

Quantificação dos níveis endógenos de auxinas e da actividade enzimática das polifenoloxidasas em oliveira (*Olea europaea* L.)

Quantification of endogenous auxin levels and polyphenoloxidase enzymatic activity in olive (*Olea europaea* L.)

C. Serra¹, R. Antunes¹, H. Hegewald², C. Costa³, A. P. Pinto^{1,4} & A. Peixe⁴

RESUMO

A actividade enzimática de polifenoloxidasas foi avaliada em folhas e na zona apical, média e basal de ramos de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.), comuns no Alentejo ('Galega vulgar' e 'Cobrançosa'), mostrando que a actividade enzimática nas folhas foi muito superior à encontrada em tecidos de ramos do ano. Maior actividade enzimática foi também detectada na variedade 'Cobrançosa' versus 'Galega vulgar'. As condições óptimas para a determinação da actividade enzimática foram: pH= 5.5 e T= 40 °C, com 20 mM de 4-metilcatecol em tampão acetato. Nestas condições o K_M determinado foi: 2,60 e 3,48 mM com o método de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk, respectivamente.

A melhor recuperação das auxinas AIA (ácido indol-3-acético) e AIB (ácido indolbutírico) em material vegetal foi conseguida através da extracção das amostras com acetona. A separação, identificação e quantificação do AIA e AIB em padrões, material vegetal dopado (tecidos de oliveira dopados

com uma concentração conhecida de padrão) e não dopado, foi efectuada por técnicas cromatográficas (HPLC-DAD e LC-MS), mostrando os resultados taxas de recuperação superiores a 40% para o AIA e 60% para o AIB.

ABSTRACT

The polyphenoloxidase enzymatic activity was evaluated in two olive cultivars (*Olea europaea* L.) widespread in Alentejo ('Galega vulgar' and 'Cobrançosa'). Leaves and apical, medium and basal regions of the year stems were used as sample material.

When compared with the different regions of the year stem, the results have shown that enzymatic activity was significantly higher in the leaves of both cultivars. Between cultivars, it was observed that 'Cobrançosa' presented higher enzymatic activity than 'Galega vulgar'. The pH at 5.5 and 40 °C temperature, using 20 mM of 4-methylcatecol in acetate buffer were the optimized conditions for the enzymatic analy-

¹ Departamento de Química, Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho nº 59, 7000 Évora; e-mail: app@uevora.pt; ²Lacrome Bairro do Bacelo, Rua César Batista, 6 D. 7000-715 Évora; ³Centro de Química de Évora, Universidade de Évora; ⁴Instituto de Ciências Agrárias Mediterrâneas (ICAM), Universidade de Évora

sis. Under these conditions, the measured K_M was 2,60 and 3,48 mM, using the Michaelis-Menten and the Lineweaver-Burk methods respectively.

The auxins IBA and IAA were removed from the plant material by an extraction with acetone. The separation, identification and quantification of IBA and IAA using vegetal plant material treated and non treated with exogenous auxins, was done by chromatographic techniques (HPLC-DAD and LC-MS). The sample preparation recoveries were higher than 40% for IAA, and higher than 60% for IBA.

INTRODUÇÃO

As propriedades das auxinas no enraizamento e a sua importância na propagação de plantas é reconhecida de há muito (Thiman & Went, 1934). Assim, a necessidade de aplicação de auxina exógena para induzir a formação de raízes em estacas tem sido descrita para muitas espécies e.g. sequóia (Berthon *et al.*, 1990), pinheiro (Greenwood & Weir, 1994), cipreste (Edson *et al.*, 1996), amendoeira (Caboni *et al.*, 1997) e eucalipto (Fett-Neto *et al.*, 2001).

Apesar das auxinas serem largamente utilizadas na indução do enraizamento, pouco se sabe sobre a sua acção específica ou a sua interacção com outros compostos endógenos. Alterações na actividade de enzimas, as quais regulam diferentes processos bioquímicos, bem como alterações nos níveis celulares de diferentes metabolitos (e.g. compostos fenólicos) durante o processo de enraizamento em estacas têm sido investigadas (Mato *et al.*, 1988; Das *et al.*, 1997; Druege *et al.*, 2000). Vários autores mostraram o envolvimento da peroxidase, AIA-oxidase e compostos fenólicos no processo de formação de raízes em estacas (Mayer,

1987; Gonzalez *et al.*, 1991; Caboni *et al.*, 1997; Gaspar *et al.*, 1997).

