

Простой и эффективный метод экстракции полярных метаболитов из листьев гуара (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) для GC-MS метаболомного анализа

С.Б. Теплякова¹✉, А.А. Шаварда^{2,3}, Т.В. Шеленга¹, Е.А. Дзюбенко¹, Е.К. Потокина^{1,2}

¹ Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

✉ e-mail: Serafima.teplyakova@mail.ru

Гуар *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. – новая для России сельскохозяйственная культура, востребованная в газо-, нефтедобывающей и пищевой промышленности. В связи с развитием «омиксных» технологий и для выявления ценных для селекции генов представляет интерес сравнительное изучение различных сортов и линий гуара с помощью метаболомики и функциональной геномики. Для массового скрининга метаболомных профилей образцов гуара из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова с использованием GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) метаболомного анализа на первых этапах важно подобрать наиболее оптимальный метод экстракции метаболитов из анализируемых образцов. Результатом метаболомного анализа чаще всего является статистическая модель различий в корреляционной структуре метаболитной сети изучаемых объектов. Надежное квантирование метаболитных профилей критично для различения сортов одной культуры, так как профили метаболитов в тканях листа у растений одного вида, культивируемых в равных условиях, практически не отличаются по набору метаболитов. В метаболомной практике при подготовке образцов к GC-MS-анализу распространено два способа экстракции полярных соединений. Один из широко используемых методов пробоподготовки основан на длительной экстракции метаболитов из цельных незамороженных тканей с помощью растворителя метанола, а другой – на краткосрочной метанольной экстракции метаболитов из замороженного и подвергнутого гомогенизации материала. Преимущества и недостатки этих двух методов побудили нас к разработке нового подхода, позволяющего избежать затруднений при анализе метаболомных профилей листьев различных сортов гуара. Предложенный нами метод объединяет преимущества двух выше указанных способов пробоподготовки, а именно: исключает потерю метаболитов на этапе центрифугирования и способствует полной деструкции всех клеточных стенок, обеспечивая максимальный уровень экстракции полярных метаболитов. Метод состоит в том, что лист быстро замораживается в жидком азоте с последующим размораживанием в холодном метаноле. При этом ткани листа сохраняют морфологическую целостность, и последующее центрифугирование, необходимое при гомогенизации, исключается. Нами была показана эффективность использования этого усовершенствованного метода на образцах листьев трех линий гуара. Установлено, что количество экстрагируемых метаболитов увеличивается более чем в пять раз по сравнению с метанольной экстракцией из свежего листа без замораживания и более чем в два раза в сравнении с экстракцией метанолом после замораживания и гомогенизации. Экстракция метаболитов новым методом позволяет проводить GC-MS-анализ образцов гуара с наименьшими потерями и высокой точностью, необходимой при выявлении сортовых различий.

Ключевые слова: *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.; гуар; газовая хроматография; масс-спектрометрия; метаболомика; экстракция метаболитов.

Для цитирования: Теплякова С.Б., Шаварда А.А., Шеленга Т.В., Дзюбенко Е.А., Потокина Е.К. Простой и эффективный метод экстракции полярных метаболитов из листьев гуара (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) для GC-MS метаболомного анализа. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):49-54. DOI 10.18699/VJ19.460

A simple and efficient method to extract polar metabolites from guar leaves (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) for GC-MS metabolome analysis

S.B. Teplyakova¹✉, A.L. Shavarda^{2,3}, T.V. Shelenga¹, E.A. Dzyubenko¹, E.K. Potokina^{1,2}

¹ Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

² St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

³ Komarov Botanical Institute, RAS, St. Petersburg, Russia

✉ e-mail: Serafima.teplyakova@mail.ru

Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) is an agricultural crop species new to Russia and is in demand by the gas, oil and food industries. Due to the progress of “omics” technologies and the marker-assisted selection, there is a huge interest in the studies that compare the metabolites of various guar varieties, employing metabolomics as a method of functional ge-

