



DEFICIÊNCIA DE NITROGÊNIO PODE AFETAR O TRANSPORTE DE UREIA EM FEIJÃO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.)?

Silviany Angelica Fernandes Silva, Wueslly de Melo Rufino da Silva, Caio Alves Toledo de Sá, Tiago Benedito dos Santos

PROBLEMÁTICA

Em termos de sistemas de produção agrícola, o sucesso no manejo nutricional de qualquer cultura agrícola depende de vários fatores: características químicas, físicas e biológicas do solo, além da influência dos genótipos. Entretanto, apesar do manejo agrônomo visando à adequação do solo para a cultura do feijoeiro estar estabelecido, pouco se conhece sobre o efeito dos genótipos na adaptação a baixa disponibilidade de nutrientes e dos genes transportadores de nitrogênio envolvidos nesse processo. Neste ínterim, a bioinformática tornou-se uma ferramenta-chave para o melhoramento vegetal, possibilitando um maior entendimento e resolução dos processos biológicos (mudanças na expressão gênica) frente as adversidades (ex: estresses abióticos, bióticos, deficiência nutricional) que as culturas podem enfrentar. Com efeito, esta pesquisa básica de identificação de genes candidatos via bioinformática, permitirá futuramente o desenvolvimento de plantas mais eficientes na absorção e utilização de nutrientes minerais, bem como, explorar a variabilidade genética, combinadas com manejo do solo e do uso de fertilizantes.

CONHECIMENTO PRÉVIO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado uma das leguminosas mais importantes do mundo para consumo humano, e dentre os maiores produtores estão Mianmar, Índia, Brasil, Estados Unidos, México e Tanzânia (FAO, 2019). Esta cultura também se destaca pela relevância econômica e social, por ser uma grande fonte nutricional, em particular para os brasileiros e população mais carentes em todo o mundo (Celmile et al., 2018; Lovato et al., 2018). Notavelmente, a maior concentração da produção desta cultura é proveniente da agricultura familiar e pouco tecnificada (Hoffmann, 2014).

Condições edafoclimáticas adversas (dentre elas a falta de nitrogênio) podem limitar severamente o crescimento e a produtividade agrícola. O nitrogênio (N) é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, considerado um dos fatores preponderantes para o sucesso da cultura do feijoeiro, visto que é o nutriente mais requerido pela espécie (Braz et al., 2018; Lange et al., 2018). Adicionalmente, este elemento é extremamente necessário para a síntese de aminoácidos e proteínas, bases nitrogenadas, enzimas, coenzimas e vitaminas, pigmentos e uma variedade de outros metabólitos que contém N em sua estrutura (Tegeder; Masclaux-Daubresse, 2018).

As principais formas inorgânicas de N absorvidas pelas plantas são amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) e a ureia [$\text{CO}_2(\text{NH})_2$]. As plantas desenvolveram



diferentes estratégias, envolvendo vias de sinalização de curto e longo alcance para lidar com as mudanças e a disponibilização de N no solo. Dentre estas estratégias, o transporte de nutrientes pode ser desencadeado por uma série de famílias gênicas, tais como, os transportadores de amônio (AMT), nitrato (NRT) e ureia (DUR3) (Nacry et al., 2013).

Particularmente, de acordo com Kojima et al. (2007), em plantas superiores, os respectivos homólogos de DUR3 podem ser os principais transportadores responsáveis pela captação de ureia de alta afinidade via membrana plasmática. O gene transportador *DUR3* já foi identificado e caracterizado em importantes culturas de interesse agrônomo: arroz (*OsDUR3*) e milho (*ZmDUR3*) (Wang et al., 2012; Liu et al., 2015). Em culturas agrícolas exigentes em N, como o feijoeiro, o transportador de ureia torna-se um grande potencial a ser explorado para otimização da absorção desta molécula diretamente da solução do solo, antes que esta passe pelo processo de hidrólise e seja, posteriormente, convertida em formas de N voláteis. Diante do exposto, utilizando as ferramentas da bioinformática na caracterização *in silico* do gene *DUR3* de *P. vulgaris* L., será o primeiro passo na seleção de genes-candidatos para futuras análises funcionais, auxiliando os programas de melhoramento desta espécie, em tornar plantas mais eficientes na utilização do fertilizante aplicado no solo.

