



Análise comparativa por GC-MS do Metaboloma de grãos de Triticale e Triticaria na Fase de Maturação da Cera

Koluntaev D.A. (e-mail para contato - Koluntaev@q-tek.me), Shchuklina O.A., Soloviev A.A.



Resumo

O estudo apresenta uma análise da abordagem metabolômica não-alvo, com foco nas principais etapas envolvidas na comparação do metaboloma do grão de triticale (linhagem L8665) com o grão de triticaria (linhagem M116) durante a fase de maturação da cera. A utilização de um sistema CG-MS permite a identificação de vários metabólitos, facilitando assim a detecção de diferenças na via metabólica, especificamente no metabolismo do glioxilato e da carboxilase, entre os grãos de triticale e triticaria. Esta investigação abrangente da composição do metaboloma desempenha um papel crucial na identificação dos fatores responsáveis pela formação de indicadores de qualidade dos grãos.

Palavras-chave: Triticale; Triticaria; Metabolômica; Cromatografia Casosa-Cspectrometria de Cassa (CG-MS), Análise da via Metabólica.

Índice.....	2
Resumo e Introdução.....	3
Introdução e Preparação.....	4
Materiais e Métodos.....	5
Resultados.....	6
Conclusão.....	12
Bibliografia.....	13

Introdução

Os metabólitos das plantas são os produtos finais da expressão gênica, e a combinação de metabólitos de baixo peso molecular, incluindo substratos, intermediários e produtos de reações bioquímicas, na verdade, fornece informações sobre como as alterações nos genes estão associadas a alterações na função biológica da planta em estudo. O estudo dos metabólitos é de interesse para o gerenciamento do melhoramento de plantas, aumentando o rendimento e a qualidade das colheitas, elucidando a função dos genes, a genotipagem, a avaliação da adaptação das plantas às condições ambientais, bem como para outras áreas.

Na química analítica, há duas abordagens para o estudo de metabólitos: direcionada e não direcionada. Cada abordagem tem suas vantagens, áreas de aplicação, bem como limitações. A metabolômica direcionada permite apenas a análise qualitativa e quantitativa de um número estritamente limitado de metabólitos direcionados. Mas essa abordagem exige padrões analíticos de alta pureza. A metabolômica não direcionada é uma análise geral de todos os metabólitos, inclusive os desconhecidos, portanto, essa análise não pode ser quantitativa em relação a todos os metabólitos de uma só vez [1]. As abordagens de análise não direcionadas são mais baseadas em hipóteses, pois não dependem de um conjunto conhecido predeterminado de compostos, mas levam em conta todos os sinais detectados.

O principal problema da abordagem analítica na metabolômica é a dificuldade de construir um perfil metabólico completo devido à enorme diversidade química dos componentes do metaboloma e aos recursos limitados das ferramentas analíticas usadas para identificá-los de forma confiável. O metaboloma inclui um grande número de compostos, em particular, com base em dados da literatura, os representantes do reino vegetal podem conter de 100.000 a 200.000 metabólitos diferentes [2, 3] e outros eucariotos - de 4.000 a 20.000 [4]. Obviamente, é difícil obter a cobertura completa do metaboloma por um único método analítico, embora seja importante estudar os fenótipos dos sistemas vivos [5]. Portanto, é necessário integrar a abordagem metabólica em uma cadeia de estudos analíticos por meio de diferentes métodos de análise instrumental e espectral [6, 7].

A cromatografia gasosa (CG) em combinação com vários métodos de detecção de espectrometria de massa (MS) (filtro de massa quadrupolo (Q), filtro de massa de tempo de voo (TOF), armadilha orbital) é considerada o "padrão ouro" no campo da metabolômica [8]. A alta sensibilidade, a seletividade e a capacidade de obter informações abrangentes sobre centenas de compostos em uma única análise tornam o CG-MS uma solução ideal, especialmente para a metabolômica não direcionada.

O uso da ionização de elétrons para fragmentação de moléculas nesses sistemas resulta em espectros de massa estritamente específicos, estáveis e altamente informativos para cada composto detectado. Tudo isso contribuiu ao mesmo tempo para o desenvolvimento de bibliotecas de espectros de massa apropriadas para a identificação rápida e confiável de compostos orgânicos, inclusive metabólitos. Atualmente, essas bibliotecas contêm registros de várias centenas de milhares de compostos de baixo peso molecular de vários campos da química analítica (NIST, Wiley, GMD, etc.).

Nota Técnica

Introdução

O triticale é um valioso grão, alimento e cultura técnica. É um anfidiplóide de trigo-centeio obtido pela combinação de complexos cromossômicos de trigo e centeio [9]. A análise do metaboloma do triticale é um dos pré-requisitos para a criação de variedades altamente produtivas de culturas agrícolas adaptadas a condições climáticas específicas e resistentes a fatores ambientais adversos [10]. Embora o triticale seja uma cultura desenvolvida há relativamente pouco tempo, ele já tem uma grande participação na produção de grãos.

O principal uso do triticale está associado à produção de ração animal e matérias-primas para a produção de álcool; em pequena escala, o grão de triticale é usado para fins alimentícios [9]. A agricultura sustentável exige o desenvolvimento de variedades adaptadas às diversas condições climáticas e de cultivo locais. Atualmente, o melhoramento do triticale tem como objetivo principal aumentar a produtividade, melhorar as características alimentares e a resistência a estresses bióticos e abióticos, com ênfase especial na resistência ao acamamento [13-16].