nomics. For a large-scale screening of guar germplasm from the VIR collection, it is important to choose an efficient method to extract metabolites from samples. The accuracy of the assessment of the content of metabolites in samples is crucial for distinguishing varieties within the crop, since the metabolome profiles of plants within the same species differ mainly in the quantitative ratio of metabolites, and not in their qualitative composition. In metabolome practice, two methods of extracting polar compounds are usually employed in the preparation of samples for GC-MS analysis. One of the widely used methods of sample preparation is the long-term extraction of metabolites from whole tissues with the aid of a methanol solvent. Another method of sample preparation is based on the short-term methanol extraction of metabolites from frozen and homogenized material. The advantages and disadvantages of these two methods revealed in the course of our work have prompted us to develop a new approach that avoids some difficulties in analyzing the metabolic profiles of leaves of various guar varieties. The method we suggested combines the advantages of the two above-mentioned approaches of sample preparation, namely eliminates the loss of metabolites due to centrifugation and ensures the complete destruction of all cell walls, ensuring the maximum extraction level of polar metabolites. The essence of the new method is that the leaf is rapidly frozen in liquid nitrogen with subsequent thawing in cold methanol. Thus, leaf tissues retain morphological integrity, and subsequent centrifugation, necessary for homogenization, is skipped. We have checked the effectiveness of this improved method by experiments with leaf samples of three guar genotypes. It has been shown that the amount of extracted metabolites increases more than 5-fold compared to extraction with methanol from fresh unfrozen leaf tissues and more than 2-fold compared to extraction with methanol after freezing and homogenization. Extraction of metabolites using the new method allows the GC-MS analysis of guar samples to be conducted with the least loss and high accuracy required to distinguish varieties.

Key words: *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub; guar; gas chromatography; mass spectrometry; metabolomics; metabolite extraction.

For citation: Teplyakova S.B., Shavarda A.L., Shelenga T.V., Dzyubenko E.A., Potokina E.K. A simple and efficient method to extract polar metabolites from guar leaves (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) for GC-MS metabolome analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):49-54. DOI 10.18699/VJ19.460 (in Russian)

Введение

Метаболомный подход позволяет получить информацию о физиологическом состоянии исследуемого объекта. Растительный организм синтезирует большое количество веществ, необходимых для поддержания жизнедеятельности. Описано не менее 200 000 веществ, относящихся к низкомолекулярным метаболитам и не являющихся природными полимерами (Hall et al., 2002; Wishart, 2011). С другой стороны, по разным оценкам, разнообразие молекул в одном конкретном организме существенно ниже и не превышает 10 000 различных структур (Fiehn, 2001; Wishart, 2011). К сожалению, никакая разработанная до настоящего времени аналитическая техника не позволяет полностью проанализировать такую сложную систему метаболитов, состоящую из соединений, обладающих совершенно различной природой и физико-химическими свойствами.

Один из наиболее востребованных способов анализа количественного и качественного составов метаболитов в исследуемом объекте – нецелевой (non-targeted) анализ первичных метаболитов, осуществляемый с применением газовой-жидкостной хроматографии (GC), сопряженной с масс-спектрометрией (МС) (Fiehn et al., 2000; Lisec et al., 2006; Kanani, Клара, 2007; Alonso et al., 2015). Набор соединений, идентифицируемых с помощью любой из используемых аналитических платформ, определяется главным образом возможностями применяемого метода. В частности, система GC-MS ограничена только соединениями, обладающими достаточной летучестью. Большинство этих соединений имеют небольшой молекулярный вес и относятся к первичным метаболитам.

Метаболомные данные могут быть сопряжены с постгеномным анализом (Fiehn et al., 2000; Fiehn, 2002). Так, совершенствование методов и протоколов метаболомного анализа позволяет все с большей точностью улавливать межвидовые различия (Bundy et al., 2002; Shinbo et al.,

2006; Farag et al., 2014; Лоскутов и др., 2016) или отличать организмы, имеющие генетические модификации, от организмов «дикого типа» (Roessner et al., 2001; Catchpole et al., 2005).

В последнее время появилась перспектива различать по метаболомным профилям сорта сельскохозяйственных культур (Смоликова и др., 2015). Описаны попытки сравнения сортов рапса (Смоликова и др., 2015), кукурузы (Röhlig et al., 2009) на основе различий в концентрации сахаров и сахароспиртов, аминокислот, жирных кислот. Ключевую роль в таких исследованиях играет выбор методики экстракции метаболитов и пробоподготовки (Lisec et al., 2006; Kanani et al., 2008). В зависимости от целей метаболомного анализа применяют различные по полярности виды растворителей – метанол, метанол/вода, метанол/хлороформ/вода – в разных соотношениях (Martineau et al., 2011; Puzanskiy et al., 2018). Нецелевой анализ профиля полярных соединений проводят преимущественно на основе метанола (Fiehn et al., 2000; Lisec et al., 2006; Kanani Клара, 2007).

