

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – CIÊNCIA ANIMAL**

**GABRIEL RIBEIRO WIGGERS**

**EFEITO DA BAIXA TEMPERATURA NO PERFIL DE ÁCIDOS  
GRAXOS E EXPRESSÃO DE GENES LIPOGÊNICOS DO AZEVÉM  
ANUAL (*L. multiflorum* L.).**

**LAGES  
2022**

**GABRIEL RIBEIRO WIGGERS**

**EFEITO DA BAIXA TEMPERATURA NO PERFIL DE ÁCIDOS  
GRAXOS E EXPRESSÃO DE GENES LIPOGÊNICOS DO AZEVÉM  
ANUAL (*L. multiflorum* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira.

**LAGES  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

WIGGERS, GABRIEL  
EFEITO DA BAIXA TEMPERATURA NO PERFIL DE  
ÁCIDOS GRAXOS E EXPRESSÃO DE GENES LIPOGÊNICOS  
DO AZEVÉM ANUAL (*L. multiflorum* L.) / GABRIEL  
WIGGERS. -- 2022.  
49 p.

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira  
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2022.

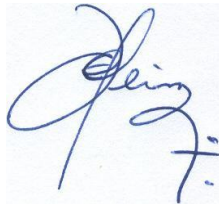
1. ACACA. 2. Tioesterase. 3. Ploidia. 4. Lipídios. 5. Frio. I.  
Estrasulas de Oliveira, Dimas . II. Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

**GABRIEL RIBEIRO WIGGERS**

**EFEITO DA BAIXA TEMPERATURA NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E  
EXPRESSÃO DE GENES LIPOGÊNICOS DO AZEVÉM ANUAL (*L.  
multiflorum* L.)**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciência animal da universidade do estado de santa catarina, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em ciência animal, área de concentração: produção animal.

Banca Examinadora:



Orientador:

Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC



Membro:

Prof. PhD. Miguel Dall'Agnol  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS



Membro:

Prof. Dr. Felipe dos Santos Maraschin  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

**LAGES, 20 DE JULHO DE 2022.**

Dedico à minha família, por todo apoio e confiança.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por guiar meus caminhos, à minha família, Ed, Vera e Tiago, por apoiarem minhas decisões e estarem sempre presentes quando mais precisei. Ao meu orientador, Professor Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira, pela oportunidade, ajuda, confiança e conversas que auxiliaram em minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Ao grupo NUTRIGER, por toda ajuda durante as atividades necessárias para realização dessa pesquisa e pela amizade que construímos. Ao professor Dr. André Fischer Sbrissia, seu grupo de pesquisa, e aos Drs. Paulo Gonçalves Duchini, Gabriela Cristina Guzatti, e Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro que também fizeram contribuições importantes para o presente trabalho. Aos demais pesquisadores de ciência animal do CAV e, principalmente, aos meus amigos de infância, que colaboraram imensamente neste período como mestrando, tornando a rotina muito mais leve e agradável.

Muito Obrigado!

“Insanidade é continuar fazendo sempre as mesmas coisas  
e esperar resultados diferentes.”

(Albert Einstein)

## RESUMO

WIGGERS, G. R. Efeito da baixa temperatura no perfil de ácidos graxos e expressão de genes lipogênicos do azevém anual (*L. Multiflorum* L.) p.49. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Lages, 2022.

Diferenças microclimáticas geram ambientes contrastantes em termos de temperatura, que por sua vez pode proporcionar alterações nas composições lipídicas de plantas forrageiras. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da temperatura na variação do perfil de ácidos graxos e na expressão dos genes lipogênicos: acetil-CoA carboxilase alfa e proteína carreadora miristoil acil tioesterase (ACACA $\alpha$  e MACPT) do azevém anual (*Lolium multiflorum* L.), cultivado em dois ambientes com temperaturas contrastantes, Lages e São Miguel do Oeste. Foram utilizadas duas cultivares (diploide e tetraploide), semeadas e adubadas manualmente que foram irrigadas conforme necessidade e mantidas a  $\pm 20$  cm de altura. A amostragem foi realizada em Agosto e Setembro, no mesmo dia em ambos os locais e a 15 cm do solo. Os dados de temperatura foram obtidos através de estação automática e de um *datalogger*. A extração de RNA total e síntese de DNA complementar foram feitas e o RT-qPCR foi realizado. A temperatura foi menor em Lages (14,4 vs. 19,5 °C,  $p < 0,05$ ). A abundância de mRNA da ACACA $\alpha$  foi reduzida em 40 enquanto da MACPT aumentou em 305% ( $p < 0,05$ ), respectivamente. Adicionalmente, na cultivar diploide a abundância de mRNA da ACACA $\alpha$  e MACPT foram, respectivamente, 40 e 47% maior quando comparada à tetraploide. O azevém cultivado no ambiente mais frio (LAG) apresentou maiores teores de C14:0, C16:1 *c9* e C18:1 *c9* e menor teor de C18:2 *c9*, *c12*, o mesmo ocorreu para o azevém diploide ao compará-lo com o tetraploide, mas com menor teor de C18:3 *c9*, *c12*, *c15* ao invés do C18:2. De maneira geral, em baixas temperaturas o azevém reduz a expressão do gene que codifica a ACACA $\alpha$  e aumenta a expressão de MACPT, aumentando o percentual de ácidos graxos de cadeia média como o C14:0 que junto aos maiores teores de C16:1 e C18:1 sugerindo que é reduzindo o comprimento da cadeia de carbono e aumentando o percentual de ácidos graxos monoinsaturados que as plantas regulam, pelo menos em parte, a síntese de ácidos graxos mantendo a funcionalidade da planta em baixas temperaturas.

**Palavras-chave:** ACACA $\alpha$ , tioesterase, ploidia, lipídios, frio.



## ABSTRACT

WIGGERS, G. R. Effect of low temperature on the fatty acids profile and expression of lipogenic genes of annual ryegrass (*L. multiflorum* L.) p.49. **Dissertation** (Master's in Animal Science – Area: Animal Production). Santa Catarina State University. Program in Animal Science. Lages, 2022.

Microclimatic differences generate contrasting environments in terms of temperature, which in turn could cause changes in the lipid composition of pastures. The objective of this study was to investigate the effect of temperature on the variation of fatty acid profile and on the expression of lipogenic genes: acetyl-CoA carboxylase alpha and myristoyl acyl thioesterase (ACACA $\alpha$  and MACPT) in annual ryegrass (*Lolium multiflorum* L.), cultivated in two environments with contrasting temperatures, Lages and São Miguel do Oeste. Two cultivars (diploid and tetraploid), sowed and fertilized manually, were manually irrigated, and maintained at 20 cm  $\pm$  height was used. Sampling was carried out in August and September, on the same day in both sites at 15 cm from the ground. Temperature data was obtained through an automatic station and a datalogger. Total RNA extraction and complementary DNA synthesis were performed and RT-qPCR was performed. The temperature was lower in Lages (14.4 vs. 19.5 °C,  $p < 0.05$ ). The abundance of mRNA of ACACA $\alpha$  was reduced by 40 while MACPT increased by 305% ( $p < 0.05$ ), respectively. Additionally, in the diploid cultivar, the abundance of mRNA of ACACA $\alpha$  and MACPT were, respectively, 40 and 47% higher when compared to tetraploid. The ryegrass cultivated in the coldest environment (LAG) showed higher levels of C14:0, C16:1  $c9$  and C18:1  $c9$  and lower content of C18:2  $c9$ ,  $c12$ , the same occurred for the diploid when comparing it with the tetraploid, but with lower content of C18:3  $c9$ ,  $c12$ ,  $c15$  instead of C18:2. Overall, at low temperatures, ryegrass reduces the expression of the gene that encodes ACACA $\alpha$  and increases the expression of MACPT, increasing the percentage of medium chain fatty acids such as C14:0, with higher levels of C16:1 and C18:1 suggesting that it is by reducing the length of the carbon chain and increasing the percentage of monounsaturated fatty acids that plants regulate, at least in part, fatty acid synthesis, maintaining plant functionality at low temperatures.

**Keywords:** ACACA $\alpha$ , thioesterase, ploidy, lipids, cold.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cidades onde o experimento foi conduzido. Lages no centro de estado, que possui inverno mais rigoroso, e São Miguel do Oeste no extremo oeste. ....	16
Figura 2. Ciclo bioquímico da síntese de ácidos graxos, em destaque a etapa de atuação das enzimas Acetil-CoA-carboxilase alfa (ACACA $\alpha$ ) e Tioesterease. ....	19
Figura 3. Dessaturação de lipídios. (a) Reação de monooxigenação, dessaturando o estearoil-ACP (18:0) e formando oleoil-ACP (18:1), no estroma do plastídio. (b) Reação das demais dessaturações, catalisadas por proteínas integrais da membrana do RE.....	20
Figura 4. Estrutura da célula vegetal e vias de formação dos lipídios de membrana. ....	22
Figura 5. Bicamada glicerolipídica, estrutura constituinte das membranas. (a) fase líquido cristalina e (b) fase gel cristalina. ....	23
Figura 6. Vias da biohidrogenação do ácido linoleico (A) e linolênico (B).....	25
Figura 7. Expressão gênica de acetil-CoA carboxilase alfa (ACACA $\alpha$ ) e proteína carreadora miristoil acil tioesterase (MACPT) em plantas de azevém anual ( <i>Lolium multiflorum</i> L.) cultivadas em Lages (LAG) e São Miguel do Oeste (SMO). ....	36
Figura 8. Expressão gênica de acetil-CoA carboxilase alfa (ACACA $\alpha$ ) e proteína carreadora miristoil acil tioesterase (MACPT) em cultivares diploide e tetraploide de azevém anual ( <i>Lolium multiflorum</i> L.).....	36
Figura 9. Relação entre ácidos graxos monoinsaturados e seus respectivos saturados. ....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos primers utilizados na análise de RT-qPCR. ....	33
Tabela 2. Comparação entre locais, Lages e São Miguel do Oeste (LAG e SMO), para Temperatura Média diária (TMD), Unidades de Frio diárias (UFd) e Soma Térmica diária (STd).....	35
Tabela 3.Comparação do perfil de ácidos graxos do azevém anual ( <i>Lolium multiflorum</i> L.) cultivado em Lages (LAG) e São Miguel do Oeste (SMO), e das duas cultivares: diploide (DIP) e tetraploide (TETRA), referentes a 1º coleta (19/08/21), expressa em porcentagem. ....	38
Tabela 4. Interações entre locais (LAG) e (SMO) e cultivares, (DIP) e (TETRA), para o perfil de ácidos graxos do azevém anual ( <i>Lolium multiflorum</i> L.), referentes a 1º coleta (19/08/21), expressa em porcentagem do total de ácidos graxos. ....	39

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1. Análise de Solo de Lages e São Miguel do Oeste. ....	46
Anexo 2. Unidades de Frio Modelo Carolina do Norte.....	46

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
2.1. LIPÍDIOS: Localização, Classificação e Funções na Célula Vegetal .....	17
2.2. Biossíntese de Ácidos Graxos .....	18
2.3. Estado Físico da Membrana e Suas Consequências .....	22
2.4. Interação entre temperatura e composição lipídica.....	23
2.5. Digestão dos Lipídios no Rúmen.....	24
<b>3. HIPÓTESE</b> .....	<b>26</b>
<b>4. OBJETIVO</b> .....	<b>27</b>
<b>5. ARTIGO - EFEITO DA BAIXA TEMPERATURA NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E EXPRESSÃO DE GENES LIPOGÊNICOS DO AZEVÉM ANUAL (<i>Lolium multiflorum</i> L.)</b> .....	<b>28</b>
5.1. INTRODUÇÃO .....	30
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
5.2.1. Cultivares, local, preparo do solo e semeadura.....	30
5.2.2. Condução do cultivo .....	31
5.2.3. Amostragem das plantas .....	31
5.2.4. Dados climáticos: temperatura, soma térmica e unidades de frio.....	31
5.2.5. Determinação do perfil de ácidos graxos .....	32
5.2.6. Extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	33
5.2.7. Análise estatística .....	34
5.3. RESULTADOS .....	35
5.3.1. Temperatura, soma térmica e unidades de frio .....	35
5.3.2. Abundância de mRNA.....	35
5.3.3. Perfil de Ácidos Graxos .....	37
5.4. DISCUSSÃO .....	40
5.4.1. Expressão gênica .....	40
5.4.2. Perfil de ácidos graxos .....	40
5.5. CONCLUSÃO.....	43
5.6. REFERÊNCIAS .....	44
<b>6. ANEXOS</b> .....	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas forrageiras naturais e/ou cultivadas são o principal componente da dieta dos ruminantes. Além disso, desempenham um papel fundamental em outras questões relacionadas à pecuária, como economia, sustentabilidade, impactos ambientais e manutenção de biomas, bem-estar animal (HUMPHREYS, 2005; KINGSTON-SMITH e THOMAS, 2003). No sul do Brasil o cultivo de pastagens de clima temperado ganha destaque por apresentar características climáticas favoráveis e uma das espécies mais utilizadas é o azevém anual (*Lolium multiflorum* L.) por sua versatilidade e valor nutritivo.

