

利用 UHPLC-ESI-MS/MS 法测定川陈皮 与其混伪品中的黄酮类成分

李峰庆¹, 王福^{1,2}, 杨放晴¹, 陈仕伟², 熊素琴¹, 陈鸿平¹, 刘友平^{1*}, 李小川^{2*}

¹成都中医药大学药学院 中药标准化教育部重点实验室, 成都 611137; ²南充市食品药品检验所, 南充 637000

摘要:为研究区分川陈皮与其常见混伪品, 采用 UHPLC-MS/MS 对川陈皮与其常见混伪品的黄酮类成分进行分析, 并利用基于代谢物信息公共数据库对 UHPLC-MS/MS 检测的一级谱、二级谱数据进行定性分析, 并采用主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 以及聚类分析三种方法对化合物进行分析。依靠数据库共鉴定出 228 种黄酮类化合物, 其中多酚 12 种、花青素 21 种、黄酮类 132 种、黄酮醇 36 种、黄酮酮 20 种、异黄酮 7 种, 川陈皮中鉴定出特有化合物 15 种, 混伪品中鉴定出特有化合物 16 种, 通过 PCA、OPLS-DA 以及聚类分析均可将川陈皮与其混伪品准确地区分开来。结果表明基于 UHPLC-ESI-MS/MS 技术的代谢组分析方法可有效区分川陈皮与其混伪品, 可以作为一种川陈皮与混伪品区分以及差异性评价的有效方法, 并为其它中药材品种的真伪鉴别以及质量评控提供参考。

关键词:川陈皮; 混伪品; UHPLC-ESI-MS/MS; 黄酮; PCA; OPLS-DA

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)8-1324-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.8.007

Analysis of flavonoids in Chuan Citrus Reticulata Pericarpium and its adulterant using UHPLC-ESI-MS/MS

LI Feng-qing¹, WANG Fu^{1,2}, YANG Fang-qing¹, CHEN Shi-wei², XIONG Su-qing¹,
CHEN Hong-ping¹, LIU You-ping^{1*}, LI Xiao-chuan^{2*}

¹Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory of Standardization
of Chinese Herbal Medicine Ministry of Education, Chengdu 611137, China;

²Food & Drugs Authority of Nanchong, Nanchong 637000, China

Abstract: In order to distinguish Chuan Citrus Reticulata Pericarpium (CCRP) from its adulterant, the flavonoids in CCRP and its adulterant were determined by UHPLC-MS/MS. The data of primary and secondary spectra detected by UHPLC-MS/MS were qualitatively analyzed based on the public metabolomics database, and the compounds were analyzed by principal component analysis (PCA), partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) and cluster analysis. Finally, a total of 228 flavonoids compounds including 132 flavones, 36 flavonols, 20 flavanones, 21 anthocyanins, 7 isoflavones, and 12 polyphenols were identified by database searching, of which 15 specific compounds were identified in CCRP and 16 specific compounds were identified in adulterant. The CCRP and its adulterant could be accurately distinguished by PCA, OPLS-DA and clustering analysis. The experimental results show that the method of metabolomics analysis based on UHPLC-ESI-MS/MS technique can effectively distinguish CCRP from its adulterant, which can be used as an effective method to differentiate CCRP and the adulterant, and the results also provide reference for the authenticity identification and quality evaluation of other traditional Chinese medicine (TCM).

Key words: Chuan Citrus Reticulata Pericarpium; adulterant; UHPLC-ESI-MS/MS; flavonoids; PCA; OPLS-DA

芸香科植物橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 及其栽

培变种的成熟干燥果皮为中药橘皮, 又称陈皮, 始载于《神农本草经》, 有理气健脾、燥湿化痰之效^[1], 是历代医家常用的一味理气药, 在临床与成药生产中都有较广泛的使用。我国柑橘分布广泛, 变种甚多, 故认为凡源于芸香科植物橘及其栽培变种的成熟果

收稿日期: 2020-02-08 接受日期: 2020-07-02

基金项目: 国家自然科学基金 (81973436)

