



Expressão gênica do metabolismo lipídico da chia sob doses de fósforo

Tiago Roque Benetoli da SILVA¹, Debora Fernanda Del Moura SOARES¹, Juliana STRACIERI¹,
Rhaizza Lana Pereira DUCHESKI¹, Gessica Daiane da SILVA¹

¹ Programa de pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

*E-mail: trbsilva@uem.br

(ORCID: 0000-0002-2015-2103; 0000-0002-2737-1368; 0000-0003-4670-8349; 0000-0003-4436-2663; 0000-0002-8998-3722)

Recebido em 19/02/2021; Aceito em 30/08/2021; Publicado em 20/09/2021.

RESUMO: A chia (*Salvia hispanica* L.) é uma planta anual herbácea considerada como fonte natural de ácidos graxos ômega-3, fibras, proteínas e antioxidantes. No entanto o cultivo no Brasil ainda é recente e as informações e recomendações técnicas existentes são limitadas, principalmente a respeito de adubação e época de semeadura. Portanto, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito da aplicação de doses de fósforo na expressão de genes responsáveis pela síntese de lipídios da cultura da chia. Foi conduzido o experimento em na Fazenda de Universidade Estadual de Maringá no Campus Regional de Umuarama. O solo usado no experimento é um Latossolo Vermelho Distrófico típico, com textura arenosa. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro e cinco repetições. Os tratamentos foram compostos por quatro doses de P₂O₅ aplicados na semeadura (0, 40, 80 e 120 kg ha⁻¹). Foi avaliada a expressão dos genes responsáveis pelo metabolismo de lipídios OLE1 e MGAT.

Palavras-chave: *Salvia hispânica*; teor de óleo; adubação fosfatada.

Lipid metabolism gene expression of chia under phosphorus rates

ABSTRACT: Chia (*Salvia hispanica* L.) is an annual herbaceous plant considered as a natural omega-3 fatty acids, fibers, proteins and antioxidants source. However, cultivation in Brazil is still recent and the existing information and technical recommendations are limited, mainly regarding fertilization. Therefore, the present work aimed the phosphorus rates application effect on the genes expression responsible for chia plants lipid synthesis. The experiment was conducted at farm of Universidade Estadual de Maringá at the Regional Campus of Umuarama, Paraná, Brazil. The experimental design was a completely randomized design with four and five replications. The treatments were composed of four rates of P₂O₅ at sowing (0, 40, 80 and 120 kg ha⁻¹). The expression of the genes responsible for lipid metabolism OLE1 and MGAT.

Key words: *Salvia hispanica*; oil meaning; phosphate fertilization.

1. INTRODUÇÃO

A chia (*Salvia hispanica* L.) é uma planta anual herbácea, pertencente à família Lamiaceae, natural do México (HERNÁNDEZ-GOMES et al., 2008; BUSILACCHI et al., 2013), suas sementes são utilizadas desde a era Pré-Colombiana, pelos Astecas e Maias como alimento para aumentar a resistência física (COELHO e SALAS-MELLADO, 2014).

Considerada como fonte natural de ácidos graxos ômega-3, fibras, proteínas e componentes nutricionais importantes, como os antioxidantes (IRALA, 2013; COELHO e SALAS-MELLADO, 2014). Poucas informações são encontradas sobre o cultivo da chia, especialmente no que diz respeito à adubação.

Torna-se crescente a necessidade de fósforo por parte de espécies vegetais produtivas, sendo que a manutenção adequada da nutrição da planta com esse nutriente é fator primordial para obtenção de altas produtividades (STAUFFER e SULEWSKI, 2004).

A expressão gênica é influenciada por fatores genéticos e principalmente por fatores ambientais tais como nutrição e condições climáticas (GUDSNUK e CHAMPAGNE, 2011). Donson et al. (2002) afirmaram que os genes estão envolvidos em vários processos biológicos, desde o

desenvolvimento de organismos bem como as interações com o ambiente.