Um estudo abrangente da composição do metaboloma do grão de triticale pode nos permitir identificar e propor os indicadores de qualidade do grão e ajustar seus programas de melhoramento. Em particular:

- estabelecimento de padrões de mudanças metabólicas em vários estágios da ontogênese.
- relação da resistência da variedade a fatores de estresse biótico e abiótico com características metabólicas, inclusive para direcionar o desenvolvimento de métodos eficazes para seu diagnóstico, bem como o desenvolvimento do conceito e do "modelo do metaboloma de uma variedade estável".
- busca de padrões e elucidação de processos fundamentais (bioquímicos) que ocorrem durante o cultivo e a reprodução, uma vez que a compreensão dos processos é a maneira de gerenciá-los.

Neste trabalho, é apresentada uma abordagem metabolômica não direcionada para analisar as diferenças no metaboloma do grão de triticale em comparação com o grão de tritrigia por CG-MS Single Quadruplo (Q-Tek, Montenegro), aprimorada com a plataforma de software MetaboAnalyst para processamento de dados metabólicos de alto desempenho para identificar disparidades nas vias metabólicas entre os dois tipos de grãos [17, 18].

Nota Técnica

Materiais e Métodos

Os grãos no estágio de maturação da cera da linhagem de triticale de primavera L8665 e da linhagem de trititrigia M116 foram usados como objetos de pesquisa.

As amostras experimentais foram fixadas em nitrogênio líquido, extraídas com metanol frio e centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos. Uma mistura de água e clorofórmio (2:1) foi introduzida no eluato obtido após a centrifugação e, em seguida, a mistura foi centrifugada novamente. A camada orgânica foi coletada e evaporada até a secura em temperatura ambiente no evaporador rotativo Eppendorf (5301) por 4 horas.

Antes de injetar a amostra no CG-MS, 20 µl de solução de cloridrato de metoxiamina em piridina foram adicionados ao resíduo seco resultante e colocados por 180 minutos em um termostato a 30°C para derivatizar os cetogrupos. Em seguida, 80 µl do reagente de derivatização MSTFA foram adicionados à mistura resultante e mantidos por 30 minutos em um termostato a 30 °C para substituir o hidrogênio nos grupos hidroxila por resíduos de -TMS. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, a amostra foi transferida para um frasco do amostrador automático de CG, deixada em repouso por pelo menos 1 hora e foram adicionados 900 µl de hexano. 1 µl da amostra foi injetado no sistema Q-Tek CG-MS (no modo splitless [Sem divisão]).

O hélio foi usado como gás de arraste, com uma taxa de fluxo de 1,1 ml/min. Uma coluna cromatográfica do tipo Mega- 5MS (30 m x 250 microns; 250 microns) foi usada para separar os metabólitos. O forno do CG foi programado da seguinte forma: temperatura inicial de 70°C por 2 minutos, depois aquecimento a 300°C, a 10°C/min, e manutenção da temperatura final por 8 minutos. A temperatura da linha de transferência do CG-MS foi ajustada em 250°C, a temperatura da fonte de íons foi ajustada em 230°C. A faixa de varredura do filtro de massa quadrupolo foi ajustada para 50-550 Da. Os cromatogramas TIC obtidos de duas amostras de grãos são mostrados nas Figuras 1 e 2.

O processamento inicial dos dados e a integração automática dos cromatogramas obtidos foram feitos no software CG-MS Qtek antes da exportação dos dados (Maestro-Analytic). A deconvolução foi realizada no software AMDIS (<http://www.amdis.net>), seguida pela identificação do composto com o banco de dados de espectro de massa comercial NIST17.

Para aumentar a confiança na identificação de compostos, foram usados índices de retenção linear (RI). O RI foi determinado com base no padrão de hidrocarbonetos saturados (C10-C40). A interpretação quantitativa do perfil metabolômico foi realizada pelas áreas de pico da corrente total de íons.

O processamento de dados estatísticos foi realizado por meio de métodos estatísticos multivariados no software MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>).

