05

Study on the effective constituents of *Spirulina platensis* with supercritical fluid extraction and separation

YAN Rong-Jun, LIN Xi, HU Jia-Yang, QIU Jun-Hong, LU Xiang-Hong

(College of Chemical Engineering and Materials, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: The effective constituents of the *Spirulina platensis* components were analysed and extracted used the supercritical CO₂ extraction. The optimal conditions of supercritical CO₂ were as follows: 20 MPa as extraction pressure, 50 °C as extraction temperature, 100 mL/100 g as entrainer, 2 h as extraction time. And also analysis on *Spirulina* protein and polysaccharide by using Kjeldahl method and Gas Chromatography, the results showed that the protein content of *Spirulina platensis* was 49.39%, the content of *Spirulina platensis* monosaccharides in the polysaccharide was 9.25%. Most of monosaccharides was composed from rhamnose, xylose, mannose, glucose and galactose.

Key words: *Spirulina platensis*; supercritical CO₂ extraction; protein; polysaccharide

螺旋藻在水产动物育苗和海水养殖中得到了广泛使用(高天荣等, 2002), 超临界 CO₂ 流体技术作为一种替代传统萃取工艺的新技术, 受到越来越多的瞩目(Sato *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1992)。利用超临界 CO₂ 流体的萃取技术对螺旋藻进行分离提取, 具有高效、便捷等特点, 有利于实现工业化、规模化生产(李天祥等, 2002; 徐海军, 1994)。该技术可同时对螺旋藻多种成分进行分离和提取, 而且在萃取过程中无溶剂残留、无污染并很好防止物质被氧

化。螺旋藻含有极其丰富而均衡的营养成分, 粗蛋白含量高达干重的 60%~70%(胡一兵等, 2002; 俞丽君等, 1999)。因此, 对螺旋藻蛋白的研究与开发具有重要意义。

本研究使用超临界 CO₂ 萃取技术对螺旋藻进行萃取与分离, 并结合凯氏定氮法及气相色谱法(章银良等, 1999; 王勇等, 1999; 胡佳续等, 2010), 研究螺旋藻的蛋白质及多糖组成, 旨在为螺旋藻在养殖饲料和食品开发应用及产业化提供依据和技术参考。

收稿日期: 2013-11-09 修回日期: 2014-01-13

基金项目: 浙江省大学生新苗计划项目(2012R403044); 教育部留学回国人员科研启动基金。

作者简介: 晏荣军(1976-), 男, 湖南岳阳人, 博士后, 讲师, 从事水环境生物学研究, (E-mail) yanrj@zjut.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 超临界萃取最佳条件设计

称取钝顶螺旋藻粉(由浙江康普螺旋藻有限公司提供)75 g,将其平均分成 2 份,用脱脂棉包好,再用纱布包成半径约 3 cm、长 10 cm 的圆柱体状,放入 1 L 萃取缸,盖上堵头。先检查阀门并观察水槽,确保正确后打开电源,打开仪表,等温度小于等于 5 ℃后运行设备。循环运行 45 min 后,加入夹带剂 80%乙醇。稳定运行 2 h 后,萃取结束,用 2 个锥形瓶接收分离 1,2 出口的物质并记录好质量差。根据萃取压力、温度、时间和夹带剂加入量对萃取的影响,设计并在能达到的最佳提取工艺条件下得到萃取物。

影响超临界萃取的主要因素是萃取压力、温度、夹带剂加入量和时间。由于萃取达到一定时间后,萃取率变化较小,本研究将温度设定为 50 ℃,萃取时间设定为 2 h,设计了 9 组实验。见表 1。

表 1 萃取压力与夹带剂加入量对超临界萃取的影响

Table 1 Relationship between extraction pressure and entrainer of supercritical CO₂

组别 Group	萃取压力 Extraction pressure (MPa)	夹带剂加入量 Addition entrainer (mL/100g)	萃取温度 Extraction pressure (°C)	萃取时间 Extraction time (h)
1	10	50	50	2
2	10	100	50	2
3	10	150	50	2
4	15	50	50	2
5	15	100	50	2
6	15	150	50	2
7	20	50	50	2
8	20	100	50	2
9	20	150	50	2