A cultura da chia é considerada importante fonte de óleos como o ômega-3 e possui ampla distribuição geográfica (HERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2008) sendo cultivada em larga escala no Paraguai (IRALA, 2013), cuja época recomendada para a semeadura é tanto no verão quanto em segunda safra (AGUILLERA, 2013), no entanto na Argentina, mais precisamente no sul de Santa Fé, a primeira quinzena de janeiro seria o mais adequado para o plantio dessa espécie (BUSILACCHI et al., 2013).

O fósforo é um elemento químico essencial para o cultivo de inúmeras plantas, dentre elas as oleaginosas, necessitando deste elemento para completar seu ciclo normal de produção (LANTMANN e CASTRO, 2004). Malavolta et al. (1997), Epstein e Bloom (2006) e Hawkesford et al. (2012) ressaltaram que, o fósforo tem por função ser constituinte de moléculas como o DNA e RNA, atua como transportador e transdutor de energia química e também participa da síntese proteica e lipídica. Portanto, a aplicação de fósforo torna-se prática indispensável para plantas produtoras de óleo, desde que o teor existente no solo não seja suficiente para suprir a necessidade fisiológica da espécie vegetal cultivada.

Existem estudos sobre o efeito do ambiente na expressão gênica em humanos (MACHADO et al., 2012), animais (NISHI et al., 2009; BORGHETTI et al., 2013) e vegetais. Como exemplo, Moraes et al. (2015) com intuito de conhecer melhor os mecanismos fisiológicos da mamoneira em resposta ao déficit hídrico, analisaram a expressão diferencial de genes potencialmente relacionados com essa tolerância, revelando que os acessos estudados possuem diferentes mecanismos de resposta esse tipo de déficit.

A chia, como é importante fonte de proteína, conteúdo até 26% (BOURRE, 2004), 40% de fibras (REYES-CAUDILLO et al., 2008), antioxidantes, minerais, vitaminas (MUNOZ et al., 2013) e ácidos graxos como ômega 3 e ômega 6 (AYERZA, 2011), considerados lipídios importantes na alimentação humana e extremamente limitados na dieta alimentar moderna. Sreedhar et al. (2015) confirmaram que a expressão de seis genes responsáveis pela síntese de lipídios é influenciada pela época de colheita da semente de chia.

O recente interesse e cultivo da chia levanta diversas questões ainda desconhecidas, visto que, a fertilização fosfatada é relevante na produção de ácidos graxos havendo necessidade de investigar se a adubação tem influência na expressão de genes responsáveis pelo metabolismo de lipídios.

Com isso o presente trabalho objetivou verificar a expressão gênica do metabolismo do lipídio em sementes de chia, em função da adubação fosfatada aplicada na semeadura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em vasos, na Fazenda da Universidade Estadual de Maringá no Campus de Umuarama, localizada a 23°47' de latitude Sul e 53°14' de longitude Oeste. O clima é subúmido com média anual de temperatura de 24 °C e precipitação de 1.600 mm. O solo usado no experimento é um Latossolo Vermelho Distrófico típico, com textura arenosa (EMBRAPA, 2018).

O clima da região é classificado como Cfa, por ser subtropical, com temperatura média no mês mais frio inferior a 18 °C (mesotérmico) e temperatura média do mês mais quente acima de 22 °C, com verões quentes, geadas pouco frequentes e tendência de concentração das chuvas nos meses do verão, contudo, sem estação seca definida (IAPAR, 2014).

A semeadura foi realizada em outubro de 2016. Como não há recomendação de adubação da chia, foi usado como base as recomendações para a menta, pois pertence a mesma família botânica, a qual consistiu em 20 e 30 kg ha⁻¹ de nitrogênio na semeadura e cobertura, respectivamente e 60 kg ha⁻¹ de K₂O na semeadura (MAIA e FURLANI, 1997). As doses de fósforo foram aplicadas conforme os tratamentos.

Cada parcela experimental foi composta por um vaso de aproximadamente 18 litros cada um, com uma planta por vaso.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos foram compostos por quatro doses de P₂O₅ aplicados na semeadura (0, 40, 80 e 120 kg ha⁻¹). Na condução do experimento foi efetuada limpeza manual sempre que necessário para controle de plantas daninhas. Foi realizada a colheita manual de folhas, após o florescimento da cultura para realização das análises.

