

TRANSPORTADOR DE UREIA EM *Vicia faba* L.: IDENTIFICAÇÃO ATRAVÉS DA BIOINFORMÁTICA

Bruno da Rocha Toroco¹, Luís Gustavo Gomes Lobo¹, Diliane Harumi Yaguinuma¹, Jardel de Oliveira¹ e Tiago Benedito dos Santos¹

¹Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: bruno-taroco@hotmail.com/dossantos@unoeste.br

PROBLEMÁTICA

O nitrogênio (N) é um macronutriente indispensável para o crescimento, desenvolvimento e rendimento das culturas. O N pode ser adquirido e assimilado de diversas fontes, como nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e ureia [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$]. O objetivo deste estudo foi identificar o gene *DUR3* (transportador de ureia) de *Vicia faba* L. baseado em métodos de bioinformática.

CONHECIMENTO PRÉVIO

As leguminosas, são uma fonte sustentável de alimentos ricos em proteínas, e amplamente cultivadas em todo o mundo. Entre as leguminosas, o feijão fava (*Vicia faba* L.), é descrito como uma das culturas mais antigas cultivadas no mundo (MÍNGUEZ; RUBIALES, 2021). Os países mediterrâneos, bem como Etiópia, Egito, China, Afeganistão, Índia, Norte da Europa e Norte de África, são grandes produtores do feijão fava (MÍNGUEZ; RUBIALES, 2021). Esta planta também é considerada importante do ponto de vista ecológico, nutricional e econômico (XIAO et al., 2021). É uma cultura multiuso que fornece vários serviços ecossistêmicos, ou seja, cultivada principalmente como fonte de alimento para a população humana, como ração/silagem animal (ZHOU et al., 2018). As plantas podem absorver e assimilar nitrogênio (N) de uma variedade de fontes, incluindo nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), ureia [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] e até mesmo alguns aminoácidos (DE CARVALHO FERREIRA et al., 2024). Também ao longo de sua evolução as plantas desenvolveram mecanismos que permitem a captação da ureia disponível no solo, que é realizada pelo transportador de ureia, o gene *DUR3*. O transportador de ureia já foi identificado e caracterizado em várias espécies de plantas: planta modelo-*Arabidopsis thaliana* (KOJIMA et al., 2007), arroz-*Oryza sativa* (WANG et al., 2012; BEIER et al., 2019), milho-*Zea mays* (ZANIN et al., 2014; LIU et al., 2015), café-*Coffea arabica* L. (DOS SANTOS et al., 2021), algas (PECHKOVSKAYA et al., 2020), forrageiras-*Megathyrus maximus* (DE CARVALHO FERREIRA et al., 2024), entre outras espécies. É importante mencionar que não há relatos desse gene em *V. faba* L. Este estudo identificou o gene *DUR3* através do genoma de *V. faba* L., com as ferramentas da bioinformática.

DESCRIÇÃO DA PESQUISA

Primeiramente, foi utilizado a sequência de *A. thaliana* (AT5G45380.1) como isca contra o genoma do feijão fava (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Vfaba_v1_1). A busca feita utilizou a ferramenta *BlastP*. Toda característica físico-química da sequência

identificada está descrito na Tabela 1. Na figura 1 pode se observar o esquema e as ferramentas de bioinformática utilizadas.