Существует несколько способов метанольной экстракции: из гомогената тканей образца и из цельного листа. Одним из самых распространенных способов пробоподготовки является гомогенизация замороженной в жидком азоте ткани с экстракцией при высоких температурах и последующим центрифугированием (Fiehn et al., 2000; Fiehn, 2002; Lisec et al., 2006). При этом наличие термической обработки позволяет добиться максимально высоких результатов (Lisec et al., 2006), а гомогенизация гарантирует разрушение клеточных стенок и, соответственно, экстракцию метаболитов из всех разрушенных клеток. Наряду с этим широко используется метод пробоподготовки, исключая агрессивные воздействия (Maharjan, Ferenc, 2003). Этот метод заключается в метанольной экстракции веществ из цельного листа без гомогенизации материала и термической обработки, а также без стадии

центрифугирования, на которой неизбежна потеря части веществ. Минимизация физико-химических воздействий на анализируемые образцы на стадии пробоподготовки позволяет получить наименее искаженную информацию об исходной представленности метаболитов в неповрежденных тканях (Kanani et al., 2007).

Выбор способа экстракции метаболитов зависит от целей исследования, а также от биологического материала. Предмет нашего исследования – сорта гуара, для изучения которых до настоящего времени не использовался метаболомный подход. В литературе отсутствуют данные о наиболее результативном методе пробоподготовки этого растения для GC-MS-анализа.

На начальных этапах метаболомного анализа требуется подбор наиболее эффективного метода экстракции метаболитов для этой культуры. Таким образом, цель настоящего исследования заключалась в подборе метода более полной экстракции метаболитов для хроматографического анализа, сопряженного с масс-спектрометрией, из листьев растений гуара.

Материалы и методы

Исследование проведено на трех линиях гуара (линии № 1, 2 и 3), относящихся к трем различным образцам (К-52572, К-52569, К-52580) из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Каждая линия представляла собой потомство одного растения, репродуцированного на Кубанской опытной станции ВИР в 2017 г. Растения для эксперимента выращивались в грунте в условиях теплицы на Пушкинском филиале ВИР в 2018 г. Во время эксперимента растения не подвергались агробιοлогическим обработкам. Полив производился ежедневно вручную. Для анализа у всех растений одновременно был отобран верхний молодой лист (второй настоящий лист). Высота растений составляла около 10 см, растения находились на равной стадии развития.

Экстракцию метаболитов проводили тремя способами (А, В, С):

	А	В	С
Линия 1	20.9*	36.1	22.5
Линия 2	26.1	30.4	22.7
Линия 3	32.3	24.3	32.6

* Масса листа, мг.

Способ экстракции А. Лист помещали в центрифужные пробирки (Eppendorf, Германия) объемом 2 мл. Фиксацию материала и последующую экстракцию метаболитов производили в 1.5 мл холодного 100 % метанола в течение 1 сут при температуре +4 °С, перемешивание на ворткексе (шейкере) не проводилось. Полученный экстракт переносили в чистые пробирки объемом 1.5 мл и выпаривали в центрифужном вакуумном испарителе Labconco (США).

Способ экстракции В. Лист и два стеклянных шарика помещали в центрифужные пробирки объемом 2 мл. Фиксацию материала проводили, помещая пробирку в жидкий азот. Гомогенизировали с помощью шаровой вибрационной мельницы Retsch MM 400 в течение 2 мин при 30 колебаниях/с (30 Гц). Экстракцию метаболитов произ-

водили в 1.5 мл холодного 100 % метанола в течение 1 ч при температуре +4 °С, периодически (один раз в 15 мин) перемешивая на ворткексе Multi-Vortex V-32 до равномерного распределения гомогенизированного материала в растворителе. Полученный экстракт перемешивали с помощью ворткекса и центрифугировали (12000 г 5 мин при +4 °С). Супернатант отбирали в пробирки объемом 1.5 мл и выпаривали в центрифужном вакуумном испарителе Labconco.