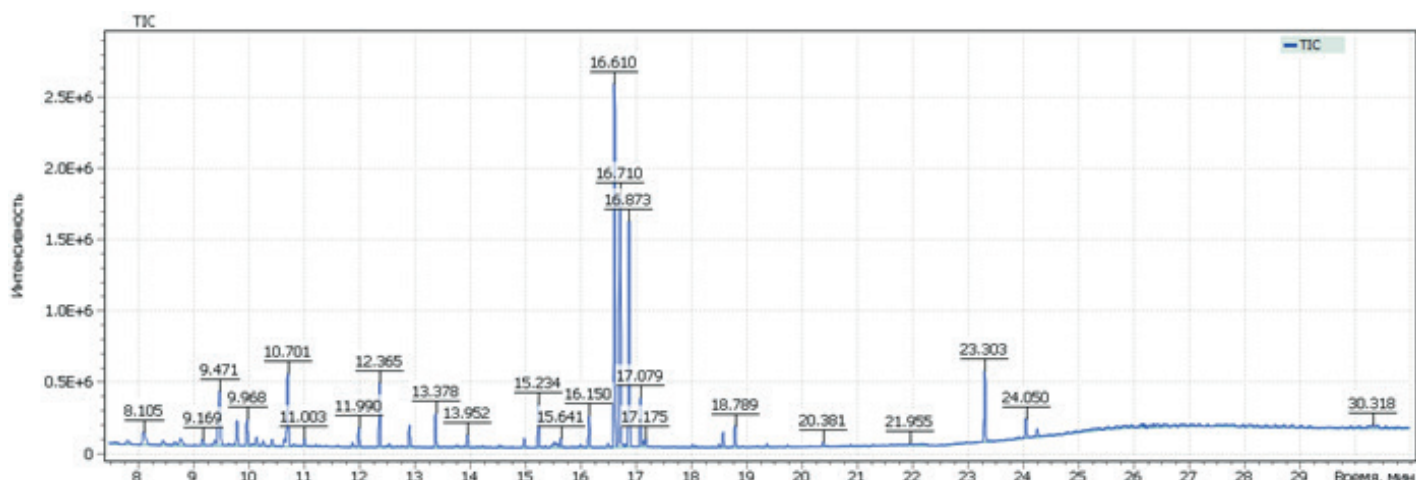


Fig. 1 O perfil do extrato de grãos de triticale da primavera (L8665).

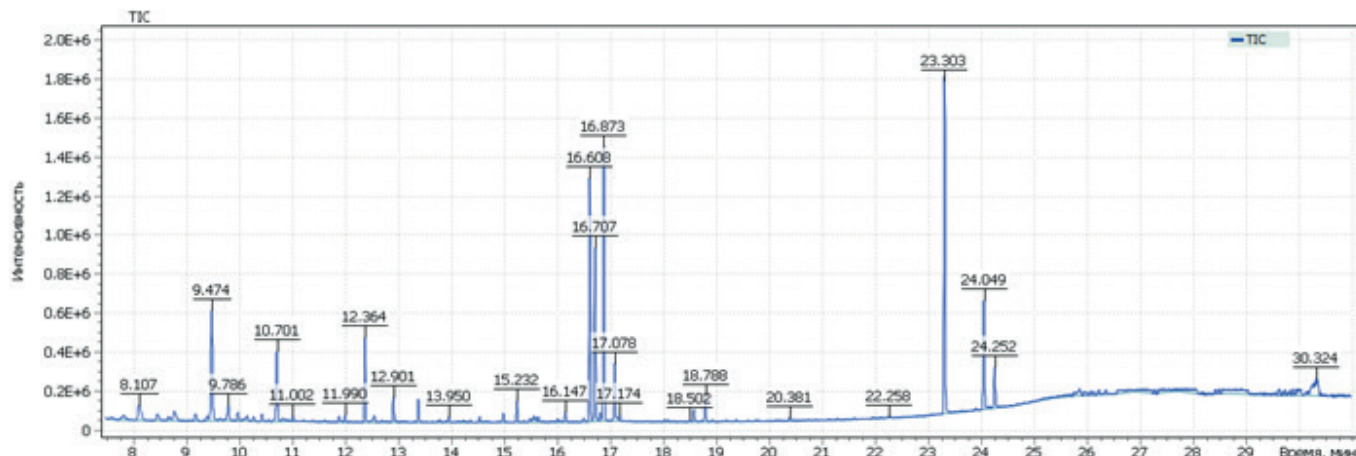


Fig. 2. O perfil do extrato de grãos de trititrigia (M116).

■ Resultados

Os perfis cromatográficos de dois grupos de grãos foram considerados bastante semelhantes, apesar de sua origem distante - no primeiro caso, o trigo e o centeio são os progenitores, enquanto no segundo, a grama de trigo desempenha esse papel. Em ambas as amostras foram identificados aminoácidos (8 componentes), ácidos carboxílicos (8 componentes), álcoois (5 componentes), ácidos graxos (2 componentes), monossacarídeos (11 componentes), dissacarídeos (2 componentes), compostos de outros grupos e não identificados (12 componentes). Obviamente, sem uma análise profunda e detalhada, é difícil identificar quaisquer diferenças significativas no metabolismo dessas duas amostras. Portanto, recorre-se com mais frequência a métodos de comparação estatística de experimentos para identificar padrões não óbvios com significância estatística calculada.

No início do perfil metabólico, os dados foram normalizados pela mediana e foi aplicado o escalonamento por Pareto. Em seguida, os metabólitos mais distintos dos grupos foram isolados com sua significância estatística. Inicialmente, o método de análise de componentes principais (PCA) (Fig. 3) e a análise discriminante de projeções ortogonais em estruturas ocultas (OPLS-DA) (Fig. 3) foram usados para avaliar a tendência dos dois grupos em consideração.

