

Revista de Ciências Agrárias, Vol.XXX, nº1, 476-482, 2007

## **Estudo histológico sobre a formação de raízes adventícias em estacas caulinares de oliveira (*Olea europaea* L.).**

### **Adventitious rooting in olive (*Olea europaea* L.) cuttings: A histological evaluation.**

**Peixe, A<sup>1</sup>., Serras, M., Campos, C., Zavattieri, M<sup>a</sup>. A., Dias, M<sup>a</sup>. A. S.**

<sup>1</sup>Universidade de Évora - ICAM, Apartado – 94, 7002-554 Évora, e-mail: [apeixe@uevora.pt](mailto:apeixe@uevora.pt)

#### **RESUMO**

Mesmo quando estimulada pela aplicação exógena de reguladores de crescimento, a capacidade de enraizamento da oliveira, por estacaria semi-lenhosa, encontra-se muito dependente do genótipo utilizado. É assim possível encontrar cultivares como a ‘Cobrançosa’, onde se atingem sem dificuldade taxas de formação de raízes adventícias próximas dos 70%, e cultivares como a “Galega vulgar”, onde só muito esporadicamente se conseguem ultrapassar os 10% de estacas enraizadas.

Este trabalho apresenta os resultados preliminares de um estudo de histologia comparativa entre as cultivares de *Olea europaea* referidas. Procuraram-se diferenças tanto na anatomia do caule como na ontogénese das raízes adventícias, que pudessem ajudar a compreender a diferença de comportamento das cultivares relativamente ao enraizamento por estacaria semi-lenhosa.

Das observações que até agora foi possível efectuar, constatou-se que a anatomia do caule na zona de formação das novas raízes adventícias não difere significativamente, apresentando no entanto qualquer uma das cultivares em estudo um anel de esclerênquima, mais ou menos contínuo, que poderá actuar como uma barreira mecânica ao normal desenvolvimento das raízes.

Relativamente às regiões ontogenicamente activas, as observações efectuadas permitiram constatar que na “Cobrançosa” as novas raízes têm origem nos tecidos situados na proximidade do câmbio vascular, enquanto que na ‘Galega vulgar’, são as células parenquimatosas do recém formado calo de cicatrização que estão na origem dos campos morfogénicos da raiz.

Esta aparente diferença entre os tecidos envolvidos no processo de desdiferenciação e reacquirição do estado meristemático primário, condição essencial para a formação dos novos meristemas radicais, é mais uma peça que, esperamos, possa ajudar a compreender as grandes diferenças observadas na capacidade de enraizamento destas cultivares, por este método de propagação vegetativa.

### **ABSTRACT**

Even when stimulated by application of exogenous growth regulators, the ability for adventitious root formation in olive remains highly genotype dependent.

When semi-hardwood cuttings are used as propagation material, it's possible to find cultivars like ‘Cobrançosa’, where it is easy to achieve 70% of adventitious root formation, and cultivars like ‘Galega vulgar’, where 10% of rooting it is very difficult to exceed.

Preliminary results of a comparative histological study between the above-mentioned *Olea europaea* cultivars, looking for differences both, in the stem anatomy and in tissues involved on adventitious root ontogenesis, are now presented.

Concerning stem anatomy, the results achieved so far, allow to conclude, that no significantly differences were observed between the cultivars, both presenting a sclerenchymal ring, that may act as a mechanical barrier to the adventitious root development.

The observations made of the ontogenically active regions, showed that in ‘Cobrançosa’ the new roots emerge in the vascular cambium or in the adjacent tissues, whereas in ‘Galega vulgar’ the parenchyma cells of the *callus* are the ones involved in the appearing of roots morphogenic fields.

This significant difference observed between the kind of tissues that are involved in the process of cell des-differentiation and reacquisition of a primary meristematic

condition, which is crucial to allow the formation of new root meristems, it's probably highly correlated with the great differences observed in the rooting ability of semi-hardwood cutting of this olive cultivars.

## MATERIAL E MÉTODOS

Estacas semi-lenhosas das cultivares “Galega vulgar” e “Cobrançosa”, provenientes da zona média de ramos do ano, foram recolhidas no campo de pés-mãe dos Viveiros Plansel S.A., apresentando cada uma cerca de 16 cm de comprimento.

A cada estaca foram retiradas as folhas da zona basal, deixando-se apenas os dois pares de folhas da extremidade superior. As bases foram então imersas numa solução de Ácido Indol-3-Butírico (AIB) a 3500 ppm durante 20 segundos. As estacas foram colocadas uma bancada de enraizamento com um substrato de perlite, e uma temperatura basal de 28°C. Foi proporcionada rega por nebulização nas bancadas, com uma frequência de 10 minutos e uma duração de 5 segundos. A temperatura ambiente da estufa, foi, na medida do possível, controlada por um sistema de arrefecimento do tipo aqua-cooling.