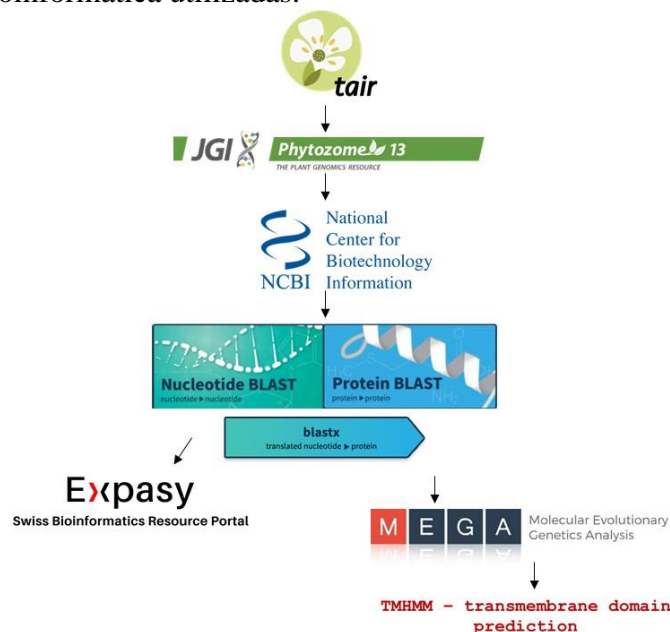


Figura 1. Esquema ilustrativo com as ferramentas (*softwares*) utilizados para obtenção dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas adquirem N através de seus sistemas radiculares durante seu ciclo fenológico e, dependendo da fonte de N e da quantidade disponível, podem ocorrer sérios problemas com o desenvolvimento das plantas (GOJON, 2017). A ureia é a fonte de N mais comumente utilizada nas culturas em todo o mundo. As plantas podem absorver a ureia do solo através do transportador de ureia de alta afinidade que é mediado pelo gene *DUR3* (KOJIMA et al., 2007). Por exemplo, a caracterização molecular e fisiológica do gene *DUR3* foi bem documentada em plantas modelo como *A. thaliana* (KOJIMA et al., 2007; WANG et al., 2008), milho-*Z. mays* (LIU et al., 2015) e arroz-*O. sativa* (BEIER et al., 2019). Dados da sequência genômica, codificadora do gene (CDS) e proteica foram obtidas no banco de dados *Phytozome* (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Vfaba_v1_1), possibilitando a investigação do gene transportador de ureia em *V. faba* L.. Neste estudo, foi previsto um gene candidato e suas informações estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Descrição das principais propriedades físico-química do gene *VfDUR3*.

Nome do gene	Número de identificação	Localização cromossômica (aa) ^a	pI ^b	kDa ^c	GRAVY ^d	Localização subcelular	
<i>VfDUR3</i>	Vfaba.Hedin2.R1.1g342200.1	chr1L:937898142..937901441	713	8.95	77.08	0.538	Membrana celular/ Aparato de Golgi

O comprimento da proteína (aa)^a foi de 713, com ponto isoelétrico (pI)^b de 8.95, peso molecular (kDa)^c previsto de 77.08 (Tabela 1). O índice GRAVY^d positivo é

indicativo de ser uma proteína hidrofóbica (Tabela 1). A possível localização do gene é na membrana celular e no aparato de golgi (Tabela 1). Essas informações são consistentes com descrições anteriores na literatura. O transporte de nutrientes nas plantas é facilitado por diversas famílias de proteínas transportadoras encontradas na membrana celular, que podem mediar a absorção de várias formas orgânicas (por exemplo, ureia) e inorgânicas de N do solo (MATIZ et al., 2019; DE CARVALHO FERREIRA et al., 2024). A estrutura éxon-íntron do gene *VfDUR3* no feijão fava também foi predito (Figura 2).

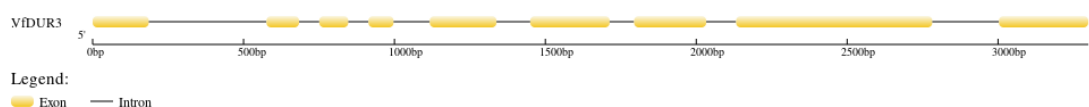


Figura 2. Estrutura do gene *VfDUR3* do feijão fava. As caixas amarelas representam a sequência de codificação (CDS), as linhas cinzas representam os íntrons.

Acredita-se que variações na estrutura e no número de genes podem ser causadas por mutações específicas, rearranjos genéticos e outros mecanismos durante a divisão de espécies monocotiledôneas e dicotiledôneas (HU et al., 2015). Foi relatado anteriormente que a proteína DUR3 de *A. thaliana* possui 14 domínios transmembranares que se projetam no lado externo da membrana (LIU et al., 2003). Neste estudo, previu-se que a proteína DUR3 possui 15 domínios transmembranares (Figura 3), concordando com membros previamente descritos da família *Poaceae*, como arroz (WANG et al., 2012) e milho (ZANIN et al., 2014; LIU et al., 2015).