* 通信作者 Tel: 86-013990886005; E-mail: liuyouping@163.com

皮都能做陈皮入药,但随着柑橘育种技术的发展和实践,柑橘新品种的推出逐渐打破了原有的品种分布格局。如以四川“大红袍”为代表的道地药材来源植物,其栽培面积逐渐被不知火柑橘等新品种所超越或取代^[2-3],道地药材川陈皮也随之减少,药材市场川陈皮常见混伪品多见宽皮柑橘类植物的果皮^[4](以不知火橘皮及其早晚熟变种为主),因此,有效区分川陈皮与常见混伪品对保证川陈皮品质、临床疗效以及资源保护具有重要意义。

不同栽培品种来源陈皮药材的区分一直较为困难,尤其混伪品切丝后与正品药材真伪难分。本课题尝试采用 DNA 条形码技术区分正品陈皮与其混伪品,结果表明条形码通用序列 ITS2 序列不能较好地区分^[5]。液相色谱或其联用质谱技术为常见文献报道中药材化学成分分析的方法,但色谱分析法依赖标准品,对中药材中含量较低的化学成分难以检测,定量分析化学种类有限,难以反映其化学成分的代谢谱^[6]。近年来,随着基于 UHPLC-ESI-MS/MS 技术的代谢组学的发展,为中药材化学成分的全面分析提供了一种可靠的方法。Qin 等^[7]提出了基于植物代谢组学技术的中药材质量评控思路,认为代谢组学技术可以用于中药的区分或差异性评价。黄酮类成分为陈皮中主要起抗氧化、抗肿瘤、抗炎、心血管保护、神经保护等活性的一大类有效成分,又细分为以川陈皮素为代表的多甲氧基黄酮类及以橙皮苷为主的二氢黄酮苷类,本课题组前期研究陈皮“陈久者良”产生机制就是以多甲氧基黄酮为主要指标成分。

因此,本文以道地药材川陈皮及其常见混伪品不知火橘皮为研究对象,利用 UHPLC-ESI-MS/MS 法测定陈皮有效成分黄酮类成分。首先基于多渠道公共质谱数据库对黄酮类化合物进行定性鉴定分

析,明确川陈皮与其混伪品的黄酮类成分代谢谱;其次采用 PCA 与 OPLS-DA 分析法对其黄酮代谢物进行分类,探寻基于代谢物类别差异进行鉴别的方法;然后通过火山图分析明确差异化合物上调下调,经过 KEGG 分析得知黄酮类化合物的代谢通路差异;最后利用基于差异化合物类别及相对含量寻找川陈皮与其混伪品特征性成分与标志物。其研究结果将建立一种高效区别川陈皮与其混伪品的方法,并为柑橘其他品种的区分与鉴定提供参考。

1 材料

超高效液相色谱-质谱联用仪(Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC, Shim-pack UFLC SHIMADZU CBM30A, Tandem mass spectrometry, MS/MS, Applied Biosystems 6500 QTRAP); 色谱柱(Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈: 1.8 μm, 2.1mm × 100mm); ME04E 电子分析天平(捷久计量衡器(上海)有限公司); 多样品组织研磨仪 CEBO-24(上海测博); SC-3610 低速离心机(安徽中科中佳科协仪器有限公司); 移液枪(德国 Eppendorf 公司)。乙腈(美国 Fisher chemical, 色谱纯); 哇哈哈纯净水; 甲酸(美国, MREDA Technology Inc); 甲醇、乙醇(北京化工厂, 分析纯)。

实验所用样品采集于四川省南充市营山县青山山村等地,采集时间为 2018 年 12 月 7 号,采集柑橘成熟果实后,现场剥皮,返回实验室晾干,编号标记后,保存于 -80 °C 冰箱。新鲜样品由成都中医药大学严铸云教授鉴定,分别为芸香科植物橘 *C. reticulata* ‘Dahongpao’ 与 *C. reticulata* ‘Buzhihuo’ 的果皮。样品信息如下表 1。

2 实验方法

2.1 样品制备

将样品置于真空冷冻机干燥,取 0.5 g 利用研

表 1 样品信息
Table 1 Sample information

样品编号 Sample No.	来源 Source	采集地点 Collecting location	采集时间 Collecting time
DHP1	<i>C. reticulata</i> ‘Dahongpao’	营山县青山村 Qingshan village, Yingshan County	2018. 12. 7
DHP1	<i>C. reticulata</i> ‘Dahongpao’	营山县高滩村 Gaotan village, Yingshan County	2018. 12. 7
DHP1	<i>C. reticulata</i> ‘Dahongpao’	营山县石埡村 Shiya village, Yingshan County	2018. 12. 7
BZH1	<i>C. reticulata</i> ‘Buzhihuo’	营山县青山村 Qingshan village, Yingshan County	2018. 12. 7
BZH2	<i>C. reticulata</i> ‘Buzhihuo’	营山县高滩村 Gaotan village, Yingshan County	2018. 12. 7
BZH3	<i>C. reticulata</i> ‘Buzhihuo’	营山县石埡村 Shiya village, Yingshan County	2018. 12. 7

