


Futuro agrícola: A proteômica como ferramenta no melhoramento de culturas

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.008-008>

Karen Vitoria Alvares

Mestranda, UNESP

E-mail: karen.alvares@unesp.br

José Augusto Liberato de Souza

Mestrando, UNESP

Gabriela da Silva Freitas

Doutoranda, UNESP

RESUMO

As proteínas são essenciais para os produtos genéticos e seu estudo contribui para a obtenção de informação regulatória. As técnicas multiômicas são utilizadas para melhorar características agronômicas e aumentar a tolerância agrícola, a utilização dessas técnicas pode servir de base para aprimorar o patrimônio genético das culturas, aumentando seus rendimentos e sua tolerância aos fatores ambientais. A análise proteômica possibilita a compreensão de todas as funções, estruturas e interações das proteínas presentes em um sistema biológico. Mediante revisão sistemática, realizou-se uma busca, encontrando 15 artigos relacionados à técnica proteômica e sua aplicação na agricultura. Na análise proteômica, uma das principais vantagens é a capacidade de estudar a expressão de proteínas em larga escala em diversos sistemas biológicos complexos e em diferentes momentos e condições. A tecnologia proteômica tem sido amplamente utilizada na identificação de mudanças no proteoma em vias de sinalização em resposta ao estresse, detectar marcadores de estresse biótico e abiótico, que podem ser aplicados no desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas. Esses avanços na proteômica vegetal têm o potencial de revolucionar a agricultura, fornecendo soluções sustentáveis e adaptáveis para enfrentar os desafios futuros da produção de alimentos.

Palavras-chave: Ômics, Proteínas, Melhoramento Genético.

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são essenciais para os produtos genéticos e seu estudo contribui para a obtenção de informação regulatória (Weckwerth, 2011). Por meio de avanços, a proteômica surgiu como uma ferramenta popular para abordagens adicionais em ômica e biologia de sistemas (Weckwerth et al., 2014). O termo proteômica foi estabelecido em 1996 pela fusão das palavras "proteína" e "genômica", ela pode ser descrita como "a análise eficiente e/ou padronizada de todas as proteínas presentes nos tecidos, células ou no compartimento subcelular" (Chaturvedi et al., 2016). A proteômica é uma tecnologia não direcionada, com o objetivo de analisar o proteoma completo do organismo alvo, embora também possa envolver a identificação e quantificação direcionadas de proteínas/peptídeos específicos. O perfil proteômico revela o nível de abundância das proteínas em diferentes tipos de células e tecidos em qualquer estado, assim como entre amostras de várias combinações (Silva-Sanchez et al., 2015; Fíla et al., 2016).

Um dos entraves atuais relacionados à produção agrícola está associado a necessidade alimentar e a adaptação de culturas para alto rendimento e resistência, seja ela a pragas ou elementos atmosféricos, com o intuito de atender a demanda mundial (Haq et al., 2023). Segundo dados das Nações Unidas, é preciso elevar a produção agrícola em 75% até 2050 para garantir o abastecimento alimentar de toda a população mundial (Bates et al., 2008). Além da produção em larga escala, a qualidade dos alimentos e sua capacidade de atender as demandas nutricionais também são de grande importância. O estudo da diversidade genética para descobrir e criar novas variações de culturas, juntamente com a compreensão da genética de características simples e complexas e a introdução eficiente dessas variações em novos cultivares, são meios para atingir esses objetivos (Haq et al., 2023; Brozynska et al., 2016). As técnicas multiômicas são utilizadas para melhorar características agrônomicas e aumentar a tolerância agrícola, a utilização dessas técnicas pode servir de base para aprimorar o patrimônio genético das culturas, aumentando seus rendimentos e sua tolerância aos fatores ambientais (Haq et al., 2023)

A análise proteômica possibilita a compreensão de todas as funções, estruturas e interações das proteínas presentes em um sistema biológico. Uma vez que proteínas defeituosas são as principais causas de doenças, elas podem servir como indicadores úteis no desenvolvimento de diagnósticos e tratamentos específicos para determinadas doenças, seja em célula animal ou vegetal (Anjolette, 2015). A proteômica não apenas fornece informações abrangentes sobre as proteínas, mas também possibilita a obtenção de perfis quantitativos, avaliação de modificações pós-tradução, investigação de vias de sinalização e estudo das interações entre proteínas (Kaushik et al., 2024). Nas últimas décadas, as tecnologias proteômicas têm sido amplamente empregadas para assimilar as respostas das plantas a diversos sinais externos e internos, contribuindo significativamente para uma compreensão do

comportamento vegetal diante das alterações nas condições ambientais (Kaushik et al., 2024; Weckwerth et al., 2014).

As plantas estão constantemente expostas a condições desfavoráveis, como estresses bióticos e abióticos, que incluem variações na disponibilidade de água, luz, nutrientes, e temperaturas extremas (Bokszczanin et al., 2013). Essas modificações ambientais exercem um papel importante no desempenho das plantas, especialmente durante o ciclo reprodutivo, e podem reduzir a produtividade das culturas (Tanou et al., 2012). Para lidar com essas restrições ambientais, a maioria das plantas desenvolvem mecanismos de defesa que envolvem alterações na expressão genética, resultando em mudanças na tradução de proteínas e na reprogramação metabólica. Esses mecanismos são essenciais para a adaptação metabólica e a sobrevivência das plantas sob condições de estresse (Tanou et al., 2012; Chaturvedi et al., 2016). Dessa forma, para promover uma maior sustentabilidade das culturas, é fundamental compreender as condições genéticas e moleculares dos mecanismos de resposta ao estresse, assim como os parâmetros fisiológicos (Chaturvedi et al., 2016).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura sistemática para compreender melhor a utilização da tecnologia proteômica no melhoramento genético, sua aplicação e benefícios relacionados à agricultura, principalmente em relação aos fatores bióticos e abióticos.

2 METODOLOGIA

Mediante revisão sistemática, realizou-se, encontrando 15 artigos em uma busca por estudos relacionados à biotecnologia proteômica e suas aplicações. As bases de dados utilizadas foram Medline/PubMed e Scopus. Os artigos que foram admitidos eram nos idiomas português e inglês. As palavras chaves utilizadas nas pesquisas foram: “Proteômica”, “melhoramento genético”, “Omics”, “agricultura sustentável”, “biologia molecular”, “genome alteration”, “espectrometria de massas”, “genetic improvement”.