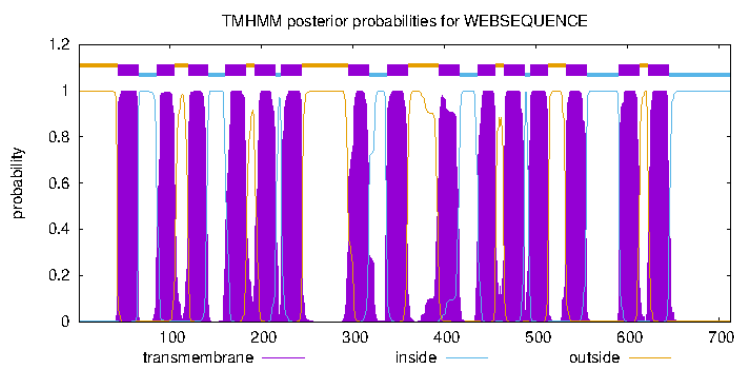


Figura 3. Domínios transmembranares da proteína *VfDUR3* predita com a ferramenta TMHMM.

Para investigar as relações filogenéticas entre as proteínas DUR3, uma árvore filogenética foi construída com base em um alinhamento de múltiplas sequências (Figura 4).

Como esperado, a sequência da proteína DUR3 do feijão fava se agrupou com espécies dicotiledônea (WANG et al., 2008). DUR3 é um gene único em espécies diplóides como *A. thaliana* e arroz (KOJIMA et al., 2007; LIU et al., 2003). De acordo com nossas descobertas, apenas uma sequência foi encontrada no banco de dados *Phytozome*. As informações obtidas do gene *VfDUR3* são estratégias benéficas para melhorar a absorção de N do fertilizante de ureia.

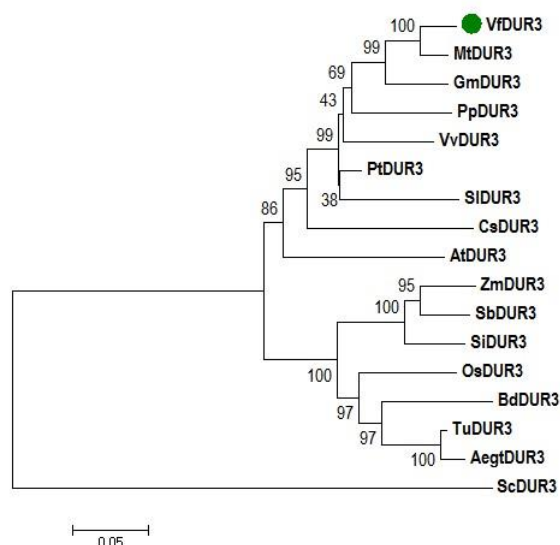


Figura 4. Análise filogenética das proteínas DUR3. Utilizou-se a sequência proteica de: *Saccharomyces cerevisiae* (Sc, AAA34582), *Z. mays* (Zm, KJ652242), *O. sativa* (Os, NP_001065513), *A. thaliana* (At, NP_199351), *Aegilops tauschii* (Aegt, EMT22254), *Triticum urartu* (Tu, EMS63712.1), *Brachypodium distachyon* (Bd, XP_003571687), *Setaria italica* (Si, XP_004965066), *Sorghum bicolor* (Sb, XP_002438118), *Cucumis sativus* (Cs, XP_004146194.1), *Vitis vinifera* (Vv, XP_002263043), *Populus trichocarpa* (Pt, XP_002303472.1), *Solanum lycopersicum* (Sl, XP_004245999), *Prunus persica* (Pp, EMJ11521.1), *Medicago truncatula* (Mt, XP_003612583), *Glycine max* (Gm, XP_003523904).

APLICAÇÃO PRÁTICA

A identificação de genes candidatos envolvidos no transporte de N em uma leguminosa são fundamentais para obter uma melhor compreensão da absorção de N via ureia e desenvolver futuras estratégias biotecnológicas para melhorar a absorção e eficiência de N nesta espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores BRT (mestrado), LGGL (mestrado), JO (doutorado) e DHY (doutorado) agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsas.