磨仪(Retsch)研磨(30 Hz, 1.5 min)至粉状,称取100 mg的粉末,与1.0 mL 70%的甲醇水溶液混合均匀,置于4 °C的冰箱过夜,期间3次涡旋,提高提取率,离心(转速10 000 rpm, 10 min)后,吸取上清,用0.22 μm微孔滤膜过滤样品,并保存于进样瓶中,用于UHPLC-ESI-MS/MS分析。

2.2 色谱与质谱条件

色谱条件:以0.04%乙酸水(A)-0.04%乙酸乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~11.0 min, 95%→5% A; 11.0~12.0 min, 5% A; 12.0~12.1 min, 5%→95% A; 12.1~15.0 min, 95% A);流速0.4 mL/min;柱温40 °C;进样量2 μL。

质谱参数:电喷雾离子源温度500 °C,质谱电压5 500 V,帘气压25 psi,碰撞诱导电离设置参数“高”,去簇电压与碰撞能的设置参考文献^[8]。

2.3 代谢物定性定量及数据分析

基于代谢物信息公共数据库对质谱检测的一级谱、二级谱数据进行定性分析。其中部分物质定性,分析时去除了同位素信号,含钾离子、钠离子、氨基离子的重复信号,以及本身是其他更大分子量物质的碎片离子的重复信号。代谢物结构解析参考MassBank、KNSPSAcK、HMDB、MoToDB、METLIN等已有的公共数据库^[9-10]。获得不同样本的代谢物质谱分析数据后,用MultiaQuant软件对所有物质质谱峰进行峰面积积分,并对其中同一代谢物在不同样本中的质谱出峰进行积分校正^[11]。如图1为随机抽取的代谢物在不同样本中的定量分析积分校正结果,横坐标为代谢物检测的保留时间(min),纵坐标为某代谢物离子检测的离子流强度(cps)。

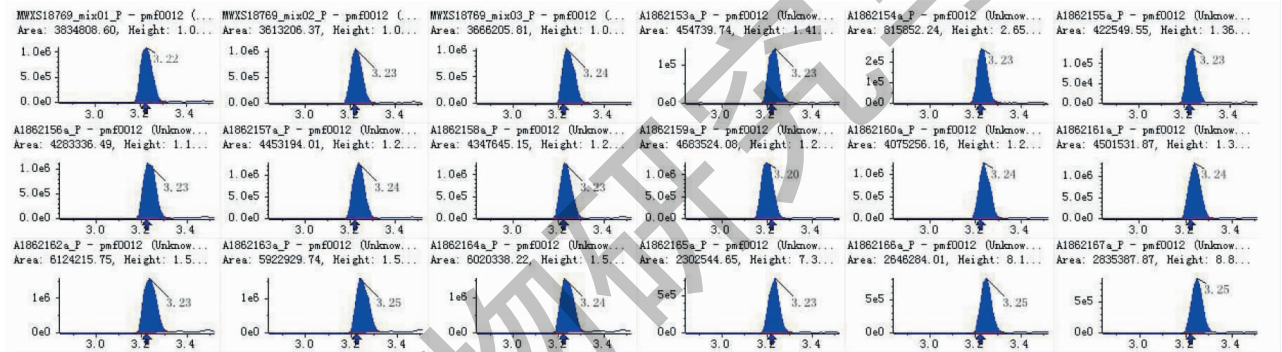


图1 代谢物积分校正图

Fig. 1 Metabolite integral correction chart

2.4 样本质控分析

质控样本(QC)由样本提取物混合制备而成,用于分析样本在相同的处理方法下的重复性。在仪器分析的过程中,每10个检测分析样本中插入一个质控样本,以监测分析过程中的重复性。通过对不同质控样本质谱检测分析的总离子流图(图2)进行重叠展示分析,可以判断代谢物提取和检测的重复性,即技术重复。仪器的高稳定性为数据的重复性和可靠性提供了保障。