Actualmente o ácido indol-butírico (AIB) é a auxina mais utilizada para estimular o processo de enraizamento em estacas porque: i) tem elevada capacidade para promover a formação inicial de raízes (Weisman *et al.*, 1988) e ii) possui fraca toxicidade e grande estabilidade em comparação com o ácido α -naftalenoacético (ANA) e ácido indol-3-acético (AIA) (Hartmann *et al.*, 1990; Qaddoury & Amssa, 2004). Estes reguladores de crescimento ocorrem nos tecidos vegetais em concentrações muito baixas (ng g^{-1}), juntamente com outras substâncias com propriedades cromatográficas semelhantes, o que dificulta a sua determinação requerendo esta, uma extensiva purificação antes da sua quantificação final.

Com o objectivo de dosear os níveis de auxinas (AIA e AIB) em tecidos vegetais de duas cultivares de oliveira comuns no Alentejo ('Galega vulgar' e 'Cobrançosa'), foram realizadas extracções sólido-líquido e extracções líquido-líquido seguidas de separação, identificação e quantificação por HPLC-DAD e LC-MS sobre padrões, amostras vegetais dopadas e não dopadas. A selecção destas cultivares teve a ver com o seu comportamento antagónico relativamente à formação de raízes adventícias por estaca semi-lenhosa. Enquanto a cultivar 'Galega vulgar' se apresenta recalcitrante ao enraizamento por este processo, com taxas de formação de raízes adventícias que não ultrapassam em média os 10%, a cultivar 'Cobrançosa', tem mostrado facilidade de enraizamento, apresentando taxas superiores a 70%.

Para que em posteriores ensaios fosse possível estudar uma eventual correlação entre os níveis internos de auxinas e a actividade enzimática das polifenoloxidases, a evolução dos níveis de actividade destas enzimas oxidativas foi avaliada espectrofo-

tometricamente em folhas e na zona apical, média e basal de ramos do ano. Estas enzimas são capazes de promover a evolução da auxina livre para a sua forma conjugada, tornando-a assim activa ao nível dos processos fisiológicos que se desenvolvem na planta e entre os quais se conta a formação de raízes adventícias.

MATERIAL E MÉTODOS

Actividade enzimática de polifenoloxidasas

O material vegetal foi homogeneizado em azoto líquido e depois extraído com tampão acetato a pH 5,5 e 4 °C durante 1 hora. Após centrifugação a 15000g, durante 30 min a 4 °C, obteve-se o extracto bruto de enzima. A quantificação da proteína total no extracto foi efectuada de acordo com Bradford (1976). A actividade enzimática foi determinada segundo Dincer *et al.* (2002), usando como substrato o 4-metilcatecol e tendo-se efectuado leituras da absorvância a 490 nm durante 3 minutos. Para a determinação da constante de Michaelis-Menten analisou-se a velocidade de transformação do substrato para várias concentrações: 0,3; 0,6; 1,2; 2,5; 4,9; 9,8 e 19,6 mM. Em seguida construíram-se as curvas com o método clássico de Michaelis e Menten e com o método de Lineweaver-Burk, determinando-se os valores de K_M graficamente.

Separação, identificação e quantificação do AIA e AIB

A 0,5 g de material vegetal liofilizado foram adicionados 10 ml de solução de extracção - 80% (v/v) de acetona (ou metanol) numa solução aquosa de BHT (butylated hydroxytoluene) 100 mg L⁻¹ (Zin-Huang *et al.*, 1996; Souza *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2005). O uso de BHT serve para

impedir a degradação das auxinas durante o processo de extracção das amostras. Em seguida a mistura foi extraída a frio, no escuro e com agitação durante 1, 3 ou 5 horas e centrifugada durante 15 minutos. O sobrenadante recolhido foi evaporado no rotavapor à temperatura ambiente. Após secagem o resíduo foi recolhido em 5 ml de BHT 100 mg L⁻¹ e o pH da mistura acertado a 3 com HCl 1M. A mistura obtida foi posteriormente extraída com éter etílico (duas vezes), obtendo-se uma fase orgânica e uma fase aquosa. A fase orgânica foi então recolhida, evaporada e reconstituída em 400 µL de metanol e injectada no aparelho HPLC-DAD.