Considerando que herbívoros domésticos têm o pasto como o principal alimento, grande parte dos nutrientes digestíveis virão da planta forrageira, que apresenta composição bromatológica inerente à espécie. Entretanto, a planta pode sofrer alterações químicas de acordo com o manejo e/ou condições edafoclimáticas e nesse contexto, os lipídios podem ser alterados de acordo com a temperatura do ambiente.

Os lipídios compõem a membrana plasmática, formada por uma dupla camada fosfolipídica ou glicolipídica, que é entremeada por proteínas que auxiliam em suas funções, tais como: permeabilidade seletiva, proteção de estruturas celulares e reconhecimento celular. Logo, para a manutenção dessas funções é necessário que haja uma certa fluidez na membrana que pode ser alterada pelo frio caso não ocorra um processo chamado de aclimação ao frio. Sakai e Larcher (2012), afirmaram que tal aclimação envolve algumas mudanças bioquímicas que ocorrem nas plantas, entre elas as mudanças na composição lipídica da membrana e na saturação dos seus ácidos graxos. Segundo Vigh et al. (1998), o objetivo dessas alterações é evitar uma transição de fase na membrana que pode passar de um estado cristalino líquido para gel, alterando a fluidez e prejudicando suas funções biológicas.

Assim, percebe-se que há relação entre a saturação/insaturação dos ácidos graxos e a temperatura. Quando a planta é submetida a temperaturas baixas, como ocorre naturalmente no sul do Brasil durante o outono e inverno, espera-se um aumento no grau de insaturação dos lipídios. Em Santa Catarina o azevém anual (*L. multiflorum* L.) é utilizado como uma forrageira de inverno e há diferenças microclimáticas entre as regiões do estado, possibilitando a existência de variação na composição lipídica da planta cultivada.

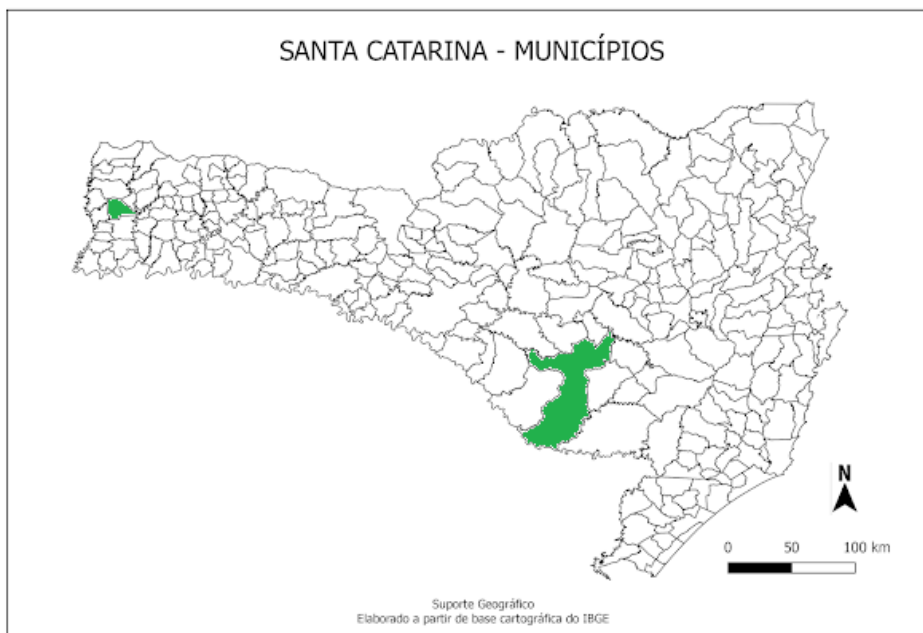
A composição lipídica das plantas forrageiras é formada por maiores proporções de ácidos graxos poliinsaturados como o ácido linolênico (C18:3) e o linoleico (C18:2), como demonstrado por Samala et al. (1998) em pastagem tropical de *Cynodon dactylon*. Similarmente, em pastagens de azevém perene (*Lolium perene L.*), Bauchart et al. (1984) e Witkowska et al. (2008) encontraram o C18:3 como principal ácido graxo.

Sabe-se que o ácido linolênico (C18:3) contido no alimento é transferido, pelo menos em parte, para os produtos animais e a literatura mostrou seus benefícios à saúde humana como a redução de riscos de doenças cardiovasculares e hiperlipidemia (HEBEISEN et al., 1993). No rúmen parte do C18:3 e do C18:2 é convertida a ácido vacênico (C18:1 *trans*-11) um dos intermediários formados na biohidrogenação ruminal e este por sua vez, no tecido adiposo e/ou na glândula mamária pode ser convertido em ácido linoleico conjugado (CLA *cis*-9, *trans*- 11) que também tem efeitos positivos à saúde humana (BAUMAN et al., 2003).

A escassez de estudos na área, a busca por melhor entendimento a respeito da composição e concentração dos lipídios em plantas forrageiras bem como a possibilidade de encontrarmos diferenças nos perfis lipídicos da carne e do leite produzidos por animais pastejando forrageiras de inverno sob diferentes temperaturas pode justificar o desenvolvimento de novos estudos.

Como as plantas no processo de adaptação ao frio podem: a) reduzir a síntese de ácidos graxos de cadeia longa (ex: C16:0 ou C18:0); b) aumentar a síntese de ácidos graxos de cadeia curta e/ou média (Ex: C10:0 a C14:0); c) aumentar a síntese de ácidos graxos insaturados ou; d) ambos eventos descritos anteriormente, este trabalho objetivou investigar o efeito da temperatura na variação do perfil de ácidos graxos e na expressão de dois genes lipogênicos em uma planta forrageira de inverno (azevém anual; *Lolium multiflorum L.*), bastante utilizada nos sistemas de produção de ruminantes no sul do país, cultivada em dois ambientes com temperatura, historicamente, contrastante (Figura 1).

Figura 1. Mapa do estado de Santa Catarina com a identificação dos dois locais onde o estudo foi desenvolvido, Lages no centro de estado e São Miguel do Oeste no extremo oeste.



Fonte: Adaptado de Suporte Geográfico, 2018.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. LIPÍDIOS: Localização, Classificação e Funções na Célula Vegetal

Os lipídios apresentam funções variadas nas plantas, entre elas, estruturais e metabólicas e estão presentes em diversos locais como: lisossomos, cera cuticular, pigmentos e membranas celulares.

Na membrana celular os lipídios se encontram na bicamada lipídica em forma de glicerolipídios. Estes, são compostos por duas partes, uma hidrofílica que fica em contato com o meio aquoso e outra hidrofóbica que forma o centro da membrana. A parte hidrofóbica é formada por duas cadeias de ácidos graxos esterificados nas posições um e dois da estrutura de glicerol. Essas cadeias têm, geralmente, entre 16 e 18 carbonos podendo ter insaturações (GURR et al., 2016). A parte hidrofílica é comumente formada por moléculas glicídicas ou fosfatadas, esterificadas na terceira posição da estrutura do glicerol, sendo então denominadas de gliceroglicolipídios e glicerofosfolipídios, respectivamente, a última sendo mais comum em moléculas fotossintéticas (TAIZ et al., 2017). A membrana está associada a inúmeras proteínas que podem estar extrínsecas ou intrínsecas à bicamada glicolipídica. As intrínsecas podem atravessá-la e formar os canais de proteínas (KERBAUY, 2004), conferindo a característica de semipermeabilidade seletiva a membrana. Desse modo, alterações na fluidez da membrana plasmática levam a perda de sua função biológica.

Os triglicerídeos encontram-se nas células do citoplasma do cotilédone ou endosperma e arranjam-se de forma circular formando os lisossomos ou esferossomos (HELDT, 2005). São compostos por uma molécula de glicerol esterificada nas três posições com ácidos graxos, e apresentam função de reserva energética, por isso, são geralmente associados às sementes (TAIZ et al., 2017). Os lipídios também estão presentes na camada epicuticular das folhas, compondo a cutícula na forma ésteres graxos (FICH et al, 2016) e conferem à planta a característica de semipermeabilidade.

Os lipídios compõem também a clorofila que é formada por uma molécula do grupo das porfirinas representada estruturalmente pelos anéis aromáticos e ligado a um deles uma molécula de fitol, que é um ácido graxo ramificado (KERBAUY, 2004). Os terpenóides formam outra classe de lipídios e entre eles estão os carotenóides, pigmentos precursores de vitamina A que se acumulam nas plantas (LOOMIS et al., 1980) e os

tocoferóis que são importantes agentes antioxidantes, também conhecidos como vitamina E (ALSCHER et al., 2017).

Os lipídios podem ser utilizados pelas plantas como sinalizadores intracelulares ou de longo alcance e Taiz et al. (2017) comentaram que um exemplo disso é o uso do ácido linolênico como precursor para síntese de jasmonato, um hormônio importante que atua na defesa da planta como um repelente contra pragas. Bartke e Hannun (2009) comentaram que para sinalização intracelular são usados os esteróis e esfingolipídios localizados na membrana celular. As principais funções dos esteróis nas plantas são de modular a permeabilidade da membrana, a fluidez e a atividade enzimática (SCHALLER, 2003) enquanto os esfingolipídios atuam mediando as interações célula-célula (Bartke e Hannun, 2009). Os mesmos autores comentaram que os esfingolipídios se associam com os esteróis e formam as “balsas lipídicas”, locais da membrana com alta atividade regulatória de transdução de sinais, funcionando como um centro para reconhecimento celular.

## 2.2. Biossíntese de Ácidos Graxos

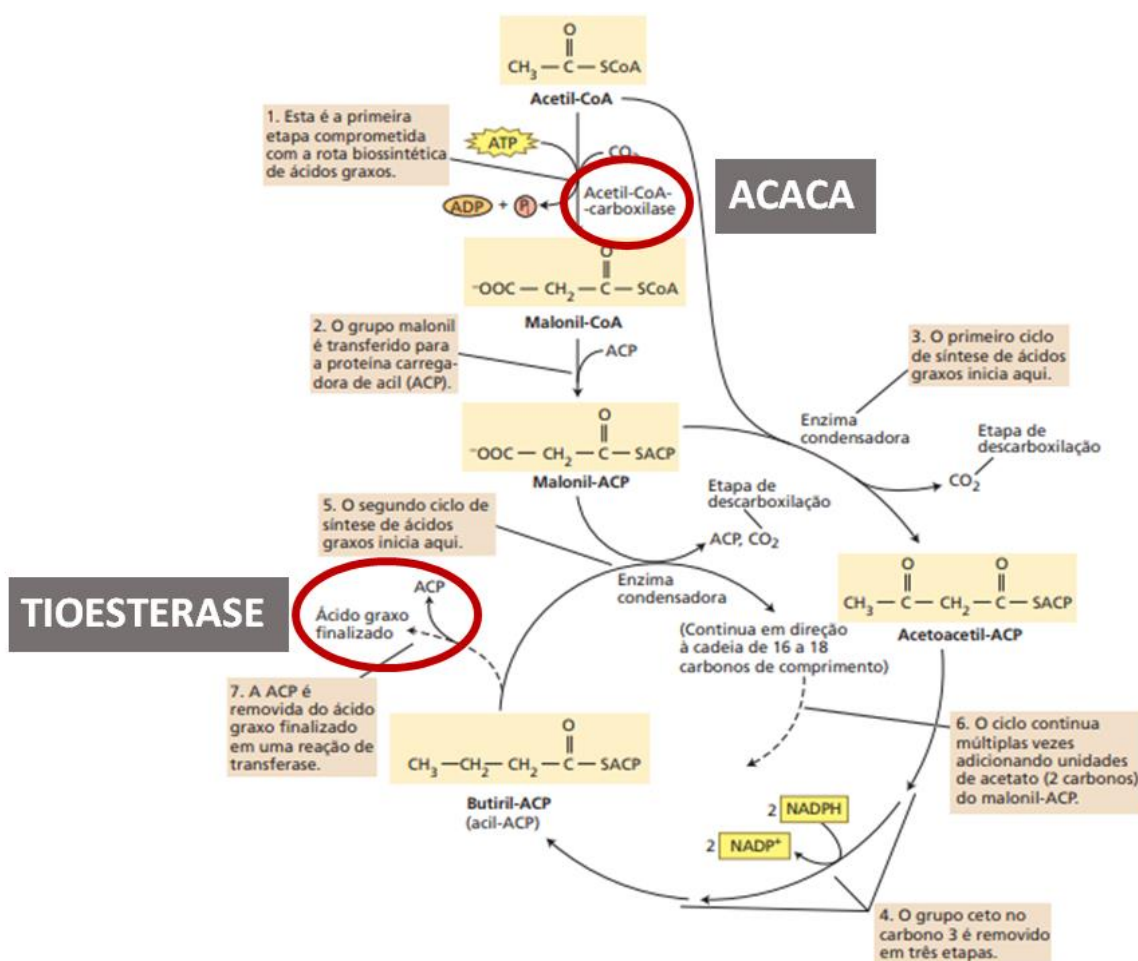
Os ácidos graxos são formados nos plastídios das células através de um ciclo de reações (Figura 2) que produz compostos com cadeias de 16 a 18 carbonos. A maioria dos ácidos graxos recém-formados que contêm 18 carbonos são dessaturados ainda no estroma do plastídio, originando o C18:1 (Figura 3a), com outras dessaturações podendo ocorrer (Figura 3b) na membrana do retículo endoplasmático ou do plastídio. Entretanto, a adição das demais duplas ligações só ocorre após o ácido graxo ter sido esterificado a um glicerol. Para isso, existem duas vias que irão diferir quanto ao ácido graxo na segunda posição do glicerol e a molécula esterificada na terceira posição, definindo se será um glicolipídio, fosfolipídio ou sulfolipídio.