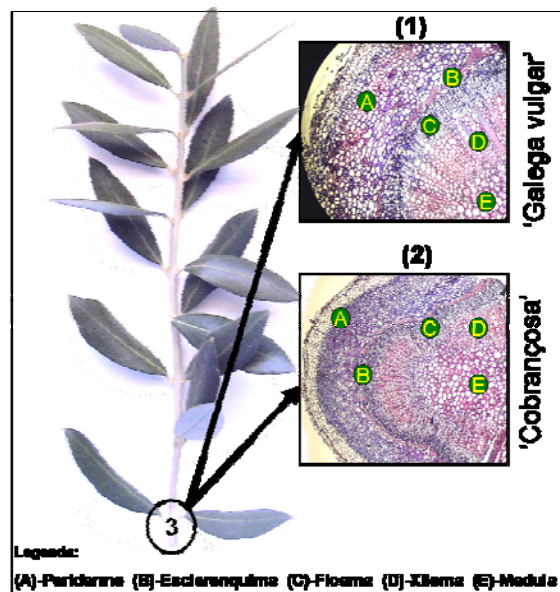
Após a colocação em bancada, amostras da base das estacas foram retiradas semanalmente, desde o dia zero até aos sessenta dias, para os ensaios de histologia. Estas amostras eram constituídas por fragmentos de 1-2mm, que foram fixados numa solução de formol-ácido acético-etanol 70% (1:1:8) de acordo com o protocolo proposto por Johansen (1940), sendo depois lavados com etanol 70% e desidratadas numa série de soluções com uma concentração crescente de butanol. Seguiu-se a impregnação das amostras em parafina liquefeita de baixo ponto de fusão (*Jung-Histowax*) e a confecção dos blocos para secção em micrótopo rotativo (*Micro Tec Cut 4055*). A espessura das secções variou entre 5-10µm e as ténias obtidas, após coloração com Safranina O e Azul de Anilina, foram observadas num microscópio óptico de campo claro Olympus CX40.

Paralelamente a este ensaio, estavam a decorrer trabalhos de micropropagação *in vitro* com a cultivar “Galega vulgar”, tendo-se também retirado destes amostras para os estudos histológicos.

Neste caso as amostras foram recolhidas duas vezes por semana, durante 30 dias, sendo depois preparadas para observação em microscopia de campo claro, seguindo o procedimento anteriormente descrito.

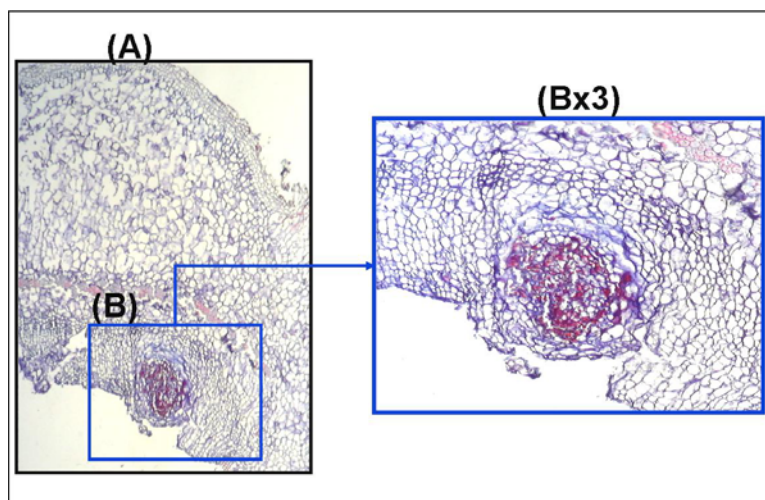
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se pode ver pela Figura 1, os cortes histológicos efectuados ao nível da base das estacas nas duas cultivares de *Olea europaea*, revelaram a inexistência de diferenças significativas quanto à anatomia do caule. É de notar em ambas as cultivares a presença de um anel de esclerênquima com uma continuidade próxima dos 70% na cultivar “Cobrançosa” e dos 60% na cultivar “Galega vulgar”, composto por 2-3 camadas de células bastante lenhificadas, o que é revelado pela a forte reacção com a Safranina O.



**Figura 1** - Aspecto da anatomia do caule em corte transversal, obtido na zona basal ③ de estacas das duas cultivares em estudo. Note-se a presença do anel de esclerênquima ② em ambas as cultivares, sendo de realçar em ambos os casos, que pela sua descontinuidade, dificilmente se poderá considerar como uma barreira mecânica à formação das raízes adventícias. Não se observam outras diferenças anatómicas significativas.

Contrariamente ao que ocorre quanto à uniformidade estrutural do caule, as observações realizadas com o objectivo de determinar quais os tecidos que estão na origem das raízes adventícias, parecem indicar a existência de diferenças entre as duas cultivares em estudo.