DESCRIÇÃO DA PESQUISA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO*

No presente estudo a sequência de *Arabidopsis thaliana* (AT5G45380.1) foi utilizada como sequência de consulta no algoritmo *BlastP* no genoma *P. vulgaris* L. depositado banco de dados *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Todas as sequências (genômica, aminoácido e sequência codificadora (CDS)), foram recuperadas e copiadas em um arquivo no formato *FASTA*. As sequências foram confrontadas individualmente com as sequências depositadas no banco de dados *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando os algoritmos *online BlastX* e *BlastP* (Altshul et al., 1997), visando confirmar a identidade das mesmas. Posteriormente, as características das propriedades físico-químicas da proteína DUR3, tais como peso molecular (kDa) e ponto isoelétrico (pI), foram preditas utilizando a ferramenta *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>). A localização subcelular foi realizada com o algoritmo *Plant-mPLOC* (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>). Através do programa *GRAVY calculator* foi verificado o índice de propriedade hidrofílica/hidrofóbica da proteína DUR3 (*hydropathy index - Grand average of hydropathy*). Adicionalmente, outras ferramentas de bioinformática foram empregadas visando a comparação de sequências obtidas, bem como: predição de hélices transmembrana (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>), estrutura gênica (*GSDS 2.0 - Gene Structure Display Gene*), alinhamento (*ClustalW*) e construção de árvore filogenética (programa *MEGA7*, usando o método de vizinhança - *Neighbor Joining* (NJ), com valor de *bootstrap* de 1000 repetições independentes).

PLANTAS CRESCIDAS SOB SUPRESSÃO DE N

Sementes de feijão provenientes de duas diferentes cultivares (IPR Colibri (ciclo precoce) e IPR Tangará (ciclo médio)), foram germinadas em caixas contendo substrato vegetal em casa de vegetação climatizada, localizada a 22°06'59"S, 51°27'02"W em altitude de 475 m, no Campus II da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Após a emergência (uma semana após semeadura), as raízes das plantas foram lavadas cuidadosamente com água destilada para retirada do substrato e foram então transferidas para vasos de 1,8 L com solução nutritiva e aeração constante contendo macro e micronutrientes com a seguinte composição (em μM): 800 K_2SO_4 , 250 MgSO_4 , 200 KH_2PO_4 , 500 CaCl_2 , 4000 NH_4NO_3 , 100 NaFeEDTA , 5 H_3BO_3 , 3 MnSO_4 , 2,5 ZnSO_4 , 0,1 CuSO_4 , 0,7 NaMoO_4 . Os vasos utilizados nesse experimento hidropônico (ver Figura 1) foram escuros (negros), para evitar que a solução nutritiva receba a luz solar evitando a proliferação de possíveis microrganismos, tais como algas. Após uma semana de crescimento em solução nutritiva, as plantas foram transferidas para uma nova solução sem fontes de N por 3, 5 dias, para verificação da dinâmica da indução dos genes relacionados ao transporte de N. Como controle experimental foram utilizadas plantas que não foram expostas a falta de N (Ctr). Após o término de cada tratamento (3 e 5 dias), foram coletadas folhas (um trifólio expandido de cada vaso) e raízes laterais. Cada replicata biológica foi representada por *pools* de tecidos (folha e raiz sob as mesmas condições). Todos materiais vegetais coletados foram imersos imediatamente em N líquido e armazenada em freezer -80°C , para posteriores análises moleculares.