A primeira etapa da síntese consiste na carboxilação de uma molécula de Acetil-CoA, que contém dois carbonos, por intermédio da enzima *Acetil-CoA Carboxilase alfa* (ACACA $\alpha$ ) formando malonil-CoA, uma molécula com três carbonos. Essa molécula troca de carreador, da coenzima A para a ACP (*acyl carrier protein*), gerando a malonil-ACP que na reação seguinte condensa-se com outra molécula de acetil-CoA, sendo catalisada pela enzima  $\beta$ -acetoacetil-ACP sintetase III, tendo como produto o  $\beta$ -acetoacetil-ACP com quatro carbonos, já que um dióxido de carbono é liberado nessa reação (HELDT, 2005; TAIZ et al., 2017). Os mesmos autores comentaram que a última

molécula formada sofre duas reações de redução e uma de desidratação para retirada de um grupo ceto formando o Butiril-ACP, concluindo o primeiro ciclo de alongamento produzindo um acil-ACP de quatro carbonos.

Na próxima rodada da síntese de ácidos graxos o Butiril-ACP condensa-se com o malonil-ACP, pela enzima  $\beta$ -acetoacetyl-ACP sintetase I liberando um  $\text{CO}_2$ , originando o acetoacetyl-ACP com seis carbonos dessa vez, que novamente vai ser reduzido e desidratado para formar acil-ACP de seis carbonos. E desta forma o ciclo continua adicionando dois carbonos por vez até chegar em uma cadeia de 16 carbonos e por fim um alongamento adicional pode ser catalisado pela  $\beta$ -acetoacetyl-ACP sintetase II formando uma cadeia com 18 carbonos (HELDT, 2005). Entretanto, cadeias de menor tamanho, tais como C10, C12 e C14, também são encontradas em menores proporções.

Figura 2. Ciclo bioquímico da síntese de ácidos graxos, em destaque a etapa de atuação das enzimas Acetil-CoA-carboxilase alfa (ACACA $\alpha$ ) e Tioesterase, que serão investigadas.



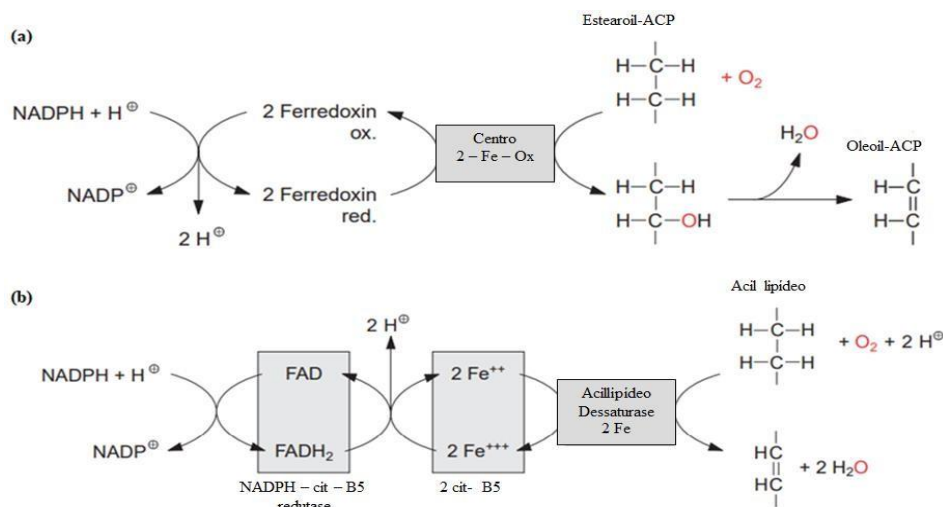
Fonte: Adaptado de Taiz et al., (2017).

Uma enzima tioesterase é responsável por interromper a síntese de ácidos graxos, determinando, assim, o tamanho do comprimento da cadeia. Ela atua hidrolisando o acil-ACP, liberando a cadeia acil, por isso é considerada uma enzima determinante no perfil lipídico (MCKEON, 1982).

No estroma do plastídio ocorre a primeira dessaturação na molécula que contém 18 carbonos, a reação é chamada de monooxigenação (Figura 3a) e é catalisada pela estearoil-ACP-dessaturase, que depende de O<sub>2</sub> e NADPH para ocorrer. Essa enzima primeiro adiciona uma molécula de oxigênio na cadeia de carbonos, enquanto o outro oxigênio é reduzido a água, com os prótons originados da redução de NADPH. Em seguida a estearoil-ACP é desidratada liberando uma molécula de água, adicionando uma dupla ligação entre um par de carbonos, assim a estearoil-ACP é convertida a oleoil-ACP (HELDT, 2005).

A maioria dos C18:0 produzidos pela planta são convertidos a C18:1 porque a enzima que catalisa essa reação é solúvel e está presente em todo o plastídio. Entretanto, essa enzima normalmente age em ácidos graxos recém-formados. A adição de mais duplas ligações é catalisada por outras dessaturases que são enzimas integrantes da membrana do retículo endoplasmático ou plastídio, mas reagem apenas com os ácidos graxos constituintes dos glicerolipídios. O mecanismo para adição da dupla ligação (Figura 3b) é muito similar com o descrito anteriormente, apenas com uma diferença na cadeia transportadora dos elétrons (HELDT, 2005).

Figura 3. Dessaturação de lipídios. (a) Reação de monooxigenação, dessaturando o estearoil-ACP (18:0) e formando oleoil-ACP (18:1), no estroma do plastídio; (b) Reação das demais dessaturações, catalisadas por proteínas integrais da membrana do RE.

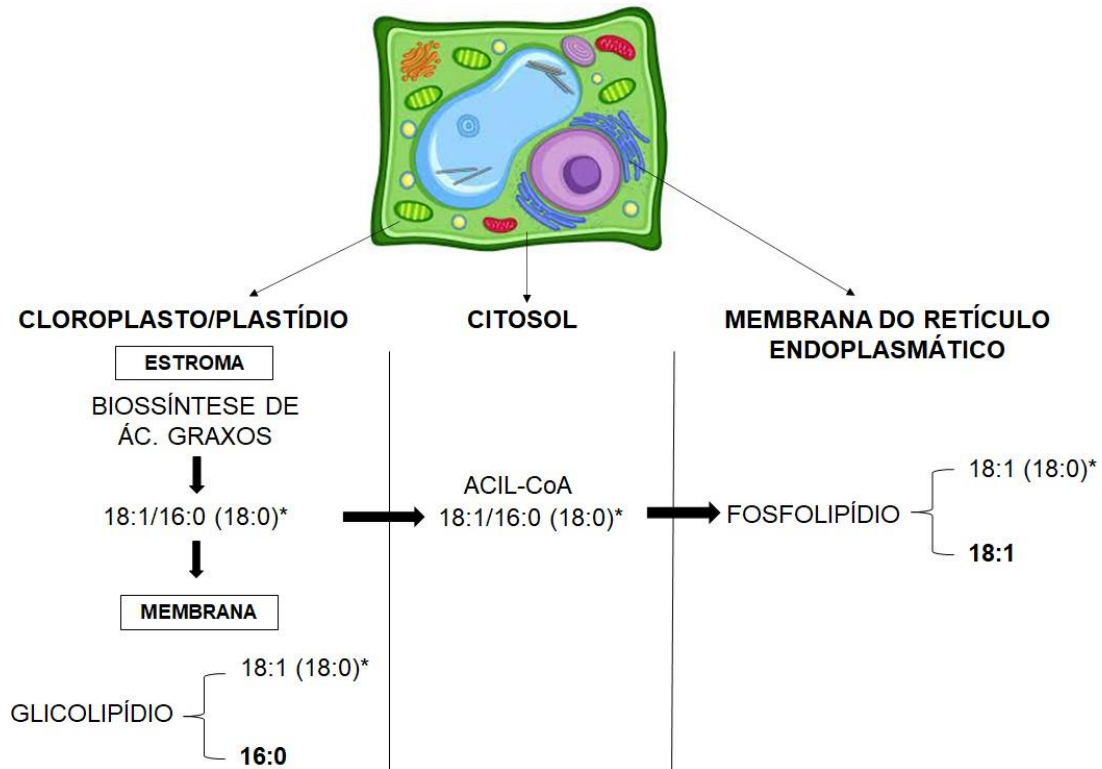


Fonte: Adaptado de Heldt, (2005).

Após a formação de um ácido graxo, há necessidade de incorporação a um glicerol, havendo duas rotas: a) a procariótica que acontece na membrana dos plastídios e; b) a eucariótica, na membrana do retículo endoplasmático (RE; Figura 4). Em ambas o primeiro glicerolípido formado é o ácido fosfatídico oriundo da redução de uma molécula de dihidroxiacetona. Após, ocorre a esterificação de dois ácidos graxos, na primeira posição do glicerol geralmente é um C18:1 e na segunda posição, a rota de formação interfere no ácido graxo a ser esterificado, sendo que na procariótica será um C16:0 e na eucariótica um C18:1 (HELDT, 2005). Após a formação do primeiro glicerolípido outras reações ocorrem para alterar a molécula esterificada na terceira posição do glicerol, formando os galactolipídios, sulfolipídios, ou fosfolipídios. Os fosfolipídios compõem as membranas celulares, enquanto os galactolipídios, especificamente, formam as membranas dos cloroplastos (TAIZ et al., 2017), e são formados na rota procariótica, ou seja, são formados nos plastídios onde serão utilizados.

Na membrana do RE, depois de serem esterificados, os ácidos graxos podem ser dessaturados até C18:3. Entretanto a acil-CoA pode carrear moléculas de C18:1 do plastídio até ao RE promovendo a troca de uma cadeia mais insaturada por uma menos insaturada, carreando a molécula mais insaturada de volta ao plastídio. Nas membranas dos plastídios também existem algumas enzimas capazes de dessaturar C18:1 e C16:0, entretanto, observa-se um C18 na posição dois do glicerol de moléculas gliceroglicolípídicas altamente insaturadas, mostrando que há contribuição da via eucariótica para com a procariótica (HELDT, 2005).

Figura 4. Estrutura da célula vegetal e vias de formação dos lipídios de membrana.



\* Menos utilizado, segundo Heldt (2005) e Taiz (2017).

Fonte: Editado pelo Autor.