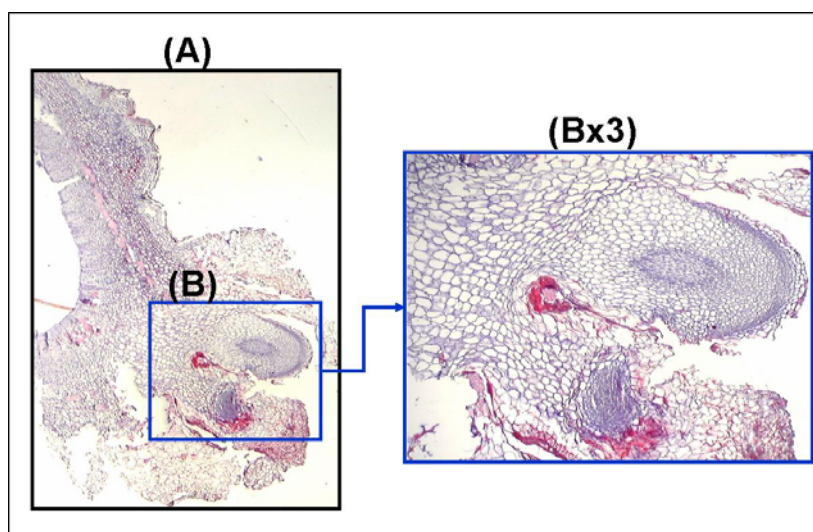


**Figura 2** – Corte transversal da base de uma estaca semi-lenhosa da cultivar “Cobraçosa”, 20 dias após a sua colocação na bancada de enraizamento. Com origem na região cambial, destaca-se a presença de um campo morfogénico da raiz (B), em fase inicial do seu desenvolvimento.

Na cultivar “Cobraçosa”, as observações efectuadas, mostram que as raízes adventícias têm a sua origem no câmbio vascular ou nos tecidos adjacentes (Figura 2-B), característica que é comum às espécies de fácil enraizamento. Já na cultivar ‘Galega vulgar’, os campos morfogénicos radicais surgem no tecido parenquimatoso do *callus* de cicatrização (Fig.3-B), situação que, como refere Hamann (1998) e confirmam Rodrigues e Ono (1996), em ensaios desenvolvidos em *Coffea sp.* e Pérez (2001), em trabalhos realizados com *Leucadendron discolor*, é comum a muitas espécies de difícil enraizamento

Não obstante a grande frequência com que ocorre a formação de tecido caloso em espécies de difícil enraizamento, é ainda assim normalmente aceite que o seu desenvolvimento não está directamente relacionado com a formação das raízes adventícias. Em ‘Galega vulgar’, níveis de correlação superiores a 90%, foram por nós observados para a relação entre as variáveis formação de *calli* de cicatrização/taxa de enraizamento (dados não apresentados). Estas altas correlações entre as duas variáveis verificaram-se tanto no enraizamento de estacaria semi-lenhosa como na

micropropagação, parecendo indicar que a formação de calose basal está aqui intimamente ligada ao enraizamento.

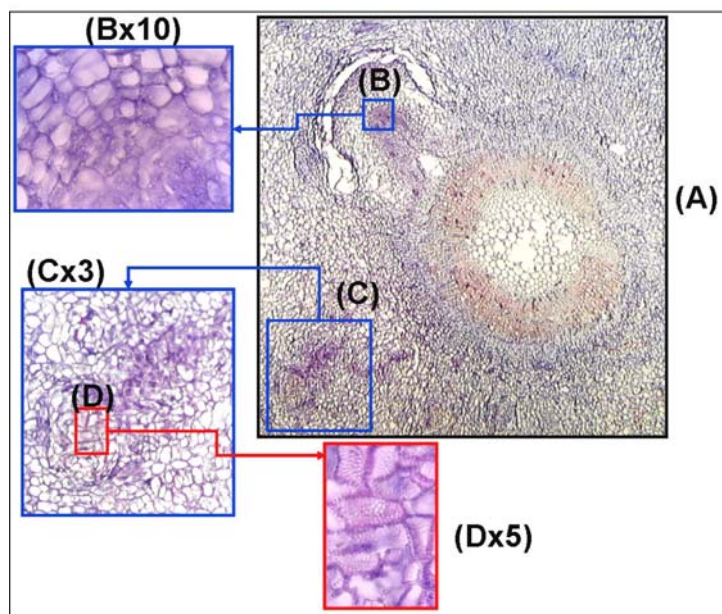


**Figura 3** – Aos 45 dias após a sua colocação em bancada de enraizamento, os campos morfogénicos da raiz começam a ser observáveis em estacas semi-lenhosas da cultivar ‘Galega vulgar’. Note-se neste caso, a origem destas estruturas no tecido parenquimatoso do *callus* de cicatrização (B).