As condições de análise usadas foram: coluna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈; Fase Móvel - Água + 2,5% MeOH + 0,5% ácido fórmico (A) e MeOH (B); gradiente utilizado - 0 min., 80% A, 5 min., 70% A, 8 min., 60% A, 11 min., 50% A, 17 min., 25% A, 22 min., 10% A; fluxo - 1 mL min⁻¹; volume de injeção - 20 µL; detecção UV a 254 nm. Tempo final de análise = 24 min. Cada amostra foi injectada 2 vezes.

Para a extracção de padrões o material vegetal foi substituído por 500µL de solução padrão de AIA e AIB (320 ng µL⁻¹). Foram realizados 3 ensaios de extracção, quer sobre padrões quer sobre amostras vegetais dopadas com uma concentração de 400 ng µL⁻¹.

Para construir a recta de calibração foram utilizadas seis concentrações diferentes (quatro réplicas para cada) de AIA e AIB: 10; 20; 30; 40; 50 e 60 ng µL⁻¹. Cada solução foi injectada três vezes.

As condições cromatográficas do LC-ESI-MS foram idênticas às descritas para o HPLC-DAD. O aparelho usado foi um LCQ Advantage ThermoFinnigan equipado com uma fonte ESI e um detector de massa "ion trap". As condições do ESI-MS foram as

seguintes: ESI operado no modo positivo, temperatura do capilar, 350°C; voltagem da fonte, 4.5 kV; corrente da fonte, 40µA; voltagem do capilar, 5V, varrimento, m/z de 200-800.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Actividade enzimática de polifenoloxidasas

O pH óptimo para a determinação da actividade enzimática das polifenoloxidasas em tecidos de oliveira foi de 5,5. O estudo do efeito da temperatura mostrou que a actividade enzimática máxima da polifenoloxidase na presença de 4-metilcatecol foi de 40 °C (Figura 1). A utilização de temperaturas abaixo deste valor conduziu à diminuição da actividade da enzima enquanto temperaturas superiores diminuíram a sua actividade, provavelmente devido à desnaturação da enzima.

Os valores de K_M obtidos na presença de 4-metilcatecol foram: 2,60 e 3,48 mM com o método de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk, respectivamente. O valor de K_M é um parâmetro característico das enzimas e é importante para a determinação da concentração do substrato no ensaio enzimático.

A actividade específica ($U \times \text{min}^{-1} \mu\text{g}$ proteína⁻¹) nas folhas e ramos do ano da variedade 'Cobrançosa' versus 'Galega vulgar' é apresentada nas figuras 2 e 3.

Separação, identificação e quantificação das auxinas AIA e AIB

Na Figura 4 apresenta-se o cromatograma obtido na extracção de uma solução de padrões a 400 ng μL^{-1} . Na Figura 5 é apresentado o cromatograma do extracto de uma amostra vegetal dopada com 400 ng μl^{-1} de AIA e AIB. A identificação do AIA e AIB foi realizada com base em