Os critérios de inclusão utilizados para a seleção dos artigos foram: (I) artigos que relatam o cenário global em relação a agricultura sustentável; (II) artigos com estudos em relação às técnicas de melhoramento genético; (III) artigos publicados em periódicos nacionais e internacionais; (IV) artigos com a utilização da tecnologia proteômica; (V) artigos originais, com corte temporal de janeiro de 2004 até janeiro de 2024. Foram excluídos do estudo: (I) artigos relacionados apenas a problemática da agricultura; (II) artigos relacionados a outras técnicas de melhoramento genético sem relação com a tecnologia ômica/proteômica; (III) artigos editoriais e estudos de caso.

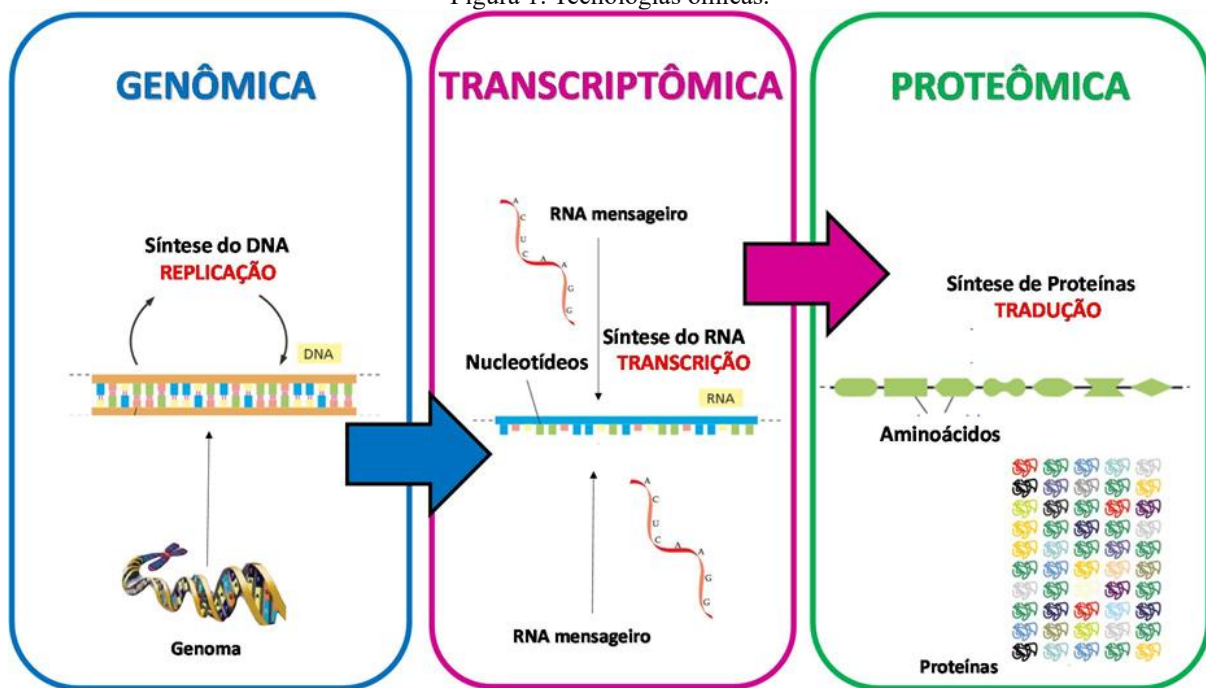
Realizou-se uma pesquisa inicial com base no título dos artigos, os estudos selecionados foram avaliados, seguindo os critérios descritos. As informações extraídas tem como base as características do estudo, título, publicação e considerações relevantes.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 CIÊNCIAS ÔMICAS

Por sua característica sésseis, as plantas desenvolvem estratégias para adaptação e crescimento em resposta às mudanças nas circunstâncias ambientais (Raza et al., 2019). A nível molecular, essas táticas incluem alterações na expressão gênica, partindo da regulação transcricional, passando pelo processamento do mRNA, seguido pela tradução, modificação proteica e renovação proteica (Rejeb et al., 2014; Haq et al., 2023). Quando expostas a condições ambientais controversas, a planta modifica seu transcriptoma, os genes regulados transcricionalmente desempenham papéis em diversas funções, como moléculas de sinalização, tradução, transcrição, metabolismo e resposta ao estresse (Rejeb et al., 2014). Novas ferramentas bioquímicas e bioanalíticas, como sequenciamento do genoma, transcriptômica, proteômica e metabolômica estão possibilitando análises mais detalhadas desses processos (Astarita & Ollero, 2015). A tecnologia ômics (figura 1) refere-se ao estudo desses processos nos contextos de genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma (Haq et al., 2023).

Figura 1. Tecnologias ômicas.



Visão geral dos campos das análises “ômicas”. A genômica fornece informações do conjunto completo de genes de um sistema biológico complexo, enquanto que a transcriptômica fornece uma descrição completa dos RNAs mensageiros do genoma. A proteômica oferece informações das proteínas expressas pelo genoma. (Anjolette, 2015)

Os marcadores moleculares são estudados na genômica com o objetivo de descobrir novos padrões de variação e determinar suas funções em características ecológicas significativas (Bevan & Waugh, 2007). Nas culturas, o melhoramento genético está ligado a abordagens genômicas para

alcançar avanços no melhoramento molecular e rastrear germoplasmas de elite com montagem multicaracterística (Raza et al., 2019; Kole et al., 2015). As abordagens ômicas auxiliam no desenvolvimento de culturas com melhor rendimento e produção sob diferentes fatores bióticos e abióticos. O melhoramento molecular de plantas é uma abordagem essencial para aumentar o rendimento e a produção das culturas na presença de vários fatores (Raza et al., 2019).

3.2 PROTEÔMICA

Nos últimos anos, estudos abordando técnicas de transcriptoma e metaboloma têm sido conduzidos para identificar reguladores transcricionais e metabólitos, fornecendo percepção fundamentais sobre como diferentes redes são afetadas e interagem durante o processo de priming (Luo et al., 2009). No entanto, há limitações na estimativa dos níveis de expressão gênica, degradação do mRNA ou tradução ineficiente, bem como em modificações pós-traducionais (PTMs) de proteínas, processamento e renovação de proteínas, sendo assim, a proteômica certifica como uma ferramenta essencial para preencher a lacuna entre o transcriptoma e o metaboloma (Tanou et al., 2012).

