

DOI: 10.13376/j.cbls/2015135

文章编号: 1004-0374(2015)08-0971-07



漆小泉, 博士, 研究员, 博士生导师, 现任中国科学院植物研究所植物次生代谢及抗病信号转导创新研究组组长 2006 年入选中国科学院“百人计划”, 2008 年获择优支持。主要研究工作: 以水稻、丹参等为主要研究材料, 采用分子生物学等手段解析植物萜类代谢途径, 探索其功能; 采用包括代谢组学在内的分子系统生物分析方法研究水稻等作物高产、优质及耐干旱、低温等逆境的代谢调控机理; 利用基因组较小、具有全基因组序列的二穗短柄草为模式植物, 解析麦类作物与麦类锈菌的互作机制, 为麦类作物的持久抗病品种培育和农业可持续发展提供理论依据。

基于GC-MS的植物代谢组学研究

段礼新, 漆小泉*

(中国科学院植物研究所植物分子生理学重点实验室, 北京 100093)

摘要: 代谢组学是系统生物学的重要组成部分。在众多代谢组学分析技术中, 气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 技术较为成熟, 分辨率高、灵敏度高、重现性好, 拥有大量标准质谱图数据库且成本相对低廉, 很早就应用到植物代谢组学研究领域, 迄今仍然是主要分析平台之一。现从 GC-MS 技术的核心原理、衍生化方法以及数据采集、分析和数据库等方面介绍了 GC-MS 植物代谢组学分析技术。同时, 综述了该技术在基因功能研究、植物代谢遗传机理、植物抗逆、生物技术和生物育种中的应用。

关键词: 气相色谱-质谱; 植物; 代谢组学

中图分类号: Q591; Q94-3 **文献标志码:** A

GC-MS-based plant metabolomics researches

DUAN Li-Xin, QI Xiao-Quan*

(Key Laboratory of Plant Molecular Physiology, Institute of Botany,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Metabolomics is one of the very important parts of systems biology. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) as a mature technology has a lot of advantages, such as high resolution, high sensitivity, good reproducibility, with a large standard library and relatively low cost. It has been early applied to the field of plant metabolomics, and now still is the main technical platform for plant metabolomics. This review introduces the technology from the aspects of basic mechanism, derivatization methods, data acquisition, data analysis and database. Meanwhile, the review comprehensively summarizes the applications of GC-MS-based plant metabolomics to the analysis of gene function, the genetic mechanisms of plant metabolism, plant metabolic response to stress and applications to biotechnology and bio-breeding.

Key words: GC-MS; plant; metabolomics

收稿日期: 2014-12-31; 修回日期: 2015-02-27

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2013CB127005); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2012AA10A304-3); 国家自然科学基金项目(31200227)

*通信作者: E-mail: xqi@ibcas.ac.cn; Tel: 010-62836671

随着人类全基因组序列的测定, 各种组学的概念应运而生。基因组学研究带动了生命科学的迅猛发展, 并极大地推动了转录组学、蛋白质组学、代谢组学、表型组学等的快速发展。代谢组学 (Metabonomics/Metabolomics) 旨在研究生物体或组织, 甚至单个细胞的全部小分子代谢物成分及其动态变化^[1-2]。代谢物距表型最接近, 是基因与表型之间的桥梁^[3]。代谢组学是系统生物学研究中非常重要的一个环节, 不仅可以揭示基因的功能, 也为生物技术的应用提供科学依据。

植物代谢组学是代谢组学的重要组成部分。已知的植物有 30 万余种, 尚不包括未知的植物物种, 据估计它们产生的代谢物数量有 20 万~100 万种^[4]。相对于动物, 植物更多地依靠合成不同种类的代谢物来适应环境、繁衍自身。这个过程使得植物逐步进化出多样性的代谢途径和复杂的代谢网络, 享有技术精湛的“绿色化学工厂”美誉。植物代谢物数量巨大, 结构迥异, 在时间和空间上都具有高度的动态性, 这使得植物代谢组学研究更具挑战性。