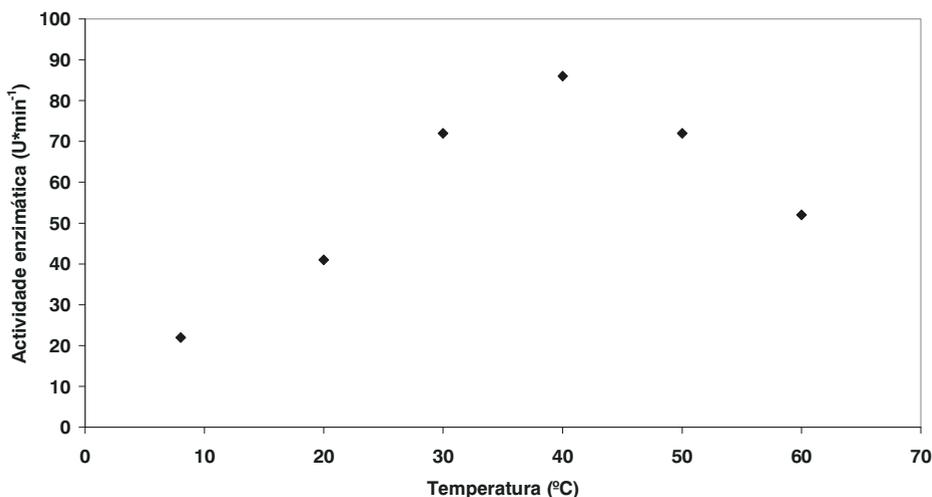


Figura 1 – Actividade enzimática ($U \times \text{min}^{-1}$) versus temperatura (°C).

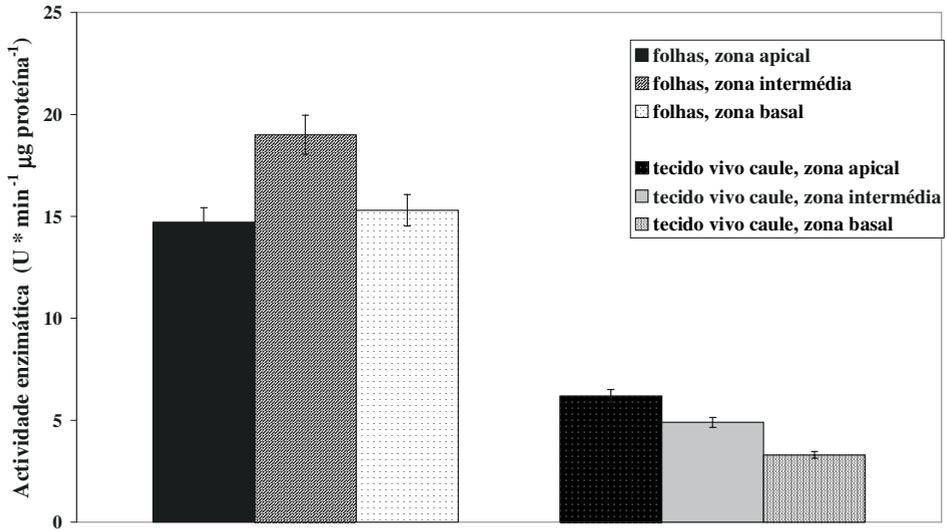


Figura 2 - Actividade específica (U × min⁻¹ μg proteína⁻¹) nas folhas e ramos do ano da variedade 'Cobrançosa'.

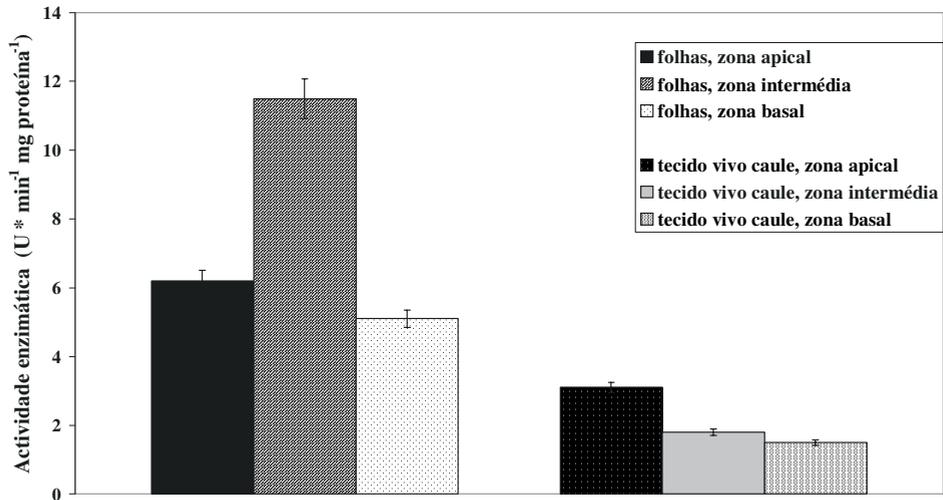


Figura 3 - Actividade específica (U × min⁻¹ μg proteína⁻¹) nas folhas e ramos do ano da variedade 'Galega vulgar'.