Para estudos genéticos, foi necessário a extração do material genético das folhas de chia colhidas em cada parcela experimental, as folhas foram coletadas e acondicionadas a -14 °C até a extração do material genético, aproximadamente 50 mg de folhas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido até formar um pó fino (Figura 1A) e submetidas ao protocolo de extração sugerido por Sreedhar et al. (2015) (Figura 1B).

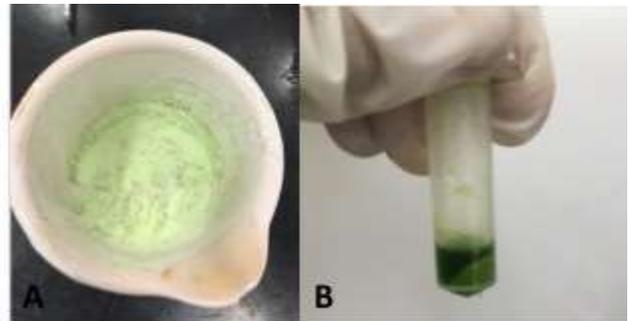


Figura 1. (A) Folhas de *Salvia hispanica* L. maceradas em nitrogênio líquido. (B) Tubo eppendorf com o material submetido a protocolo de extração Sreedhar et al. (2015).

Figure 1. (A) *Salvia hispanica* L. leaves macerated in liquid nitrogen. (B) Eppendorf tube with the material submitted to extraction protocol Sreedhar et al. (2015).

Os primers SSR referentes a sequências dos genes-alvo foram encontradas por meio de busca no banco de dados do genoma *Salvia hispanica* L. disponível no GenBank, gene MGAT (FW: 5' ATGTCGCCGGAAATCC 3' - RW: 5'ATTCTTCTTACCATATCTCTCAACT 3'), OLE1 (FW: 5'TGGCTGATCAACACTACGG3' - RV: 5'AGAGCTTTGCGCAACGG3') (SREEDHAR et al., 2015).

Para a amplificação com os primers as reações foram realizadas em um termociclador Nexus (Eppendorf), sendo utilizado um ciclo a 95 °C por 1 minutos, 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, temperatura específica do primer por 30 segundos para amplificação e 72 °C por 2 minutos, e para finalizar 1 ciclo a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese usando um gel de agarose a 1%.

3. RESULTADOS

O presente trabalho utilizou folhas de chia para a extração do material genético já que as sementes quando em contato com água exsudam um gel transparente mucilaginoso que adere ao macerado e dificulta a ação dos reagentes. Essa mucilagem é composta de 15% de umidade e 85 % de sólidos totais, dos quais 48 % era de carboidratos (xilose e glicose), 23,22 % de ácido urônico, 8 % de cinzas, 4 % de proteínas e 1,78 % de lipídeos (LIN et al., 1994; Muñoz et al. 2012).

O produto da PCR não apresentou amplificação de bandas após a eletroforese (Figura 2), tornando a interpretação dos resultados impossível. Sreedhar et al. (2015) obteve sucesso quando submeteu amostras de sementes de chia colhidas em épocas diferentes aos mesmos primers.



Figura 2. Padrão de bandas do produto de PCR para as amostras 1, 2, 3 e 4 referentes aos tratamentos 0, 40, 80 e 120 kg ha⁻¹ de P₂O₅ aplicados na semeadura respectivamente, submetidas ao primer específico MGAT e as amostras 5, 6, 7 e 8 referentes aos tratamentos 0, 40, 80 e 120 kg ha⁻¹ de P₂O₅ aplicados na semeadura respectivamente, submetidas ao primer específico OLE1.

Figure 2. banding pattern of the PCR product for samples 1, 2, 3, and 4 referring to the 0, 40, 80, and 120 kg ha⁻¹ P₂O₅ treatments applied at sowing respectively, submitted to the specific primer MGAT and samples 5, 6, 7, and 8 referring to the 0, 40, 80, and 120 kg ha⁻¹ P₂O₅ treatments applied at sowing respectively, submitted to the specific primer OLE1.