代谢组学研究的需求刺激了各种高灵敏度、高分辨率分析仪器的迅速发展。目前, 植物代谢组学主要采用两大分析技术平台, 磁共振谱 (nuclear magnetic resonance, NMR) 平台和质谱 (mass spectrometry, MS) 平台。尽管 NMR 具有简单的样品预处理、较高的重现性和良好的检测客观性等优势^[5], 但是质谱拥有较高的分辨率和灵敏度, 对于植物这样复杂的样本尤其适合。质谱作为检测器通常和各种色谱分离仪器联用, 基于质谱的代谢组学分析技术又可以分为气相色谱质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、液相色谱质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 和毛细管电泳质谱联用 (capillary electrophoresis-mass spectrometry, CE-MS)。这 3 种色谱-质谱联用分析技术分别适合检测不同极性和类别的代谢物, 相互之间也有一定的重叠。无论采用哪种分析技术, 都不能完全覆盖整个代谢组的化合物^[6]。近年来, 研究人员开始尝试整合多种分析技术, 以期发挥各种方法的优势, 弥补单一分析技术的不足。

相对其他代谢组学分析技术而言, GC-MS 是代谢组学研究中应用最早的分析技术之一, 最早有关代谢组学 (代谢轮廓分析) 的文章就是用 GC-MS 分析尿液和组织提取物的代谢谱^[7]。GC-MS 是最为成熟的色谱-质谱联用技术之一, 由于其分辨率高、灵敏度高、重现性好, 具有大量标准代谢物谱

图库, 且成本相对低廉等特点, 适合分析相对分子质量小、低极性、低沸点的代谢物或者衍生化后具有挥发性的物质, 是目前植物代谢组学研究的主要分析平台之一。

1 基于GC-MS的代谢组学分析技术

1.1 GC-MS的原理及关键技术

气相色谱部分起分离作用, 并将目标物质引入质谱系统。色谱柱以恒温加热或以程序控制加热, 各组分依据热力学性质 (即根据化合物沸点的差异和在色谱柱固定相中的选择性吸附的差异) 的不同, 在固定相及流动相 (即载气) 中有不同的分布, 而达到分离的目的。质谱部分实为检测器, 主要包括电离源、质量分析器和电子倍增管等。目标物质通过气相色谱仪后, 在电离源被电离成气相离子, 然后进入质量分析器。质量分析器将不同质荷比离子依次分开, 到达电子倍增管产生电信号, 这样就得到目标物质的三维信息, 即保留时间、 m/z 、离子强度, 利用离子碎片信息可以更准确地对物质进行定性。

GC-MS 最常用的离子化技术是电子轰击 (electron impact, EI), EI 离子源的灯丝通常用钨丝或铼丝制成, 在高真空条件下, 炙热的灯丝发出电子轰击样品分子。为了获得可重复的质谱图, 轰击电子能量一般为 70 eV, 远大于样品的离子化电位, 剩余能量高于分子中某些键的键能, 从而使分子离子发生裂解。电子轰击源的一个主要缺点是固、液态样品须气化进入离子源, 因此, 不适合于难挥发的样品和热稳定性差的样品。但是, GC-MS 的 EI 离子化效果较高, 不同分子几乎都能被电离而进入质谱系统; 不同于 LC-MS, GC-MS 不同分子之间的离子抑制效应很低, 基质干扰也较小。

近年来, 飞行时间 (time of flight, TOF) 类质谱发展迅速。TOF 具有较高的扫描速率和极高的离子采集效率, 相同的分析时间, TOF 类质谱获得数据量远大于四极杆质谱, 有利于共流出峰的检测, 因而越来越受到代谢组学研究者的青睐。高分辨 TOF 类质谱, 不但可以得到化合物的质谱图, 而且可以对每一个碎片离子进行高分辨检测, 结合高分辨的标准数据库, 能大大提高定性的准确度。

20 世纪 90 年代新发展起来的一种全二维气相色谱 (comprehensive two-dimensional gas chromatography, GC×GC) 分析方法具有高分辨率、高灵敏度等特点, 是目前最为强大的分离工具之一。通过二维色谱柱