3 结果与分析

3.1 黄酮类化合物的鉴定结果

经过分析本文共鉴定出228种黄酮类化合物,包括多酚12种、花青素21种、黄酮类132种、黄酮醇36种、黄烷酮20种、异黄酮7种,其中川陈皮中鉴定出特有化合物15种(表3),混伪品中鉴定出特有化合物16种(表4),具有明显药理活性的化合物

组合可以明显作为区分二者的标志化合物。

3.2 主成分分析(PCA)与正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)结果

主成分分析是一种将变量重新组合成一组新的相互无关的几个综合变量^[12],同时根据实际需要从中可以取出几个较少的总和变量尽可能多地反映原来变量的信息的方法。本文通过该分析方法将黄酮类化合物的差异通过降维处理以直观反映样本之间的代谢物差异情况。图3a中可以看出,主成分PC1与PC2的占比分别达到了63.10%和20.77%,累积贡献率达到了83.87%。川陈皮与其混伪品分别聚为一类,证实了实验的可靠性与重复性。

正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)被广泛用于代谢组数据的分析,由于其分析方法可以最大化组间差异常被用于差异代谢物的筛选^[13]。在OPLS-DA分析中, Q^2 是一个重要的参数,若数值大

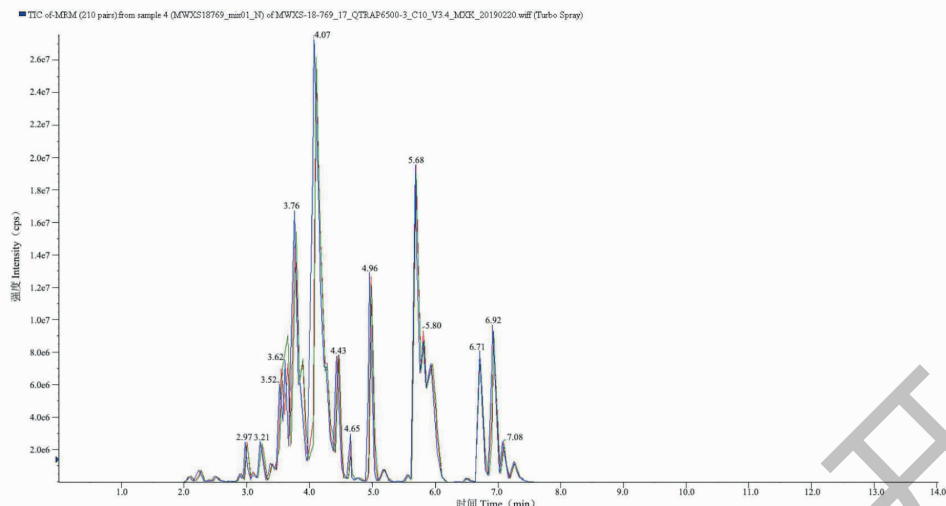


图2 QC样本质谱检测TIC重叠图

Fig. 2 TIC overlapping map detected by QC sample mass spectrometry

表3 川陈皮中特有的黄酮类化合物

Table 3 Unique flavonoids in CCRP

编号 No.	Q1 (Da)	Q3 (Da)	t_R (min)	分子量 MW	离子模式 Mode	化合物 Compound
1	519.0	271.0	4.23	518.00	$[M+H]^+$	Apigenin <i>O</i> -malonylhexoside
2	435.1	273.0	4.22	434.12	$[M+H]^+$	Naringenin 7- <i>O</i> -glucoside (Prunin)
3	367.1	149.0	7.38	368.13	$[M-H]^-$	Curcumin
4	273.0	229.0	3.40	274.08	$[M-H]^-$	Afzelechin (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavan)
5	433.0	287.0	4.49	432.11	$[M+H]^+$	Kaempferol 3- <i>O</i> -rhamnoside (Kaempferin)
6	331.0	151.0	5.15	332.05	$[M-H]^-$	Laricitrin
7	479.2	317.0	4.55	478.15	$[M+H]^+$	Persicoside
8	437.1	275.0	4.37	436.14	$[M+H]^+$	Phloridzin
9	757.1	433.4	3.10	756.10	$[M+H]^+$	6- <i>C</i> -Hexosyl-apigenin <i>O</i> -hexosyl- <i>O</i> -hexoside
10	639.1	331.4	4.07	638.10	$[M+H]^+$	Tricin 5- <i>O</i> -rutinoside
11	625.4	301.0	2.00	625.40	Protonated	Peonidin 3,5-diglucoside chloride
12	771.2	177.1	4.25	770.21	$[M+H]^+$	<i>C</i> -pentosyl-chrysoeriol 7- <i>O</i> -feruloylhexoside
13	565.2	271.1	4.06	564.15	$[M+H]^+$	Apiin
14	697.1	535.1	3.03	697.10	Protonated	Malvidin 3-acetyl-5-diglucoside
15	497.1	331.3	5.75	496.10	$[M+H]^+$	Tricin 4'- <i>O</i> -syringyl alcohol