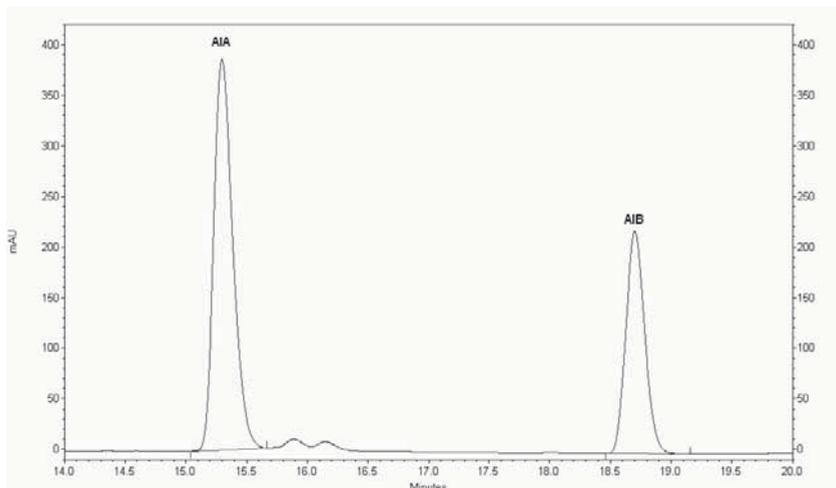


Figura 4 – Cromatograma obtido na extração de uma solução de padrões a $400 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ de AIA e AIB.

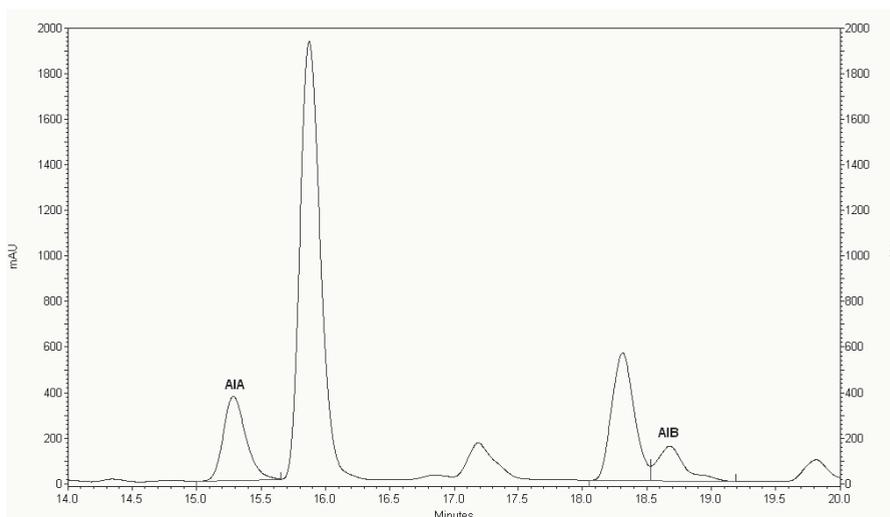


Figura 5 – Cromatograma obtido em amostras vegetais dopadas com $400 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ de AIA e AIB ao fim de 3 horas de extração.

estudos de co-eluição e no espectro de massa obtido por LC-ESI-MS. O AIB apresenta o pico $m/Z=204$, correspondente ao íon de massa molecular $[M+H]^+$ e o pico $m/Z=186$ que corresponde a $[M-H_2O+H]^+$. O AIA apresenta um pico

$m/Z=176$ correspondente ao íon de massa molecular $[M+H]^+$.

As taxas de recuperação obtidas para a extração de padrões são apresentadas no Quadro 1.

Da observação do Quadro 1, podemos concluir que o método de extracção desenvolvido apresentou boas taxas de recuperação para os analitos (AIA e AIB), podendo desta forma ser utilizado para o doseamento destes compostos em tecidos vegetais de oliveira.