O transcriptoma e o proteoma são mais complexos do que o genoma, pois respostas distintas podem ser atribuídas ao mesmo gene, e várias proteínas podem ser traduzidas a partir do mesmo RNAm, enquanto o genoma é uma fonte estática de informação, o transcriptoma e o proteoma são dinâmicos, podendo variar sob diferentes condições devido ao processamento de RNA, regulação da transcrição, síntese proteica e modificações nas proteínas (Bernot, 2004). O splicing alternativo, promotores alternativos ou uso de sítios de poliadenilação podem gerar diversos transcritos. Além disso, modificações como glicosilação e fosforilação podem ocorrer durante ou após a tradução, resultando em uma grande variedade de variantes proteicas (Twyman, 2004; Anjolette, 2015)

Os estudos proteômicos oferecem a oportunidade de investigar proteomas subcelulares e complexos proteicos, incluindo proteínas nas membranas plasmáticas, cloroplastos, mitocôndrias e núcleos, e, mais significativamente, as PTMs associadas ao priming (Angel et al., 2012). Após a separação bidimensional do extrato protéico, os avanços mais recentes na proteômica baseada em espectrometria de massa (MS), como separações de mobilidade iônica, medições de proteoma baseadas em microchip, cromatografia líquida de fase reversa em nanoescala e eletroforese capilar, têm sido aplicados como fundamentais no processo de separação de proteínas (Tanou et al., 2012; Angel et al., 2012).

A variedade de instrumentos disponíveis para análise proteômica torna essa escolha complexa e desafiadora. Atualmente, a espectrometria de massas é o principal método analítico utilizado nos estudos proteômicos para identificação e caracterização de compostos proteicos (Thompson; Schaeffer-Reiss; Ueffing, 2008). Na análise proteômica, uma das principais vantagens é a capacidade

de estudar a expressão de proteínas em larga escala em diversos sistemas biológicos complexos e em diferentes momentos e condições (Barbosa et al., 2012).

As três etapas principais das metodologias proteômicas são identificação/quantificação, extração e separação (com ou sem gel). As metodologias sem gel incluem técnicas como LC-MS, e técnicas baseadas em etiquetas, como ICAT e iTRAQ (Haq et al., 2023). Devido à complexidade do proteoma vegetal, um método único não pode avaliá-lo com precisão, portanto, diversas técnicas são utilizadas para melhorar o entendimento, a resolução e a abrangência do proteoma vegetal (Altelaar et al., 2013). A escolha da metodologia de estudo do proteoma depende de vários fatores, como a disponibilidade de recursos, o tipo de instalações e as aplicações desejadas, seja um perfil global ou direcionado e o composto de interesse (Anjolette, 2015). A proteômica sem gel está se tornando mais prevalente, comparada à proteômica baseada em gel, ela apresenta maior reprodutibilidade e menos viés (Haq et al., 2023).

4 METODOLOGIA PROTEÔMICA SEM GEL

Entre as técnicas quantitativas, destacam-se a rotulagem baseada em tags (ICAT, iTRAQ), a rotulagem metabólica (SILAC) e a rotulagem livre (MudPIT) (Haq et al., 2023). A marcação de afinidade codificada por isótopos (ICAT) é uma metodologia de quantificação que utiliza uma etiqueta de afinidade de biotina, um ligante de isótopos estáveis e um componente reativo que se liga a grupos tiol de proteínas (cisteínas) *in vitro* (Shiio & Aebersold, 2006). A cromatografia é empregada para separar os peptídeos tripticos marcados antes de sua detecção por espectrometria de massa (MS). O ICAT é amplamente utilizado para descobrir novas proteínas que influenciam funções biológicas importantes em cultivares específicas (Barkla et al., 2013).

No método de quantificação de proteínas multiplex conhecido como iTRAQ (marcação isobárica para quantificação relativa e absoluta), são utilizados marcadores isobáricos para identificar grupos de proteínas N-terminal e amina de cadeia lateral (Haq et al., 2023). Esta técnica permite a quantificação de proteínas de várias fontes em um único experimento, com sensibilidade muito maior que o ICAT. Pesquisadores de culturas usam iTRAQ para detectar marcadores de estresse biótico e abiótico, que podem ser aplicados no desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas (Su et al., 2019).

A marcação de isótopos estáveis por aminoácidos em cultura de células (SILAC) é a ferramenta de marcação metabólica mais eficaz para a pesquisa quantitativa dinâmica do proteoma vegetal. Esta técnica envolve a marcação *in vivo* de populações celulares cultivadas em meio contendo N14 ou N15 (Soufi & Macek, 2014). A identificação de mudanças no proteoma em vias de sinalização geradas por PTMs em resposta ao estresse é de grande valor (Mastrobuoni et al., 2012).

MudPIT é uma abordagem proteômica shotgun para analisar proteínas complexas e de baixa abundância (Zhang et al., 2010). Esta tecnologia é mais sensível, separa proteínas digeridas utilizando colunas microcapilares bifásicas ou trifásicas, que são então analisadas por MS em tandem (Haq et al., 2023). MudPIT tem sido usada para explorar os mecanismos que regulam o número de perfilhos em arroz (Lee et al., 2011).

4.1 METODOLOGIAS PROTEÔMICA BASEADAS EM GEL

A metodologia com uso do gel é a técnica de separação e quantificação de proteínas mais populares, adaptáveis e reconhecidas. Elas são mais econômicas do que abordagens sem gel e podem ser usadas para caracterizar isoformas de proteínas e identificar proteínas de baixa abundância (Sriyam et al., 2007). A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) é fundamental na proteômica devido à sua acessibilidade e familiaridade. O ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (M) são aplicados para diferenciar as proteínas (Marouga et al., 2005). As proteínas são classificadas em dois grupos com base na sua massa molecular (M) e na presença ou ausência de 2-mercaptoetanol. Elas podem ser visualizadas com corantes como azul Coomassie, nitrato de prata ou SYPRO Ruby (Rabilloud, 2013).

A eletroforese em gel de diferença (DIGE) foi desenvolvida para superar as limitações do 2D-PAGE, como variações entre géis e baixa repetibilidade. A técnica DIGE permite avaliar variações na expressão de proteínas em resposta a estresses bióticos e abióticos (Marouga et al., 2005). Para reduzir as interferências de co-migração observadas no 2D-PAGE, é utilizada a eletroforese em gel tridimensional (3DGE), que identifica proteínas e modificações pós-traducionais (PTMs) com precisão, usando dois tampões distintos com diferentes transportadores de íons (Sriyam et al., 2007).

Após a digestão dos peptídeos, as proteínas de interesse são identificadas por espectrometria de massa (MS). AS abordagens computacionais auxiliam na identificação de proteínas com base em dados de massa e fragmentação de peptídeos (MS/MS) (Haq et al., 2023). O processo de identificação da proteína por MS envolve três fases: transformar moléculas em íons em fase gasosa, separá-los em um campo elétrico ou magnético de acordo com sua relação massa-carga (m/z) e identificar os íons separados com valores específicos de m/z (Sriyam et al., 2007). Métodos de ionização incluem ionização por eletrospray (ESI), ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e dessorção/ionização a laser aprimorada por superfície (SELDI) (El-Aneed et al., 2009).