的分离, 复杂重叠峰得到进一步的分析, 但是全二维气相色谱质谱的数据信息量大, 对数据分析要求较高^[8]。

1.2 GC-MS衍生化技术

大多数植物初生代谢物(三羧酸循环、卡尔文循环、氨基酸代谢、脂肪酸代谢、糖代谢、萜类代谢等产生的代谢物)适合GC-MS分析, 低极性的代谢物一般相对分子质量小, 有较好的挥发性; 大极性的糖、氨基酸、有机酸则能被衍生化, 增加它们的挥发性。GC-MS常用的衍生化方法是两步衍生化。第一步是与甲氧胺(methoxyamine)的吡啶溶剂反应, 目的是为了稳定羰基, 抑制羰基的酮-烯醇互变(keto-enol tautomerism)或者抑制羰基转化成缩酮或缩醛结构(acetal-或ketal-structures)。还原性糖的结构存在多种构型, 在水溶液中主要以半缩醛的环状结构存在, 糖也可能以直链的多羟基醛的结构存在, 因此, 糖在衍生化时可能存在多个衍生化的峰。第一步的甲氧胺脎化使糖主要生成顺式和反式(*syn*和*anti*)的直链衍生化产物, 减少糖的其他衍生化产物^[9]。第二步是三甲基硅烷化反应, 最常用的是*N*-甲基-*N*-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺[*N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, MSTFA], 硅烷化对大多数含有羟基(-OH)、羧基(-COOH)、氨基(-NH₂)、巯基(-SH)等具有活泼氢原子的基团有较好的衍生化效果, 这些含有活泼氢的基团被衍生化后, 减少了分子间氢键的形成, 降低了分子的沸点。

衍生化的效能极大影响代谢组学的分析, 不完全衍生化不仅影响峰的定量而且也增加了谱图的复杂性。Koek等^[10]研究了代谢物的衍生化效能和稳定性, 他们将代谢物分为3类, 不同类别的代谢物具有不同的衍生化能力和稳定性。第一类化合物是含有羟基或羰基的基团, 如糖、脂肪酸和有机酸等, 这些类别的化合物衍生化后符合美国FDA(Food and Drug Administration)关于靶向物质分析的要求, 衍生化效能可在60%~115%之间, 相对标准偏差RSD<5%。第二类化合物是含有氨基和磷酸基团的代谢物, 如氨基酸、磷酸果糖等, 它们具有较好的衍生化效果、重现性和中等的精度。第三类化合物是含有酰胺、巯基、磺酸基的化合物, 衍生化相对困难, 衍生化效果是醇羟基>酚羟基>羰基>氨基>酰胺。和其他衍生化试剂相比, MSTFA具有最好的衍生化效果, 更高的回收率和重现性, 衍生化的副产物在色谱图中出峰时间较早, 在MSTFA中添加1%的TMCS(trimethylchlorosilane)并不能提高硅烷化效果。

另外一部分学者使用酰基衍生化方法——氯甲酸甲酯(methyl chloroformate, MCF)^[11-12]。氯甲酸甲酯可以衍生化氨基、含羧基的有机酸等, 进行酰基化反应, 生成碳酸酯或氨基甲酸酯, 该类试剂的衍生化反应可以在水中进行, *Nature Protocols*杂志对两种方法都有报道^[11,13]。

1.3 GC-MS数据采集

对于非靶向GC-MS代谢组学分析, 由于对化合物的种类以及结构信息知之甚少, 一般采用全扫描的采集方式, 期望得到整体的代谢轮廓(metabolic profiling)。非靶向的GC-MS方法相对靶向分析方法专属性差、灵敏度低、线性范围较窄。GC-MS全扫描质谱图十分复杂, 使得数据分析困难, 成为GC-MS代谢组学分析瓶颈之一。而传统的靶向分析方法, 需要根据已知的化合物设定专门的检测条件, 如选择离子检测(select ion monitoring, SIM)或多反应检测(multiple reaction monitoring, MRM)。许国旺课题组提出将非靶向的全扫描方法转化为“拟靶向”的SIM或MRM方法^[14], 具体通过质控(quality control, QC)样本(从每一个样本中取同等量混合而成)解卷积后获得所有待分析代谢物(解卷积后得到的峰即可), 然后针对这些峰建立针对性(靶向性)的分析方法。通过SIM或MRM采集方式提高分析的稳定性和灵敏度, 其他学者也有类似的分析思路^[15]。根据经验, 这种“拟靶向”的分析方法特别适合两组样本的比较, 如突变体和野生型、处理组和对照组。但对遗传群体大规模的代谢组学样本, 那些在大多数样本中存在的代谢物可以在QC中正常检出。如果是仅在少量样本中存在的峰, 含量也不是很高时, 很有可能在制备QC时, 含量被稀释后不能检出。同时, QC样本的解卷积效果对“拟靶向”限定的代谢物范围影响较大, 解卷积假阳性结果也可能对分析造成一定的影响。