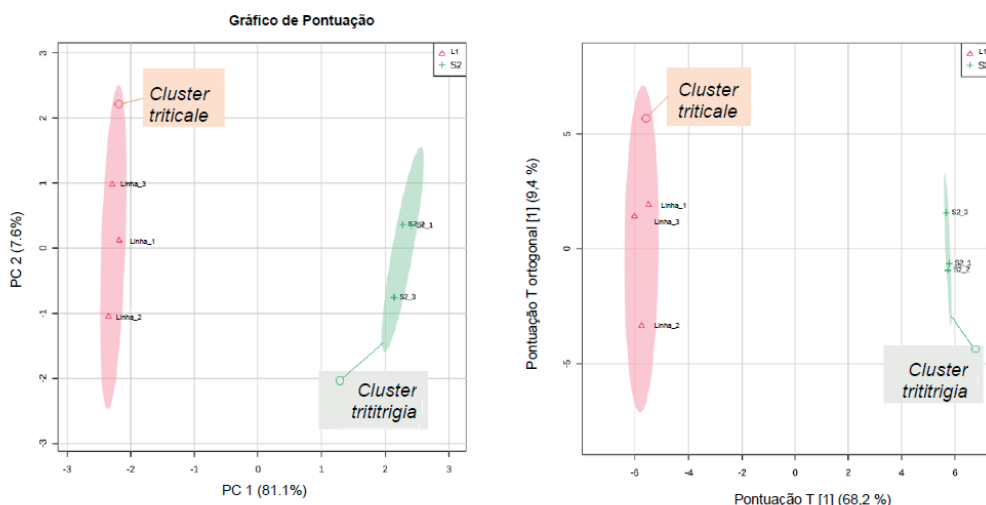


Fig. 3 À esquerda: Distribuição dos grupos estudados usando o método de componentes principais (PCA). À direita: Diagrama do método de análise discriminante de projeções ortogonais em estruturas ocultas (OPLS-DA).

Resultados

Para identificar as características que mais influenciam as diferenças entre os dois grupos de pesquisa, adotou-se o método de teste A/B. Nesse método, um dos objetos de teste é designado como controle e comparado com o objeto testado com base em um conjunto de características, avaliadas por meio de métricas quantitativas. Um gráfico de dispersão (*volcano slot* [abertura de vulcão]) é usado como o diagrama resultante dessa abordagem para combinar a medida de significância estatística (valor p) e o intervalo de mudanças (*Fold Change* [modulação]), para visualização rápida das diferenças.

As amostras de teste nos experimentos de CG-MS servem como objetos de análise, com suas características distintas sendo representadas por uma coleção de picos integrados nos cromatogramas. Esses valores de área de pico integrado, obtidos dos cromatogramas de Íons Totais (TIC), são utilizados como uma medida quantitativa. A Figura 4 exibe o diagrama de gráfico de vulcão que compara o tritcale da linhagem L8665 e a trititrigia da linhagem M116, mostrando os resultados da pesquisa conduzida pelos dois grupos respectivos. Ao interpretar os resultados apresentados no diagrama, fica evidente que os pontos vermelhos e azuis exibem faixas substanciais de variação e possuem alta significância estatística. Esses atributos os estabelecem como indicadores confiáveis de disparidades entre os objetos sob investigação. Por outro lado, os pontos cinzas, apesar de possuírem um nível notável de significância, não devem ser considerados marcadores confiáveis de diferença se seu intervalo de variações for inferior a 2 ($\log_2 = 1,2$).

A Tabela 1 apresenta uma compilação dos principais metabólitos isolados, que devem servir de referência para a avaliação e apreciação da convergência dos grupos examinados no próximo período.

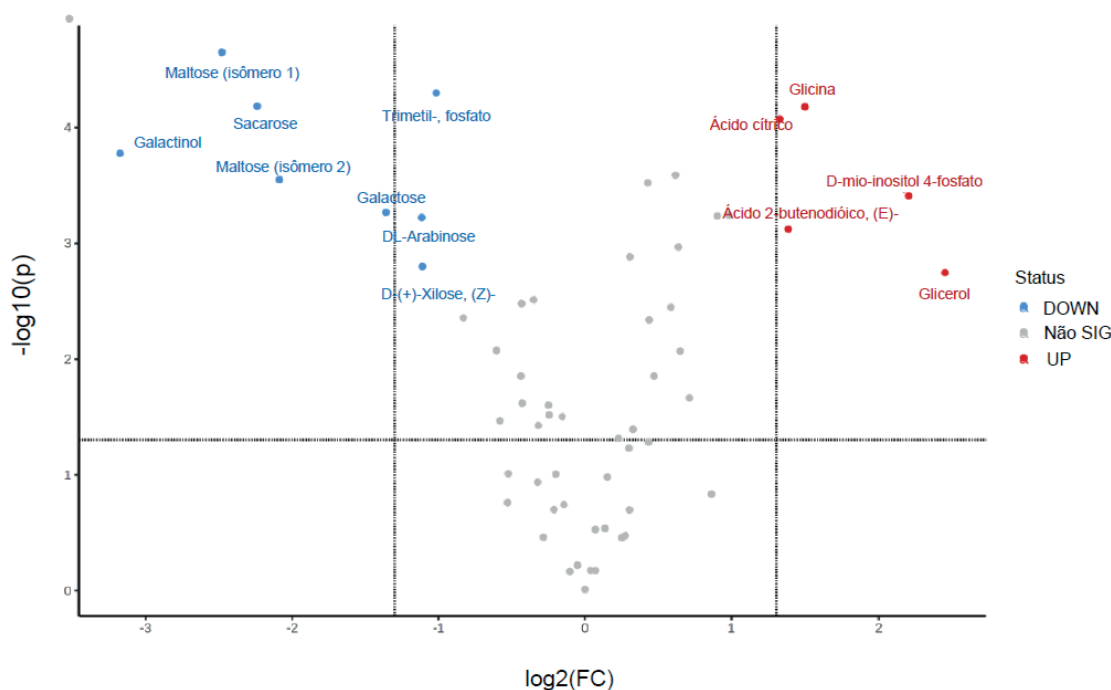


Fig. 4 Um diagrama de pontos comparando a composição do metaboloma nos grupos.

Resultados

Tabela 1. O diagrama de pontos de comparação revela uma distinção na lista de metabólitos isolados entre os dois grupos de plantas em estudo.