QUADRO 1 - Taxas de recuperação (%) obtidas para a extracção de padrões a 400 ng μL^{-1}

	Amostra I	Amostra II	Amostra III
AIA	60.2	59.6	61.8
AIB	59.5	61.6	55.2

Foram efectuados estudos para otimizar o tempo de extracção das amostras vegetais, sendo os resultados apresentados no Quadro 2. Os valores apresentados são a média de três réplicas de amostras vegetais dopadas a 400 ng μL^{-1} .

Nos ensaios de extracção observaram-se diferenças significativas ($P < 0.05$, ANOVA factor único) para o AIA, nos vários tempos de extracção estudados (Quadro 2). Não foram no entanto encontradas diferenças significativas no estudo referente à extracção do AIB. O tempo de extracção considerado óptimo foi de 3 horas.

Em seguida foram efectuados ensaios para determinar taxas de recuperação dos analitos, ao fim de 3 horas de extracção, em amostras de oliveira dopadas com 400 ng μL^{-1} (Quadro 3).

Os valores apresentados para a concentração endógena são a média de três réplicas de amostras vegetais não dopadas. O cálculo da concentração endógena nos tecidos de oli-

veira foi efectuado recorrendo à recta de calibração para o AIA: $Y = 66977X$, ($R^2 = 0.9999$).

Os resultados obtidos neste estudo permitiram mostrar que a actividade enzimática das polifenoloxidasas nas folhas de oliveira foi aproximadamente três vezes mais alta do que a encontrada em tecidos de ramos do ano. Verificou-se ainda que, nestes ramos, a actividade das polifenoloxidasas diminuiu da zona apical para a zona basal dos mesmos. Níveis de actividade enzimática mais elevados nas zonas de produção de auxinas, como são os gomos e folhas jovens, já tinham sido observados por Szecskó *et al.* (2004), trabalhando com estacas lenhosas de ameixeira. Uma relação entre a actividade das polifenoloxidasas e o enraizamento adventício é referida por Gur *et al.* (1988). Estes autores observaram em porta-enxertos de macieira, que as diferenças na capacidade de enraizamento de estacas lenhosas, estavam directamente relacionadas com os níveis endógenos de floridzina, os quais, por sua vez, tinham uma relação directa com o nível de actividade das polifenoloxidasas. A apoiar esta interacção entre os níveis de actividade das polifenoloxidasas e o potencial de enraizamento, estão os valores por nós obtidos para as duas cultivares em estudo, com os níveis mais elevados da actividade das polifenoloxidasas a serem detectados na cultivar 'Cobrançosa', onde a formação de raízes adventícias ocorre naturalmente com maior facilidade. Estes resultados necessitam no entanto de posterior confirmação.

QUADRO 2 - Área dos picos (média \pm desvio padrão) de AIA e AIB em função dos diferentes tempos de extracção

	1h	3h	5h
AIA	1897028 \pm 711220 ^{a*}	25180198 \pm 951475 ^{b*}	21148917.7 \pm 3287485.1 ^a
AIB	2001140 \pm 169611.6 ^a	2174709 \pm 279338.9 ^a	1988664 \pm 344126.2 ^a

Os valores seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes. ANOVA factor único.* ($P \leq 0.05$).

QUADRO 3 – Concentração endógena de auxinas e taxas de recuperação obtidas em tecidos vegetais de oliveira dopada com 400 ng μl^{-1}

	Concentração endógena ($\mu\text{g g}^{-1}$)*	Amostra dopada I	Amostra dopada II	Amostra dopada III
AIA	108.7 \pm 14.7	42.0	41.6	47.0
AIB	nd	63.1	62.9	71.1

nd- não detectado; * g^{-1} de material vegetal liofilizado

Relativamente ao doseamento das auxinas em tecidos vegetais, o método de extracção (solvente e tempo de extracção), desenvolvido e optimizado com recurso a padrões, permitiu a separação e quantificação da auxina AIA endógena e a quantificação de AIA e AIB em amostras de oliveira dopada com taxas de recuperação superiores a 40% para o AIA e 60% para o AIB.