1.4 GC-MS数据预处理及数据库

在展开多维统计分析之前, 对于由分析仪器导出的原始数据, 还需进行预处理, 主要包括滤噪、重叠峰解卷积(deconvolution)、峰对齐、峰定量、标准化和归一化等步骤。其中, 重叠峰的解卷积和不同样本峰对齐相对比较困难。对靶向分析代谢组学而言, 数据前处理只需根据设定的检测离子积分即可。代谢组学分析要求仪器长期运行, 保留时间的漂移和背景噪音不可避免, 开发一种针对所有样本的无偏差的峰提取、峰对齐方法尤其困难。目前关于GC-MS代谢组学研究约有三分之一是方法学

研究, 其中的大部分是关于数据分析。然而, 很多 GC-MS 的应用文章在数据预处理部分介绍得比较简单, 不同数据处理方法之间的可比较性较差。特别对于 mQTL (metabolite quantitative trait loci) 和 mGWAS (metabolome genome wide association study) 分析, 由于样本量巨大, 对各种算法的运算能力要求比较高, 数据分析的时间远大于样本检测的时间。

目前有两种方法分析 GC-MS 数据, 一种是把 GC-MS 的数据当 LC-MS 来处理, 提取离子特征进行分析, 可用的软件有 XCMS、MetAlign、MathDAM、MetaQuant、MET-IDEA 等; 另一种方法是直接对 GC-MS 数据进行解卷积, 算法或软件有 MCR、TagFinder、PyMS、MetaboliteDetector 等。但是, 目前使用较为满意的软件不多。Robinson 等^[16]首次提出将动态规划算法应用到 GC-MS 峰对齐中, 类似基因序列间的比对。GC-MS 可以获得标准的质谱图, 所以, 与 LC-MS 相比, GC-MS 的数据库相对较多^[17]。

2 GC-MS在植物代谢组学中的应用

代谢组学在人类疾病研究和疾病诊断等领域具有广阔的应用前景^[18]。植物代谢组学已逐步应用于基因功能研究、代谢途径及代谢网络调控机理的解析等基础生物学的研究^[2,19-20], 也开始应用于作物产量、营养成分等育种领域^[21]。

2.1 植物代谢组学在基因功能研究中的应用

植物代谢组学作为系统生物学的重要组成部分, 在揭示生命基本活动及规律中将发挥越来越重要的作用。Fiehn 等^[2]最先将 GC-MS 代谢组学方法应用到功能基因组的研究中, 采用了 4 种拟南芥基因型: C24、Col-2、*sddl-1* 和 *dgd1* 为材料。*sddl-1* 突变体为 C24 背景回交 4 代的纯合株系。*SDD1* 基因参与气孔发育, 在缺乏 *SDD1* 情况下, 除了导致气孔密度增加 2~4 倍外, 没有其他明显的表型。突变体 *dgd1* 为 Col-2 背景下回交 4 代的纯合株系, 它是 digalactosyldiacylglycerol (DGD) 合成酶基因的突变体。从 4 种基因型的拟南芥中共定量分析了 326 个代谢物, 通过主成分分析 (principal component analysis, PCA), 4 种基因型拟南芥呈现明显的区分。结果证明, 代谢组学可以作为一种非常有用的工具, 用来展示植物最终的代谢表型, 区分没有明显表型的突变体和野生型拟南芥, 进而为研究基因功能提供帮助。代谢表型不仅反映了遗传差异, 而且还反映环境对植物代谢的影响。传统中药材的真伪鉴别

关系到药材的疗效。本实验室采用 GC-MS 代谢组学方法结合 AFLP 分子标记的 DNA 多态性方法, 对传统中草药膜荚黄芪和蒙古黄芪进行区分, 同时鉴定一些潜在的代谢标识物^[22]。

代谢组与转录组数据结合可以预测功能基因。在研究硫饥饿的实验中, 发现一些和氨基酸、脂质、次生代谢产物 (如硫代葡萄糖苷、黄酮) 等相关的代谢物和基因发生了变化。通过批量学习、自组织图的方法, 分析了 10 000 个转录组数据 (DNA 芯片) 和 1 000 个代谢物, 这种分析预测了涉及到硫代葡萄糖苷生物合成的基因, 如编码磺基转移酶的基因^[23]、两个 MYB 转录调节因子^[24]、侧链延长相关的酶和一个假定的硫代葡萄糖苷转运体^[25]。