Способ экстракции С. Лист помещали в центрифужные пробирки объемом 2 мл. Фиксацию материала проводили, помещая пробирки в жидкий азот. Экстракцию метаболитов производили в 1.5 мл холодного 100 % метанола в течение 1 ч при температуре +4 °С, перемешивание на ворткексе (шейкере) не проводилось. Полученный экстракт переносили в пробирки объемом 1.5 мл и выпаривали в центрифужном вакуумном испарителе Labconco.

Далее по единой схеме, вне зависимости от выбора метода экстракции, к выпаренному сухому остатку добавляли 50 мкл BSTFA (N,O-Bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide, Sigma), 50 мкл пиридина (Pyridine) и 20 мкл внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовали трикозан (Tricosane, Sigma), растворенный в пиридине (1 мкг/мкл).

Хроматографический анализ был произведен на газожидкостном хроматографе Agilent (США) 6850 с масс-селективным детектором 5975В. Разделение аналита производилось на капиллярной колонке умеренной полярности Agilent DB-5HT (5 % фенилметилсилоксан, длина 30 м, внутренний диаметр 250 мкм, толщина пленки 0.25 мкм). Анализ проводился в условиях программирования температуры термостата 70-320 °С при скорости нагревания 6° в мин; газ-носитель – гелий в режиме постоянной скорости потока (1 мл/мин). Использованная инъекция без деления потока, температура испарителя 250 °С. Скорость сканирования масс-селективного детектора 2 скана/с в диапазоне от 50 до 800 m/z. Хроматограммы регистрировались по сигналу полного ионного тока с помощью программы Agilent ChemStation.

Разметку пиков и расчет относительных концентраций соединений в пробе производили с использованием программного обеспечения UniChrome 5.0.19.1162 (www.unichrom.com). Методами полуколичественного (semi-quantitative) анализа производили расчет относительных концентраций соединений по отношению к концентрации используемого внутреннего стандарта Трикозан (1 мкг/мкл). Идентификацию веществ проводили в программе AMDIS 32 (<https://chemdata.nist.gov/>) с помощью библиотеки NIST/EPA/NIH 08 Mass Spectral Library (<http://www.nist.gov/srd>). Статистическую обработку метаболомных данных проводили с использованием программы MetaboAnalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) методами многомерной статистики (Chong et al., 2018). В частности, был использован дискриминантный анализ проекций на латентные структуры (PLSDA, Partial Least Squares Regression).

Результаты

В полученных хроматограммах для каждой пробы было детектировано 71 вещество, 41 из которых было иденти-