4.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA

Essa técnica opera identificando sinais gerados por transições iônicas durante a fragmentação, utilizando um espectrômetro de massa. Ferramentas adicionais incluem MS tandem, armadilha linear quadrupolo orbitrap (LTQ-Orbitrap), armadilha quadrupolo (Q-trap) e triplo quadrupolo (Haq et al.,

2023). O monitoramento de reações múltiplas (MRM) é o processo de detecção de várias alterações, enquanto o monitoramento de reações selecionadas (SRM) é o processo de identificação de transições em um triplo quadrupolo (Yocum & Chinnaiyan, 2009). Por outro lado, as abordagens mencionadas acima concentram-se na precisão da amostra. Para contornar esse problema, os métodos SRM/MRM utilizam marcação isotópica (Yocum & Chinnaiyan, 2009).

As transições SRM são varreduras altamente específicas que visam detectar analitos específicos em misturas complexas, geralmente utilizando espectrômetros de massa baseados em triplo quadrupolo (Anderson & Hunter, 2006). Essas transições são planejadas de forma que o primeiro quadrupolo de análise de massa (Q1) seja configurado para transmitir uma janela de massa estreita em torno do íon pai desejado, enquanto o terceiro quadrupolo (Q3, o segundo quadrupolo de análise de massa) seja configurado para transmitir uma janela de massa estreita em torno do íon fragmento desejado (Wolf-Yadlin et al., 2007). A fragmentação ocorre no segundo quadrupolo (Q2) via dissociação induzida por colisão (CID). Portanto, o SRM exige a presença de dois íons para produzir um resultado positivo, o que o torna uma metodologia de detecção altamente específica, com um nível de ruído muito baixo, aumentando assim a sensibilidade da detecção (Yocum & Chinnaiyan, 2009). O sucesso das transições SRM depende não apenas da eficiência de ionização do íon pai (transmissão Q1), mas também da eficiência de fragmentação desse íon pai e, conseqüentemente, da intensidade do íon fragmento (transmissão Q3) (Jenkins et al., 2006). Ao inserir várias transições SRM diferentes para o mesmo analito ou para diferentes analitos, múltiplas transições podem ser monitoradas em uma única execução MS. Esse método é conhecido como MRM, equilibrando produtividade e sensibilidade (Yocum & Chinnaiyan, 2009).

Para a identificação e quantificação de proteínas, o MRM-MS não tem sido tão amplamente utilizado devido aos desafios no desenvolvimento do método (Griffiths et al., 2007). Embora teoricamente seja possível introduzir uma mistura padrão de proteínas em uma amostra em concentrações conhecidas para a quantificação, semelhante ao que é feito em análises de pequenas moléculas, na prática, isso não garante uma quantificação robusta de proteínas (Yocum & Chinnaiyan, 2009). Isso ocorre porque as proteínas padrão e as proteínas do analito podem produzir respostas diferentes no espectrômetro de massa devido à supressão de íons e às variações na fragmentação (Barnidge et al., 2004). Além disso, as taxas de recuperação das diferentes proteínas podem ser afetadas por etapas de preparação da amostra antes da MS. Por esse motivo, são sugeridos peptídeos marcados isotopicamente em vez de proteínas para a quantificação precisa de proteínas (Yocum & Chinnaiyan, 2009).

5 PROTEÔMICA COMO FERRAMENTA NA AGRICULTURA

O secretoma abrange todas as proteínas secretadas, representando até 30% do proteoma de um organismo, e desempenha papéis críticos em uma variedade de processos celulares (Skach, 2007). Essas proteínas são essenciais para funções como percepção e transdução de sinais, respostas ao estresse e apoptose. O processo de secreção em plantas é altamente sofisticado e rigorosamente regulado, e foi observado que as proteínas secretadas atuam tanto local quanto sistemicamente (Gupta et al., 2011). Os genes responsáveis pela codificação dessas proteínas estão presentes com menor frequência no genoma central, mas são mais comuns em regiões móveis. Entretanto, a aplicação da proteômica para analisar o secretoma encontra limitações devido a vários fatores, sendo eles, as proteínas secretadas podem ser expressas em baixa abundância; produzidas por tipos celulares especializados e expressas em estágios específicos de desenvolvimento (Ahsan et al., 2007).

O grão-de-bico é uma leguminosa importante consumida globalmente como fonte de proteína vegetal, contém em sua composição 25% de proteína (Gupta et al., 2011). Em estudo com cultura em suspensão de calos de grão-de-bico, Gupta (2011) o secretoma foi caracterizado utilizando SDS-PAGE clássico acoplado à espectrometria de massa. Como resultado foram identificadas 773 proteínas secretadas, proporcionando uma visão abrangente do secretoma de uma espécie de dicotiledônea. Em relação às proteínas identificadas, a maioria estava relacionada ao metabolismo primário e secundário (19,1%), seguido pela transdução de sinal (14,1%), proteínas com funções diversas (11,6%) e na manutenção do estado redox (9,2%) no espaço extracelular. Outra categoria incluía proteínas envolvidas na defesa celular (9%) e no transporte (8,9%) entre regiões intercelulares. Houve também identificação de proteínas envolvidas no envelhecimento (8,9%) e modificação (6,7%) de proteínas. Proteínas cuja identidade não foi determinada foram classificadas como não identificadas (6,6%). Além disso, várias proteínas (5,9%) envolvidas em modificações da parede celular foram detectadas.

A análise proteômica é muito útil para a identificação de proteínas extraída do grão do pão de trigo (*Triticum aestivum* L.), em estudo de Lesage et al. (2012), foi realizada uma análise comparativa do proteoma de duas linhagens quase isogênicas (NILs) com o auxílio da eletroforese bidimensional (2-DE) e espectrometria de massa. Como resultado da análise, durante o desenvolvimento do grão as proteínas de dobramento e as relacionadas ao estresse foram mais abundantes na linhagem dura em comparação com a linhagem mole. Esses resultados, sugerem que a formação da matriz proteica ocorre mais cedo na linhagem dura, indicando uma resposta mais precoce ao estresse, possivelmente a resposta de proteínas desdobradas, em comparação com a linhagem mole, levando a uma morte celular mais precoce no endosperma. Dessa forma, surgem novas perspectivas sobre o papel das puroindolinas na maquinaria de dobramento de proteínas de armazenamento, afetando assim o desenvolvimento do endosperma do trigo e a formação da matriz proteica.