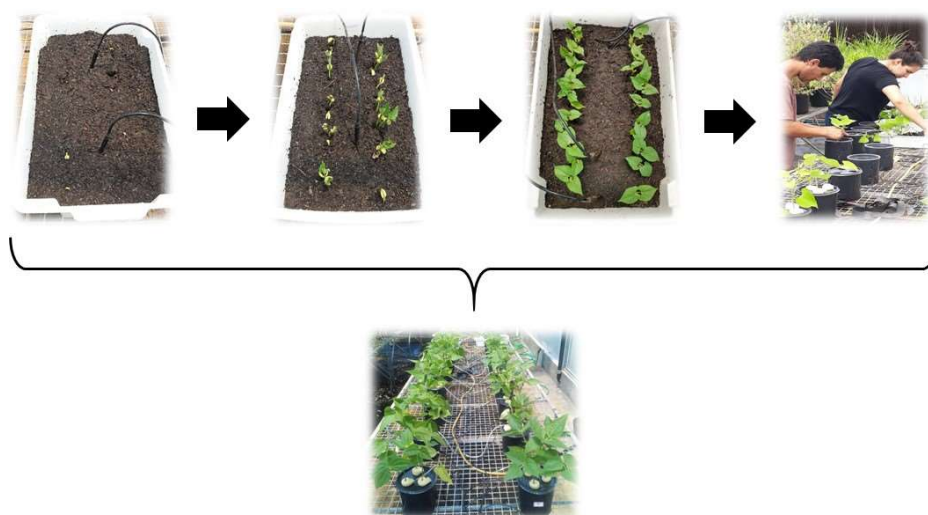


Figura 1. Representação do experimento hidropônico do feijoeiro sob supressão de N. (Fonte próprio autor).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema de transporte de uréia nas plantas foi identificado e caracterizados há pouco tempo, sendo a primeira evidência descrita por Liu et al. (2003). Utilizando as ferramentas *in silico*, foi identificado um membro do

transportador de ureia (número de acesso no genoma de *P. vulgaris* L. - Phvul.002G127200.1), o qual foi denominado *PvDUR3*. Este transportador está localizado no cromossomo dois (Chr02:26934399..26937859). Quanto as características físico-químicas da proteína, o tamanho deduzido da sequência de aminoácidos (aa) do gene foi de 713 aa, pI foi de 8.80 e o peso molecular (kDa) foi de 76.90. Quanto a predição da localização subcelular foi observado que *PvDUR3* está localizado na membrana celular. Também foi verificado a presença de 15 domínios transmembrana na proteína *PvDUR3* (Figura 2).

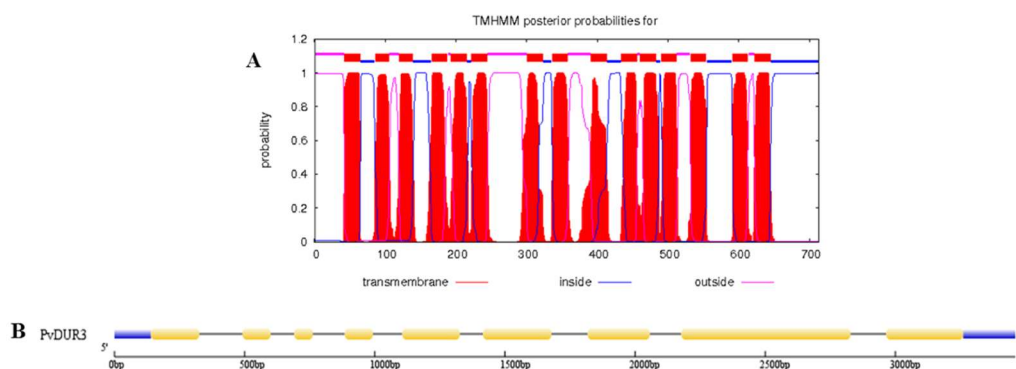


Figura 2. A. Predição da topologia transmembrana obtida na análise realizada pelo programa *TMHMM*. **B.** Estrutura gênica do gene *PvDUR3*. Caixas amarelas representam os éxons e as linhas representam íntrons.

Tomados em conjunto, estes resultados corroboram com o observado em outros genomas de plantas sequenciados, como em *A. thaliana* (planta modelo) e *Vitis vinifera*, onde comprovou-se que o transportador *PvDUR3* também pertence a subfamília de transportadores de uréia *DUR3*, o qual, está relacionado com a superfamília de transportadores de solutos por simporte com sódio (SSS; Kojima et al., 2007), além de ser descrito como gene de cópia única (De Michele et al., 2012).

A Figura 3A revelou que baseados nos critérios de homologia e filogenia os genes *DUR3* formaram um agrupamento que respeita a divisão entre dicotiledôneas, monocotiledôneas. A sequência de *PvDUR3* foi agrupada com sequências de outras plantas dicotiledôneas (Figura 3A).