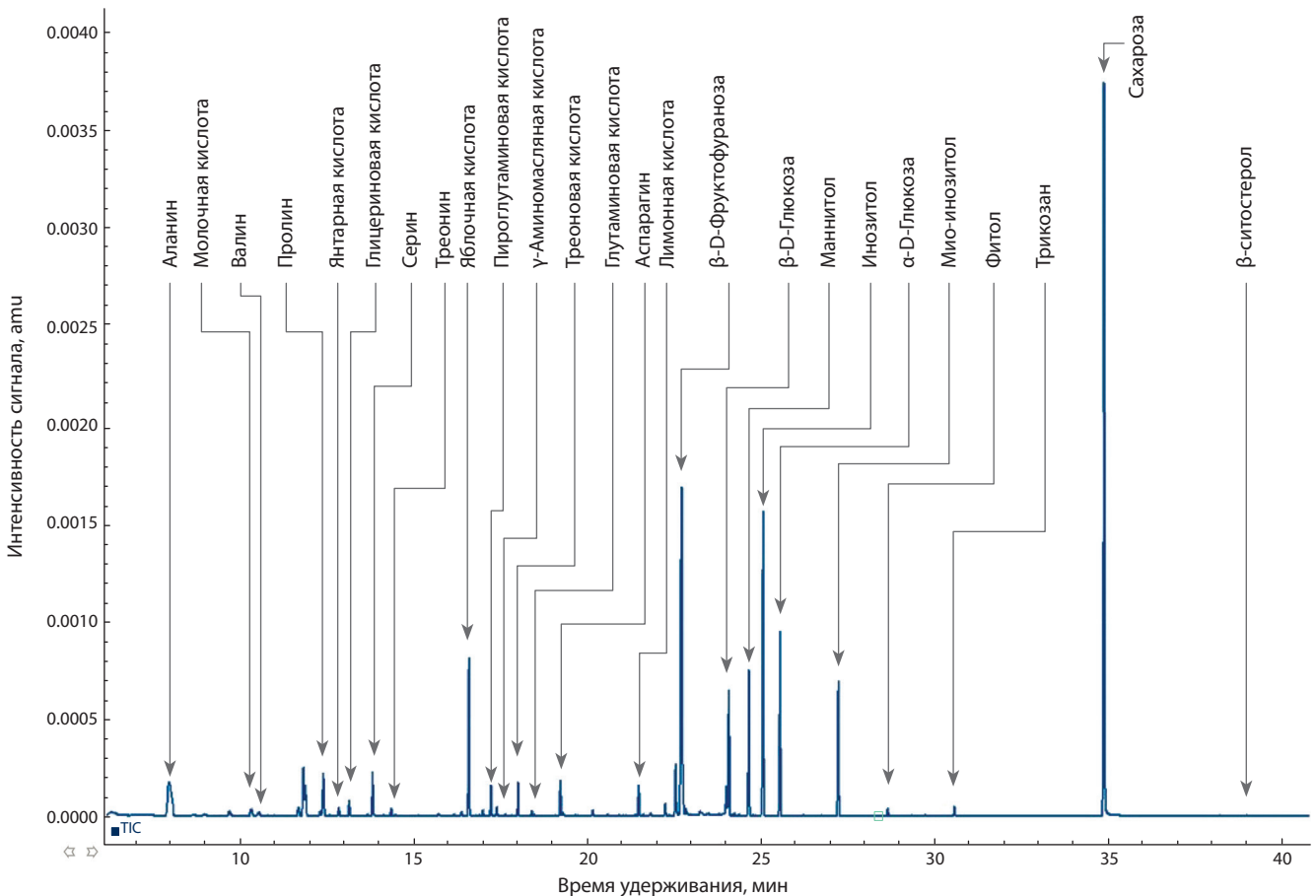


Рис. 1. Хроматограмма профиля метаболитов, экстрагированных из листа гуара линии 2 (способом С) с расшифровкой наиболее представленных пиков (при указании названий соединений использованы стрелки).

amu (arbitrary machine units) – условные машинные единицы.

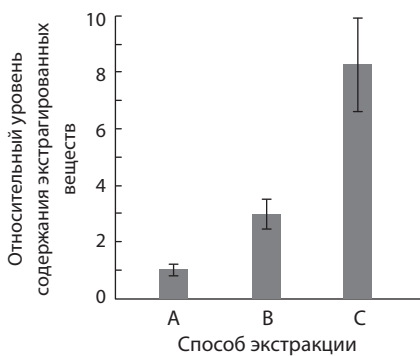


Рис. 2. Сравнение суммарного (усредненного) содержания метаболитов в листьях трех линий гуара, экстрагированных способами А, В и С.

фицировано. На рис. 1 показана хроматограмма профиля метаболитов с обозначением пиков, наиболее представленных по содержанию соединений в листе гуара линии 2. В числе идентифицированных соединений преобладали аминокислоты и органические кислоты.

Сопоставление результатов проведенного GC-MS-анализа показало, что, независимо от способа экстракции (А, В или С) и принадлежности к определенной линии, качественный состав метаболитов оставался неизменным (71 соединение). Однако по количественному содержанию аналитов наблюдалось существенное различие. По результатам полуколичественного анализа, максимальное содержание общего пула метаболитов было достигнуто при использовании способа экстракции С. Эффективность экстракции способом С повышалась в два раза по сравнению с эффективностью экстракции способом В, и более чем в пять раз в сравнении со способом А (рис. 2). При этом тенденция максимальной вытяжки соединений способом С наблюдается при экстракции метаболитов из всех трех исследуемых линий гуара, что говорит об эффективности методики вне зависимости от биологического образца.

При экстракции способом С одинаково хорошо выделяются метаболиты, принадлежащие к разным классам соединений (рис. 3). Сравнение содержания метаболитов из класса веществ сахаридов и сахароспиртов (см. рис. 3, а) показало наибольшее содержание соединений при экстракции метаболитов способом С. Экстракция аминокислот при выделении метаболитов способом С происходит в среднем в три раза более результативно, в отличие от способа В и в среднем в десять раз, в отличие от способа А (см. рис. 3, б). У всех линий гуара при пробоподготовке по способу С наблюдается высокое содержание аланина, пролина, серина, аспарагиновой кислоты, чуть меньшее содержание валина, треонина, аспарагина. Наиболее высокое содержание данных аминокислот наблюдается у линии 2. Максимальное содержание аспарагина наблюдалось у линии 1. Содержание этих аминокислот в тех же пропорциях,