6 A PROTEÔMICA NAS INVESTIGAÇÕES DE MECANISMOS ABIÓTICOS E BIÓTICOS DE TOLERÂNCIA

Katam et al. (2020), em estudo investigou os efeitos de vários estresses abióticos na regulação de proteínas foliares em cultivares de soja, fornecendo dados valiosos sobre as respostas proteômicas e enzimáticas da soja a esses estresses em condições de campo. Utilizando o mapeamento de proteínas 2-DE e espectrometria de massa, os resultados revelaram que estresses simultâneos causam alterações na fisiologia, proteoma e atividade enzimática, diferentemente do que ocorre em situações de estresse individual. Observou-se um grau significativo de diversidade genética na abundância de proteínas entre as duas cultivares quando submetidas a diferentes tipos de estresses. Múltiplas proteínas relacionadas ao metabolismo, resposta ao calor e fotossíntese exibiram mecanismos de tolerância cruzada. Tal fenômeno foi especialmente evidente na cultivar R95-1705, onde proteínas responsivas ao calor, fotossíntese, metabolismo e proteínas redox estavam abundantemente presentes em resposta ao estresse térmico, assim como ao estresse combinado de calor e água na cultivar PI-471938, sugerindo uma relativa tolerância ao calor nesta última.

O calor e a seca são os principais fatores de estresse abiótico que limitam o crescimento e o desenvolvimento das plantas de soja, em nível celular, as plantas exibem uma variedade de respostas fisiológicas e bioquímicas para superar esses estresses (Eldakak et al., 2013). Em estudo Das et al. (2016) investigaram a expressão diferencial de proteínas na soja (*Glycine max* L.) em resposta à seca e ao estresse térmico. Eles identificaram 44 proteínas responsivas ao estresse abiótico que influenciaram cascatas de sinalização e processos moleculares. Além disso, muitas proteínas relacionadas à fotossíntese, que foram expressas de maneira diferencial, impactaram a regulação do RuBisCO, o transporte de elétrons e o ciclo de Calvin durante os períodos de estresse abiótico. De acordo com os resultados obtidos, 25 proteínas relacionadas à fotossíntese foram reguladas negativamente sob condições de estresse em ambas as variedades de soja.

A produção de milho (*Zea mays* L.) enfrenta graves ameaças devido a diversos estresses abióticos, como seca, salinidade, frio, calor e inundações. Entre esses fatores, a seca ou déficit hídrico é o mais crítico, representando uma ameaça significativa à produção de milho em todo o mundo (Yousaf et al., 2023). Em estudo sobre as respostas ao estresse hídrico no milho no nível proteico, Zenda et al. (2018), empregou uma estratégia quantitativa baseada em iTRAQ para realizar o perfil proteômico de duas linhagens endogâmicas de milho contrastantes. Foi realizada uma análise proteômica comparativa das folhas dessas duas linhagens e algumas respostas fisiológicas sob estresse hídrico. Analisaram 721 proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) em duas linhagens de milho, identificando tanto proteínas comuns quanto únicas acumuladas em resposta à limitação de água no milho. Utilizando um método baseado em iTRAQ, que resultou em um total de 721 proteínas

diferencialmente abundantes (DAPs), foi identificado cinco conjuntos essenciais de DAPs responsivos à seca, incluindo 13 DAPs específicos.

Wang et al. (2019), em análise proteômica dos proteomas do núcleo de enchimento de duas linhagens de milho tolerantes à seca, utilizou uma estratégia baseada em iTRAQ para identificar os perfis de expressão proteica durante o desenvolvimento dos grãos e para comparar as respostas ao estresse hídrico das mesmas linhagens (YE8112 e MO17) após uma exposição de 14 dias ao déficit de umidade. Como resultado, foi identificado uma variedade de elementos moleculares que estão envolvidos na mediação da tolerância à seca, houve uma mudança no proteoma das plantas estressadas em comparação às condições de controle. Foram identificados 5.175 DAPs nas quatro comparações experimentais, os DAPs expressos exclusivamente em YE8112 estavam principalmente envolvidos em vias relacionadas ao "processamento de proteínas no retículo endoplasmático" e ao "metabolismo do triptofano", enquanto os DAPs em MO17 estavam associados às vias do "metabolismo do amido e sacarose" e à "fosforilação oxidativa". Dessa forma, os resultados revelaram que os grãos de YE8112 eram comparativamente mais tolerantes à seca do que os grãos de MO17.

A cevada (*Hordeum vulgare* L.) destaca-se como uma das culturas mais tolerantes à salinidade, sendo um excelente modelo para estudos sobre os mecanismos e a herança da tolerância à salinidade, além de ser fundamental para o desenvolvimento de ferramentas que melhorem a tolerância ao sal em cereais (Wang et al., 2018). Com o objetivo de realizar uma análise bioquímica e proteômica da cevada, Zhu et al. (2020), verificou dois pares de linhagens quase isogênicas (NILs), que são geneticamente quase idênticas, exceto pela região alvo contendo QSl.TxNn.2H. De acordo com o estudo, foram identificadas 53 e 51 proteínas expressas diferencialmente em folhas e raízes, respectivamente. O QTL QSl.TxNn.2H pode melhorar a tolerância à salinidade ao controlar a carga de Na⁺ no xilema, reduzindo a toxicidade de Na⁺ nas folhas. Além disso, este QTL induz a expressão de proteínas relacionadas à fotossíntese, eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e genes da ATP sintase.

Huang et al. (2016), aplicou a proteômica para analisar a interação entre cultivares de tomate resistentes e suscetíveis à infecção por TYLCV. Proteínas extraídas de folhas do cultivar de tomate resistente 'Zheza-301' e do cultivar vulnerável 'Jinpeng-1', após infecção por TYLCV, foram comprovadas por eletroforese em gel bidimensional. Foram identificadas 86 proteínas diferencialmente expressas, definidas em sete grupos com base em suas funções, sendo elas responsáveis pela fotossíntese, proteometabolismo, metabolismo de carboidratos, transdução de sinal, proteínas acompanhantes, desintoxicação, antioxidante e metabolismo de aminoácidos. Os resultados ajudam a identificar as principais proteínas envolvidas na interação entre o tomate e o TYLCV, potencialmente aumentando a resistência ao vírus e fornecendo proteção contra a infecção.

Em análises proteômicas com milho infectado com MCMV (vírus mancha clorótica), Dang et al. (2019), aplicou uma abordagem comparativa com tags isobáricas para quantificação relativa e

absoluta (iTRAQ) para analisar o milho infectadas com MCMV. Foram identificadas 972 proteínas diferencialmente abundantes (DAPs), sendo 661 com aumento de abundância e 311 com redução de abundância. Anotações funcionais e orientação de atividade fotossintética revelaram diminuição da fotossíntese e mudanças significativas em proteínas ribossômicas, respostas ao estresse, oxidação-redução e homeostase redox. Sendo assim, os resultados sugerem que a combinação de análises proteômicas comparativas e silenciamento gênico induzido por vírus pode ajudar na identificação de proteínas do hospedeiro que modulam a infecção por MCMV, contribuindo assim para orientar o desenvolvimento de estratégias.