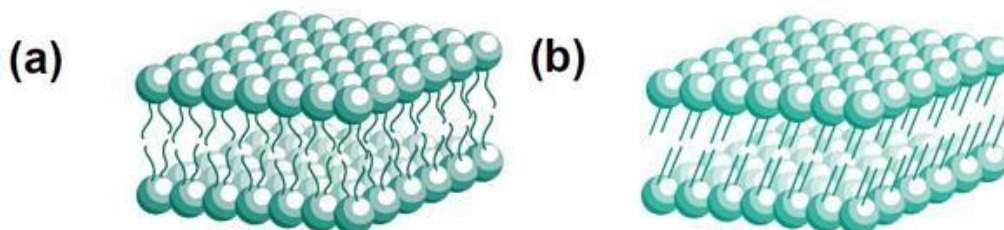
### 2.3. Estado Físico da Membrana e Suas Consequências

Murata e Los (1997) e Vigh et al. (1998) destacaram a importância da fluidez da membrana para a manutenção das funções biológicas das células. Nesse contexto, a temperatura ganha destaque visto que quando é alterada requer uma resposta celular para adaptação da planta ao ambiente.

Estudando uma bactéria (*Synechocystis sp.*) e suas respostas à mudança de temperatura Vigh et al. (1998), mostraram que há uma transição de fase da membrana plasmática quando a temperatura é elevada, aumentando a sua fluidez e a formação da fase não lamelar da membrana, chamada de HII. Essa fase é reconhecida pela diferente conformação dos glicolipídios, que se arranjam hexagonalmente formando cilindros dentro da membrana. Esses mesmos autores mostraram que em temperaturas baixas a membrana passa de uma fase líquido cristalina para gel cristalina, onde os ácidos graxos sofrem um “empacotamento” ficando paralelos entre si, perdendo sua mobilidade e consequentemente impedindo o correto funcionamento da membrana (Figura 5). Quando há alteração por temperaturas elevadas a membrana induz a expressão do gene HS (heat-

shock) (VIGH et al., 1998), aumentando a síntese de HSP (heat-shock-protein), que são proteínas que interagem com a membrana assegurando a fluidez necessária para seu correto funcionamento (LINDQUIST, 1992).

Figura 5. Bicamada glicerolípídica, estrutura constituinte das membranas; (a) fase líquido cristalina e (b) fase gel cristalina.



Fonte: Adaptado de Vigh et al., 1998.

#### 2.4. Interação entre temperatura e composição lipídica

A resposta ao frio tem sido investigada em muitos organismos submetidos a baixas temperaturas. Falcone et al., (2004) constataram que há um aumento no número de insaturações dos lipídios de membrana em *Arabidopsis t.* quando a temperatura é reduzida. Uemura et al. (1995), com a mesma planta, encontraram resposta semelhante comparando plantas aclimatadas e não aclimatadas ao frio, onde as aclimatadas aumentaram a proporção de ácidos graxos com duas duplas ligações entre carbonos. Em plantas forrageiras um aumento na insaturação em temperaturas mais baixas também é observado, como mostraram Witkowska et al. (2008) estudando *Lolium perenne* L. e Cyril et al. (2002) avaliando *Paspalum vaginatum* sw.

Buscando explicar como ocorre a percepção à mudança de temperatura e indução à uma maior insaturação dos ácidos graxos de membrana Vigh et al. (1993) utilizando cianobactérias, avaliaram a abundância de mRNA do gene "desA", responsável pela dessaturação dos lipídios de membrana, e obtiveram um aumento quando os organismos eram incubados em uma temperatura inferior à que estavam anteriormente. Os mesmos autores avaliaram a expressão desse gene após hidrogenação *in vivo* de uma pequena parte da membrana plasmática, observando novamente um aumento da sua expressão. Assim, concluíram que é a mudança de fluidez da membrana que regula a expressão gênica, entretanto ainda é desconhecido como o sinal é transmitido da membrana ao gene.

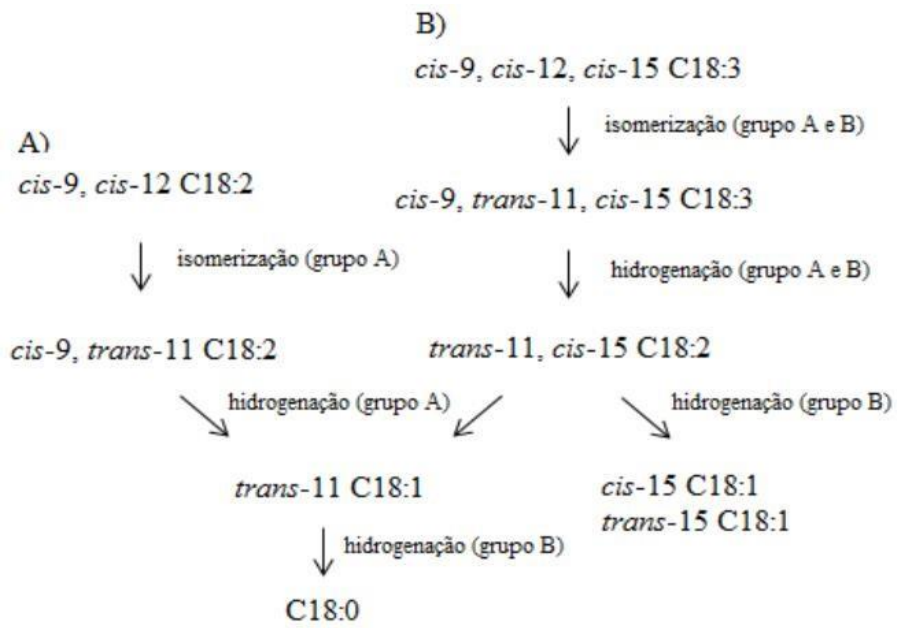
## 2.5. Digestão dos Lipídios no Rúmen

As forrageiras são o principal componente das dietas de ruminantes, assim, alterações em sua composição podem modificar as características e qualidade dos produtos de origem animal e nesse contexto, destacamos os lipídios da dieta e suas possíveis consequências.

Quando chegam ao rúmen os lipídios são hidrolisados, separando a molécula de glicerol dos ácidos graxos. O glicerol é transformado em ácido graxo volátil (AGV), principalmente propionato e absorvido pela parede do rúmen. Os ácidos graxos saturados passam pelo rúmen sem sofrer alterações chegando no intestino delgado onde serão absorvidos e utilizados pelo fígado, glândula mamária e/ou tecido adiposo. Os ácidos graxos insaturados serão biohidrogenados de forma incompleta no rúmen, formando alguns compostos intermediários como por exemplo o ácido vacênico C18:1 *trans*-11 e o ácido linoleico conjugado (CLA) *cis*-9, *trans*-11 (Figura 6; FERNANDES, 2012), oriundos do C18:2/C18:3 ou C18:2, respectivamente. O CLA *cis*-9, *trans*-11 possui características benéficas à saúde humana com efeito anticarcinogênico, anti-aterogênico e imunoestimulante (BAUMAN et al., 2003). Esse isômero pode chegar ao intestino e ser absorvido ou também pode ser sintetizado na glândula mamária e/ou tecido adiposo, a partir do ácido vacênico pela ação da enzima delta-9-dessaturase (estearoil Co-A-dessaturase) (GRIINARI et al., 1998). Considerando que a velocidade de saturação do ácido vacênico é inferior à de sua formação (KOZLOSKI, 2011), há uma tendência desse intermediário chegar ao intestino delgado, aumentando as chances desse CLA estar presente no leite e na carne. Dessa forma, produtos de origem animal podem apresentar diferenças qualitativas porque os animais consumiram forragens com diferentes composições lipídicas.



Figura 6. Vias da biohidrogenação do ácido linoleico (A) e linolênico (B).



Fonte: Fernandes (2012), adaptado de Harfoot e Hazlewood (1997).

### **3. HIPÓTESE**

Haverá menor expressão do gene que codifica a acetil CoA carboxilase alfa (ACACA $\alpha$ ) e maior percentual de ácidos graxos insaturados no ambiente mais frio.

#### **4. OBJETIVO**

Avaliar o efeito da temperatura sobre a síntese de ácidos graxos e abundância de mRNA dos genes lipogênicos acetil CoA carboxilase alfa (ACACA $\alpha$ ) e proteína carreadora miristoil acil tioesterase (MACPT) no azevém anual (*Lolium multiflorum* L.)

## 5. ARTIGO - EFEITO DA BAIXA TEMPERATURA NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E EXPRESSÃO DE GENES LIPOGÊNICOS DO AZEVÉM ANUAL (*Lolium multiflorum* L.)

**RESUMO:** Temperaturas baixas alteram as rotas bioquímicas na planta, alterando o perfil de ácidos graxos, incluindo aqueles constituintes de membranas celulares que modulam a sua fluidez. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da temperatura na variação do perfil de ácidos graxos e na expressão dos genes lipogênicos: acetil-CoA carboxilase e proteína carreadora miristoil acil tioesterase (ACACA $\alpha$  e MACPT) do azevém anual (*Lolium multiflorum* L.), cultivado em dois ambientes com temperaturas contrastantes, Lages e São Miguel do Oeste. Foram utilizadas duas cultivares (diploide e tetraploide), mantidas a  $\pm 20$  cm de altura. A amostragem foi realizada em Agosto e Setembro, no mesmo dia em ambos os locais e a 15 cm do solo. Os dados de temperatura foram obtidos através de estação automática e de um *datalogger*. A extração de RNA total e síntese de DNA complementar foram feitas e o RT-qPCR foi realizado. A temperatura foi menor em Lages (14,4 vs. 19,5 °C,  $p < 0,05$ ). A abundância de mRNA da ACACA $\alpha$  foi reduzida em 40 enquanto da MACPT aumentou em 305% ( $p < 0,05$ ), respectivamente. Adicionalmente, na cultivar diploide a abundância de mRNA da ACACA $\alpha$  e MACPT foram, respectivamente, 40 e 47% maior quando comparada à tetraploide. O azevém cultivado no ambiente mais frio (LAG) apresentou maiores teores de C14:0, C16:1 *c9* e C18:1 *c9* e menor teor de C18:2 *c9*, *c12*, o mesmo ocorreu para o azevém diploide ao compará-lo com o tetraploide, mas com menor teor de C18:3 *c9*, *c12*, *c15* ao invés do C18:2. De maneira geral, os resultados sugerem que em baixas temperaturas no azevém há uma redução na expressão do gene que codifica a ACACA $\alpha$  e aumento na expressão de MACPT, aumentando o percentual de ácidos graxos de cadeia média como o C14:0 que junto aos maiores teores de C16:1 e C18:1 sugerem que é reduzindo o comprimento da cadeia de carbono e aumentando o percentual de ácidos graxos monoinsaturados que as plantas de azevém anual regulam, pelo menos em parte, a síntese de ácidos graxos mantendo a funcionalidade da planta em baixas temperaturas.

**Palavras-chave:** ACACA $\alpha$ , tioesterase, ploidia, síntese de ácidos graxos, lipídios, frio.

**ARTICLE - EFFECT OF LOW TEMPERATURE ON THE FATTY ACIDS PROFILE AND EXPRESSION OF LIPOGENIC GENES OF ANNUAL RYEGRASS (*L. MULTIFLORUM* L.)**

**ABSTRACT:** Low temperatures alter the biochemical routes of the plant, altering the profile of fatty acids, including those constituents of cell membranes that modulate its fluidity. The objective of this work was to investigate the effect of temperature on the variation of fatty acid profile and on the expression of lipogenic genes: acetyl-CoA carboxylase and myristoyl acyl thioesterase (ACACA $\alpha$  and MACPT) of the ryegrass (*Lolium multiflorum* L.), cultivated in two environments with contrasting temperatures, Lages and São Miguel do Oeste. Two cultivars (diploid and tetraploid), sowed and fertilized manually, were manually irrigated, and maintained at 20 cm  $\pm$  height was used. Sampling was carried out in August and September, on the same day in both sites and 15 cm from the ground. Temperature data was obtained through an automatic station and a datalogger. Total RNA extraction and complementary DNA synthesis were performed using a commercial kit, so RT-qPCR was performed. The temperature was lower in Lages (14.4 vs. 19.5 °C,  $p < 0.05$ ). The abundance of mRNA of ACACA $\alpha$  was reduced by 40 while MACPT increased by 305% ( $p < 0.05$ ), respectively. Additionally, in the diploid cultivar, the abundance of mRNA of ACACA $\alpha$  and MACPT were, respectively, 40 and 47% higher when compared to tetraploid. The ryegrass cultivated in the coldest environment (LAG) showed higher levels of C14:0, C16:1 *c9* and C18:1 *c9* and lower content of C18:2 *c9*, *c12*, the same occurred for the diploid when comparing it with the tetraploid, but with lower content of C18:3 *c9*, *c12*, *c15* instead of C18:2. In general, the results suggest that at low temperatures the ryegrass reduces the expression of ACACA $\alpha$  and increases the expression of MACPT, reducing the length of carbon chains, demonstrated by the higher C14:0 content found, that together with the higher levels of C16:1 and C18:1 suggest that this is how annual ryegrass plants regulate, at least in part, the synthesis of fatty acid maintaining plant functionality at low temperatures.