4. DISCUSSÃO

Problemas com amplificação são relatadas cotidianamente em trabalhos de biotecnologia. Mesquita et al. (2001) comparou três métodos de extração de DNA para amplificação de DNA genômico pela técnica de PCR e obteve resultados de não amplificação de bandas por conta da baixa quantidade de DNA extraída pelo protocolo com partículas de sílica, já Ferreira e Santos 2015 concluíram que esse mesmo métodos de extração de DNA é o mais eficiente quando usado para extração do DNA genômico de bactérias do gênero *Salmonella*, a eficiência das metodologias de extração de DNA depende do organismo que esta em estudo e também do material selecionado para a extração de DNA.

Gouveia et al. (2011) compararam três protocolos distintos de extração de RNA, onde a metodologia de Trizol não produziu resultados satisfatório e assim prejudicando os resultados obtidos. Santos et al. 2016 comparou protocolos de extração de RNA em sementes de pimenta *Capsicum chinense* e concluíram que a metodologia CTAB e Borato quente são considerados ineficientes para obter RNA de boa qualidade de sementes de pimenta. Assim o uso de RNA de *Capsicum chinense* proveniente dessas metodologias de extração de RNA podem apresentar resultados insatisfatórios em pesquisas. Trabalhos que comparam as metodologias de extração de material genético dos mais diversos gêneros e espécies e de grande importância para o sucesso de pesquisas posteriores. Bitencourt et al. (2011) avaliaram dois métodos de extração de RNA em folhas e raízes de braquiária e concluiu que a eficiência na extração de RNA depende do material utilizado e também do protocolo selecionado.

Feres et al. (2005) aconselha testar metodologias diferentes no início de qualquer estudo com caracteres moleculares, incluindo métodos de conservação de amostras e de extração de material genético, para evitar, posteriormente, uma eventual perda de tempo e de recursos, já que problemas de amplificação podem ocorrer rotineiramente e por diversos motivos.

5. CONCLUSÕES

Os resultados da análise de expressão gênica relativa aos genes MGAT e OLE1 em chia foram inconclusivos por falta de amplificação das sequências alvo.

6. REFERÊNCIAS

- AGUILERA, L. A. **Tecnología de semillas, siembra e instalación del cultivo de *Salvia hispanica***. Assuncion: Facultad de Ciencias Agrarias, 2013. 59p.
- AYERZA, R.; COATES, W. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). **Industrial Crops and Products**, Amsterdã, v. 34, n. 2, p. 1366-1371, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.007>
- BITENCOURT, G. D. A.; CHIARI, L.; DO VALLE, C. B.; LAURA, V. A.; MORO, J. R. **Avaliação de diferentes métodos para extração de RNA total de folhas e raízes de braquiária. Embrapa Gado de Corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2011. 26p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 26)
- BORGHETTI, G.; YAMAZAKI, R. K.; COELHO, I.; PEQUITO, D. C. T.; SCHIESSEL, D. L.; KRYCZYK, M.; MAMUS, R.; NALIWAIKO, K.; FERNANDES, L. C. Tumor growth reduction is regulated at the gene level in Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with fish oil rich in EPA and DHA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 46, n. 8, p. 696-699, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/1414-431X20132970>
- BOURRE, J. M. Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. **Journal of Nutrition Health Aging**, v. 8, n. 3, p. 63-174, 2004.
- BUSILACCHI, H.; QUIROGA, M.; BUENO, M.; SAPIO, O.; FLORES, V.; SEVERIN, C. Evaluación de *Salvia hispanica* L. cultivada en el sur de Santa Fe (República Argentina). **Cultivos Tropicales**, v. 34, n. 4, p. 55-59, 2013.
- COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. M. Composição química, propriedades funcionais e aplicações tecnológicas da semente de chia (*Salvia hispanica* L) em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 259-268, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.1814>
- DONSON, J.; FANG, Y.; ESPIRITU-SANTO, G.; XING, W.; SALAZAR, A.; MIYAMOTO, S.; ARMENDAREZ, V.; VOLKMUTH, W. Comprehensive gene expression analysis by transcript porfiling. **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1-2, p. 75-97, 2002.
- EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos/CNPQSO, 2018. 532p.

- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta, 2006. 402p.
- FERES, F.; SOUZA, A. P. D.; AMARAL, M. D. C. E. D.; BITTRICH, V. Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de savanas Neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. **Brazilian Journal of Botany**, v. 28, n. 2, p. 277-283, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042005000200008>.
- GUDSNUK, K. M. A.; CHAMPAGNE, F. A. Epigenetic effects of maternal care. **Clinics in Perinatology**, v. 38, n. 4, p. 703-717, 2011.
- HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MOLLER, I.S.; WHITE, P. Functions of macronutrients. In: MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. Londres: Elsevier, 2012. p. 135-189.
- HERNÁNDEZ-GÓMEZ, J. A.; MIRANDA-COLÍN, S.; PEÑA-LOMELÍ, A. Cruzamento natural de chía. (*Salvia hispanica* L.). **Revista Chapingo - Serie Horticultura**, Chapingo, v. 14, n. 3, p. 331-337, 2008.
- IAPAR_Instituto Agronômico do Paraná. Agrometeorologia. **Redes de Estações Meteorológicas do Paraná**. Estações Meteorológicas Convencionais. Umuarama. 2014.
- IRALA, R. L. **Cultivo da chia (*Salvia hispanica*)**. Assuncion: Agrofield, 2013. 16p.
- LANTMANN, A. F.; CASTRO, C. Resposta da soja à adubação fosfatada. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: Potafos, 2004. p. 223-239.
- LIN, K. Y.; DANIEL, J. R.; WHISTLER, R. L. Structure of chia seed polysaccharide exudate. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, n. 1, p. 13-18, 1994.
- MACHADO, L. E. S.; PINHO, J. R. R.; SITNIK, R.; MUTO, N. H.; VELLOSO, E. D. R. P.; PETRONI, R. C.; CAMPREGHER, P. V. Detecção de mutações no gene KIT em leucemia mieloide aguda. **Einstein**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 286-291, 2012.
- MAIA, N. B.; FURLANI, A. M. C. Menta ou hortelã. In: RAIJ B. van; CANTARELA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2 ed. Campinas: IAC, 1997. 85p. (Boletim Técnico, 100).
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafos, 1997. 308p.
- MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 314-319, 2001.
- MORAES, P. F.; DE LAAT, D. M.; SANTOS, M. E. A. H.; COLOMBO, C. A.; KIIHL, T. Expressão gênica diferencial em genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) submetidos a déficit hídrico induzido por PEG. **Bragantia**, Campinas, v. 74, n. 1, p. 25-32, 2015.
- MUÑOZ, L. A.; AGUILERA, J. M.; RODRIGUEZ-TURIENZO, L.; COBOS, A.; DIAZ, O. Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia hispanica* and whey protein concentrate. **Journal of Food Engineering**, v.111, 511-518, 2012.
- NISHI, S. M.; VIERO, L. M.; SOARES, R. M.; MAIORKA, P. C.; GENNARI, S. M. Emprego da RT-PCR em tempo real para a quantificação da expressão de genes associados à resposta imune em bezerros bovinos experimentalmente infectados por *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 8-14, 2009.
- REYES-CAUDILLO, E.; TECANTE, A.; VALDIVIA-LOPEZ, M. A. Dietary fiber content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 656-663, 2008.
- DOS SANTOS, H. O.; PEREIRA, E. de M.; PIRES, R. M. de O.; PEREIRA, R. W.; VON PINHO, É. V. D. R. Protocolos de extração de rna e atividade enzimática em sementes de pimenta. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 91, n. 3, p. 285-299, 2016.
- SATUFFER, M. D.; SULEWSKI, G. Fósforo, essência para a vida. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: Potafos, 2004. p.1-11.
- SREEDHAR, R. V.; KUMARI, P.; RUPWATE, S. D.; RAJASEKHARAN, R.; SRINIVASAN, M. Exploring triacylglycerol biosynthetic pathway in developing seeds of chia (*Salvia hispanica* L.): a transcriptomic approach. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. 1-18, 2015.