1.2 蛋白质含量测定

称取 2 g 超临界萃取后萃取缸内的螺旋藻粉,依次加入 30 mL 浓 H₂SO₄, 0.3 g CuSO₄, 3 g K₂SO₄,加热到 300 ℃直至炭化无泡沫后,降温到 180 ℃,分 3 次加入 30 mL H₂O₂。再次加热到 300 ℃,呈蓝绿色后,继续加热 30 min,消解完全后,浓硫酸将样品中的有机氮都转变成无机铵盐。取同样质量的硫酸铜、硫酸钾、浓硫酸、过氧化氢为空白样。应用凯氏定氮测定蛋白质含量。

用已知浓度的 HCL 标准溶液进行滴定,依据酸滴定量用下列公式计算含氮量及粗蛋白含量。

$$\text{含氮量: } N(\%) = \frac{1.401 \times M}{W} (V - V_0)$$

$$\text{粗蛋白含量: } P(\%) = N(\%) \times C$$

式中, M 为标准摩尔浓度; W 为样品重量; V_0 为空白样滴定标准酸消耗量; V 为样品滴定标准酸消耗量; C 为粗蛋白转换系数。

取两组数据平均值,即螺旋藻的蛋白质含量。

1.3 多糖提取与单糖成分分析

1.3.1 提取工艺路线 工艺路线:超临界萃取物→加 95%乙醇回流脱脂→热介质浸提→离心合并上清液→残渣复提→离心合并上清液→减压浓缩→sevage 法去蛋白→糖溶液加乙醇至 60%~65%,醇沉过夜→离心收集沉淀→加水复溶→离心去除不溶物→冻干得多糖粗品。

Sevage 法(穆文静等,2011):正丁醇,氯仿混合溶液(正丁醇:氯仿=1:5)和样物提取液混合并且震荡,不需加热,直到液面交界处无白色混悬。

1.3.2 提取工艺条件 脱脂回流:85 ℃,2 h;料液比:1:25;提取介质:稀盐酸,pH=4;提取条件:70 ℃,4 h;减压浓缩温度:40 ℃;醇沉:置于 4 ℃冰箱中。

1.3.3 多糖中单糖成分分析

(1)多糖的水解:称取多糖样品 10 mg,置于 20 mg 水解管中,加入 20 mL,2 mol/L 的三氟乙酸溶液溶解,封管,100 ℃水浴中水解 8 h,60 ℃下减压浓缩至干。

(2)单糖衍生物的制备:糖腈乙酰胺衍生:在蒸干的多糖水解样品中加入 10 mg 肌醇作为内标、100 mg 盐酸羟胺、10 mg 吡啶,在摇床上震荡 5 min,使之完全溶解后 90 ℃水浴反应 30 min,使单糖还原成相应糖,取出后冷却至室温,加入 10 mL 乙酸酐,混合均匀后 90 ℃水浴反应 30 min,反应物可直接进行气相色谱分析。

(3)气相色谱分析:色谱条件(Chanegrih *et al.*, 1992):Rtx-1 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm,美国 Restek 公司);进样口温度 250 ℃;柱箱起始温度 60 ℃,15 ℃/min 至 180 ℃,保持 2 min,3 ℃/min 至 240 ℃,保持 15 min;载气为高纯氮,流速 30 mL/min;FID 检测器,温度 250 ℃。

根据结果绘制色谱曲线,并与鼠李糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、木糖、葡萄糖、肌醇的标准曲线做对比,分析单糖的成分。

(4)糖腈乙酰胺衍生法测定水解单糖含量:根据标准样品的色谱曲线,得各种单糖的相对质量校正

因子,按下式计算: $F_i = (A_s \times W_i) / (A_i \times W_s)$ 。

式中, F_i 为单糖的校正因子; A_i, W_i 分别为单糖的峰面积和质量; A_s, W_s 分别为内标物的峰面积和质量。

2 结果与分析

2.1 超临界萃取

准确称取分离 1 与分离 2 接收的物质,研究结果见表 2。

表 2 分离 1 与分离 2 接收量

Table 2 Received quantity of separation 1 and separation 2

组别 Group	分离 1 接收量 Separation 1 (g)	分离 2 接收量 Separation 2 (g)	总接收量 Total received quantity (g)
1	0.93	1.3	2.23
2	1.07	1.49	2.56
3	1.08	1.53	2.61
4	2.16	2.51	4.63
5	2.39	2.80	5.19
6	2.44	2.81	5.25
7	3.08	3.77	6.85
8	3.41	4.02	7.43
9	3.43	4.08	7.51