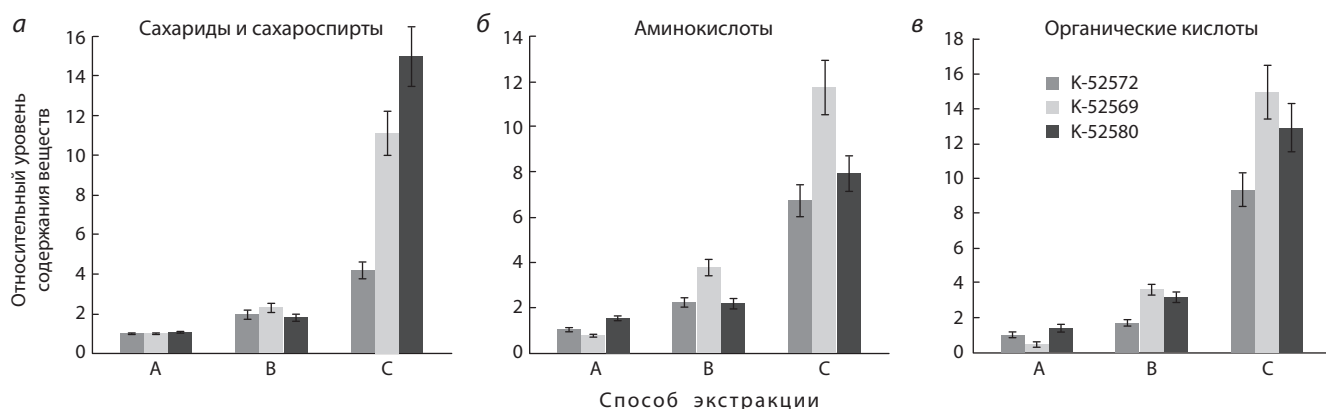


Рис. 3. Сравнение содержания метаболитов разных классов соединений, экстрагированных способами А, В и С из листьев трех линий гуара.

однако в меньших концентрациях, наблюдается и при экстракции метаболитов способом В.

Экстракция метаболитов способом С позволяет достичь максимально эффективной экстракции органических кислот, наряду с сахарами и аминокислотами (см. рис. 3, в). При выделении метаболитов способом С прослеживается высокое содержание органических кислот: молочной, янтарной, яблочной, а также гамма-аминомасляной. Наибольшее содержание органических кислот при экстракции способом С было отмечено у линии 2 (яблочная, гамма-аминомасляная), а также у линии 3 (молочная, янтарная). При экстракции способом В практически не наблюдается различий в содержании молочной, янтарной органических кислот у линий 2 и 3, однако заметно их относительно высокое содержание по сравнению с линией 1.

Результат дискриминантного анализа проекций на латентные структуры (PLSDA) показал, что метод экстракции существенно влияет на результаты анализа профиля метаболитов, содержащихся в листьях линий гуара (рис. 4, компонента 1, 13.2 % объясненной дисперсии). Межсортовые различия по концентрации метаболитов объясняют до 18.5 % наблюдаемой дисперсии (см. рис. 4, компонента 2). Однако эти различия проявляются только при условии использования в процессе пробоподготовки способа В или С, но не способа А. Разделить линии гуара при экстракции метаболитов способом А не представляется возможным.

Обсуждение

Низкую концентрацию метаболитов, экстрагированных способом А, можно объяснить отсутствием равномерного механического воздействия на клеточные стенки. Одно лишь химическое воздействие метанола, по-видимому, не может обеспечить полноценного разрушения клеточного «барьера» и полную вытяжку спирторастворимых соединений из всей массы растительной пробы. Экстракция происходит лишь частично и случайно. Ошибки в оценке количества метаболитов, связанные с этой случайной экстракцией, могут быть препятствием при оценке достоверных различий метаболомных профилей гуара. Ранее считалось, что метод экстракции В позволяет избежать такого «вероятностного» процесса экстрагирования метаболитов, так как разрушение клеточных стенок

