

Resposta de Peroxidasas Classe III ao Estresse Salino em *Zea mays* L.: Evidências Transcriptômicas e Genes Candidatos para Tolerância à Salinidade

Maria Adrielle dos Santos de Sousa do Nascimento^[1], Matheus Finger Ramos de Oliveira^[2],
Thais Andrade Germano^[3], Andresiane Sousa da Silva^[4], Rafael de Souza Miranda^[5], José
Hélio Costa^[6].

RESUMO: As peroxidasas de classe III (PRX III) desempenham um papel fundamental na resposta antioxidante de plantas submetidas ao estresse salino. Em *Zea mays* L., 159 proteínas estão depositadas no RedoxiBase, as quais correspondem a 136 genes. Este estudo teve como objetivo identificar genes de PRX III diferencialmente expressos em folhas e raízes de *Z. mays* usando dados transcriptômicos públicos sob estresse salino (NaCl 100 mM) (bioprojeto PRJNA670840). Os dados transcriptômicos foram obtidos de plântulas da cultivar Jing724 com coletas de tecidos em 12 intervalos de tempos (0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h/1 d, 48 h/2 d, 72 h/3 d, 120 h/5 d and 168 h/7 d). Os dados revelaram que a expressão total das PRX III foi significativamente maior nas raízes em todos os tempos de análise. No total, 99 dos 136 genes de PRX III foram diferencialmente expressos, sendo 54 “upregulados” e 79 “downregulados” ao longo do tratamento por NaCl. A análise por classes funcionais revelou que as classes 1A, 1B, 2A e 2C concentraram o maior número de genes regulados, principalmente nas raízes. Esses resultados indicam uma atuação preferencial das PRX III na raiz, órgão mais exposto ao acúmulo salino, e sugerem que membros gênicos específicos podem estar diretamente envolvidos nos mecanismos moleculares de defesa antioxidante em resposta ao estresse salino. Os dados obtidos sugerem genes candidatos promissores para estudos funcionais e aplicações em programas de melhoramento genético visando tolerância à salinidade.

PALAVRAS-CHAVE: PRX III; Estresse abiótico; Expressão gênica

Class III Peroxidases Response to Salt Stress in *Zea mays* L.: Transcriptomic Evidence and Candidate Genes for Salinity Tolerance

ABSTRACT:

Class III peroxidases (PRX III) play a crucial role in the antioxidant response of plants under salt stress. In *Zea mays* L., 159 proteins corresponding to 136 genes are deposited in RedoxiBase. This study aimed to identify differentially expressed PRX III genes in leaves and roots of *Z. mays* using public transcriptomic data under salt stress (100 mM NaCl) (bioproject PRJNA670840). The transcriptomic data were obtained from seedlings of the Jing724 cultivar, with tissue sampling at 12 time points (0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h/1 d, 48 h/2 d, 72

[1] Mestre em Bioquímica, Doutoranda em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará-UFC, CEP 60455-760. Fortaleza - CE, Fone: (88)99806-3312.
e-mail: maria.adrielle@alu.ufc.br.

[2] Bacharel em Biotecnologia, Graduando em Ciência de Dados. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

[3] Doutorado em Bioquímica. Bolsista de Pós-doutorado da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

[4] Mestre em Bioquímica. Doutoranda em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

[5] Doutorado em Bioquímica Vegetal (Bolsista de Produtividade 2 –CNPq). Professor Adjunto II da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI.

[6] Doutorado em Bioquímica (Bolsista de Produtividade 1C – CNPq). Professor Associado IV da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

h/3 d, 120 h/5 d, and 168 h/7 d). The data revealed that the total expression of PRX III genes was significantly higher in roots at all time points analyzed. In total, 99 out of 136 PRX III genes were differentially expressed, with 54 upregulated and 79 downregulated throughout the NaCl treatment. Functional class analysis revealed that classes 1A, 1B, 2A, and 2C encompassed the highest number of regulated genes, predominantly in roots. These results indicate a preferential role of PRX III in roots, the organ most exposed to salt accumulation, and suggest that specific gene members may be directly involved in the molecular mechanisms of antioxidant defense in response to salt stress. The findings highlight promising candidate genes for functional studies and applications in breeding programs aimed at improving salinity tolerance.