**Keywords:** ACACA $\alpha$ , thioesterase, ploidy, fatty acid synthesis, lipids, cold.

## 5.1. INTRODUÇÃO

Nas plantas os lipídios compõem a membrana plasmática das células sendo fundamentais para a manutenção de sua fluidez de modo a garantir a manutenção das suas atividades. Para evitar os efeitos ocasionados pelo frio a planta passa por um processo de aclimatação que envolve mudanças bioquímicas como a alteração na composição lipídica das membranas e no grau de insaturação dos seus ácidos graxos (SAKAI E LARCHER, 2012). Segundo Vigh et al. (1998), a alteração da fluidez da membrana prejudica suas funções biológicas então, o objetivo da aclimatação seria evitar uma transição de fase na membrana quando a temperatura diminui que pode passar de um estado cristalino líquido para gel.

A região sul brasileira se destaca pela capacidade de produzir pastagens de inverno, onde baixas temperaturas ocorrem naturalmente. Entretanto, há diferenças microclimáticas entre as regiões que cultivam tais forrageiras, oportunizando a investigação sobre o perfil de ácidos graxos em ambientes contrastantes.

Como as plantas no processo de adaptação ao frio podem: a) reduzir a síntese de ácidos graxos de cadeia longa (ex: C16:0 ou C18:0); b) aumentar a síntese de ácidos graxos de cadeia curta e/ou média (Ex: C10:0 a C14:0); c) aumentar a síntese de ácidos graxos insaturados ou; d) ambos eventos descritos anteriormente, este trabalho objetivou investigar o efeito da temperatura na variação do perfil de ácidos graxos e na expressão de genes lipogênicos em uma planta forrageira (azevém anual; *Lolium multiflorum* L.), utilizada nos sistemas de produção de ruminantes no sul do país, cultivada em dois ambientes contrastantes em temperatura.

## 5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1. Cultivares, local, preparo do solo e semeadura

Foram utilizadas duas cultivares de azevém anual, uma diploide (BRS ponteio, de origem brasileira) e outra tetraploide (Potro, de origem uruguaia), semeadas separadamente em duas parcelas de 9 m<sup>2</sup>, nas cidades de Lages (LAG; 27° 47' 34" S e 50° 18' 24" O) e São Miguel do Oeste (SMO; 26° 43' 31" S e 53° 31' 14" O), localizadas no centro e no extremo oeste do estado, respectivamente. O solo foi previamente preparado com aração, gradagem e adubado manualmente com nitrogênio, fósforo e potássio. Foi

utilizada uma dose de 100 kg/ha de nitrogênio, e os demais nutrientes foram elevados para a classe de disponibilidade denominada “alto”, de acordo com a análise de solo (Tabela suplementar 1) e o Manual de Adubação e Calagem para os estados do Rio grande do Sul e Santa Catarina de 2016. A semeadura foi feita de forma manual em cada unidade experimental com um acréscimo de 50% da dose recomendada para a cultura, utilizando uma proporção de 37 kg/ha, ocorrendo na mesma data nos dois locais, em 21/05/2021 para cultivar diploide e 27/05/2021 para tetraploide.

### **5.2.2. Condução do cultivo**

As parcelas foram irrigadas de acordo com o potencial matricial do solo, verificado como auxílio de um tensiômetro com 20 cm de comprimento, mantendo sua tensão acima de -40 kPa. O pasto foi mantido em uma altura de 20 cm durante todo o período experimental, com corte manual usando tesoura. Após cada amostragem o pasto foi rebaixado à 15 cm.

### **5.2.3. Amostragem das plantas**

A primeira amostragem ocorreu quando todas as parcelas atingiram 20 cm de altura, no mesmo dia e em ambos os locais, em 19/08/2021 e a segunda em 06/09/2021. As duas amostragens foram obtidas com a planta em estágio vegetativo, cortando a 15 cm do solo, constituindo-se de 16 amostras por parcela para determinação do perfil de ácidos graxos (PAG) e 12 para expressão gênica (EG), pesando 40 g para PAG e 20 g para EG, sendo imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C para PAG e a -80°C para EG.

### **5.2.4. Dados climáticos: temperatura, soma térmica e unidades de frio**

As áreas experimentais, Lages (LAG) e São Miguel do Oeste (SMO) foram escolhidas pela diferença prévia contrastante de temperatura. Os dados de temperatura média do ar, diárias e horárias, de LAG foram obtidos através de uma estação meteorológica automática do Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (EPAGRI) e em SMO, com um *datalogger*

instalado no local de condução do experimento. O cálculo de unidades de frio foi realizado a partir das temperaturas do ar das duas cidades, seguindo o modelo de Carolina do Norte que se baseia no acúmulo de unidades de frio, onde cada temperatura média horária equivale a um determinado valor de unidade de frio (Tabela Suplementar 2). A Soma Térmica (ST) foi calculada pela diferença entre as temperaturas médias diárias (Tmd) e a temperatura base (Tb) de crescimento da cultura ( $ST = Tmd - Tb$ ), sendo a temperatura base considerada como 9°C (MULLER et al., 2009). Para comparação entre os locais e períodos foram considerados os dados dos 15 dias anteriores as datas de coleta, comparando as Temperaturas Médias diárias (Tmd), Unidades de Frio diárias (UFd) e Somas Térmicas diárias (STd). As Somas Térmicas totais e as Unidades de Frio Totais foram calculadas pelo somatório total do período de cultivo.

#### **5.2.5. Determinação do perfil de ácidos graxos**

As amostras de azevém foram analisadas conforme descrito por Ribeiro e Eastridge (2006). Brevemente, as amostras colhidas foram imersas em uma solução de hexano:isopropanol (H:IP) para a extração dos lipídios. Os ácidos graxos foram metilados conforme descrito por Sukhija e Palmquist (1988) e os ésteres metílicos dos ácidos graxos (EMAG) foram determinados utilizando um cromatógrafo a gás (modelo Focus GC; Thermo Scientific, Milan, Italy), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida SP-2560 (100 m x 25 mm x 0.2 µm de espessura de filme; Supelco, Bellefonte, Pennsylvania). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste (1 ml/min) e nitrogênio como gás auxiliar. As temperaturas do injetor e detector foram ajustadas a 250°C, com razão de “Split” de 15:1. A temperatura do forno foi ajustada a 70°C por 4 minutos, aumentando 13°C/min até 175°C, sendo mantida por 27 min, aumentando 4°C/min até 215°C e mantida por mais 31 minutos (KRAMER et al., 1997). Os EMAG foram identificados por comparação com um padrão de referência (Supelco FAME mix #C4-C24).



### 5.2.6. Extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

O RNA total foi extraído das amostras de azevém usando o kit comercial “SV Total RNA Isolation System” (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A concentração de RNA foi medida através do espectrofotômetro “NanoDrop” (ND-2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e a pureza através da relação A260/280 ( $2,13 \pm 0,006$ ). O RNA foi transcrito em DNA complementar (cDNA) usando o kit “GoScript” de transcrição reversa (Promega Corporation, Madison, WI, USA) com *random primers*.

A análise por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi realizada em triplicatas em uma placa de reação de 48 poços (MicroAmp, Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) com um volume de reação de 15  $\mu$ L, 30 ng de cDNA com “SYBR Green Mix” (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Os *primers* utilizados foram desenhados especificamente para cada gene de interesse. A curva padrão utilizada continha sete pontos com um *pool* de cDNA de todas as amostras em uma diluição seriada (100, 50, 25, 12, 6,25, 3,12 e 1,56%). A placa foi quantificada no aparelho “StepOne Real-Time” (Applied BioSystems, USA), e os dados analisados com software “StepOne versão 2.1” (Applied BioSystems, USA), gerando curvas de dissociação para verificar a presença de um único produto. Em seguida, foi gerado uma equação de regressão com os valores do ciclo “CT” do RT-qPCR, a fim de verificar a eficiência da reação. As reações apresentaram coeficiente de determinação superior a 0,98 e eficiência entre 90 e 110%.

As sequências dos *primers* utilizados para avaliação da expressão gênica foi obtida a partir do banco de dados de anotações de sequências de nucleotídeos – “GenBank” (NCBI, Bethesda, MD, EUA) e/ou de estudos previamente publicados (Tabela 1), sintetizados pela “Invitrogen” (Carlsbad, CA, EUA) e validados previamente quanto a especificidade e eficiência antes da utilização. Foram utilizados dois genes *housekeeping* (eF1A: *eukaryotic elongation factor 1 alpha*; YT521-B: *like protein family protein*.) e dois genes de interesse (ACACA $\alpha$ : Acetil-CoA carboxilase alfa para *Lolium multiflorum* e; MACP: *Miristoyl acyl carrier protein thioesterase* para *Lolium perene*; Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos primers utilizados na análise de RT-qPCR.

Gene	Primers <sup>1</sup>	Acesso
ACACA $\alpha$	F: GCCCAAGGGAAGATGCATTT	AF325710.1
	R: CCAATCCGAGCACCAGAGTT	
MACP	F: GCACCAACGAGTCTGGAGAAA	JF747410.1
	R: TTGGGCTTCCACGTGGTT	
eF1A	F: CCGTTTTGTGCGAGTTTGGT	Lee et al. (2010)
	R: AGCAACTGTAACCGAACATAGC	
YT521-B	F: TGTAGCTTGATCGCATACCC	Lee et al. (2010)
	R: ACTCCCTGGTAGCCACCT	

<sup>1</sup> Os *primers* são reportados em sequência 5' – 3'. ACACA $\alpha$ : Acetil-CoA carboxilase alfa; MACP: *Miristoyl acyl carrier protein thioesterase*; eF1A: *eukaryotic elongation factor 1 alpha*; YT521-B: *like protein family protein*.

### 5.2.7. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (SAS Edition, 2017), utilizando-se o procedimento “MIXED”, a normalidade e homoscedasticidade foram testados por Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para os dados de temperatura, unidades de frio e graus-dia foram considerados os dados dos 15 dias antecedentes às datas de coleta, formando dois períodos de avaliação (P1 e P2) que foram analisados como medidas repetidas no tempo com o local e o período como efeitos fixos e as amostras dentro do local como efeito aleatório. Para os dados de expressão gênica o local, a cultivar e as datas de coleta foram consideradas como efeitos fixos e as amostras dentro do local como efeito aleatório e a média geométrica dos genes *housekeeping* (*eukaryotic elongation factor 1 alpha* - EF1-ae *YT521-B-like protein family protein*, YT521-B), foi usada como covariável. Os dados de perfil de ácidos graxos foram avaliados pelo mesmo procedimento, sendo o local e a cultivar como efeito fixos e as amostras dentro do local como efeito aleatório. As possíveis interações entre as variáveis estudadas também foram testadas. O nível de significância adotado foi de 5% e quando o teste F foi significativo, as médias foram comparadas com o comando “LSMEANS” e a opção “DIFF”. Ainda, valores de resíduos estudentizados fora de  $\pm 3,0$  foram considerados “outliers” e excluídos da análise estatística.

## 5.3. RESULTADOS

### 5.3.1. Temperatura, soma térmica e unidades de frio

Não houve interação entre locais e períodos ( $P > 0,05$ ). As temperaturas médias e somas térmicas diárias foram mais baixas em Lages, que apresentou também maior acúmulo diário de unidades de frio (Tabela 2). O segundo período apresentou temperatura mais alta e maior soma térmica diária (Tmd: 17,9 vs. 16 °C com  $P = 0,022$ ; STd: 7,05 vs. 8,9 com  $P = 0,001$ ).

Tabela 2. Temperatura média diária (Tmd), unidades de frio diárias (Ufd) e soma térmica diária (STd) em Lages (LAG) e São Miguel do Oeste (SMO).