2.2 mQTL分析和mGWAS分析

重要的农艺性状, 如谷物产量、品质, 与作物的整体代谢密切相关。植物代谢及调节由遗传因素控制, 代谢物通常属于数量表型。然而, 基因和代谢物之间往往并不是直接对应的关系, 代谢物含量的动态变化还与环境有关。通过代谢物 QTL 研究, 解析代谢物的遗传位点是植物代谢组学最近几年的研究热点^[19,26]。Matsuda 等^[27]用 85 份 (*Oryza sativa* Sasanishiki×Habataki) 水稻回交自交系 (Back-crossed Inbred Lines), 采用 4 种分析方法 (CE-TOF/MS 分析离子型代谢物、GC-TOF/MS 分析初生代谢物、LC-IT-TOF/MS 分析脂质、LC-Q-TOF/MS 分析次生代谢产物) 分别对 2005 年和 2007 年种植的水稻进行检测, 共覆盖了 759 个代谢物信号, 其中 93 个代谢物通过标准品或数据库得到鉴定, 38 个代谢物通过一级质谱和二级质谱解析结构, 总共鉴定出 802 个 mQTLs。一些初生代谢物, 如角鲨烯 (squalene)、3- 氰丙氨酸 (3-cyanoalanine)、丙三醇 (glycerol)、天冬酰胺 (asparagine)、脂质 (lipids) 和一些次生代谢物具有相对较高的广义遗传力, 氨基酸在水稻第 3 号染色体上存在热点。结果显示, 水稻种子中大部分的化合物对环境比较敏感而有弱的 mQTLs, 黄酮类化合物则存在高的遗传控制力。

全基因组关联分析 (GWAS) 是用来检测全基因组范围内的常见遗传变异与可观性状之间遗传关联的一种方法。基于 GC-MS 的 mGWAS 方法已经在拟南芥^[28]、玉米^[29]、小麦^[30] 中有报道。Riedelsheimer 等^[29]研究了 289 份来自世界各地多样性的玉米品种, 这些材料拥有较高的 LD 值 ($r^2=0.1$ at~500 kb) 和 56 110 个 SNPs。采用 GC-MS 方法, 从这些自交系的叶片中检测到 118 个代谢物, 主要包括 21 个氨基

酸、13个有机酸、7个苯丙氨酸类, 其他20个已知代谢物和57个未知代谢物。通过GWAS分析发现, 26个化合物与SNPs紧密相关, 最大能解释32%的遗传变异率(平均值16.2%)。在9条染色体上共发现了15个明显的代谢物-SNP相关信号, 遗传变异解释都超过15%(平均值22.1%)。木质素的前体物质对羟基肉桂酸(*p*-Coumaric acid)、咖啡酸(caffeic acid)与第9号染色体上肉桂酰辅酶A还原酶(cinnamoyl-CoA reductase)有非常强的相关性(*P*-values $2.7 \times 10^{-10} \sim 3.9 \times 10^{-18}$)。此外, 这些前体还与木质素的含量、植物株高、干物质等具有明显的相关性。

2.3 GC-MS在植物抗逆、抗病反应研究中的应用

植物受到病原菌的侵染后会产生自身免疫应答反应, 代谢物在这种免疫反应中扮演着非常重要的角色。植物识别病原物以后, 细胞会进行一系列动员活动, 从而激活抗病反应, 抵挡病原菌的入侵。这种抗病反应需要来自初级代谢途径的大量能量、还原力和碳骨架, 以实现能量的补充和调度。相反, 病原菌侵入植物以后, 通常会干扰植物的正常代谢以满足其营养需求。通过对小麦和大麦不同抗性品种进行非目标性代谢谱分析, 获得一些与抗病性相关的标志代谢物, 这些标志性代谢物在生产实践中起到了辅助育种的作用^[31]。采用代谢组学研究方法, 对模式植物短柄草(*Brachypodium distachyon*)——水稻稻瘟菌(*Magnaporthe grisea*)互作系统进行了研究, 发现病原菌一旦成功侵入植物以后, 将会严重干扰植物的正常代谢以满足自身的营养吸收和利用, 抗、感性品种在病原菌入侵后代代谢谱的变化不同^[32]。