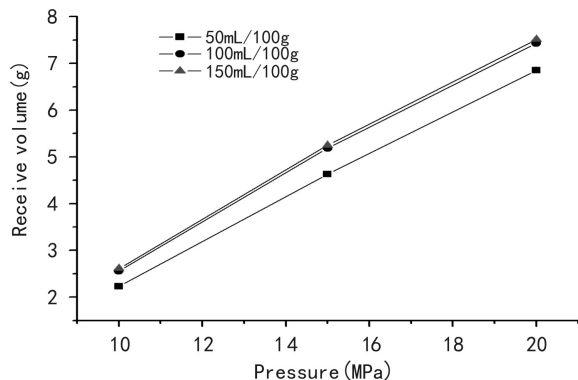


图 1 萃取压力—总接收量

Fig. 1 Relationship between extraction pressure and receiving amount

对比萃取压力与总接收量,结果如图 1。图 1 结果表明,随着萃取压力的加大与夹带剂加入量的增加,分离 1 和分离 2 的接收量都有所增加,当萃取压力达到 20 MPa 时分离所得产物最多,此时夹带剂加入量为 100、150 mL/100g 条件下所得产物质量接近。

萃取压力是超临界 CO₂ 萃取的最重要的工艺参数之一,在温度恒定时,压力增大,超临界 CO₂ 密

度增大,从而使其溶解能力增大。当压力增大到一定程度时,溶解能力增加缓慢。因此,压力并非越大越好,需要根据萃取物质的不同和机器的运行状况来设定。综合研究结果选定超临界 CO₂ 最优萃取条件为压力 20 MPa,夹带剂加入量 100 mL/100g,温度 50 °C,时间 2 h。

2.2 蛋白质含量测定

2.2.1 加液速率测定 根据凯氏定氮仪的加液时间及加液量,计算加液速率(陈钧辉等,2003)(表 3)。

表 3 凯氏定氮仪加液速率

Table 3 Liquid filling rate of Kieldahl Azotometer

加液类型 Type of Liquid filling	加液量 Content of Liquid filling (mL)	加液时间 Time of Liquid filling (s)	加液速率 Liquid filling rate (mL/s)
碱液 Alkali lye	22	5	4.4
酸液 Acid liquor	36.5	5	7.3

上机后蒸馏前,需加入 114 mL 氢氧化钠和 30 mL 硼酸,根据加液速率,设定加液时间为碱液 26 s,酸液 5 s。完成蒸馏后,得到硼酸吸收液。

2.2.2 定氮结果 取粗蛋白系数为 6.25,根据公式计算螺旋藻中蛋白质含量。消解方法的选择,对螺旋藻中蛋白质含量的测定影响较大,经多次实验得 2 g 螺旋藻粉中加入 30 mL H₂SO₄, 0.3 g CuSO₄, 3 g K₂SO₄, 30 mL H₂O₂ 为最优,且温度需严格按照消解方法进行调节。两次定氮的结果如表 4, P(%) 取两次结果的平均值,测定螺旋藻的蛋白质含量为 49.39%。

表 4 螺旋藻中的蛋白质含量

Table 4 Protein level of *Spirulina platensis*

组别 Group	V (mL)	V ₀ (mL)	M (mol/L)	W (g)	N (%)	P (%)
1	101.0	0.1	0.1	2	7.068	44.18
2	124.8	0.1	0.1	2	8.735	54.60

2.3 多糖成分分析

2.3.1 多糖粗品提取 由于超临界萃取物质量有限,先使用螺旋藻粉取得最佳测试条件,步骤中的 Seavage 法重复去蛋白会导致多糖的大量损失。利用藻粉实验中第一次用 7 g 藻粉,去蛋白次数为 5 次,收集到多糖粗品仅 4 mg;第二次用 12.5 g 藻粉,去蛋白次数为 3 次,收集到多糖粗品约 506 mg。若再减少次数,去蛋白效果就会降低,故得出 Seavage 法去蛋白,较优次数为 3 次。因为螺旋藻多糖中含有硫酸根基团,故碱提易使其脱落;而水提和稀酸提