表4 混伪品中特有的黄酮类化合物

Table 4 Unique flavonoids in adulterant

编号 No.	Q1 (Da)	Q3 (Da)	t_R (min)	分子量 MW	离子模式 Mode	化合物 Compound
1	417.2	297.1	4.00	416.20	$[M+H]^+$	Chrysin <i>C</i> -hexoside
2	637.1	303.4	3.27	637.10	Protonated	Delphinidin <i>O</i> -malonyl-malonylhexoside
3	491.1	287.1	5.09	492.10	$[M-H]^-$	Acetyl-eriodictyol <i>O</i> -hexoside
4	445.0	283.0	3.54	446.12	$[M-H]^-$	Glycitin

续表 4(Continued Tab. 4)

编号 No.	Q1 (Da)	Q3 (Da)	t_R (min)	分子量 MW	离子模式 Mode	化合物 Compound
5	431.0	269.0	4.01	432.11	[M-H] ⁻	Genistein 7- <i>O</i> -glucoside (Genistin)
6	433.1	271.0	2.83	433.10	Protonated	Pelargonidin 3- <i>O</i> -beta-D-glucoside (Callistephin chloride)
7	429.1	267.0	4.59	430.13	[M-H] ⁻	Formononetin 7- <i>O</i> -glucoside (Ononin)
8	465.1	300.7	4.00	464.10	[M-H] ⁻	Gossypitrin
9	301.1	258.0	6.28	300.06	[M+H] ⁺	Hydroxygenkwanin
10	433.1	271.1	4.21	432.10	[M+H] ⁺	Apigenin 7- <i>O</i> -glucoside (Cosmosiin)
11	659.2	331.1	4.50	658.20	[M+H] ⁺	Tricin 4'- <i>O</i> -(syringyl alcohol) ether 5- <i>O</i> -hexoside
12	435.1	303.0	3.98	434.08	[M+H] ⁺	Quercetin 3-alpha-L-arabinofuranoside (Avicularin)
13	285.0	257.0	5.08	286.05	[M-H] ⁻	Orobol (5,7,3',4'-tetrahydroxyisoflavone)
14	595.0	270.9	2.38	595.00	Protonated	Pelargonin
15	625.1	445.2	2.47	626.10	[M-H] ⁻	Hesperetin C-hexoside <i>O</i> -hexoside
16	725.2	331.1	4.50	724.20	[M+H] ⁺	Tricin <i>O</i> -rhamnosyl- <i>O</i> -malonylhexoside

于 0.9,则可以反映该模型的可靠性与稳定性。图 3b 中可以看出, Q^2 为 0.998,证实该模型可以用以下一步的差异代谢物分析。

3.3 差异代谢物的筛选、注释与富集

本文结合单变量分析的差异倍数 (fold change) 与多变量分析 OPLS-DA 模型中变量重要性投影 (variable importance in project, VIP) 数值进行样

品之间的差异代谢物筛选。筛选标准为选取 fold change ≥ 2 或 fold change ≤ 0.5 和 VIP ≥ 1 的差异代谢物,即代谢物在组间差异为 2 倍以上或 0.5 倍以下以及 VIP ≥ 1 ,则认为差异显著^[14],由此共计筛选出 52 种差异代谢物。根据差异代谢物含量作聚类热图(图 4),由图可以清晰看出川陈皮样品与其混伪品间成分差异明显,而组内样品成分差异较小。