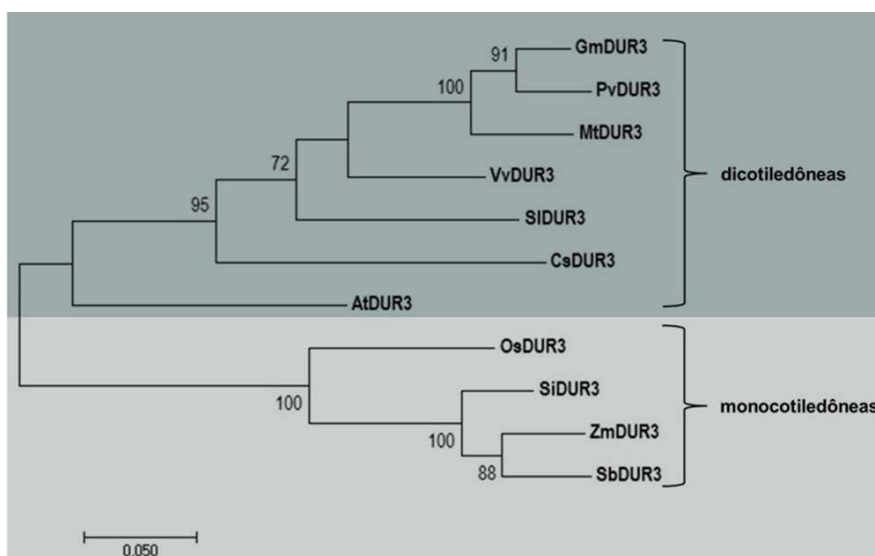


Figura 3. A. Árvore filogenética de transportadores de uréia, construída a partir do alinhamento das 11 proteínas DUR3 de espécies dicotiledôneas e monocotiledôneas, utilizando o programa MEGA7. São indicados valores de *bootstrap* acima de 50%.

Para entender o mecanismo transcricional do gene *PvDUR3* (folha e raiz) no feijoeiro sob supressão de N (Figura 1), a próxima etapa desse estudo será a validação do gene, a ser realizada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

APLICAÇÃO PRÁTICA

O transportador de N descrito neste estudo é um gene-candidato promissor para a engenharia genética, permitindo o desenvolvimento de novas estratégias que visem o melhoramento do feijoeiro. Adicionalmente, os resultados obtidos ajudarão a aumentar a eficiência na absorção e utilização de fertilizantes pelo feijoeiro, desencadeando uma diminuição nos custos com insumo, além de diminuir o impacto ambiental da produção agrícola.

AGRADECIMENTO

Ao banco de germoplasma do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, por disponibilizar através de suas coleções, as sementes IPR Colibri e IPR Tangará para este estudo.

LITERATURA CITADA

Altschul, S. F. et al. Gapped BLASTb and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389–3402, 1997.

Braz, A. J. B. P. et al. Nitrogen fertilization in super-early cycle common bean using new sources of urea. *Científica*, 46: 180–186, 2018.



BOLETIM DE PESQUISA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - UNOESTE



- Celmeli, T. et al. The Nutritional Content of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Landraces in Comparison to Modern Varieties. *Agronomy*, Madison, 8: 166, 2018.
- De Michele, R. et al. Ammonium and urea transporter inventory of the *Selaginella* and *Physcomitrella* genomes. [Front Plant Science](#), 62, 2012.
- FAO – Food and Agriculture Organization the United Nations. FAOSTAT: Crops. Disponível em: Acesso em: 13 jun. 2019.
- Hoffmann, R. Agricultura familiar produz 70% dos alimentos consumidos no Brasil? *Segurança Alimentar e Nutricional*, 21: 417-421, 2014.
- Kojima, S. et al. AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. *Plant Journal*, 52: 30–40, 2007.
- Lange, A. et al. Métodos de fornecimento de nitrogênio para melhorar a produtividade na cultura do feijoeiro irrigado no Cerrado Mato-grossense. *Nativa*, Sinop, 6: 252–260, 2018.
- Liu, G. W. et al. Identification and functional analysis of a maize (*Zea mays*) DUR3 homolog that transports urea with high affinity. *Planta*, 241: 861–874, 2015.
- Liu, L. H. et al. Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133: 1220–1228, 2003.
- Lovato, F. et al. Composição centesimal e conteúdo mineral de diferentes cultivares de feijão biorfortificado (*Phaseolus vulgaris* L.). *Brazilian Journal of Food Technology*, 21: e2017068, 2018.
- Nacry, P., Bouguyon, E., Gojon, A. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant Soil* 370, 1–29, 2013.
- Tegeder, M., Masclaux-Daubresse, C. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytologist*, 217: 35-53, 2018.
- Wang, W. H. et al. Rice DUR3 mediates high-affinity urea transport and plays an effective role in improvement of urea acquisition and utilization when expressed in Arabidopsis. *New Phytologist*, 193: 432–444, 2012.