取所得多糖色泽相对很好,且操作过程较易控制,在 pH 值为 4,料液比 1:25,浸取时间 4.0 h,浸取温度 70℃的工艺条件下,对螺旋藻多糖进行提取。取萃取压力 20 MPa,夹带剂加入量为 100 mL/100g 条件下的分离 1 的超临界萃取物 3.41 g,提取得多糖粗品 73.80 mg。

2.3.2 气相色谱分析 单糖标准样品糖腈乙酰胺衍生物气相色谱图见图 2。图 2 出现七个吸收峰,从左往右分别为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、肌醇,其中肌醇为内标物。6 种单糖的相对质量校正因子见表 5。

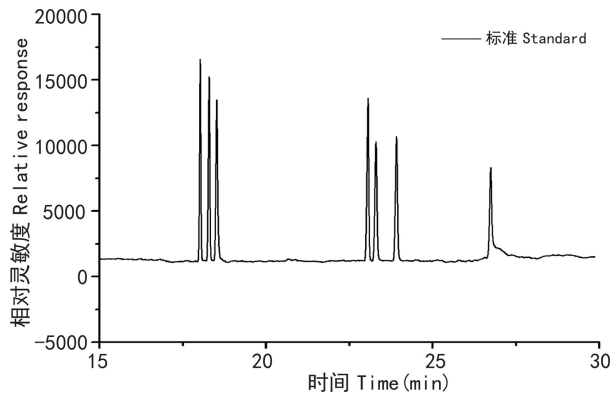


图 2 单糖标准样品糖腈乙酰胺衍生物气相色谱图
Fig. 2 Gas chromatogram of glyco-nitrile derivatization

表 5 标准单糖的保留时间和相对质量校正因子
Table 5 Retention time and correction factor of standard monosaccharide

单糖 Standard monosaccharide	保留时间 Retention time (s)	相对质量校正因子 Relative calibration factor
鼠李糖 Rhamnose	18.014	1.755
阿拉伯糖 Arabinose	18.297	1.960
木糖 Xylopyranose	18.463	2.933
甘露糖 Mannose	23.005	1.547
葡萄糖 Glucose	23.244	1.988
半乳糖 Galactose	23.909	1.963
肌醇 Inositol	26.671	1.000

将螺旋藻多糖样品的气相色谱曲线与标准品的曲线做比较见图 3。

经内标法测定后,测得鼠李糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖质量分别为 0.854、1.894、0.756、0.534、2.787 mg。单糖总量为 6.825 mg,占多糖粗品的 9.25%。选用的糖腈乙酰胺衍生物后,色谱峰并未产生异构峰,每个单糖都能找到对应的色谱峰,且无需后续处理过程,直接色谱进样分析,从而保证定性、

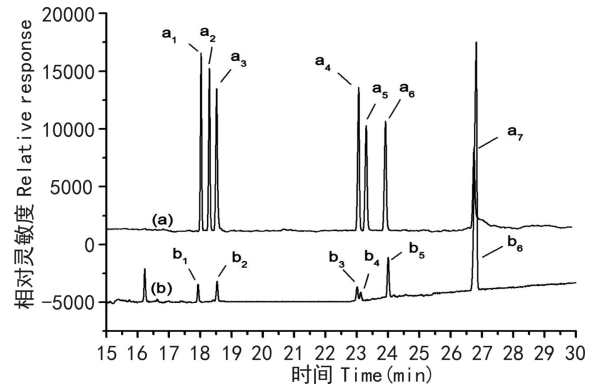


图 3 单糖标准样品和螺旋藻多糖样品的糖腈乙酰胺衍生物气相色谱图 b 为螺旋藻多糖样品的色谱曲线,参照标准曲线 a,判断结果 b₁ 鼠李糖; b₂ 木糖; b₃ 甘露糖; b₄ 葡萄糖; b₅ 半乳糖; b₆ 肌醇。

Fig. 3 Gas chromatogram of glyco-nitrile derivatization of standard monosaccharide and *Spirulina platensis* polysaccharide b showed chromatogram curve of *Spirulina* polysaccharide samples according to the standard curve of a, the result of gas chromatogram of glyco-nitrile derivatization; b₁ Rhamnose; b₂ Xylopyranose; b₃ Mannose; b₄ Glucose; b₅ Galactose; b₆ Inositol.