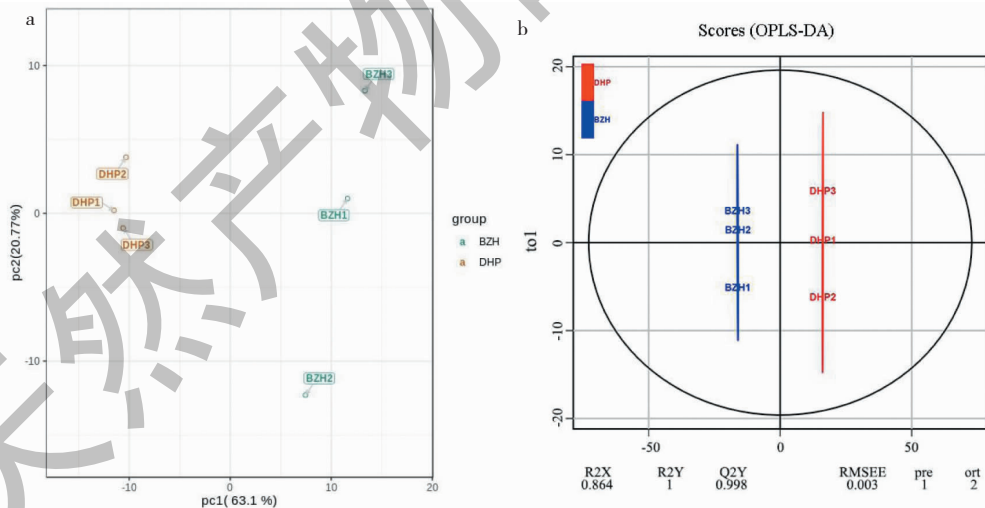


图 3 川陈皮与其混伪品代谢物的 PCA (a) 与 OPLS-DA (b) 分析。

Fig. 3 PCA (a) and OPLS-DA (b) analysis of metabolites of CCRP and its adulterant

另以代谢物在样品中定量差异倍数的对数值为横坐标, VIP 值为纵坐标绘制火山图差异代谢火山图(图 5c),横坐标越大,则表达量在两类样品间表达量倍数差异越大;纵坐标越大,差异表达越明显。从图 5c 中可以看出,上调化合物 31 种,下调化合物

21 种。另由 2.1 分析结果可知,川陈皮中鉴定出特有化合物 15 种,混伪品中鉴定出特有化合物 16 种,因此,可以判断川陈皮与其混伪品中的黄酮类化合物有显著差异,建议在临床使用上区别使用。