Lista de metabólitos	Fórmula	FC	log2(FC)	raw.pval	(-lg(p))
Maltose (isômero 1)	$C_{12}H_{22}O_{11}$	0,17907	-2,4814	$2.24E^{-5}$	4,6493
Trimetil fosfato	$(CH_3)_3PO_4$	0,49437	-1,0163	$5.04E^{-5}$	4,2975
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	0,21162	-2,2405	$6.55E^{-5}$	4,1836
Glicina	$C_2H_5NO_2$	2,8165	1,4939	$6.65E^{-5}$	4,1772
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7$	2,5011	1,3226	$8.48E^{-5}$	4,0718
Galactinol	$C_{12}H_{22}O_{11}$	0,11069	-3,1754	$1.68E^{-4}$	3,7751
Maltose (isômero 2)	$C_{12}H_{22}O_{11}$	0,23535	-2,0871	$2.83E^{-4}$	3,5481
D-mio-inositol-4-fosfato	$C_6H_{13}O_9P$	4,6057	2,2034	$3.90E^{-4}$	3,4092
Galactose	$C_6H_{12}O_6$	0,38962	-1,3599	$5.41E^{-4}$	3,2665
DL - Arabinose	$C_5H_{10}O_5$	0,46142	-1,1158	$6.01E^{-4}$	3,2213
Ácido 2-butenodióico, (E)-	$C_4H_4O_4$	2,6046	1,381	$7.56E^{-4}$	3,1217
D-(+)-Xilose, (Z)-	$C_5H_{10}O_5$	0,46288	-1,1113	$1.59E^{-3}$	2,7995
Glicerol	$C_3H_8O_3$	5,4692	2,4513	$1.80E^{-3}$	2,7458

Para validar a precisão da seleção de compostos, foi empregada a análise discriminante de projeções ortogonais em estruturas ocultas. Além disso, um gráfico de dispersão S foi construído com base nessa análise (Fig. 5a). Em seguida, foi realizado o teste t de Student ou o teste U de Mann-Whitney nos recursos escolhidos, dependendo da normalidade da distribuição dos dados.

Essa etapa teve como objetivo identificar características com um [valor de p abaixo de 0,05.

Os resultados desses cálculos foram apresentados como um gráfico que ilustra a importância da variável na projeção, conhecida como pontuação VIP. A pontuação VIP reflete a importância da variável na análise discriminante, bem como sua correlação com as respostas e a importância na projeção. Ao combinar essa análise com a análise dispersão S, conseguimos confirmar a maioria dos compostos potencialmente significativos estatisticamente identificados anteriormente que caracterizam as diferenças no metaboloma.

Para uma investigação estatística mais aprofundada, foram considerados os compostos com uma pontuação VIP superior a 1 (Fig. 5). Consequentemente, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os perfis metabolômicos dos grãos de tritcale e trititrigia no estágio de maturação da cera (Tabela 2).

Resultados

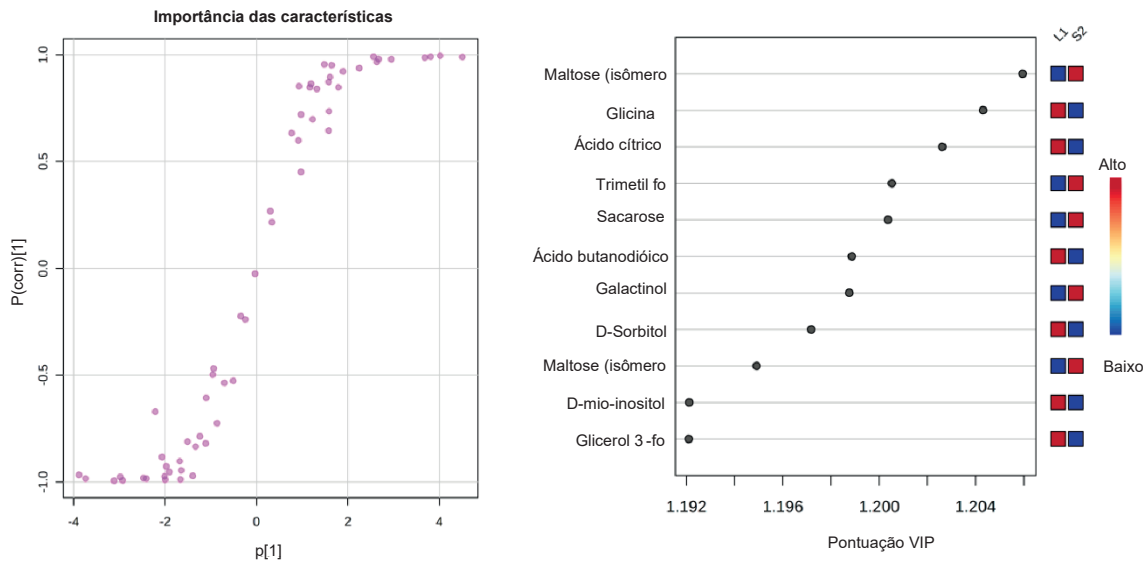


Fig. 5 À esquerda O diagrama de dispersão S, derivado da análise discriminante de projeções ortogonais em estruturas ocultas (OPLS-DA) do metaboloma de amostras de grãos de tritcale e trititrigia, revela componentes potencialmente significativos no modelo OPLS-DA. À direita: O gráfico ilustra a importância da variável na projeção por meio da pontuação VIP.