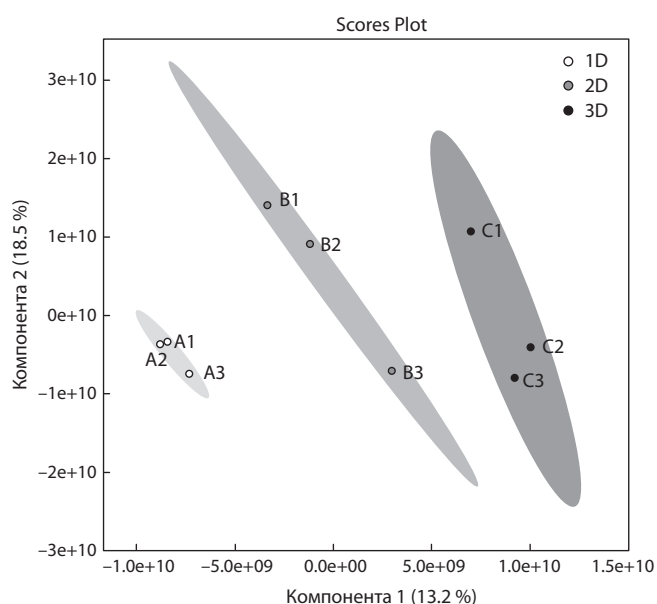


Рис. 4. Распределение результатов анализа 71 детектированного метаболита у трех линий гуара с учетом трех разных способов экстракции А (1D), В (2D) и С (3D) в плоскости первых двух главных компонент, рассчитанное по методу дискриминантного анализа проекций на латентные структуры (PLSDA).

происходит в равной степени для всего материала. Однако этот метод имеет еще один недостаток, связанный с возможной потерей части экстрагированных метаболитов в процессе центрифугирования, что также может являться помехой для точной оценки концентраций метаболитов, содержащихся в листьях линий гуара.

По результатам проведенного анализа метаболомного профиля линий гуара, установлено, что способ экстракции С является наиболее эффективным. Его результативность основана на физико-механическом разрушении всех клеточных стенок при резком воздействии температуры $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ с последующим быстрым размораживанием при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. При таком шоковом температурном воздействии практически все растительные клетки повреждаются кристаллами воды, которые разрушают клеточные стенки, препятствующие экстракции. Способ С не предусматривает также процедуры гомогенизации и центрифугирования,

что позволяет избежать потери метаболитов в процессе пробоподготовки. В итоге конечная концентрация метаболитов существенно повышается, в связи с чем мы исследуем систему, более приближенную к своему нативному состоянию.

Заключение

Таким образом, при экстракции метаболитов из растений гуара применимы методики В и С. Наиболее полным и объективно отражающим метаболомный профиль анализируемого образца можно считать предлагаемый нами новый способ С, заключающийся в пробоподготовке материала без использования гомогенизации и центрифугирования, основанный на воздействии резкого перепада температур, что позволяет снизить потери веществ и добиться более полной экстракции метаболитов из листьев гуара.

Список литературы / References

Лоскутов И.Г., Шеленга Т.В., Конарев А.В., Шаварда А.Л., Блинова Е.В., Дзюбенко Н.И. Метаболомный подход к сравнительному анализу диких и культурных видов овса (*Avena L.*). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):636-642. DOI 10.18699/VJ16.185.
[Loskutov I.G., Shelenga T.V., Konarev A.V., Shavarda A.L., Blinova E.V., Dzyubenko N.I. The metabolomic approach to the comparative analysis of wild and cultivated species of oats (*Avena L.*). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):636-642. DOI 10.18699/VJ16.185. (in Russian)]

Смоликова Г.Н., Шаварда А.Л., Алексейчук И.В., Чанцева В.В., Медведев С.С. Метаболомный подход к оценке сортовой специфичности семян *Brassica napus L.* Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):121-127. DOI 10.18699/VJ15.015.
[Smolikova G.N., Shavarda A.L., Alekseychuk I.V., Chantseva V.V., Medvedev S.S. The metabolomic approach to the assessment of cultivar specificity of *Brassica napus L.* seeds. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015; 19(1):121-127. DOI 10.18699/VJ15.015. (in Russian)]

Alonso A., Marsal S., Julià A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. Front. Bioeng. Biotechnol. 2015; 3(23):1-20. DOI 10.3389/fbioe.2015.00023.