KEYWORDS: PRX III; Stress abiotic; Gene expression

INTRODUÇÃO:

A salinidade é um dos principais fatores limitantes da agricultura em escala global, afetando diretamente o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade de diversas culturas (Munns & Tester, 2015). Estima-se que mais de 20% das áreas irrigadas no mundo apresentem problemas relacionados ao acúmulo de sais, tornando urgente a compreensão dos mecanismos de tolerância das plantas a esse estresse (FAO, 2021). Nesse contexto, o estudo de genes e proteínas associados à resposta ao estresse salino tem se mostrado fundamental para o desenvolvimento de estratégias de mitigação e para o melhoramento genético de espécies cultivadas.

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas agrícolas mais relevantes do mundo, essencial na alimentação, na produção animal e na indústria. A produtividade dessa cultura, no entanto, é significativamente afetada por estresses abióticos como a salinidade, que compromete o desenvolvimento vegetal ao causar estresse osmótico e tóxico (Yang et al., 2020). A exposição ao excesso de Na^+ e Cl^- gera acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o H_2O_2 , que afetam a integridade celular. Para contornar esse efeito, as plantas ativam mecanismos antioxidantes, nos quais se destacam enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e diferentes peroxidases, como as peroxidases de classe III (PRX III) (Mittler, 2017).

As PRX III, presentes na parede celular e vacúolos, são enzimas do tipo hemoproteína e exercem funções diversas, como lignificação, defesa contra patógenos e resposta a estresses abióticos (Passardi et al., 2005). Essas enzimas formam uma grande família multigênica, cuja expressão pode variar de forma específica entre tecidos, condições ambientais e tempo de exposição (Wang et al., 2022). No milho, a atuação dessas peroxidases ainda é pouco compreendida, especialmente em relação à sua resposta ao estresse salino. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar o perfil de expressão das peroxidases de classe III em folhas e raízes de *Z. mays* ao longo de diferentes tempos de exposição ao NaCl, com foco em identificar genes potencialmente envolvidos na resposta ao estresse salino.

A investigação de enzimas antioxidantes é especialmente relevante porque a produção excessiva de EROs sob condições de salinidade pode levar à peroxidação lipídica, danos às proteínas e ao DNA, culminando em morte celular (Gill & Tuteja, 2010). Nesse sentido, compreender a regulação e a atividade de enzimas como as PRX III pode fornecer informações fundamentais para elucidar como o milho ajusta suas respostas moleculares diante do estresse. Além disso, tais estudos podem subsidiar programas de melhoramento genético e biotecnologia

vegetal voltados à obtenção de variedades mais tolerantes, contribuindo para a segurança alimentar e sustentabilidade agrícola em ambientes cada vez mais desafiadores.

MATERIAL E MÉTODOS:

1. Identificação dos genes PRX Classe III de Zea mays

As análises de bioinformática foram conduzidas no Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (DDBM- UFC). Para as análises foram inicialmente coletados 159 genes que codificam proteínas de peroxidase de classe III (PRX III) disponíveis no banco de dados **PeroxiBase**, cuja classificação foi realizada conforme os critérios descritos por Freitas et al. (2024). Em seguida, procedeu-se à triagem com o objetivo de identificar cDNAs únicos associados às proteínas de PRX III previamente catalogadas. Para essa etapa, aplicou-se um alinhamento **tBLASTn** contra o banco de dados **RefSeq RNA**, utilizando como parâmetro de corte identidade $\geq 99\%$. Essa análise permitiu verificar a ocorrência de diferentes proteínas derivadas de um mesmo gene. A partir desses resultados, os cDNAs correspondentes foram recuperados no banco de dados **GenBank**, assegurando a obtenção de sequências representativas e não redundantes.