定量的准确性。结果表明螺旋藻多糖的单糖组成以木糖和半乳糖为主。

参考殷钢等(1999)的研究结果,测得的单糖含量有所偏低,可能的原因一方面是由于螺旋藻多糖提取不够充分,使用 sewage 法去蛋白时多糖损失过高;另一方面跟螺旋藻多糖水解不完全有关。

3 结论

(1)使用超临界 CO₂ 萃取技术对钝顶螺旋藻粉进行萃取与分离。筛选超临界 CO₂ 萃取的最优条件为压力 20 Mpa,夹带剂使用量 100 mL/100 g,温度 50℃,萃取时间 2 h;

(2)利用凯氏定氮法及气相色谱法分别对螺旋藻超临界萃取产物中蛋白质和多糖进行研究与分析。研究结果表明螺旋藻粉中蛋白质含量为 49.39%,螺旋藻多糖中的单糖组成为鼠李糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖,质量占多糖粗品的 9.25%。

参考文献:

Chanegrih N, Baaliouamer A, Rolando C. 1998. Polarity changes during capillary gas chromatographic and gas chromatographic-mass spectrometric analysis using serially coupled columns of different natures and temperature programming: Application to the identification of constituents of essential oils[J]. *J Chroma-*

- togr A*, **819**(1-2):61-65
- Chen JH(陈钧辉), Tao L(陶力), Li J(李俊), *et al.* 2003. Biochemical Experiments(生物化学实验)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社):59-62
- Gao TR(高天荣), Wei XK(韦薇). 2002. Studies on comprehensive utilization technique of *Spirulina*(螺旋藻综合利用工艺研究)[J]. *J Yunnan Norm Univ; Nat Sci Edit*(云南师范大学学报·自然科学版), **22**(2):42-44
- Hu YB(胡一兵), Hu HJ(胡鸿钧), Li YG(李夜光), *et al.* 2002. Study on mass production of phycobilins from PC rich strain of *Spirulina platensis*(从一种富含藻胆蛋白的螺旋藻中大量提取和纯化藻胆蛋白的研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **20**(4):299-302
- Hu JX(胡佳续), Liu Q(刘强). 2010. Analysis of the composition of petroleum extraction from stem and leaf of *Tetraena mongolica*(四合木茎叶石油醚提取物化学成分分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), **30**(003):426-428
- Li TX(李天祥), Wang JK(王静康). 2002. Review on supercritical fluid extraction of natural flora(超临界 CO₂ 流体萃取技术在天然物提取上的研究进展)[J]. *J Tianjin Univ; Nat Sci & Technol Edit*(天津大学学报·自然科学与工程技术版), **35**(4):417-424
- Mu WJ(穆文静), Du L(杜玲), Xing YY(邢莹莹), *et al.* 2011. The study on deproteinization of polysaccharides from *Spirulina platensis* (Arthrospira) by Sevage method(钝顶螺旋藻多糖 Sevage 法脱蛋白工艺的研究)[J]. *Inn Mongolia Petrochem Ind*(内蒙古石油化工), **37**(10):1-4
- Rao GV, Srinivas P, Sastry S, *et al.* 1992. Modeling solute-co-solvent interactions for supercritical-fluid extraction of fragrances [J]. *J Supercrit Fluid*, **5**(1):19-23
- Sato M, Goto M, Hirose T. 1994. Fractional of citrus oil by supercritical fluid extraction tower[C]//Proceedings of the third international symposium on supercritical. *Strasb Franc*, **2**(10):830-89
- Wang Y(王勇), Qian KX(钱凯先), Dong Q(董强). 1999. The study for isolation and purification of phycocyanin with high purity and its spectra characteristics(高纯度藻蓝蛋白分离纯化及光谱特性研究)[J]. *Progr Biochem & Biophys*(生物化学与生物物理进展), **26**(5):457-460
- Xu HJ(徐海军), Deng BY(邓碧玉). 1991. Application of entrainer in supercritical extraction(夹带剂在超临界萃取中的应用)[J]. *Chem Eng*(化学工程), **19**(2):58-63
- Yin G(殷钢), Li C(李琛), He QH(何清华), *et al.* 1999. Isolation and characterization of biliproteins and polysaccharides from *Spirulina*(螺旋藻中藻胆蛋白和多糖的分离纯化及产品特性)[J]. *Fine Chem*(精细化工), **16**(2):10-13
- Yu LJ(俞丽君), Li YM(李永明), Chen YL(陈艳丽), *et al.* 1999. Studies on phycobiliprotein of *Spirulina platensis* for its purification and ability to scavenge active oxygen radical(钝顶螺旋藻藻胆蛋白的纯化及其清除氧自由基的作用)[J]. *J Oceanogr Taiwan Strait*(台湾海峡), **18**(2):172-176
- Zhang YL(章银良), Li HQ(李红旗), Gao J(高峻), *et al.* 1999. New process for separation & purification of polysaccharide from *Spirulina platensis*(螺旋藻多糖提取新工艺的研究)[J]. *Food & Ferment Ind*(食品与发酵工业), **25**(2):15-18