Bundy J.G., Spurgeon D.J., Svendsen C., Hankard P.K., Osborn D., Lindon J.C., Nicholson J.K. Earthworm species of the genus *Eisenia* can be phenotypically differentiated by metabolic profiling. FEBS Letters. 2002;521(1-3):115-120. DOI 10.1016/s0014-5793(02)02854-5.

Catchpole G., Beckmann M., Enot D., Mondhe M., Zywicki B., Taylor J., Fiehn O. Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. Proc. Natl. Acad. Sci. 2005;102(40):14458-14462. DOI 10.1073/pnas.0503955102.

Chong J., Soufan O., Li C., Caraus I., Li S., Bourque G., Wishart D., Xia J. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. Nucl. Acids Res. 2018;46(1):486-494. DOI 10.1093/nar/gky310.

Farag M.A., Gad H.A., Heiss A.G., Wessjohann L.A. Metabolomics driven analysis of six *Nigella* species seeds via UPLC-qTOF-MS and GC-MS coupled to chemometrics. Food Chem. 2014;151:333-342. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.11.032.

Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. Comp. Funct. Genomics. 2001;2(3):155-168. DOI 10.1002/cfg.82.

Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. Plant Mol. Biol. 2002;48:155-171. DOI 10.1007/978-94-010-0448-0_11.

Fiehn O., Kopka J., Dörmann P., Altmann T., Trethewey R., Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. Nat. Biotechnol. 2000;18(11):1157-1161. DOI 10.1038/81137.

Hall R., Beale M., Fiehn O., Hardy N., Sumner L., Bino R. Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies. Plant Cell. 2002;14(7):1437-1440. DOI 10.1105/tpc.140720.

Kanani H., Chrysanthopoulos P.K., Klapa M.I. Standardizing GC-MS metabolomics. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2008;871(2):191-201. DOI 10.1016/j.jchromb.2008.04.049.

Kanani H.H., Klapa M.I. Data correction strategy for metabolomics analysis using gas chromatography-mass spectrometry. Metab. Eng. 2007;9(1):39-51. DOI 10.1016/j.ymben.2006.08.001.

Liseč J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L., Fernie A.R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. Nat. Protoc. 2006;1(1):387-396. DOI 10.1038/nprot.2006.59.

Maharjan R.P., Ferenci T. Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. Anal. Biochem. 2003;313(1):145-154. DOI 10.1016/S0003-2697(02)00536-5.

Martineau E., Tea I., Loaç G., Giraudeau P., Akoka S. Strategy for choosing extraction procedures for NMR-based metabolomic analysis of mammalian cells. Anal. Bioanal. Chem. 2011;401(7):2133-2142. DOI 10.1007/s00216-011-5310-y.

Puzanskiy R.K., Yemelyanov V.V., Kliukova M.S., Shavarda A.L., Shtark O.Y., Yurkov A.P., Shishova M.F. Optimization of metabolite profiling for Black Medick (*Medicago lupulina*) and Peas (*Pisum sativum*). Applied Biochem. Microbiol. 2018;54(4):442-448. DOI 10.1134/S0003683818040129.

Roessner U., Luedemann A., Brust D., Fiehn O., Linke T., Willmitzer L., Fernie A.R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. The Plant Cell. 2001;13(1):11-29. DOI 10.1105/tpc.13.1.11.

Röhlig R.M., Eder J., Engel K.H. Metabolite profiling of maize grain: differentiation due to genetics and environment. Metabolomics. 2009;5(4):459-477. DOI 10.1007/s11306-009-0171-5.

Shinbo Y., Nakamura Y., Altaf-Ul-Amin M., Asahi H., Kurokawa K., Arita M., Kanaya S. KNApSACk: a comprehensive species-metabolite relationship database. Plant Metabolomics. 2006;57:165-181. DOI 10.1007/3-540-29782-0_13.

Wishart D.S. Advances in metabolite identification. Bioanalysis. 2011; 3(15):1769-1782. DOI 10.4155/bio.11.155.

ORCID ID

S.B. Teplyakova orcid.org/0000-0002-5624-4245
A.L. Shavarda orcid.org/0000-0003-1778-2814
T.V. Shelenga orcid.org/0000-0003-3992-5353
E.A. Dzyubenko orcid.org/0000-0003-4576-1527
E.K. Potokina orcid.org/0000-0002-2578-6279

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-29-08027-офи-м с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.10.2018. После доработки 03.12.2018. Принята к публикации 21.12.2018.