Shah et al. (2012), utilizou a análise proteômica das proteínas liberadas no microambiente dos locais de infecção de frutos de tomate verdes e vermelhos com *B. cinerea* para identificar as proteínas produzidas por frutos verdes maduros e vermelhos maduros em resposta à infecção, bem como as proteínas liberadas por *B. cinerea*. Dessa forma, a análise caracterizou 186 proteínas em tomates infectados com *B. cinerea*, sendo uma abordagem viável tanto para obter informações suficientes para identificar proteínas do patógeno e do hospedeiro a partir de locais de infecção, quanto para descrever as diversas classes de proteínas. Os resultados forneceram informações simultâneas sobre as proteomas do hospedeiro e do patógeno, identificando um número significativo de diversas proteínas envolvidas na patogenicidade e proteínas relacionadas à proteção contra a resposta ao estresse oxidativo do hospedeiro.

7 CONCLUSÃO

Enfrentar os desafios crescentes da produção agrícola exige abordagens inovadoras e integrativas. A compreensão da diversidade genética das culturas e sua introdução eficaz em novas cultivares são cruciais para atender à crescente demanda mundial por alimentos. Nesse contexto, as técnicas ômicas, incluindo a proteômica, desempenham um papel fundamental. A proteômica não apenas fornece compreensão abrangentes sobre as proteínas, mas também oferece a oportunidade de investigação de modificações pós-tradução, vias de sinalização e interações entre proteínas, contribuindo assim para uma compreensão mais profunda do comportamento das plantas diante das mudanças ambientais.

Métodos como LC-MS, ICAT e iTRAQ têm sido amplamente utilizados para analisar o proteoma vegetal, cada um trazendo suas próprias vantagens e aplicações específicas. Além disso, abordagens como MudPIT têm sido valiosas para explorar mecanismos regulatórios em culturas importantes. Ao integrar essas metodologias inovadoras, não podemos apenas identificar marcadores de estresse biótico e abiótico, mas também contribuem para o desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas mais resilientes e produtivas. Esses avanços na proteômica vegetal têm o



potencial de revolucionar a agricultura, fornecendo soluções sustentáveis e adaptáveis para enfrentar os desafios futuros da produção de alimentos.

REFERÊNCIAS

- Ahsan, Nagib, Sang-Hoon Lee, Dong-Gi Lee, Hyoshin Lee, Shin Woo Lee, Jeong Dong Bahk, and others, 'Physiological and Protein Profiles Alternation of Germinating Rice Seedlings Exposed to Acute Cadmium Toxicity', *Comptes Rendus. Biologies*, 330.10 (2007), pp. 735–46, doi:10.1016/j.crv.2007.08.001
- Altelaar, A. F. Maarten, Javier Munoz, and Albert J. R. Heck, 'Next-Generation Proteomics: Towards an Integrative View of Proteome Dynamics', *Nature Reviews. Genetics*, 14.1 (2013), pp. 35–48, doi:10.1038/nrg3356
- Anderson, Leigh, and Christie L. Hunter, 'Quantitative Mass Spectrometric Multiple Reaction Monitoring Assays for Major Plasma Proteins', *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 5.4 (2006), pp. 573–88, doi:10.1074/mcp.M500331-MCP200
- Angel, Thomas E., Uma K. Aryal, Shawna M. Hengel, Erin S. Baker, Ryan T. Kelly, Errol W. Robinson, and others, 'Mass Spectrometry-Based Proteomics: Existing Capabilities and Future Directions', *Chemical Society Reviews*, 41.10 (2012), pp. 3912–28, doi:10.1039/C2CS15331A
- Anjolette, Fernando Antonio Pino, 'Análise proteômica comparativa das secreções das glândulas parotoides e mucosas do sapo *Rhinella schneideri* e avaliação, in vitro, da atividade antimicrobiana' (unpublished Doutorado em Toxicologia, Universidade de São Paulo, 2015), doi:10.11606/T.60.2015.tde-29102015-135110
- Astarita, Giuseppe, and Mario Ollero, 'Lipidomics: An Evolving Discipline in Molecular Sciences', *International Journal of Molecular Sciences*, 16.4 (2015), pp. 7748–52, doi:10.3390/ijms16047748
- Barkla, Bronwyn J., Rosario Vera-Estrella, and Omar Pantoja, 'Progress and Challenges for Abiotic Stress Proteomics of Crop Plants', *Proteomics*, 13.12–13 (2013), pp. 1801–15, doi:10.1002/pmic.201200401
- Barnidge, David R., Marcia K. Goodmanson, George G. Klee, and David C. Muddiman, 'Absolute Quantification of the Model Biomarker Prostate-Specific Antigen in Serum by LC-Ms/MS Using Protein Cleavage and Isotope Dilution Mass Spectrometry', *Journal of Proteome Research*, 3.3 (2004), pp. 644–52, doi:10.1021/pr049963d
- Bates, Bryson, Zbigniew Kundzewicz, and Shaohong Wu, *Climate Change and Water* (Intergovernmental Panel on Climate Change Secretariat, 2008) <<https://www.taccire.sua.ac.tz/handle/123456789/552>> [accessed 7 May 2024]
- Bevan, Michael, and Robbie Waugh, 'Applying Plant Genomics to Crop Improvement', *Genome Biology*, 8.2 (2007), p. 302, doi:10.1186/gb-2007-8-2-302
- Bokszczanin, Kamila L., Sotirios Fragkostefanakis, Hamed Bostan, Arnaud Bovy, Palak Chaturvedi, Maria L. Chiusano, and others, 'Perspectives on Deciphering Mechanisms Underlying Plant Heat Stress Response and Thermotolerance', *Frontiers in Plant Science*, 4 (2013), doi:10.3389/fpls.2013.00315
- Brozynska, Marta, Agnelo Furtado, and Robert J. Henry, 'Genomics of Crop Wild Relatives: Expanding the Gene Pool for Crop Improvement', *Plant Biotechnology Journal*, 14.4 (2016), pp. 1070–85, doi:10.1111/pbi.12454

Chaturvedi, Palak, Arindam Ghatak, and Wolfram Weckwerth, 'Pollen Proteomics: From Stress Physiology to Developmental Priming', *Plant Reproduction*, 29.1 (2016), pp. 119–32, doi:10.1007/s00497-016-0283-9

Dang, Mingqing, Qi Cheng, Ya Hu, Jianxiang Wu, Xueping Zhou, and Yajuan Qian, 'Proteomic Changes during MCMV Infection Revealed by iTRAQ Quantitative Proteomic Analysis in Maize', *International Journal of Molecular Sciences*, 21.1 (2019), p. 35, doi:10.3390/ijms21010035