2. Análise da expressão dos genes PRX Classe III

Coleta de genes/cDNAs/proteínas foram realizadas através de buscas em bancos de dados PeroxiBase relacionados aos genes de PRX III. A classificação desses genes foi feita de acordo com FREITAS et al., 2024. Os dados de expressão foram obtidos do bioprojeto PRJNA670840 originário de RNAs extraído de folhas e raízes da cultivar Jing724 sob estresse salino (100 mM) com coletas em 12 intervalos de tempos (0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h/1 d, 48 h/2 d, 72 h/3 d, 120 h/5 d and 168 h/7 d) a partir de plântulas com 15 dias de idade (Luo et al., 2021). A análise da expressão dos genes de PRX nos dados transcriptômicos foram realizadas em três etapas: 1) mapeamento das reads pelo software Magic-Blast, (Boratyn et al., 2019); 2) quantificação das reads mapeadas usando o programa HTseq Anders & Huber (2015) e 3) normalização da quantidade de reads em todas as amostras. Após a quantificação das reads mapeadas, a normalização das reads entre diferentes amostras foi realizada pelo método RPKM (Reads Per Kilobase of transcript per Million of mapped reads) (Mortazavi et al., 2008) de acordo com a seguinte equação: $RPKM = (\text{número de reads mapeadas} \times 10^9) / (\text{número de sequências em cada banco de dados} \times \text{número de nucleotídeos de cada cDNA})$. Também foi calculado o Log2 Fold change para comparar a expressão gênica no tratamento com o controle nos genes estudados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A expressão global das peroxidases de classe III em folhas e raízes de *Z. mays* submetidas ao estresse salino foi representada por somatórios das contagens normalizadas (Figura 1). Observou-se um padrão claro de maior expressão nas raízes em todos os tempos analisados. Além disso, na folha houve uma redução progressiva na expressão dos genes da PRX nos tempos finais (24 a 168 horas) quando comparado ao controle, o que não foi observado nas raízes. Esse comportamento sugere que a resposta antioxidante inicial nas folhas tende a ser transitória, enquanto nas raízes ela se mantém ativa durante a progressão do estresse. Segundo Mittler (2017), a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é uma das primeiras respostas celulares desencadeadas por estresses como a salinidade, exigindo ativação rápida e sustentada de sistemas antioxidantes, em especial peroxidases e ascorbato peroxidases (APXs). A maior expressão dos genes de PRX nas raízes, portanto, pode refletir a necessidade desse tecido em lidar com o acúmulo de EROs já no ponto de entrada do NaCl. Esse resultado é coerente com achados recentes que evidenciam maior regulação de genes antioxidantes nas raízes sob estresse abiótico (Wang et al., 2022).

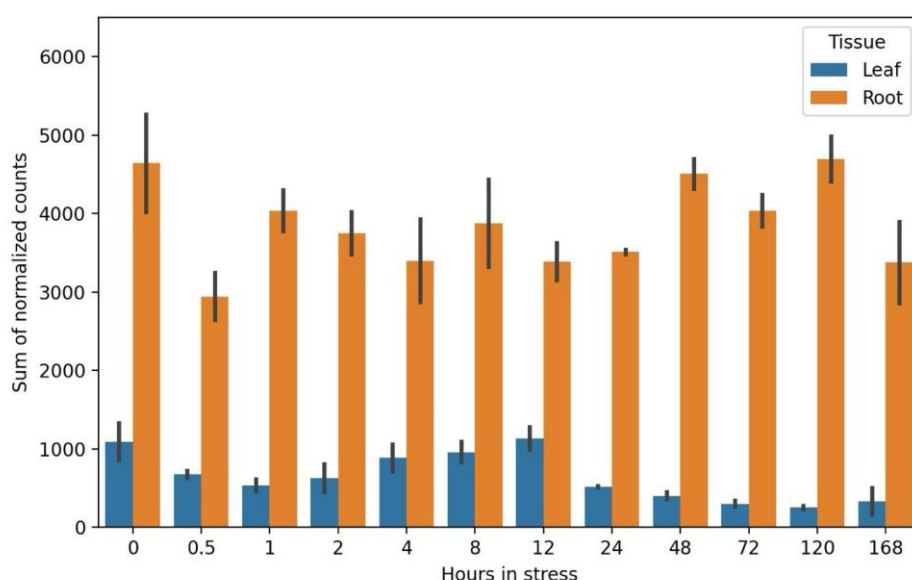


Figura 1. Expressão total (contagens normalizadas) das peroxidases de classe III em folhas e raízes de milho em diferentes tempos de exposição ao estresse salino (0h = controle).

Além da expressão total, foi realizada uma análise de expressão diferencial por classes funcionais de peroxidases. No total, 99 dos 136 genes foram diferencialmente expressos durante o tratamento com NaCl, sendo 54 “upregulados” e 79 “downregulados”, com sobreposição entre os grupos devido a respostas específicas em diferentes tempos. A Tabela 1 mostra que as classes 1A, 1B, 2A e 2C concentraram a maioria dos genes diferencialmente expressos, especialmente nas raízes, onde se observou um predomínio da regulação negativa. Esse padrão sugere uma regulação fina e dinâmica da atividade antioxidante, com repressão de isoformas específicas em momentos de menor acúmulo de EROs ou possivelmente em função de ajustes estruturais, como a lignificação da parede celular (Passardi et al., 2005).