A comprovar o que acabamos de referir estão os cortes histológicos realizados em material vegetal submetido a processos de cultura *in vitro*. Tal como aconteceu com a estacaria semi-lenhosa, também aqui se verifica que os campos morfogénicos surgem na zona do *callus* (Fig.4-B,C). Ainda pela observação da figura 4, podemos ver que neste caso não é identificável o anel de esclerênquima que caracterizava a anatomia do caule nas estacas semi-lenhosas. A esta situação não será alheio o facto de se estar a trabalhar com rebentos herbáceos e não semi-lenhosos. Saliente-se que, em ramos do ano, apenas nos foi possível constatar a formação do anel de esclerênquima ao nível do 3º entre-nó contado a partir do ápice.

Do trabalho realizado, e ressaltando o facto de a cultivar ‘Cobraçosa’ carecer de um maior número de observações, parece ser possível concluir que a maior ou menor dificuldade na formação de raízes adventícias nestas duas cultivares de oliveira, não é directamente afectada pela existência de uma barreira mecânica devida à existência de um anel de esclerênquima, mas antes pela diferente localização das zonas

ontogenicamente activas e pela maior ou menor dificuldade com que as novas raízes se ligam aos feixes vasculares.



**Figura 4** – Corte transversal num explante da cultivar ‘Galega vulgar’ 20 dias após a sua passagem para meio de enraizamento *in vitro*. Note-se em (A) a ausência do anel de esclerênquima. Observam-se vários campos morfogénicos radicais (B–C). São visíveis na ampliação de (B), células com citoplasma denso e núcleos em posição central, característicos das regiões meristemáticas. Na ampliação de (D), observam-se traqueídeos de xilema, característicos do enraizamento a partir do tecido caloso.

Quanto ao primeiro aspecto, o facto de em ‘Galega vulgar’ os campos morfogénicos da raiz se localizarem no tecido parenquimatoso do *callus*, pode estar na origem da dificuldade desta cultivar em enraizar, pois é compreensível que estas células tenham mais dificuldade em se desdiferenciar e posteriormente readquirir as características de células meristemáticas primárias, do que as células meristemáticas cambiais em ‘Cobrançosa’. Quanto à vascularização, embora não existam ainda elementos suficientes para comparar as duas cultivares em estudo, deve salientar-se em ‘Galega vulgar’ a presença traqueídeos xilémicos (Fig. 4-D), estruturas que segundo White (1986 citado por Pérez, 2001), são características do processo de vascularização em espécies de difícil enraizamento.

## CONCLUSÕES

Os resultados apresentados, ainda que preliminares, parecem indicar que a presença de um anel de esclerênquima, nas duas cultivares de oliveira analisadas, devido à sua descontinuidade, não será um factor determinante na explicação da dificuldade de enraizamento da ‘Galega vulgar’.

Já as diferenças ao nível da localização dos campos morfogénicos da raiz entre “Galega vulgar” e “Cobrançosa”, bastante evidentes nas observações efectuadas, poderão ser uma explicação para este facto. A apoiar esta hipótese encontram-se diversos estudos realizados em outras espécies vegetais, indicando que as plantas que iniciam o processo de enraizamento no tecido parenquimatoso do *callus* não apresentam um grande sucesso na formação de raízes adventícias. Saliente-se no entanto que este estudo de histologia comparativa está integrado num estudo multidisciplinar onde paralelamente estão a ser realizados ensaios tendo em vista quantificar a variação endógena de reguladores de crescimento, nestas duas cultivares, tanto ao longo do ano em plantas instaladas no campo, como em estacas semi-lenhosas, durante o processo de enraizamento. Uma análise global dos resultados, conduzirá certamente a resultados mais conclusivos.

## AGRADECIMENTOS

Trabalho desenvolvido no âmbito do projecto AGRO 683

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hamann, A. (1998). Adventitious root formation in cuttings of loblolly pine (*Pinus taeda* L.): developmental sequence and effects of maturation. *Trees*, 12: 175-180.
- Johansen, D.A. (1940). *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York.



Lovell, P.H. and White, J. (1986). Anatomical changes during adventitious root formation. In: New root formation in plants and cuttings (Jackson M.B., ed.), Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht. P.p.:111-140.

Pereira, M. (2003). Propagação via estacas apicais, caracterização morfológica e molecular de Jabuticabeiras (*Myrciaria* spp). Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Brasil.

Pérez-Francés, J.F., Melián-Capote, M.N., Martín-Pérez, R., Rodríguez-Pérez, J.A. (2001). An anatomical study of adventitious root development in wounded cuttings of *Leucadendron discolor* and *Leucadendron* "Safari Sunset" (Proteaceae). *Acta Horticulturae*, 545, 191-194.