Das, Aayudh, Moustafa Eldakak, Bimal Paudel, Dea-Wook Kim, Homa Hemmati, Chhandak Basu, and others, 'Leaf Proteome Analysis Reveals Prospective Drought and Heat Stress Response Mechanisms in Soybean', *BioMed Research International*, 2016 (2016), p. e6021047, doi:10.1155/2016/6021047

El-Aneed, Anas, Aljandro Cohen, and Joseph Banoub, 'Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers', *Applied Spectroscopy Reviews*, 44.3 (2009), pp. 210–30, doi:10.1080/05704920902717872

Eldakak, Moustafa, Sanaa I. Milad, Ali I. Nawar, and Jai S. Rohila, 'Proteomics: A Biotechnology Tool for Crop Improvement', *Frontiers in Plant Science*, 4 (2013), doi:10.3389/fpls.2013.00035

Griffiths, John R., Richard D. Unwin, Caroline A. Evans, Siân H. Leech, Bernard M. Corfe, and Anthony D. Whetton, 'The Application of a Hypothesis-Driven Strategy to the Sensitive Detection and Location of Acetylated Lysine Residues', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18.8 (2007), pp. 1423–28, doi:10.1016/j.jasms.2007.04.021

Gupta, Sonika, Vijay Wardhan, Shikha Verma, Saurabh Gayali, Uma Rajamani, Asis Datta, and others, 'Characterization of the Secretome of Chickpea Suspension Culture Reveals Pathway Abundance and the Expected and Unexpected Secreted Proteins', *Journal of Proteome Research*, 10.11 (2011), pp. 5006–15, doi:10.1021/pr200493d

Haq, Syed Anam Ul, Tanzeel Bashir, Thomas H. Roberts, and Amjad M. Husaini, 'Ameliorating the Effects of Multiple Stresses on Agronomic Traits in Crops: Modern Biotechnological and Omics Approaches', *Molecular Biology Reports*, 51.1 (2023), p. 41, doi:10.1007/s11033-023-09042-8

Huang, Ying, Hong-Yu Ma, Wei Huang, Feng Wang, Zhi-Sheng Xu, and Ai-Sheng Xiong, 'Comparative Proteomic Analysis Provides Novel Insight into the Interaction between Resistant vs Susceptible Tomato Cultivars and TYLCV Infection', *BMC Plant Biology*, 16.1 (2016), p. 162, doi:10.1186/s12870-016-0819-z

Jenkins, Rosalind E., Neil R. Kitteringham, Christie L. Hunter, Sally Webb, Tony J. Hunt, Robert Elsby, and others, 'Relative and Absolute Quantitative Expression Profiling of Cytochromes P450 Using Isotope-Coded Affinity Tags', *Proteomics*, 6.6 (2006), pp. 1934–47, doi:10.1002/pmic.200500432

Katam, Ramesh, Sedigheh Shokri, Nitya Murthy, Shardendu K. Singh, Prashanth Suravajhala, Mudassar Nawaz Khan, and others, 'Proteomics, physiological, and biochemical analysis of cross tolerance mechanisms in response to heat and water stresses in soybean', *PLOS ONE*, 15.6 (2020), p. e0233905, doi:10.1371/journal.pone.0233905

Kaushik, Neha, Ravi Gupta, Manorma Negi, Ajeet Kaushik, June Hyun Kim, Eun Ha Choi, and others, 'Integrating Cutting-Edge Plasma Technology for Environmentally Friendly Smart Horticulture: A Proteomics Approach', *Applied Materials Today*, 37 (2024), p. 102142, doi:10.1016/j.apmt.2024.102142

Kole, Chittaranjan, Mehanathan Muthamilarasan, Robert Henry, David Edwards, Rishu Sharma, Michael Abberton, and others, 'Application of Genomics-Assisted Breeding for Generation of Climate Resilient Crops: Progress and Prospects', *Frontiers in Plant Science*, 6 (2015), p. 563, doi:10.3389/fpls.2015.00563

Lee, Joohyun, Wenzhu Jiang, Yongli Qiao, Young-II Cho, Mi-Ok Woo, Joong-Hyun Chin, and others, 'Shotgun Proteomic Analysis for Detecting Differentially Expressed Proteins in the Reduced Culm Number Rice', *Proteomics*, 11.3 (2011), pp. 455–68, doi:10.1002/pmic.201000077

Lesage, Véronique S., Marielle Merlino, Christophe Chambon, Brigitte Bouchet, Didier Marion, and Gérard Branlard, 'Proteomes of Hard and Soft Near-Isogenic Wheat Lines Reveal That Kernel Hardness Is Related to the Amplification of a Stress Response during Endosperm Development', *Journal of Experimental Botany*, 63.2 (2012), pp. 1001–11, doi:10.1093/jxb/err330

Luo, Zhi-Bin, Dennis Janz, Xiangning Jiang, Cornelia Göbel, Henning Wildhagen, Yupeng Tan, and others, 'Upgrading Root Physiology for Stress Tolerance by Ectomycorrhizas: Insights from Metabolite and Transcriptional Profiling into Reprogramming for Stress Anticipation', *Plant Physiology*, 151.4 (2009), pp. 1902–17, doi:10.1104/pp.109.143735

Marouga, Rita, Stephen David, and Edward Hawkins, 'The Development of the DIGE System: 2D Fluorescence Difference Gel Analysis Technology', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382.3 (2005), pp. 669–78, doi:10.1007/s00216-005-3126-3

Mastrobuoni, Guido, Susann Irgang, Matthias Pietzke, Heike E. Aßmus, Markus Wenzel, Waltraud X. Schulze, and others, 'Proteome Dynamics and Early Salt Stress Response of the Photosynthetic Organism *Chlamydomonas Reinhardtii*', *BMC Genomics*, 13.1 (2012), p. 215, doi:10.1186/1471-2164-13-215

Rabilloud, Thierry, 'When 2D Is Not Enough, Go for an Extra Dimension', *PROTEOMICS*, 13.14 (2013), pp. 2065–68, doi:10.1002/pmic.201300215

Raza, Ali, Ali Razzaq, Sundas Saher Mehmood, Xiling Zou, Xuekun Zhang, Yan Lv, and others, 'Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review', *Plants*, 8.2 (2019), p. 34, doi:10.3390/plants8020034

Rejeb, Ines Ben, Victoria Pastor, and Brigitte Mauch-Mani, 'Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms', *Plants*, 3.4 (2014), pp. 458–75, doi:10.3390/plants3040458

Schaeffer-Reiss, Christine, 'A Brief Summary of the Different Types of Mass Spectrometers Used in Proteomics', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 484 (2008), pp. 3–16, doi:10.1007/978-1-59745-398-1_1