Tabela 2. A lista de metabólitos distintos nos grupos tritcale e trititrigia obtida por meio da implementação de dois métodos de análise estatística no MetaboAnalyst.

Lista de metabólitos	Fórmula	VIP [t]	VIP [orto-t]
Maltose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	1,20595	0,272271
Glicina	$C_2H_5NO_2$	1,2043	0,336429
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7$	1,20261	0,362339
Fosfato de trimetila	$(CH_3)_3PO_4$	1,20053	0,015575
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	1,20036	0,273631
Ácido butanodióico	$C_4H_6O_4$	1,19887	0,296376
Galactinol	$C_{12}H_{22}O_{11}$	1,19876	0,043346
D-Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	1,19718	0,414953
D-mio-inositol-4-fosfato	$C_6H_{11}O_9P$	1,19211	0,532071
Glicerol 3-Fosfato	$C_3H_9O_6P$	1,19209	0,282619

Nota Técnica

O Enriquecimento e a Identificação de Potenciais vias Metabólicas

Com base na compilação de metabólitos isolados, que apresentaram variações significativas entre as culturas, foram distinguidas quatro categorias principais de metabólitos. Essas categorias foram ainda classificadas em 7 subclasses com base no sistema de classificação de metabólitos da plataforma RefMet. A maioria dos metabólitos se enquadrava nas categorias de carboidratos (três subclasses) e ácidos orgânicos (quatro subclasses).

Um exame mais aprofundado das vias metabólicas no software MetaboAnalyst permitiu a identificação de aproximadamente 16 vias metabólicas potenciais (Fig. 6) associadas a um conjunto específico de metabólitos significativos.

No entanto, apenas três dessas vias demonstraram uma probabilidade de abranger mais de 10% do conjunto total de metabólitos. Essas vias incluem o metabolismo da galactose, o metabolismo do ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo do citrato) e o metabolismo do glioxilato e do dicarboxilato. As vias metabólicas específicas selecionadas para análise são apresentadas na Tabela 3.

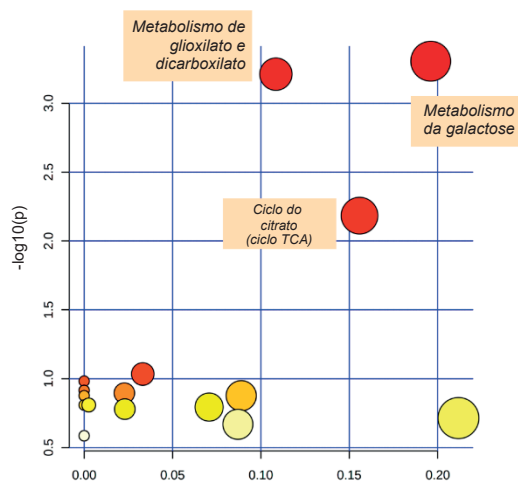


Fig. 6 Gráfico do efeito de compostos isolados nas vias metabólicas (<https://www.genome.jp/kegg/>).

Tabela 3. vias metabólicas mais associadas a metabólitos isolados.

A via metabólica	Status de conformidade	Valor P	log(p)	Holm p	FDR	Impacto
Metabolismo da galactose	4/27	2.120E-5	4,674	0,002	0,0020	0,196
Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato	3/29	8.655E-4	3,063	0,081	0,0411	0,108
Ciclo do Citrato (ciclo PDCA)	2/20	8.120E-3	2,091	0,755	0,2570	0,156

O Enriquecimento e a Identificação de Potenciais vias Metabólicas

Um exame aprofundado das vias selecionadas revelou uma discrepância entre os grupos estudados apenas na via do metabolismo do glicoxilato e do dicarboxilato, que serve principalmente para a síntese de carboidratos. Os metabólitos associados ao ciclo do citrato (TCA) também participam dessa via. Entretanto, o TCA compreende uma série de oito enzimas que facilitam a descarboxilação oxidativa do piruvato e do malato (ácido málico). Nesse processo, o (2S)-malato quiral é gerado na conclusão de todo o ciclo, onde é posteriormente oxidado pela malato desidrogenase para formar oxaloacetato e $\text{NADH} + \text{H}^+$.

Essa reação conclui efetivamente o ciclo do citrato. Consequentemente, a intensidade do sinal do ácido málico no perfil do cromatograma deve corresponder à disparidade nas respostas do citrato e do succinato em relação ao grupo de estudo. No entanto, esse efeito não é observado, pois o ácido málico não foi identificado como um metabólito estatisticamente significativo. Isso é confirmado ainda mais por sua concentração média em ambos os grupos de amostras analisadas (Figura 7).

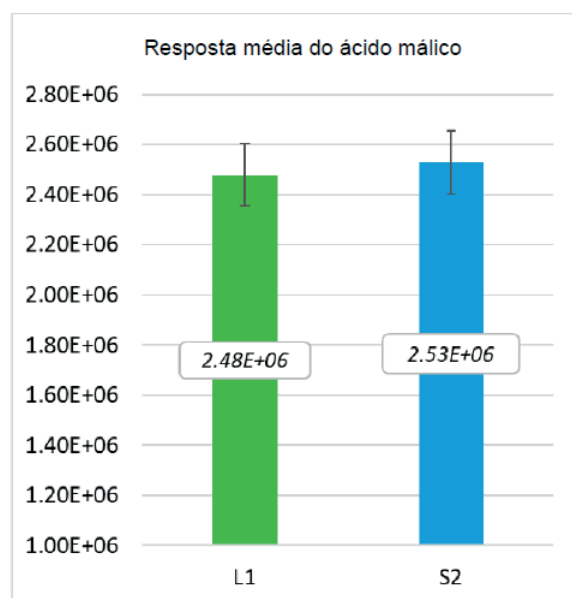


Fig. 7. Resposta média dos compostos de ácido málico nos perfis cromatográficos em ambos os grupos de estudo: L1 – L8665, S2 – M116.