(上接第 293 页 Continue from page 293)

- Liu B, Xu C, Zhao N, *et al.* 2009. Rapid genomic changes in polyploid wheat and related species; implications for genome evolution and genetic improvement[J]. *J Genet Genomics*, **36**(9):519-528
- Masterson J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms[J]. *Science*, **264**(5 157):421-424
- Mayfield D, Chen ZJ, Pires JC. 2011. Epigenetic regulation of flowering time in polyploids[J]. *Curr Opin Plant Biol*, **14**(2):174-178
- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, *et al.* 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids[J]. *Trend Genet*, **19**(3):141-147
- Ossowski S, Schneeberger K, Lucas-Lledo JI, *et al.* 2010. The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Science*, **327**(5961):92-94
- Ozkan H, Levy AA, Feldman M. 2001. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group[J]. *Plant Cell*, **13**(8):1 735-1 747
- Paun O, Bateman RM, Fay MF, *et al.* 2011. Altered gene expression and ecological divergence in sibling allopolyploids of *Dactylo-rhiza* (*Orchidaceae*)[J]. *BMC Evol Biol*, **11**:113
- Peng H, Zhang J, Wu X. 2008. The ploidy effects in plant gene expression; progress, problems and prospects[J]. *Sci Chin C Life Sci*, **51**(4):295-301
- Rapp RA, Udall JA, Wendel JF. 2009. Genomic expression dominance in allopolyploids[J]. *BMC Biol*, **7**:18
- Rapp RA, Wendel JF. 2005. Epigenetics and plant evolution[J]. *New Phytol*, **168**(1):81-91
- Reik W, Walter J. 2001. Genomic imprinting; parental influence on the genome[J]. *Nat Rev Genet*, **2**(1):21-32
- Rieseberg LH. 2001. Polyploid evolution: keeping the peace at genomic reunions[J]. *Curr Biol*, **11**(22):925-928
- Sang T. 2002. Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **37**(3):121-147
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, *et al.* 2009. Polyploidy and angiosperm diversification[J]. *Am J Bot*, **96**(1):336-348
- Song K, Lu P, Tang K, *et al.* 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**(17):7 719-7 723
- Tucker S, Vitins A, Pikaard CS. 2010. Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing[J]. *Curr Opin Cell Biol*, **22**(3):351-356
- Vuylsteke M, van Eeuwijk F, Van Hummelen P, *et al.* 2005. Genetic analysis of variation in gene expression in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Genetics*, **171**(3):1 267-1 275
- Wang J, Tian L, Lee HS, *et al.* 2006. Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids[J]. *Genetics*, **172**(1):507-517
- Wang S, Akhunova A, Lun Y, *et al.* 2013. Homoeologous imbalance of gene expression in polyploid wheat[C]//Plant and Animal Genome XXI Conference. San Diego, CA: Plant and Animal Genome
- Wang X, Wang H, Wang J, *et al.* 2011. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*[J]. *Nat Genet*, **43**(10):1 035-1 039
- Zhu Q, Ge S. 2005. Phylogenetic relationships among A-genome species of the genus *Oryza* revealed by intron sequences of four nuclear genes[J]. *New Phytol*, **167**(1):249-265