LITERATURA CITADA

BEIER, M.P., FUJITA, T., SASAKI, K., KANNO, K., OHASHI, M., TAMURA, W., KONISHI, N., SAITO, M., IMAGAWA, F., ISHIYAMA, K., MIYAO, A., YAMAYA, T., KOJIMA, S., 2019. The urea transporter DUR3 contributes to rice production under nitrogen-deficient and field conditions. **Physiol. Plant.** 167, 75–89.

DE CARVALHO FERREIRA, J., BAVARESCO, L. G., FIGUEIREDO, M. D. O. V., DOS SANTOS, T. B., RIBAS, A. F. 2024. Urea transporter *DUR3* gene in grasses: In silico characterization and relative expression in *Megathyrsus maximus* under different nitrogen sources. **Plant Gene**, 37, 100444.

DOS SANTOS, T.B., BABA, V.Y., VIEIRA, L.G.E., PEREIRA, L.F.P., DOMINGUES, D. S., 2021. The urea transporter DUR3 is differentially regulated by abiotic and biotic stresses in coffee plants. **Physiol. Mol. Biol. Plants** 27, 203–212.

GOJON, A., 2017. Nitrogen nutrition in plants: rapid progress and new challenges. **J. Exp. Bot.** 68, 2457–2462.

KOJIMA, S., BOHNER, A., GASSERT, B., YUAN, L., VON WIRÉN, N., 2007. AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. **Plant J.** 52, 30–40.

LIU, G.W., SUN, A.L., LI, D.Q., ATHMAN, A., GILLIHAM, M., LIU, L.H., 2015. Molecular identification and functional analysis of a maize (*Zea mays*) DUR3 homolog that transports urea with high affinity. **Planta** 241, 861–874.

MATIZ, A., CAMBUÍ, C.A., RICHET, N., MIOTO, P.T., GOMES, F., PIKART, F.C., CHAUMONT, F., GASPAR, M., MERCIER, H., 2019. Involvement of aquaporins on nitrogen-acquisition strategies of juvenile and adult plants of an epiphytic tank-forming bromeliad. **Planta** 250, 319–332.

MÍNGUEZ, M. I., RUBIALES, D. 2021. Faba bean. In V. O. Sadras & D. F. Calderini (Eds.), *Crop Physiology Case Histories for Major Crops* (pp. 452–481). **Academic Press**.

PECHKOVSKAYA, S.A., KNYAZEVA, N.A., MATANTSEVA, O.V., EMELYANOV, A.K., TELESH, I. V., SKARLATO, S.O., FILATOVA, N.A., 2020. Dur3 and nrt2 genes in the bloom-forming dinoflagellate *Prorocentrum minimum*: Transcriptional responses to available nitrogen sources. **Chemosphere** 241, 125083.

XIAO, J. X., ZHU, Y. A., BAI, W. L., LIU, Z. Y., LI, T. A. N. G., ZHENG, Y. 2021. Yield performance and optimal nitrogen and phosphorus application rates in wheat and faba bean intercropping. **Journal of Integrative Agriculture**, 20(11), 3012–3025.

WANG, W.H., KÖHLER, B., CAO, F.Q., LIU, G.W., GONG, Y.Y., SHENG, S., SONG, Q.C., CHENG, X.Y., GARNETT, T., OKAMOTO, M., QIN, R., MUELLER-ROEBER, B., TESTER, M., LIU, L.H., 2012. Rice DUR3 mediates high-affinity urea transport and plays an effective role in improvement of urea acquisition and utilization when expressed in Arabidopsis. **New Phytol.**, 193, 432–444.

WANG, W.H., KÖHLER, B., CAO, F.Q., LIU, L.H., 2008. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. **Plant Sci.** 175, 467–477.

ZHOU, R., HYLDGAARD, B., YU, X., ROSENQVIST, E., UGARTE, R. M., YU, S., WU, Z., OTTOSEN, C. O., ZHAO, T. 2018. Phenotyping of faba beans (*Vicia faba* L.) under cold and heat stresses using chlorophyll fluorescence. **Euphytica**, 214, 68.

ZANIN, L., TOMASI, N., WIRDNAM, C., MEIER, S., KOMAROVA, N.Y., MIMMO, T., CESCO, S., RENTSCH, D., PINTON, R., 2014. Isolation and functional characterization of a high affinity urea transporter from roots of *Zea mays*. **BMC Plant Biol.** 14, 222.