Outras considerações sobre as diferenças no metabolismo da galactose foram desconsideradas devido às variações na distribuição dos metabólitos associados dentro dos grupos. Especificamente, verificou-se que a resposta de sacarose e galactose foi maior na amostra de trititrigia (S2 - M116) em comparação com a amostra de triticales (L1 - L8665). Por outro lado, os compostos D-sorbitol e mio-inositol apresentaram uma presença significativa na amostra de triticales (L1 - L8665). Consequentemente, com base nessa observação, não é possível inferir quaisquer dissimilaridades nos grupos estudados ao longo do caminho do metabolismo da galactose (Fig. 8).

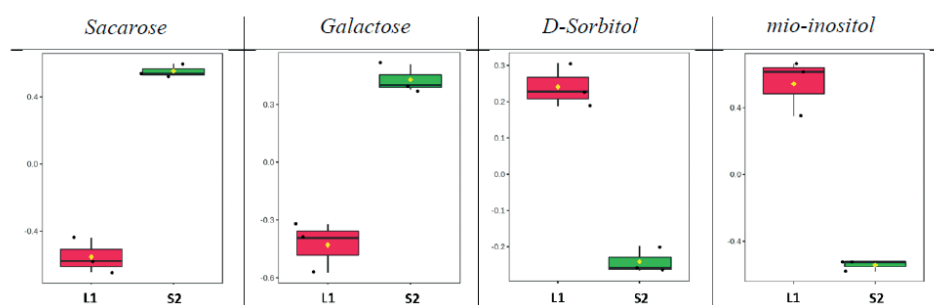


Fig. 8 O intervalo de distribuições das áreas de pico de metabólitos característicos integrados no perfil TIC, com os dados normalizados. Especificamente, o diagrama ilustra os valores de L1 a L8665 e S2 a M116.

Nota Técnica

O Enriquecimento e a Identificação de Potenciais vias Metabólicas

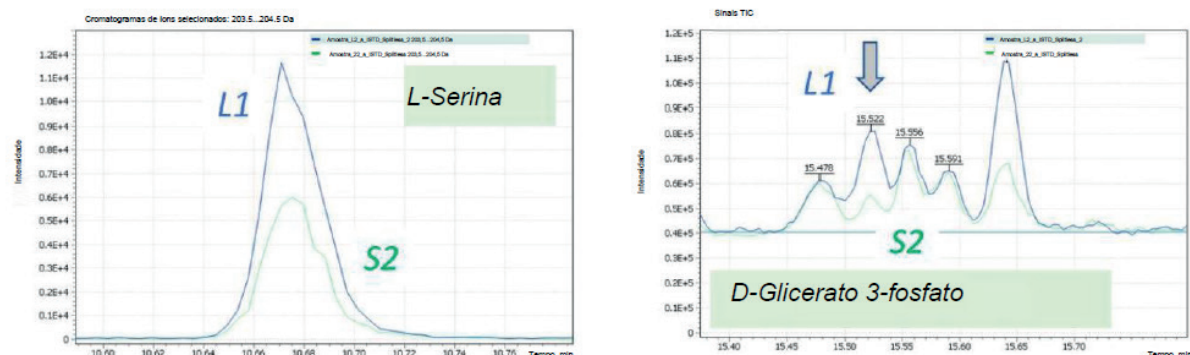


Fig. 10. Os sinais sobrepostos para compostos de L-serina e 3-fosfoglicerato em dois grupos.

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que a utilização do CG-MS Single Quadrupolo da Qtek, seguida do processamento de dados do metabólito usando técnicas de estatística multivariada, permite a identificação de determinadas alterações metabolômicas que ocorrem durante o crescimento do grão nas plantas examinadas. Essa abordagem também ajuda a compreender o comportamento geral de pequenas moléculas na composição do objeto. Consequentemente, o estudo construiu com sucesso um modelo que ilustra o envolvimento de metabólitos isolados no metabolismo de glioxilato e dicarboxilato. A atividade aumentada desta via resulta em grãos de triticales (L8665) que possuem um teor aumentado de carboidratos, o que é uma característica de melhoramento significativa.

Em conclusão, uma análise comparativa concisa destaca que o perfil metabolômico é uma grande promessa como método altamente sensível. Porém, fica evidente que a busca por marcadores bioquímicos depende da padronização de métodos de cultivo, preparo de amostras e posterior análise. Além disso, abordagens unificadoras são necessárias para alcançar progressos substanciais nos estudos genômicos e transcriptômicos. A expansão das investigações metabolômicas pode contribuir muito para uma compreensão mais profunda das questões da taxonomia vegetal.