川陈皮与混伪品之间差异代谢物经过数据库

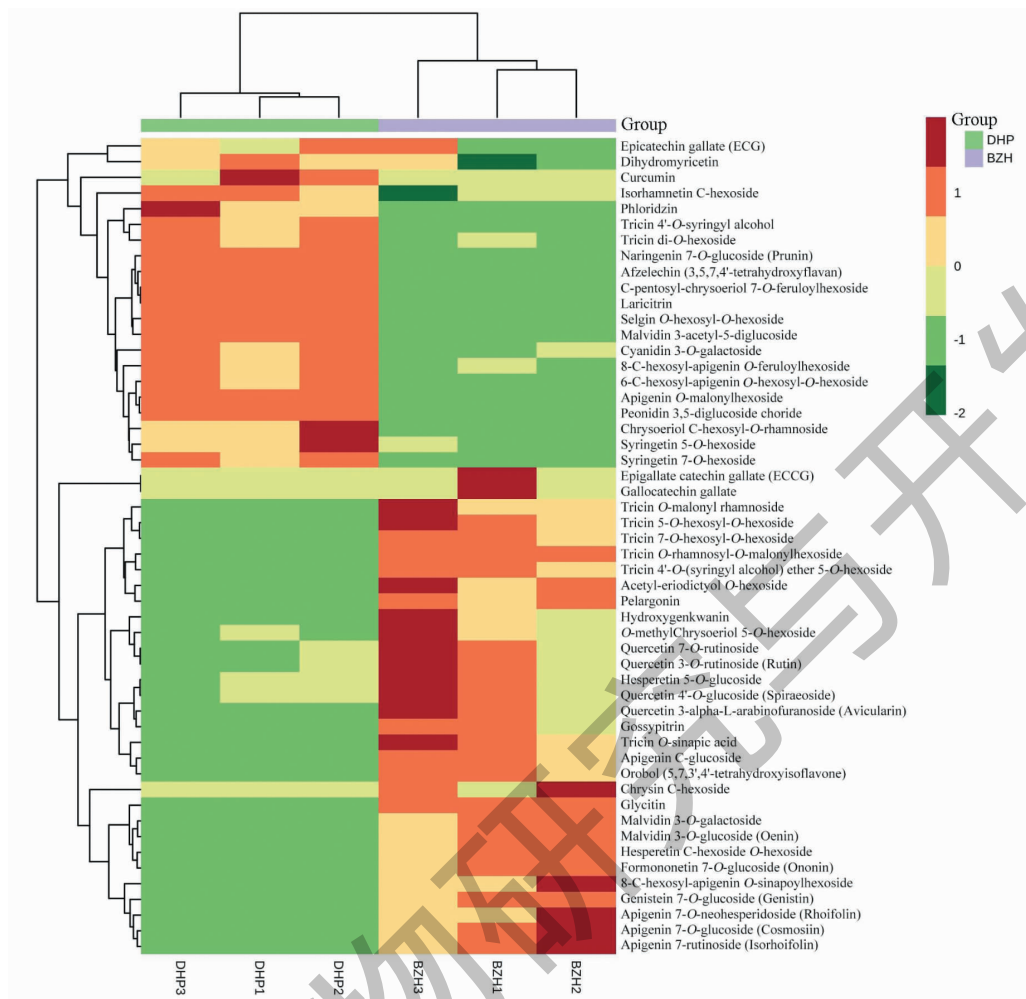


图4 川陈皮与其混伪品的代谢物聚类热图

Fig. 4 Metabolite clustering heatmap of CCRP and its adulterant

KEGG 注释。KEGG 分类与富集分析结果显示(图 5a 和 5b), 差异代谢物主要参与花青素生物合成、黄酮与黄酮醇生物合成、黄烷酮生物合成和黄酮类生物合成。

4 讨论

本文基于 UHPLC-ESI-MS/MS 技术的代谢组学方法对川陈皮与其混伪品中的黄酮类化合物进行分析。结果表明,共鉴定出 228 种黄酮类化合物,包括多酚 12 种、花青素 21 种、黄酮类 132 种、黄酮醇 36 种、黄烷酮 20 种、异黄酮 7 种。川陈皮与混伪品所含黄酮类化合物差异较大,PCA 分析、OPLS-DA 分析与聚类分析均可显著区别。另共筛选出 52 种差异代谢物,其中川陈皮中鉴定出特有化合物 15 种,混伪品中鉴定出特有化合物 16 种。这些特征化合物均可作为鉴别川陈皮与混伪品的特征性成分。如川陈皮中特有成分姜黄素、根皮素类、花青素类及其

苷类等化合物在临床上具有显著抗氧化、抗肿瘤、降血脂等功效,对其质量控制以及品质评价均有重要参考价值。

中国 2015 年版本《中国药典》陈皮项下规定,橘及其栽培变种均可作为陈皮药材来源品种。本文研究结果表明,不知火橘皮与川陈皮中的黄酮类化合物具有显著差异。进过文献查阅得知,不知火柑橘为现代柑橘杂交品种,是农学科学家为迎合消费者追求的舒服口感以及果农追求的经济价值高、抗病、高产需求而选育出来的杂交品种,物种基因组可能含有其他橙、柚品种的基因^[15]。设想如橙或柚基于渗入橘杂交品种中,在改变橘甜度、口感、高产、抗病等农艺性状的时候,其药用部位有效成分、药效变异与传递是否等效值得深入研究。因此,建议加强对不同来源品种陈皮药材在基因、化学、药理作用等各方面变异值大小的评价研究,以筛选出适合临床