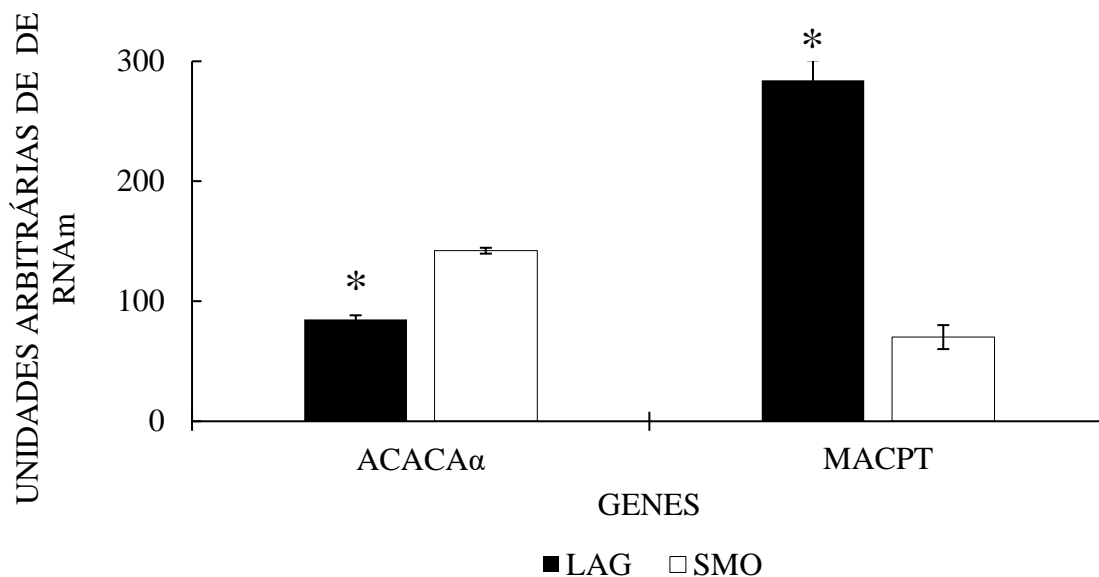
	Dados Climáticos			
	LAG	SMO	EPM <sup>#</sup>	P
Tmd (°C)	14,4 <sup>b</sup>	19,5 <sup>a</sup>	0,1	0,001
Ufd	-2,1 <sup>a</sup>	-19,9 <sup>b</sup>	0,4	0,001
STd (°C)	5,4 <sup>b</sup>	10,6 <sup>a</sup>	0,1	0,001

\*Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem entre si à 5% de significância. <sup>#</sup>EPM = Erro padrão da média; P = probabilidade.

### 5.3.2. Abundância de mRNA

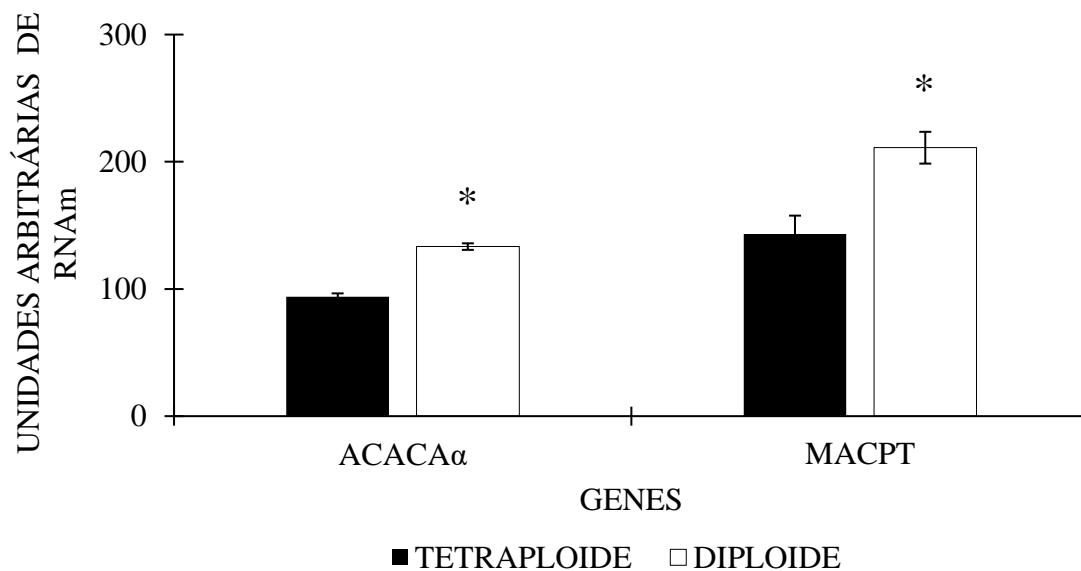
Não houve interação entre os períodos de coleta e ambos os genes ( $P > 0,05$ ). Na Figura 7 observa-se que no ambiente mais frio (LAG) a abundância de mRNA da ACACA $\alpha$  foi reduzida em 40% enquanto a de MACPT foi aumentada em 305% ( $P = 0,001$ ). Já na Figura 8, nota-se entre as cultivares que as abundâncias de mRNA da ACACA $\alpha$  e MACPT foram 40 e 47% maiores na diploide ( $P = 0,0005$  e  $P = 0,004$ , respectivamente).

Figura 7. Abundância de mRNA da acetil-CoA carboxilase (ACACA $\alpha$ ) e proteína carreadora miristoil acil tioesterase (MACPT) em plantas de azevém anual (*Lolium multiflorum* L.) cultivadas em Lages (LAG) e São Miguel do Oeste (SMO).



I - Os valores são apresentados como a média  $\pm$  EPM. Asterisco denota diferença entre os locais (P<0,05).

Figura 8. Abundância de mRNA da acetil-CoA carboxilase (ACACA $\alpha$ ) e proteína carreadora miristoil acil tioesterase (MACPT) entre cultivares diploide e tetraploide de azevém anual (*Lolium multiflorum* L.)



II - Os valores são apresentados como a média  $\pm$  EPM. Asterisco denota diferença entre os locais (P<0,05).

### 5.3.3. Perfil de Ácidos Graxos

No azevém cultivado no ambiente mais frio (LAG) encontrou-se maiores teores de ácido mirístico (C14:0), palmitoleico (C16:1 *c9*), esteárico (C18:0) e oleico (C18:1 *c9*). Entre as cultivares, na tetraploide foram encontrados maiores teores de ácido láurico (C12:0) e linolênico (C18:3 *c9*, *c12*, *c15*). Entre locais não houve diferenças para os teores de ácidos cáprico (C10:0), palmítico (C16:0) e linolênico (C18:3 *c9*, *c12*, *c15*), nem entre as cultivares para cáprico (C10:0), miristoleico (C14:1 *c9*) e linoleico (C18:2 *c9*, *c12*). Não houve interação entre locais e cultivares apenas para os teores de C10:0 e C12:0. As relações C14:1/14:0 e C16:1/16:0 foram, respectivamente, menores e maiores em Lages (Tabela 3).

Comparando as cultivares em LAG, os teores dos ácidos graxos saturados (C14:0, 16:0 e 18:0) e monoinsaturados (C14:1 *c9*; 16:1 *c9* e 18:1 *c9*) foram maiores na diploide, enquanto os teores de ácidos graxos poliinsaturados (C18:2 *c9*, *c12* e C18:3 *c9*, *c12*, *c15*) foram menores. Comparando locais para uma mesma cultivar, em LAG observou-se maior teor de C14:0 para tetraploide, enquanto os teores de C16:1 *c9* e C18:1 *c9* foram maiores na diploide. (Tabela 4).

O efeito do frio sobre o perfil de ácidos graxos é evidenciado (Tabela 4) comparando os locais para a uma mesma cultivar e entre elas para um mesmo local, não foi encontrada nenhuma diferença entre elas quando cultivadas em SMO.

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos do azevém anual (*Lolium multiflorum* L.) cultivado em Lages (LAG) e São Miguel do Oeste (SMO) e das duas cultivares (diploide - DIP e; tetraploide - TETRA).

Perfil de Ácidos Graxos								
AG	% Ácidos Graxos					P*	EPM <sup>#</sup>	L x C
	LAG	SMO	P*	DIP	TETRA			
C10:0	0,14 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,143	0,14 <sup>A</sup>	0,13 <sup>A</sup>	0,184	0,001	0,501
C12:0	0,95 <sup>b</sup>	1,15 <sup>a</sup>	<0,001	0,91 <sup>B</sup>	1,19 <sup>A</sup>	<0,001	0,006	0,064
C14:0	3,5 <sup>a</sup>	1,9 <sup>b</sup>	<0,001	3,2 <sup>A</sup>	2,17 <sup>B</sup>	0,0002	0,014	0,018
C14:1 <i>c9</i>	0,14 <sup>b</sup>	0,24 <sup>a</sup>	0,0002	0,2 <sup>A</sup>	0,18 <sup>A</sup>	0,323	0,004	0,002
C16:0	30,0 <sup>a</sup>	23,0 <sup>a</sup>	0,11	28,4 <sup>A</sup>	24,3 <sup>B</sup>	0,0006	0,012	0,012
C16:1 <i>c9</i>	0,86 <sup>a</sup>	0,59 <sup>b</sup>	<0,001	0,82 <sup>A</sup>	0,63 <sup>B</sup>	0,0011	0,013	0,008
C18:0	11,6 <sup>a</sup>	8,7 <sup>b</sup>	<0,001	11,4 <sup>A</sup>	9,0 <sup>B</sup>	<0,001	0,008	<0,001
C18:1 <i>c9</i>	16,2 <sup>a</sup>	11,5 <sup>b</sup>	<0,001	15,6 <sup>A</sup>	12,0 <sup>B</sup>	<0,001	0,128	0,0014
C18:2 <i>c9, c12</i>	4,7 <sup>b</sup>	7,8 <sup>a</sup>	<0,001	6,1 <sup>A</sup>	6,4 <sup>A</sup>	0,222	0,044	0,0001
C18:3 <i>c9, c12, c15</i>	16,8 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	0,98	14,5 <sup>B</sup>	19,3 <sup>A</sup>	0,0497	1,42	0,005
Outros	15,1	27,9	-	18,7	24,7	-	-	-
Relações entre produto e substrato								
14:1/14:0	0,04 <sup>b</sup>	0,12 <sup>a</sup>	<0,001	0,084 <sup>A</sup>	0,078 <sup>B</sup>	0,0015	0,005	0,0351
16:1/16:0	0,03 <sup>a</sup>	0,025 <sup>b</sup>	<0,001	0,034 <sup>A</sup>	0,026 <sup>B</sup>	0,0072	0,0002	0,172
18:1/18:0	1,36 <sup>a</sup>	1,35 <sup>a</sup>	0,727	1,37 <sup>A</sup>	1,34 <sup>A</sup>	0,389	0,008	0,904

\*P = Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem entre si, sendo as minúsculas para comparação entre locais e maiúsculas entre cultivares. <sup>#</sup>EPM = Erro padrão da média. L x C = Interação entre locais e cultivar.

Tabela 4. Interações entre locais (LAG, SMO) e cultivares (DIP, TETRA), para o perfil de ácidos graxos do azevém anual (*Lolium multiflorum* L.).