低温(冷和冻)对模式植物拟南芥代谢的影响研究较深入。Cook等^[33]使用GC-TOF/MS大规模研究拟南芥冷害的代谢应答途径, 实验比较了两种拟南芥生态型, Wassilewskija-2(Ws-2)和Cape Verde Islands-1(Cvi-1)(前者比后者更加耐冷)。总共分析了434种代谢物, 结果表明冷驯化与代谢组密切相关: 在Ws-2生态型中, 75%的代谢物在低温处理后含量增加; 在Cvi-1生态型中, 62%的代谢物在低温处理后含量增加; Cvi-1中91%含量增加的代谢物与Ws-2含量增加的代谢物一致。植物代谢组学在植物抗逆中的研究还有很多报道^[34]。

2.4 代谢组学在作物育种和生物技术上的应用

转基因育种的安全性一直是困扰该技术广泛应用的关键问题。代谢组学研究植物的全成分, 结合致敏反应和毒理反应实验, 可以综合评价转基因植

物(GM)的安全性^[35-36]。使用GC-MS靶向分析转基因土豆和它的栽培品种的代谢谱, 研究基因修饰对代谢的潜在影响, 研究覆盖了经济合作与发展组织(The Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD)所要求检测的成分, 如大多数可溶性碳水化合物、维生素C、总氮和有机酸。使用方差分析和主成分分析显示, GM系和对照之间没有明显且稳定的差异, 那些存在的差异也是随机的, 转基因植物代谢谱的变异范围存在于各种栽培品种之间^[37]。

作物的主要性状, 特别是营养、品质等性状已成为代谢组学研究的主要对象。代谢组学不仅能够鉴别引起甜、酸等口味的化合物成分, 而且在提高作物营养、品质及食品品质, 以及作物育种等方面有着很好的应用前景^[38]。

3 展望

随着植物代谢组学的迅猛发展, 各种分析方法不断更新, 基于GC-MS的代谢组分析方法在植物代谢组学研究中(特别是初生代谢物的研究中)具有非常重要的地位。目前在化合物结构鉴定、数据分析等方面还存在着技术瓶颈, 面临着多项挑战, 这些技术瓶颈和挑战也是植物代谢组学研究亟待攻克的目标。由于现阶段各种分析方法还存在偏好性, 因此, 在开展代谢组学研究之前, 需要选定合适的分析技术。在处理大规模的遗传代谢组学样本时, 仪器响应的波动、保留时间的漂移、海量数据的处理等方面尤其值得注意, 要将仪器分析的误差控制在较小的范围之内。随着更先进的分析仪器的出现, 多分析平台的综合运用, 多种组学数据的整合, 必将使得代谢组学分析更加全面、精确, 更加深入地应用到生命科学研究中去。

[参 考 文 献]

- [1] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological nmr spectroscopic data. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-9
- [2] Fiehn O, Kopka J, Dormann P, et al. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotech*, 2000, 18(11): 1157-61
- [3] Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(1-2): 155-71
- [4] Dixon RA, Strack D. Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. *Phytochemistry*, 2003, 62(6): 815-6
- [5] Griffin JL. Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern