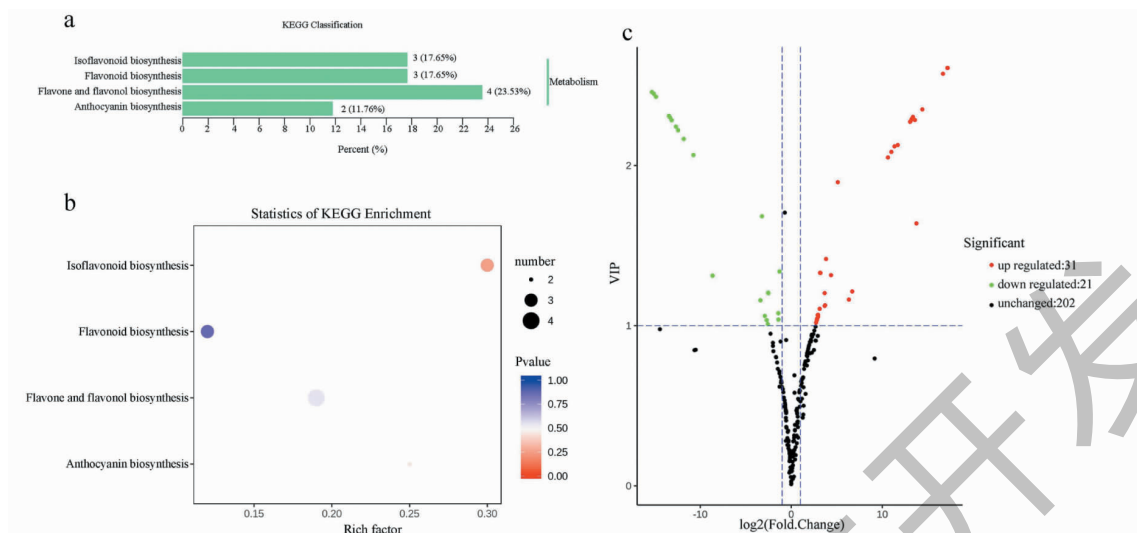


图5 川陈皮与其混伪品差异代谢物的 KEGG 分类图(a)、KEGG 富集图(b)及火山图(c)

Fig. 5 KEGG classification(a), statistics of KEGG enrichment(b) and Volcanic plots(c) of differential metabolites of CCRP and its adulterant

使用的品种,确保临床用药的有效、安全与稳定。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 191-192.
- Wang F, Chen L, Chen H, et al. Analysis of flavonoid metabolites in citrus peels (*Citrus reticulata* Dahongpao) using UPLC-ESI-MS/MS [J]. *Molecules*, 2019, 24 (15) :2680.
- Yi LZ, Dong NP, Liu S. Chemical features of Pericarpium Citri Reticulatae and Pericarpium Citri Reticulatae Viride revealed by GC-MS metabolomics analysis [J]. *Food Chem*, 2015, 186:192-199.
- Li M. Study on the quality equality of different cultivars of Citri Reticulatae Pericarpium [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (成都中医药大学), 2017.
- Liu R. Analysis and research of main medicine components dynamic change and genetic diversity in different cultivars *Citrus* [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (成都中医药大学), 2014.
- Liu XQ, Tu H, Wang SC, et al. Flavonoid composition of Citrus juice sacs determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Plant Physiol J* (植物生理学报), 2016, 52:762-770.
- Qin XM, Li ZY. Thinking of Chinese medicinal materials quality evaluation based on the technology of plant metabolomics [C]. Ministry of Science and Technology, PRC, NSFC, Chinese Pharmacological Society: Symposium of metabolomics and modern research of traditional Chinese medicine (代谢组学与中医药现代研究学术论坛论文集), 2013:42.
- Chen W, Gong L, Guo ZL, et al. A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: application in the study of rice metabolomics [J]. *Mol Plant*, 2013, 6:1769-1780.
- Wishart DS, Jewison T, Guo AC, et al. HMDB 3.0--the human metabolome database in 2013 [J]. *NAR*, 2013, 41:801-807.
- Zhu ZJ, Schultz AW, Wang JH, et al. Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8:451-456.
- Fraga CG, Clowers BH, Moore RJ, et al. Signature-discovery approach for sample matching of a nerve-agent precursor using liquid chromatography-mass spectrometry, XCMS, and chemometrics [J]. *Anal Chem*, 2010, 82:4165-4173.
- Daniel JD. Univariate, bivariate, and multivariate statistics using R: quantitative tools for data analysis and data science [M]. Hoboken: John Wiley & Sons Inc, 2020:281-305.
- Thévenot EA, Roux A, Xu Y, et al. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and opls statistical analyses [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14:3322-3335.
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *NAR*, 2000, 28(1) :27-30.
- Wu GA, Terol J, Ibanez V, et al. Genomics of the origin and evolution of *Citrus* [J]. *Nature*, 2018, 554:311-316.