Bibliografia

1. Goncharov N. V., Ukolov A. I., Orlova T. I., Migalovskaia E. D., Voitenko N. G. Metabolomics: on the Way to Integration of Biochemistry, Analytical Chemistry, and Informatics. [Metabolômica: a caminho da integração da bioquímica, química analítica e informática.] *Advances in Current Biology*. 2015;135(1):3–17.
2. Oksman-Caldentey KM., Inzé D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. [Fábricas de células vegetais na era pós-genômica: novas maneiras de produzir metabólitos secundários projetados.] *J. Trends Plant Sci.* 2004; 9(9):433–40. DOI 10.1016/j.tplants.2004.07.006.
3. Last R., Jones A., Shachar-Hill Y. Towards the plant metabolome and beyond. [Em direção ao metaboloma da planta e além.] *J. Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8, 167–174. DOI 10.1038/nrm2098.
4. Fernie A.R., Trethowey R.N., Krotzky A., Willmitzer L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. [Perfil metabólico: do diagnóstico à biologia de sistemas.] *J. Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2004; (5):763–769. DOI 10.1038/nrm1451.
5. Yanes O., Tautenhahn R., Patti G.J., Siuzdak G. Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. [Expandindo a cobertura do metaboloma para perfil metabólico global.] *J. Anal Chem.* 2011; 83(6):2152–2161. DOI 10.1021/ac102981k.
6. Dunn W.B., Bailey N.J., Johnson H.E. Measuring the metabolome: current analytical technologies. [Medindo o metaboloma: tecnologias analíticas atuais.] *J. Analyst.* 2005; 130(5):606–625. DOI 10.1039/b418288j.
7. Dunn W., Broadhurst D., Begley P. et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. [Procedimentos para perfil metabólico em larga escala de soro e plasma usando cromatografia gasosa e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.] *J. Nat Protoc.* 2011; 6(7):1060–1083. DOI 10.1038/nprot.2011.335.
8. Li, M., Wang, X. R. Peak alignment of gas chromatography–mass spectrometry data with deep learning. [Alinhamento de pico de dados de cromatografia gasosa – espectrometria de massa com aprendizado profundo.] *J. Chromatography A.* 2019; 1604:460–476.
9. Grabovets A.I., Krokhmal A.V. Triticale. Monograph. [Monografia.] ‘Yug’ Publishing House LLC., 2018.
10. Kroupin, P., Chernook, A., Karlov, G., Soloviev, A., Divashuk, M. Effect of Dwarfing Gene Ddw1 on Height and Agronomic Traits in Spring Triticale in Greenhouse and Field Experiments in a Non-Black Earth Region of Russia. [Efeito do Gene de Nanismo Ddw1 na Altura e Características Agronômicas de Trigo-Triticale de Primavera em Experimentos em Estufa e Campo em uma Região de Terra Não-Preta da Rússia.] *J. Plants (Basel, Switzerland).* 2019; 8(5):131. DOI 10.3390/plants8050131
11. Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas. Banco de dados estatístico FAOSTAT. [Rome]: FAO, 1997.
12. Results of the All-Russian Agricultural Census. [Resultados do Censo Agrícola de Toda a Rússia.] Russian Federal State Statistic Service. [Serviço de Estatística do Estado Federal Russo.] Volume 4, Livro 1.
13. Rubets, V.S.; Igonin, V.N.; Pylnev, V.V. Breeding of winter hexaploid triticale in RSAU –MAA named after K.A. Timiryazev: [Criação de triticale hexaplóide de inverno em RSAU –MAA em homenagem a K.A. Timiryazev:] History, features, results Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy (TAA). [História, características, resultados Izvestiya da Timiryazev Agricultural Academy (TAA).] 2014; (1):115–124.
14. Medvedev A.M.; Poma N.G.; Osipov V.V.; Zhiharev S.A. The stability of winter triticale against lodging in connection with stem height, resistance to stress factors and productivity. [A estabilidade do triticale de inverno ao acamamento está relacionada à altura do caule, resistência a fatores de estresse e produtividade.] *J. Legumes and Groat Crops.* 2016;(2):40–47.
15. Skatova, S.E.; Tyslenko, A.M. The selection of varieties of the spring triticale for the stability of crop production as a factor of sustainable feed production. [A seleção de variedades de triticale de primavera para a estabilidade da produção agrícola como fator de produção sustentável de rações.] *J. Legumes and Groat Crops.* 2017; (2):106–110.
16. Kovtunenkov, V.; Bespalova, L.; Panchenko, V.; Kalmysh, A. The direction and results of triticale breeding in the Krasnodar State Research Institute for Agriculture Behalf of P. Lukyanenko. [A direção e os resultados do melhoramento de triticale no Instituto de Pesquisa Agrícola do Estado de Krasnodar, em nome de P. Lukyanenko.] *J. Proc. Kuban State Agrar. Univ.* 2017; (1):115–120. DOI: 10.21515/1999-1703-66-115-120
17. Xia J., Wishart D. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. [Inferência baseada na Web de padrões biológicos, funções e caminhos a partir de dados metabolômicos usando MetaboAnalyst.] *J. Nat Protoc.* 2011; 6(6):743–760. DOI 10.1038/nprot.2011.319
18. Xia J., Wishart D.S. Metabolomic data processing, analysis, and interpretation using MetaboAnalyst. [Processamento, análise e interpretação de dados metabolômicos usando MetaboAnalyst.] *Current protocols in bioinformatics, Chapter 14.* [Protocolos atuais em bioinformática, Capítulo 14.] 2011. DOI 10.1002/0471250953.bi1410s34.



Análise comparativa por CG-EM do Metaboloma de grãos de Triticale e Trititrigia na Fase de Maturação da Cera.