- recognition analysis of body fluids and tissues for characterisation of xenobiotic toxicity and disease diagnosis. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7: 648-54
- [6] Bedair M, Sumner LW. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *Trends Anal Chem*, 2008, 27(3): 238-50
- [7] Dalglish CE, Horning EC, Horning MG, et al. A gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts. *Biochem J*, 1966, 101(3): 792-810
- [8] Koek M, van der Kloet F, Kleemann R, et al. Semi-automated non-target processing in GC × GC-MS metabolomics analysis: applicability for biomedical studies. *Metabolomics*, 2011, 7(1): 1-14
- [9] Fiehn O, Kopka J, Trethewey RN, et al. Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. *Anal Chem*, 2000, 72(15): 3573-80
- [10] Koek MM, Muilwijk B, van der Werf MJ, et al. Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*, 2006, 78(4): 1272-81
- [11] Smart KF, Aggio RB, Van Houtte JR, et al. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2010, 5(10): 1709-29
- [12] Villas-Boas SG, Delicado DG, Akesson M, et al. Simultaneous analysis of amino and nonamino organic acids as methyl chloroformate derivatives using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2003, 322(1): 134-8
- [13] Lisek J, Schauer N, Kopka J, et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc*, 2006, 1(1): 387-96
- [14] Li Y, Ruan Q, Li Y, et al. A novel approach to transforming a non-targeted metabolic profiling method to a pseudo-targeted method using the retention time locking gas chromatography/mass spectrometry-selected ions monitoring. *J Chromatogr A*, 2012, 1255(14): 228-36
- [15] Chen W, Gong L, Guo Z, et al. A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: application in the study of rice metabolomics. *Mol Plant*, 2013, 6(6): 1769-80
- [16] Robinson MD, De Souza DP, Keen WW, et al. A dynamic programming approach for the alignment of signal peaks in multiple gas chromatography-mass spectrometry experiments. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 419
- [17] 漆小泉, 王玉兰, 陈晓亚. 植物代谢组学-方法与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011
- [18] Nicholson JK, Lindon JC. Metabonomics. *Nature*, 2008, 455(23): 1053-6
- [19] Keurentjes JJ, Fu J, de Vos CH, et al. The genetics of plant metabolism. *Nat Genet*, 2006, 38(7): 842-9
- [20] Saito K, Matsuda F. Metabolomics for functional genomics, systems biology and biotechnology. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 463-89
- [21] Schauer N, Fernie AR. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(10): 508-16
- [22] Duan LX, Chen TL, Li M, et al. Use of the metabolomics approach to characterize chinese medicinal material huangqi. *Mol Plant*, 2012, 5(2): 376-86
- [23] Hirai MY, Klein M, Fujikawa Y, et al. Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in arabidopsis by integration of metabolomics and transcriptomics. *J Biol Chem*, 2005, 280(27): 25590-5
- [24] Hirai MY, Sugiyama K, Sawada Y, et al. Omics-based identification of arabidopsis myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(15): 6478-83
- [25] Sawada Y, Toyooka K, Kuwahara A, et al. Arabidopsis bile acid: sodium symporter family protein 5 is involved in methionine-derived glucosinolate biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(9): 1579-86
- [26] Fernie AR, Schauer N. Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? *Trends Genet*, 2009, 25(1): 39-48
- [27] Matsuda F, Okazaki Y, Oikawa A, et al. Dissection of genotype-phenotype associations in rice grains using metabolome quantitative trait loci analysis. *Plant J*, 2012, 70(4): 624-36
- [28] Chan EK, Rowe HC, Hansen BG, et al. The complex genetic architecture of the metabolome. *PLoS Genet*, 2010, 6(11): e1001198
- [29] Riedelsheimer C, Lisek J, Czedik-Eysenberg A, et al. Genome-wide association mapping of leaf metabolic profiles for dissecting complex traits in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(23): 8872-7
- [30] Hill CB, Taylor JD, Edwards J, et al. Whole-genome mapping of agronomic and metabolic traits to identify novel quantitative trait loci in bread wheat grown in a water-limited environment. *Plant Physiol*, 2013, 162(3): 1266-81
- [31] Hamzehzarghani H, Kushalappa AC, Dion Y, et al. Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against fusarium head blight. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2005, 66(4): 119-33
- [32] Parker D, Beckmann M, Zubair H, et al. Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *magnaporthe grisea*. *Plant J*, 2009, 59(5): 723-37
- [33] Cook D, Fowler S, Fiehn O, et al. A prominent role for the *cbf* cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(42): 15243-8
- [34] Shanker AK, Venkateswarlu B. Abiotic stress in plants - mechanisms and adaptations[M]. Croatia: InTech, 2011: 440
- [35] Simo C, Ibanez C, Valdes A, et al. Metabolomics of genetically modified crops. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(10): 18941-66
- [36] Rischer H, Oksman-Caldentey KM. Unintended effects in genetically modified crops: revealed by metabolomics? *Trends Biotechnol*, 2006, 24(3): 102-4
- [37] Shepherd LV, McNicol JW, Razzo R, et al. Assessing the

potential for unintended effects in genetically modified potatoes perturbed in metabolic and developmental processes. Targeted analysis of key nutrients and anti-nutrients. *Transgenic Res*, 2006, 15(4): 409-25

[38] Cevallos-Cevallos JM, Reyes-De-Corcuera JI, Etxeberria E, et al. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends Food Sci Tech*, 2009, 20(11-12): 557-66