% DE ÁCIDOS GRAXOS										
AG	LAG			DIP.			TETRA			EPM <sup>#</sup>
	DIP.	TETRA	P*	LAG	SMO	P*	LAG	SMO	P*	
C14:0	4,4 <sup>a</sup>	2,6 <sup>b</sup>	<0,001	4,4 <sup>A</sup>	2,0 <sup>B</sup>	<0,001	2,6 <sup>A</sup>	1,7 <sup>B</sup>	0,003	0,03
C14:1 c9	0,19 <sup>a</sup>	0,10 <sup>b</sup>	0,005	NS	NS	-	0,1 <sup>B</sup>	0,3 <sup>A</sup>	<0,0001	0,01
C16:0	33,3 <sup>a</sup>	26,3 <sup>b</sup>	<0,001	33,3 <sup>A</sup>	23,5 <sup>B</sup>	0,008	NS	NS	-	0,23
C16:1 c9	1,05 <sup>a</sup>	0,70 <sup>b</sup>	<0,001	1,1 <sup>A</sup>	0,6 <sup>B</sup>	<0,001	NS	NS	-	0,03
C18:0	13,7 <sup>a</sup>	9,4 <sup>b</sup>	<0,001	13,7 <sup>A</sup>	9,0 <sup>B</sup>	<0,001	NS	NS	-	0,02
C18:1 c9	19,3 <sup>a</sup>	13,1 <sup>b</sup>	<0,001	19,3 <sup>A</sup>	12,0 <sup>B</sup>	<0,001	13,1 <sup>A</sup>	10,9 <sup>B</sup>	0,05	0,26
C18:2 c9,c12	4,0 <sup>b</sup>	5,5 <sup>a</sup>	0,0004	4,0 <sup>B</sup>	8,2 <sup>A</sup>	<0,001	5,5 <sup>B</sup>	7,4 <sup>A</sup>	<0,001	0,09
C18:3 c9, c12, c15	10,8 <sup>b</sup>	22,7 <sup>a</sup>	0,0014	NS	NS	-	NS	NS	-	0,84
C14:1/14:0	0,044 <sup>a</sup>	0,036 <sup>b</sup>	0,0002	0,044 <sup>A</sup>	0,125 <sup>B</sup>	<0,0001	0,036 <sup>B</sup>	0,125 <sup>A</sup>	<0,0001	0,011

\* P = Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem entre si à 5% de significância, sendo as minúsculas para comparação entre locais e maiúsculas entre cultivares.  
NS = Não significativo. <sup>#</sup>EPM = Erro padrão da média

## 5.4. DISCUSSÃO

### 5.4.1. Expressão gênica

A abundância de mRNA da ACACA $\alpha$  foi reduzida em 40% enquanto a MACPT aumentou 305% em Lages. Considerando que a ACACA $\alpha$  é considerada uma enzima regulatória e está envolvida nos passos iniciais da síntese de ácidos graxos, regulando e limitando a velocidade de síntese dos lipídios (HELDT, 2005) e a MACPT pelo tamanho da cadeia finalizando a síntese com 14 carbonos (ácido mirístico - C14:0), os resultados sugerem que em baixas temperaturas as plantas de azevém anual sintetizam menos ácidos graxos de cadeia curta e saturada, como por exemplo o C12:0, que há a síntese de ácidos graxos de cadeia longa como C16:0 e C18:0 mas para serem usados como substratos para a formação de seus respectivos monoinsaturados (C16:1 *c9* e C18:1 *c9*; Tabela 3) mas priorizam a síntese de C14:0 como uma forma de adaptação ao frio, auxiliando a planta a manter as suas funções normais.

O ponto de vista acima vem ao encontro do que descreveu Heldt (2005) que em um ácido graxo o decréscimo de carbonos em sua cadeia ou o acréscimo de insaturações resulta na redução da temperatura de fusão (ex: C18:0 70°C; C12:0 40°C e C18:0 70°C; C18:1 13°C), ou seja, a planta cultivada em temperaturas baixas precisaria aumentar o grau de insaturação de seus ácidos graxos e/ou reduzir o tamanho das cadeias carbônicas para manter suas atividades vitais.

Comparada ao tetraploide, a cultivar diploide mostrou um aumento de 40 e 47% na abundância de mRNA da ACACA $\alpha$  e MACPT, respectivamente. Sabendo-se que a temperatura basal da cultivar diploide é inferior à da tetraploide (8 vs. 10,5°C; MULLER et al., 2009) e pelo aumento da expressão de genes lipogênicos no azevém diploide cultivado no ambiente mais frio (LAG), podemos inferir que a manutenção de seu crescimento e metabolismo ocorre sob temperaturas mais baixas que as da cultivar tetraploide, dando suporte ao sugerido por Sugiyama (2006) de que é mais tolerante às temperaturas baixas que o tetraploide.

### 5.4.2. Perfil de ácidos graxos

O maior teor de C14:0 encontrado no azevém anual cultivado em LAG é reflexo da maior abundância de mRNA da MACPT e menor da ACACA $\alpha$  quando comparado às



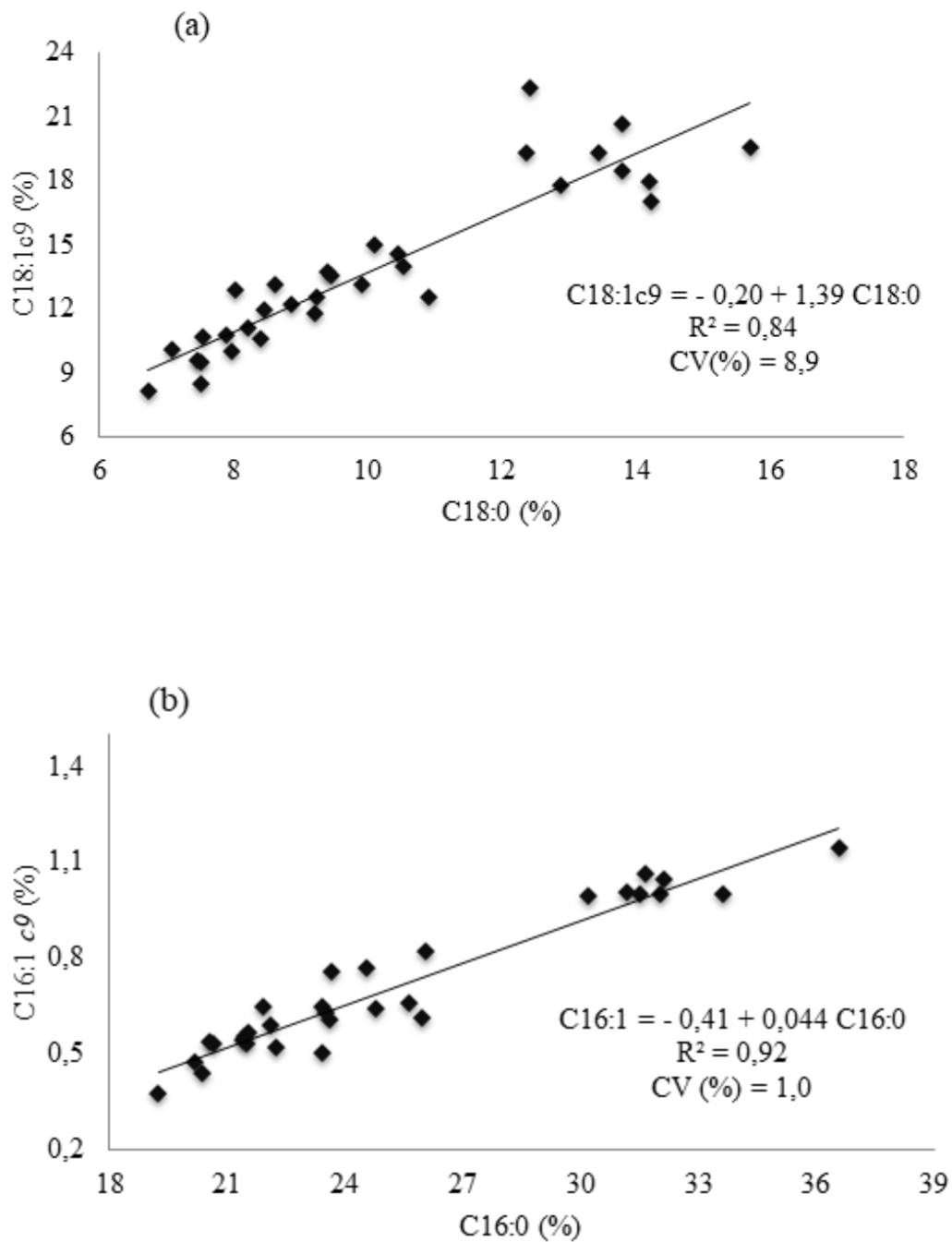
plantas cultivadas em SMO. Entretanto, em SMO encontrou-se maior teor de C12:0, mas observando a participação destes ácidos graxos no percentual total (C12:0 = 1,15 vs. C14:0 = 1,9%) e a diferença entre os locais, fica evidente que o C14:0 é mais relevante para adaptação da planta ao frio.

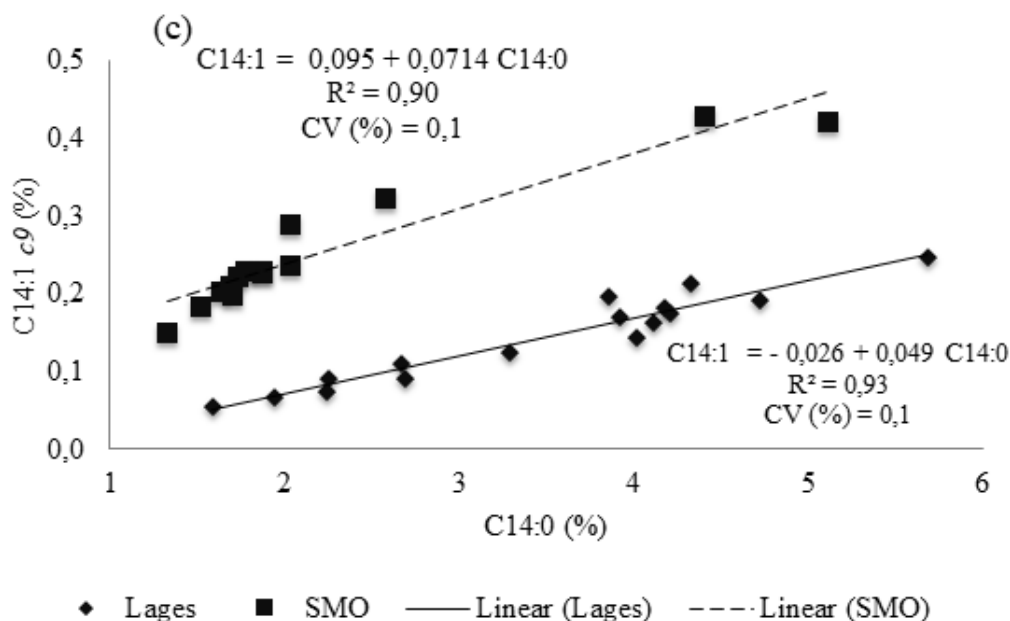
O maior percentual (46 e 33%, respectivamente) dos ácidos graxos monoinsaturados (C16:1 *c9* e C18:1 *c9*) nas plantas cultivadas em LAG sugerem um papel importante desses ácidos graxos nas plantas em ambientes mais frios e justifica o maior teor de C18:0 para servir de substrato para sintetizar C18:1 *c9* (Figura 9a). O mesmo ocorreu para C14:0 e C16:0 (Figura 9b), embora o C14 apresentou menor porcentagem de C14:1 *c9* no ambiente mais frio e menor relação C14:1/14:0 (Figura 9c), sugerindo que o azevém em ambiente mais frio acumula C14:0 compensando o perfil com ácido graxo saturado, mas de cadeia média. Essa relação também foi observada quando as cultivares foram comparadas. O aumento dos monoinsaturados pode estar relacionado com o decréscimo de ao menos um poliinsaturado, como mostram os resultados de C18:2 *c9*, *c12* e C18:3 *c9*, *c12*, *c15* em LAG e para DIP, comparando locais e cultivares, respectivamente. Heldt, (2005), comentou que os ácidos graxos poliinsaturados esterificados na segunda posição da molécula de glicerol podem ser substituídos por C18:1 e este pode ser novamente dessaturado. Assim, o aumento de C18:1 *c9* pode estar relacionado à um mecanismo de defesa da planta, por substituir parte dos ácidos graxos altamente insaturados e/ou pela sua maior participação, que em uma situação de frio extremo pode ser mais insaturado permitindo, por exemplo, elevar o grau de insaturação dos AG. Ainda, considerando esse ponto de vista, o ácido oleico (C18:1 *c9*) poderia desempenhar um papel importante quando ocorresse o aumento da temperatura após o frio, substituindo os ácidos graxos que foram anteriormente insaturados, reestabelecendo o equilíbrio. O aumento nos teores de ácidos graxos poliinsaturados de plantas cultivadas em baixas temperaturas foi encontrado por Cyril et al., (2002) estudando *Paspalum vaginatum sw.*, Tovuu et al., (2016) com *Oryza sativa*, e Uemura et al., (1995) e Falcone et al., (2004) usando *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudo. Cabe ressaltar que os estudos citados anteriormente foram conduzidos em ambientes controlados para provocar o frio, deste modo, este trabalho mostra que a planta se comporta de uma maneira diferente à campo e que os resultados dos trabalhos citados podem ocorrer em momentos específicos do período de produção.