A repressão diferencial de certas classes de PRX pode indicar que não apenas a ativação, mas também a supressão seletiva dessas isoformas é essencial para a homeostase celular durante o estresse. Isso é consistente com o modelo proposto por Passardi, Penel & Dunand (2005), no qual diferentes isoformas de PRX podem ter funções até opostas: algumas promovendo a detoxificação de EROs e outras direcionando sua utilização para processos como o endurecimento da parede celular. Assim, a redução de expressão de determinados genes em folhas pode estar relacionada a uma estratégia de economia de energia, redirecionando recursos metabólicos para rotas de proteção mais específicas, como a síntese de osmólitos (Munns & Tester, 2008; Yang, Guo & Shi, 2020).

Outro ponto importante é que a predominância da regulação negativa observada nas raízes pode estar associada à fase de aclimação da planta. Em estágios iniciais do estresse, há ativação rápida de antioxidantes para conter o pico inicial de EROs; posteriormente, certos genes podem ser reprimidos como forma de evitar excesso de atividade peroxidásica, o qual poderia comprometer o balanço redox intracelular ou afetar processos como o alongamento celular. Esse ajuste dinâmico sugere que as raízes não apenas ativam, mas também refinam a expressão de PRX de acordo com a intensidade e duração do estresse salino.

Adicionalmente, a diferenciação tecidual observada — com respostas contrastantes entre folhas e raízes — reforça a hipótese de especialização funcional das PRX III em *Z. mays*. Enquanto as folhas parecem priorizar mecanismos de fotoproteção e ajuste osmótico, as raízes mantêm um sistema antioxidante robusto e regulado de forma seletiva, o que pode ser crucial para a tolerância global da planta à salinidade. Estudos recentes em milho e outras espécies confirmam que membros específicos da família PRX atuam como genes-chave em mecanismos adaptativos a estresses abióticos, incluindo salinidade (Wang et al., 2015; Louo et al., 2021; Ma et al., 2021).

Portanto, os resultados apresentados corroboram a ideia de que a família das PRX de classe III desempenha papéis múltiplos e tecidualmente específicos no estresse salino em milho, atuando tanto na neutralização de EROs quanto em processos de remodelamento da parede celular. Essa dualidade funcional pode ser um dos fatores que explicam a ampla diversidade de isoformas dessa família gênica (Freitas et al., 2024; Zhang et al., 2022).

classe	Up_folha	Down_folha	Up_raiz	Down_raiz
0	0	0	0	1
1A	5	6	12	21
1B	1	6	3	11
1C	1	1	2	2
2A	5	9	8	12
2B	2	2	3	3
2C	1	0	0	4
2D	0	2	4	1
2E	1	0	0	0
3A	3	3	5	7
3B	0	1	0	0
3C	0	0	0	0
3D	1	1	1	2
3E	0	0	1	0

Tabela 1. Número de genes diferencialmente expressos (upregulados e downregulados) por classe de peroxidase de classe III em folhas e raízes de milho sob estresse salino.

CONCLUSÕES:

As peroxidases de classe III mostraram expressão significativamente maior nas raízes de *Zea mays* ao longo do estresse salino, indicando que esse tecido é o principal local de regulação antioxidante frente ao acúmulo de EROs. A identificação de 99 genes diferencialmente expressos, com destaque para as classes 1A, 1B, 2A e 2C, reforça o papel funcional dessas enzimas na resposta ao estresse. Tais genes representam alvos promissores para estudos funcionais e aplicações no melhoramento genético visando à tolerância à salinidade em milho.