Shah, Punit, Ann L. T. Powell, Ron Orlando, Carl Bergmann, and Gerardo Gutierrez-Sanchez, 'Proteomic Analysis of Ripening Tomato Fruit Infected by *Botrytis Cinerea*', *Journal of Proteome Research*, 11.4 (2012), pp. 2178–92, doi:10.1021/pr200965c

Shio, Yuzuru, and Ruedi Aebersold, 'Quantitative Proteome Analysis Using Isotope-Coded Affinity Tags and Mass Spectrometry', *Nature Protocols*, 1.1 (2006), pp. 139–45, doi:10.1038/nprot.2006.22

Silva-Sanchez, Cecilia, Haiying Li, and Sixue Chen, 'Recent Advances and Challenges in Plant Phosphoproteomics', *PROTEOMICS*, 15.5–6 (2015), pp. 1127–41, doi:10.1002/pmic.201400410



Skach, William R., ‘The Expanding Role of the ER Translocon in Membrane Protein Folding’, *Journal of Cell Biology*, 179.7 (2007), pp. 1333–35, doi:10.1083/jcb.200711107

Soufi, Boumediene, and Boris Macek, ‘Stable Isotope Labeling by Amino Acids Applied to Bacterial Cell Culture’, in *Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC): Methods and Protocols*, ed. by Bettina Warscheid (Springer, 2014), pp. 9–22, doi:10.1007/978-1-4939-1142-4_2

Sriyam, Supawadee, Supachok Sinchaikul, Payungsak Tantipaiboonwong, Ching Tzao, Suree Phutrakul, and Shui-Tein Chen, ‘Enhanced Detectability in Proteome Studies’, *Journal of Chromatography B, Analytical Tools for Proteomics*, 849.1 (2007), pp. 91–104, doi:10.1016/j.jchromb.2006.10.065

Su, Jiangshuo, Jiafu Jiang, Fei Zhang, Ye Liu, Lian Ding, Sumei Chen, and others, ‘Current Achievements and Future Prospects in the Genetic Breeding of Chrysanthemum: A Review’, *Horticulture Research*, 6 (2019), p. 109, doi:10.1038/s41438-019-0193-8

Tanou, Georgia, Vasileios Fotopoulos, and Athanassios Molassiotis, ‘Priming against Environmental Challenges and Proteomics in Plants: Update and Agricultural Perspectives’, *Frontiers in Plant Science*, 3 (2012), doi:10.3389/fpls.2012.00216

Twyman, Richard M., *Principles of Proteomics* (New York: BIOS Scientific Publishers, 2004) <<http://archive.org/details/principlesofprot0000twym>> [accessed 1 May 2024]

Van Der Kelen, Katrien, Rudi Beyaert, Dirk Inzé, and Lieven De Veylder, ‘Translational Control of Eukaryotic Gene Expression’, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44.4 (2009), pp. 143–68, doi:10.1080/10409230902882090

Wang, Haiyang, Lana Shabala, Meixue Zhou, and Sergey Shabala, ‘Hydrogen Peroxide-Induced Root Ca²⁺ and K⁺ Fluxes Correlate with Salt Tolerance in Cereals: Towards the Cell-Based Phenotyping’, *International Journal of Molecular Sciences*, 19.3 (2018), p. 702, doi:10.3390/ijms19030702

Wang, Xuan, Tinashe Zenda, Songtao Liu, Guo Liu, Hongyu Jin, Liang Dai, and others, ‘Comparative Proteomics and Physiological Analyses Reveal Important Maize Filling-Kernel Drought-Responsive Genes and Metabolic Pathways’, *International Journal of Molecular Sciences*, 20.15 (2019), p. 3743, doi:10.3390/ijms20153743

Weckwerth, Wolfram, ‘Green Systems Biology — From Single Genomes, Proteomes and Metabolomes to Ecosystems Research and Biotechnology’, *Journal of Proteomics, A Proteomics Odyssey Towards Next Decade*, 75.1 (2011), pp. 284–305, doi:10.1016/j.jprot.2011.07.010

Weckwerth, Wolfram, Stefanie Wienkoop, Wolfgang Hoehenwarter, Volker Egelhofer, and Xiaoliang Sun, ‘From Proteomics to Systems Biology: MAPA, MASS WESTERN, PROMEX, and COVAIN as a User-Oriented Platform’, in *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, ed. by Jesus V. Jorrin-Novo, Setsuko Komatsu, Wolfram Weckwerth, and Stefanie Wienkoop (Humana Press, 2014), pp. 15–27, doi:10.1007/978-1-62703-631-3_2

Wolf-Yadlin, Alejandro, Sampsa Hautaniemi, Douglas A. Lauffenburger, and Forest M. White, ‘Multiple Reaction Monitoring for Robust Quantitative Proteomic Analysis of Cellular Signaling Networks’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104.14 (2007), pp. 5860–65, doi:10.1073/pnas.0608638104



Yocum, Anastasia K., and Arul M. Chinnaiyan, 'Current Affairs in Quantitative Targeted Proteomics: Multiple Reaction Monitoring–Mass Spectrometry', *Briefings in Functional Genomics*, 8.2 (2009), pp. 145–57, doi:10.1093/bfgp/eln056

Yousaf, Muhammad Irfan, Muhammad Waheed Riaz, Amar Shehzad, Shakra Jamil, Rahil Shahzad, Shamsa Kanwal, and others, 'Responses of Maize Hybrids to Water Stress Conditions at Different Developmental Stages: Accumulation of Reactive Oxygen Species, Activity of Enzymatic Antioxidants and Degradation in Kernel Quality Traits', *PeerJ*, 11 (2023), p. e14983, doi:10.7717/peerj.14983

Zenda, Tinashe, Songtao Liu, Xuan Wang, Hongyu Jin, Guo Liu, and Huijun Duan, 'Comparative Proteomic and Physiological Analyses of Two Divergent Maize Inbred Lines Provide More Insights into Drought-Stress Tolerance Mechanisms', *International Journal of Molecular Sciences*, 19.10 (2018), p. 3225, doi:10.3390/ijms19103225

Zhang, Xiang, Aiqin Fang, Catherine P. Riley, Mu Wang, Fred E. Regnier, and Charles Buck, 'Multi-Dimensional Liquid Chromatography in Proteomics--a Review', *Analytica Chimica Acta*, 664.2 (2010), pp. 101–13, doi:10.1016/j.aca.2010.02.001

Zhu, Juan, Yun Fan, Sergey Shabala, Chengdao Li, Chao Lv, Baojian Guo, and others, 'Understanding Mechanisms of Salinity Tolerance in Barley by Proteomic and Biochemical Analysis of Near-Isogenic Lines', *International Journal of Molecular Sciences*, 21.4 (2020), p. 1516, doi:10.3390/ijms21041516