Os maiores teores dos ácidos mirístico (C14:0), palmitoleico (C16:1 *c9*) e oleico (C18:1 *c9*) também foram observados na cultivar diploide quando comparada à

tetraploide, corroborando que esses ácidos graxos são responsáveis pela melhor adaptação do azevém anual ao ambiente mais frio. Nota-se ainda que, comparando as cultivares no ambiente mais quente (SMO) não houve qualquer interação, destacando o efeito do frio para as modificações no perfil de ácidos graxos.

Figura 9. Relação entre ácidos graxos monoinsaturados e seus respectivos saturados, sendo: a) C18:1c9 x C18:0; b) C16:1 x C16:0 e; c) C14:1 x C14:0.





A cultivar diploide em ambiente mais frio apresentou diferença no perfil de ácidos graxos e na abundância dos genes lipogênicos em comparação à tetraploide em mesmo ambiente e a mesma cultivar em ambiente mais quente, sendo similares às encontradas somente comparando os locais de cultivo, evidenciando sua maior resistência ao frio como sugerido por Sugiyama (2006), avaliando azevém perene e anual.

Assim, nossos resultados sugerem que havendo redução da temperatura ambiente a planta de azevém anual reduz o comprimento da cadeia carbônica de pelo menos alguns ácidos graxos e aumenta o percentual de ácidos graxos monoinsaturados como forma de adaptação, corroborando com Sakai e Larcher (2012) que afirmaram haver alterações na composição lipídica das plantas submetidas ao frio com essa finalidade e de Lynch e Steponkus (1987), Palta et al., (1993) e Uemura e Steponkus (1994), de que estas são influenciadas pela exposição a baixas temperaturas.

## 5.5. CONCLUSÃO

No frio, o azevém anual reduz a expressão de ACACA $\alpha$  (Acetil-CoA Carboxilase alfa) e aumenta a de MACPT (Proteína Carreadora Miristoil Acil Tioesterase), reduzindo o comprimento da cadeia carbonada dos ácidos graxos, aumentando o teor de ácido mirístico (C14:0). O frio promove um aumento na concentração de ácidos graxos monoinsaturados C16:1 *c*9 e C18:1 *c*9, mas não aumenta o teor total de ácidos graxos

insaturados. O azevém diploide apresenta maior abundância de genes lipogênicos e perfil de ácidos graxos que o possibilita ser mais resistente ao frio que o tetraploide.

## 5.6. REFERÊNCIAS

CYRIL, J. et al. Changes in membrane polar lipid fatty acids of seashore paspalumin response to low temperature exposure. **Crop Science**, v. 42, n. 6, p. 2031-2037, 2002

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Banco de dados de variáveis ambientais de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2020. 20p.(Epagri, Documentos, 310) - ISSN 2674-9521 (On-line).

FALCONE, D. L.; OGAS, J. P.; SOMERVILLE, C. R. Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of Arabidopsis with alterations in membrane lipid composition. **BMC Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 2004.

HELDT, H.; **Plant Biochemistry**, Academic Press. 2005.

KRAMER, J. K. G, et al. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, 1997, vol. 32, no 11, p. 1219-1228.

LEE, J. M. et al. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies of gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **BMC Molecular Biology**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2010.

LYNCH, D. V.; STEPONKUS, P. L. Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). **Plant physiology**, v. 83, n. 4, p. 761-767, 1987.

MÜLLER, L. et al. Lower base temperature and seasonal production of diploid and tetraploid ryegrass genotypes. **Ciência Rural** [online]. 2009, v. 39, n. 5 [Accessed 20 June 2022], pp. 1343-1348. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000098>>. Epub 22 May 2009. ISSN 1678-4596. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000098>.

PALTA J. P, WHITAKER B. D, WEISS L. S. Plasma Membrane Lipids Associated with Genetic Variability in Freezing Tolerance and Cold Acclimation of Solanum Species. **Plant Physiology**. 1993.

RIBEIRO, C. V. D. M.; EASTRIDGE, M. L. Effect of number of extractions on percentage of long-chain fatty acids from fresh alfalfa. **Journal of dairy science**, v.89, n. 9, p. 3505-3507, 2006.

SAKAI, A; LARCHER, W. **Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress**. Springer Science & Business Media, 2012.

SUGIYAMA, S. Responses of shoot growth and survival to water stress gradient in diploid and tetraploid populations of *Lolium multiflorum* and *L. perenne*. **Grassland science**, 2006, vol. 52, no 4, p. 155-160.

SUKHIJA, P. S.; PALMQUIST, D. L. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. **Journal of agricultural and food chemistry**, 1988, vol. 36, no 6, p. 1202-1206.

TOVUU, A. et al. Rice mutants deficient in  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (FAD8) fail to acclimate to cold temperatures. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 525- 535, 2016.

UEMURA, M; JOSEPH, R. A.; STEPONKUS, P. L. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). **Plant physiology**, v. 109, n. 1, p. 15-30, 1995.

UEMURA, M; STEPONKUS, P. A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. **Plant Physiology**. 1994.

VIGH, L; MARESCA, B; HARWOOD, J. L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? **Trends in biochemical sciences**, 1998, vol. 23, no 10, p. 369-374.

## 6. ANEXOS

Anexo 1. Análise de Solo de Lages e São Miguel do Oeste.

	pH	MOS (%)	P (mg/dm <sup>3</sup> )	K (mg/dm <sup>3</sup> )	Argila (%)	CTC pH 7 (cmolc/dm <sup>3</sup> )
LAG	4,7	3,2	4,0	97	61	17,9
SMO	5,0	2,7	13,4	41	41	19,4

	Ind. SMP	V (%)	Al (mg/dm <sup>3</sup> )	Ca (mg/dm <sup>3</sup> )	Mg (mg/dm <sup>3</sup> )
LAG	5,34	48	14,02	5,14	3,2
SMO	5,56	62,75	2,01	8,45	3,54

Anexo 2. Unidades de Frio Modelo Carolina do Norte.

Modelo Carolina do Norte	
Temperatura (°C)	Unidades de Frio (UF)
< -1,1	0
1,6	0,5
7,2	1
13	0,5
16,5	0
19	-0,5
20,7	-1
22,1	-1,5
> 23,3	-2

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSCHER, R. G.; HESS, J. L. Antioxidants in Upper plants. **CRC press**, 2017.
- BARTKE, N; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. **Journal of lipid research**, v. 50, p. S91-S96, 2009.
- BAUCHART, D; VÉRITÉ, R.; REMOND, B. Long-chain fatty acid digestion in lactating cows fed fresh grass from spring to autumn. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 64, n. Suppl 1, p. 330-333, 1984.
- BAUMAN, D. E.; CORL, B. A.; PETERSON, D. G. The biology of conjugated linoleic acids in ruminants. **Advances in conjugated linoleic acid research**, p. 146-173, 2020.
- CYRIL, J. et al. Changes in membrane polar lipid fatty acids of seashore paspalumin response to low temperature exposure. **Crop Science**, v. 42, n. 6, p. 2031-2037, 2002
- Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Banco de dados de variáveis ambientais de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2020. 20p. (Epagri, Documentos, 310) - ISSN 2674-9521 (On-line).
- FALCONE, D. L.; OGAS, J. P.; SOMERVILLE, C. R. Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of Arabidopsis with alterations in membrane lipid composition. **BMC Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 2004.
- FERNANDES, D. **Efeito de doses crescentes do ácido linoleico conjugado trans-10, cis-12 sobre a produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite e parâmetros sanguíneos de cabras leiteiras da raça Toggenburg**. 2012. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2012.
- FICH, E. A.; SEGERSON, N. A.; ROSE, J. K. C. **A cutina de poliéster vegetal: biossíntese, estrutura e funções biológicas**. Revisão anual da biologia vegetal , 2016, vol. 67, pág. 207-233.
- GRIINARI, J. M.; et al. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science.**, v.81, p.1251-1261, 1998.
- GURR, M. I. et al. **Lipids: biochemistry, biotechnology and health**. John Wiley & Sons, 2016.
- HEBEISEN, D. F., et al. Increased concentrations of omega-3 fatty acids in milk and platelet rich plasma of grass-fed cows. **International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin-und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition**, 1993, vol. 63, no 3, p. 229-233.
- HELDT, H.; **Plant Biochemistry**, AcademicPress. 2005.

- HUMPHREYS, M. O. Genetic improvement of forage crops—past, present and future. **The Journal of Agricultural Science**, v. 143, n. 6, p. 441-448, 2005.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KINGSTON-SMITH, A. H.; THOMAS, H. M. Strategies of plant breeding for improved rumen function. **Annals of Applied Biology**, v. 142, n. 1, p. 13-24, 2003.
- KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos Ruminantes**. Santa Maria: UFSM, 2011. 216 p.
- LEE, J. M. et al. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies of gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **BMC Molecular Biology**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2010.
- KRAMER, J. K. G, et al. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and totaltrans fatty acids. **Lipids**, 1997, vol. 32, no 11, p. 1219-1228.
- LINDQUIST, S. Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. **Current opinion in genetics & development**, v. 2, n. 5, p. 748-755, 1992.
- LOOMIS, W. D; CROTEAU, R. Biochemistry of terpenoids. In: *Lipids: structure and function*. **Academic Press**, 1980. p. 363-418.
- LYNCH, D. V; STEPONKUS, P. L. Alterações lipídicas da membrana plasmática associadas à aclimação de mudas de centeio de inverno (*Secale cereale* L. cv Puma) ao frio. **Plant Physiology**, 1987.
- Suporte Geográfico, **Mapa municípios de Santa Catarina**. 2022. Disponível em <<https://suportegeografico77.blogspot.com/2018/04/mapa-municipios-de-santa-catarina.html>>. > Acesso em: 06 ago. 2022.
- MCKEON, T. A.; STUMPF, P. K. Purification and characterization of the stearyl-acyl carrier protein desaturase and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 20, p. 12141-12147, 1982.
- MÜLLER, L. et al. Lower base temperature and seasonal production of diploid and tetraploid ryegrass genotypes. **Ciência Rural** [online]. 2009, v. 39, n. 5 [Accessed 20 June 2022], pp. 1343-1348. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000098>>. Epub 22 May 2009. ISSN 1678-4596. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000098>.
- MURATA, N; LOS, D. A. Membrane fluidity and temperature perception. **Plant physiology**, v. 115, n. 3, p. 875, 1997.
- PALTA J. P, WHITAKER B. D, WEISS L. S. Plasma Membrane Lipids Associated with Genetic Variability in Freezing Tolerance and Cold Acclimation of Solanum Species. **Plant Physiology**. 1993.



- RIBEIRO, C. V. D. M.; EASTRIDGE, M. L. Effect of number of extractions on percentage of long-chain fatty acids from fresh alfalfa. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 9, p. 3505-3507, 2006.
- SAKAI, A; LARCHER, W. Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress. **Springer Science & Business Media**, 2012.
- SAMALA, Suresh; YAN, Jiyu; BAIRD, Wm Vance. Changes in polar lipid fatty acid composition during cold acclimation in 'Midiron' and 'U3' bermudagrass. **Crop Science**, v. 38, n. 1, p. 188-195, 1998.
- SCHALLER, Hubert. The role of sterols in plant growth and development. **Progress in lipid research**, v. 42, n. 3, p. 163-175, 2003.
- SUGIYAMA, S. Responses of shoot growth and survival to water stress gradient in diploid and tetraploid populations of *Lolium multiflorum* and *L. perenne*. **Grassland science**, 2006, vol. 52, no 4, p. 155-160.
- SUKHIJA, P. S.; PALMQUIST, D. L. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. **Journal of agricultural and food chemistry**, 1988, vol. 36, no 6, p. 1202-1206.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.
- TOVUU, A. et al. Rice mutants deficient in  $\omega$ -3 fatty acid desaturase (FAD8) fail to acclimate to cold temperatures. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 525-535, 2016.
- UEMURA, M; JOSEPH, R. A.; STEPONKUS, P. L. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). **Plant physiology**, v. 109, n. 1, p. 15-30, 1995.
- UEMURA, M; STEPONKUS, P. A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. **Plant physiology**. 1994.
- VIGH, L. et al. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the desA gene in *Synechocystis* PCC6803. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, n. 19, p. 9090-9094, 1993.
- VIGH, L; MARESCA, B; HARWOOD, J. L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? **Trends in biochemical sciences**, 1998, vol. 23, no 10, p. 369-374.
- WITKOWSKA, I. M, et al. Effects of nitrogen rate and regrowth interval on perennial ryegrass fatty acid content during the growing season. **Agronomy Journal**, 2008 vol. 100, no 5, p. 1371-1379.