AGRADECIMENTOS: INCT em Agricultura Sustentável no Semiárido Tropical-INCTAGriS (CNPq/Funcap/Capes).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq - a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, v. 31, n. 2, p. 166-169, 2015. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu638.
- BORATYN, G. M.; THIERRY-MIEG, J.; THIERRY-MIEG, D.; BUSBY, B.; MADDEN, T. L. Magic-BLAST, an accurate RNA-seq aligner for long and short reads. *BMC Bioinformatics*, v. 20, n. 405, 2019. DOI: 10.1186/s12859-019-2996-x.
- ELJEBBAWI, A.; SAVELLI, B.; LIBOUREL, C.; ESTEVEZ, J. M.; DUNAND, C. Class III peroxidases in response to multiple abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana* Pyrenean populations. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 7, p. 3960, 2022. DOI: 10.3390/ijms23073960.
- FAO. The state of the world's land and water resources for food and agriculture: Systems at breaking point. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2021.
- FREITAS, C. D. T.; COSTA, J. H.; GERMANO, T. A.; ROCHA, R. O.; RAMOS, M. V.; BEZERRA, L. P. Class III plant peroxidases: From classification to physiological functions. *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 130306, 2024. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.130306.
- LI, Z. F. D.; WANG, X.; ZENG, R.; ZHANG, X.; TIAN, J.; ZHANG, S.; YANG, X.; TIAN, F.; LAI, J.; SHI, Y.; YANG, S. The transcription factor bZIP68 negatively regulates cold tolerance in maize. *Plant Cell*, v. 34, n. 8, p. 2833–2851, 2022. DOI: 10.1093/plcell/koac137.
- LOUO, M.; ZHANG, Y.; LI, J.; ZHANG, P.; CHEN, K.; SONG, W.; WANG, X.; YANG, J.; LU, X.; LU, B.; ZHAO, Y.; ZHAO, J. Molecular dissection of maize seedling salt tolerance using a genome-wide association analysis method. *Plant Biotechnol J.*, v. 19, n. 10, p. 1937–1951, 2021. DOI: 10.1111/pbi.13607.
- MA, L. L.; ZHANG, M. Y.; CHEN, J.; QING, C. Y.; HE, S. J.; ZOU, C. Y.; YUAN, G. S.; YANG, C.; PENG, H.; PAN, G. T.; et al. GWAS and WGCNA uncover hub genes controlling salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 134, n. 10, p. 3305–3318, 2021. DOI: 10.1007/s00122-021-03897-w.
- MATTOS, E. C.; SILVA, J. A. G.; SILVA, E. S.; GOMES, R. L. F.; SILVA, A. M. S.; SILVA, J. R. A.; et al. Estresse salino em plantas: efeitos fisiológicos e estratégias de mitigação. *Revista*

Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 24, n. 5, p. 321–328, 2020. DOI: 10.1590/1807-1929/agriambi.v24n5p321-328.

MITTLER, R. ROS are good. *Trends in Plant Science*, v. 22, n. 1, p. 11–19, 2017. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.08.002.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, v. 59, p. 651–681, 2008. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, v. 24, n. 5, p. 255–265, 2005. DOI: 10.1007/s00299-005-0977-2.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, v. 10, n. 11, p. 534–540, 2005. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.09.002.

PEREIRA FILHO, I. A. Milho (*Zea mays* L.). In: SILVA, J. A. G.; PEREIRA FILHO, I. A.; SILVA, E. S.; et al. (Org.). *Tecnologias de produção de milho*. 2. ed. Fortaleza: Embrapa, 2015. p. 1–20.

RAY, D. K.; RAMANKUTTY, N.; COHEN, J. M.; WEST, P. C. The state of food and agriculture 2021: Making agrifood systems more resilient to shocks and stresses. FAO, 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/publications/sofa/2021/en/>.

SOBIECH, A.; TOMKOWIAK, A.; JAMRUSZKA, T.; KOSIADA, T.; SPYCHAŁA, J.; LENORT, M.; et al. Transcriptomic characterization of candidate genes for *Fusarium* resistance in maize (*Zea mays* L.). *Pathogens*, v. 14, n. 8, p. 779, 2025. DOI: 10.3390/pathogens14080779.

WANG, Y.; WANG, Q.; ZHAO, Y.; HAN, G.; ZHU, S. Systematic analysis of maize class III peroxidase gene family reveals a conserved subfamily involved in abiotic stress response. *Gene*, v. 566, n. 1, p. 95–108, 2015. DOI: 10.1016/j.gene.2015.04.041.

WANG, Y.; ZHANG, M.; GUO, R.; ZHAO, J. Genome-wide analysis of class III peroxidase gene family in maize: Gene structure, evolution and expression profiling under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 171, p. 135–147, 2022. DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.12.007.

YANG, Y.; GUO, Y.; SHI, H. Recent advances in the mechanisms of plant response to salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 1, p. 248, 2020. DOI: 10.3390/ijms21010248.

ZHANG, X.; LIU, J.; ZHAO, Y.; LI, Z.; LIU, X.; ZHANG, H.; et al. Genome-wide analysis of the class III peroxidase gene family in sesame and elucidation of their role in conferring drought stress tolerance in contrasting sesame cultivars. *Plant Science*, v. 314, p. 111073, 2022. DOI: 10.1016/j.plantsci.2021.111073.