AGRADECIMENTOS

Trabalho desenvolvido no âmbito do projecto AGRO 683.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berthon, J. Y., Boyer, N. & Gaspar, T. 1990. Phenols as regulators and markers of root formation by shoots of *Sequoiadendron giganteum* raised in vitro. *Arch. Intern. Physiol. Biochem.*, **98**: 28-36.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Caboni, E., Tonelli, M. G., Lauri, P., Iacovacci, P., Kervers, C., Damiano, C. & Gaspar, T. 1997. Biochemical aspects of almond microcuttings related to in vitro rooting ability. *Biologia Plant.*, **39**: 91-97.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A. & Güner, S. 2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). *Food Chemistry*, **77**: 1-7.
- Das, P., Basak, U. C. & Das, A. B. 1997. Metabolic changes during rooting in pre-grilled stem cuttings and air layers of *Heritiera*. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **38**: 1-4.
- Druege, U., Zerche, K. R. & Ernst, M. 2000. Relationship between nitrogen status, carbohydrate distribution and subsequent rooting of *Chrysanthemum* cuttings as affected by nitrogen supply and cold-storage. *Ann. Bot.*, **85**: 687-701.
- Edson, J. L., David, L., Wenny, R., Kasten, D. R. & Leege-Brusven, A. 1996. propagation of Juniper from shoot tip cuttings. *Tree Plant. Notes*, **47**: 94-99.
- Fett-Neto, A. G., Fett, P. S., Goulart, L. W. V., Pasquali, G., Termignoni, R. R. & Ferreira, A. G. 2001. Distinct effect of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globules*. *Tree Physiol.*, **21**: 457-464.
- Gaspar, T., Kevers, C. & Hausman, J. F. 1997. Indissociable chief factors in the inductive phase of adventitious rooting. In A. Altman & Y. Waisel (eds) *Biology of Root Formation and Development*, pp. 55-63. Plenum Press, New York.
- Greenwood, M. S. & Weir, R. J. 1994. Genetic variation in rooting ability of loblolly pine cuttings: effects of auxin and family on rooting by hypocotyls cuttings. *Tree Physiol.*, **15**: 41-45.
- Gur, A., Gad, A.E. & Haas, E. 1988. Rooting of apple rootstock clones as related

- to phenols and their oxidation. *Acta Hort.*, **227**:160-166.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E. & Davies, J. R. 1990. *Plant Propagation Principle and Practices*. Prentice-Hall International, Eaglewood Cliffs Editions, NJ.
- Mato, M. C., Rua, M. L. & Ferro, E. 1988. Changes in levels of peroxidase and phenolics during root formation in *Vitis* cultured in vitro. *Physiol. Plant.*, **72**: 84-88.
- Mayer, A. M. 1987. Polyphenoloxidases in plant: recent progress. *Phytochemistry*, **26**: 11-20.
- Mori, Y., Takeshi, T. & Koshiha, T. 2005. Vigorous synthesis of indole-3-acetic acid in the apical very tip lead to a constant basipetal flow of the hormone in maze coleoptiles, *Plant Science*, **168**: 467-473.
- Qaddoury, A. & Amssa, M. 2004. Effect of exogenous indole butyric acid on root formation and peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase activities and phenolic contents in date Palm offshoots. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **45**: 127-131.
- Souza, B. M., Kraus, J. E., Endres, L. & Mercier, H. 2003. Relationships between endogenous hormonal levels and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. *Plant Physiol. And Biochem.*, **41**: 733-739.
- Szecsó, V., Hrotkó, K. & Stefanovits-Bányai, É. 2004. Phenolic Compounds, Bud Dormancy, and Rooting Ability of Plum Hardwood Cuttings. *Acta Hort.*, **658**:679-687.
- Thiman, K. V. & Went, F. W. 1934. On the chemical nature of the root-forming hormone. *Proc. K. Ned. Acad. Wet. Ser. C Biol. Med. Sci.*, **37**: 456-459.
- Weisman, Z., Riov, J. & Epstein, E. 1988. Comparison of movement and metabolism of indole-3-acetic acid in mung bean cuttings. *Physiol. Plant.*, **74**: 556-560.
- Zin-Huang, L., I-Chau, H. & Ya-Wen P. 1996. Effect of naphthaleneacetic acid on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and auxin oxidase in hypocotyls cuttings of soybean during root formation. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **37**: 247-253.