

## ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DA BASE DE ESTACAS DE SOBREIRO (*Quercus suber* L.) EM ENRAIZAMENTO, APÓS ESCURECIMENTO E AIB

Ribeiro M.M.\*<sup>1</sup>, Amâncio S.<sup>2</sup>, Quilhó T.<sup>3</sup>, Graça J.<sup>3</sup>, Rodrigues J.<sup>3</sup>, Mata I.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Depto de Silvicultura e Recursos Naturais. Escola Superior Agrária de Castelo Branco, 6000 Castelo Branco.

<sup>2</sup>Depto de Botânica e Engenharia Biológica. Instituto Superior de Agronomia. 1300 Lisboa. <sup>3</sup>Depto de Engenharia Florestal. Instituto Superior de Agronomia. 1300 Lisboa. <sup>4</sup>Delegação Florestal da Beira Interior. Instituto Florestal. 6300 Guarda.

### Resumo

Estacas em enraizamento, retiradas de jovens plantas de sobreiro com 7 meses, foram utilizadas na recolha de amostras para acompanhamento anatomo-histológico das modificações estruturais da sua base. As plantas-mãe foram submetidas durante um mês a um pré-tratamento de escurecimento, que consistiu no envolvimento da parte do caule correspondente à futura base da estaca por uma banda preta. Em metade das plantas sujeitas ao escurecimento aplicou-se auxina (AIB em pó, na concentração de 0,5%) antes da colocação da banda preta. Para a montagem do ensaio de enraizamento, as estacas foram preparadas com cerca de 7 cm e, em cada grupo dos pré-tratamentos prévios das plantas mãe (só escurecimento ou escurecimento e AIB), metade foram tratadas com AIB na mesma formulação e dosagem. Realizaram-se seis colheitas de material (base das estacas em enraizamento), ao longo do mês que se seguiu ao início do ensaio, para posterior observação de cortes histológicos.

No dia 0 observaram-se diferenças em relação à testemunha (não submetida a escurecimento), especialmente ao nível da periderme e do xilema. Até ao dia 20 as diferenças estruturais das estacas submetidas ao tratamento prévio de escurecimento foram-se acentuando, com alteração da disposição normal dos tecidos e aparecimento, por vezes abundante, de *callus*. Outra alteração ocorreu ao nível do anel de fibras perivasculares que rodeia o floema, que começou a evidenciar rupturas. No tratamento que incluía o escurecimento e a aplicação de AIB na banda preta surgiram, a partir do dia 3, descontinuidades nesse anel que se acentuaram ao longo do tempo, até que a partir do dia 14 essa estrutura praticamente deixou de existir. A partir desse dia e especialmente no dia 20, observou-se uma grande proliferação das células de floema e córtex, em particular as células parenquimatosas e ainda alteração ao nível do câmbio que deixou de ser nítido e único. A aplicação de AIB à base da estaca antes de esta ser posta a enraizar não conduziu a diferenças tão evidentes como o tratamento de escurecimento. Para todos os tratamentos efectuados as modificações surgiram primeiro na zona do nó e só depois na zona do entrenó.

**Palavras-chave:** Propagação vegetativa, enraizamento, estacas, anatomia, sobreiro, *Quercus suber* L.

**Abreviaturas:** AIB - ácido indolbutírico, *Banda+AIB* - Tratamento de escurecimento com aplicação de 0,5% de AIB na banda preta, *Com Banda* - Tratamento de escurecimento sem aplicação de 0,5% de AIB na banda preta, *Sem Banda* - Tratamento de escurecimento sem aplicação da banda preta.

### **Introdução**

O sobreiro é uma espécie de acentuada importância em Portugal pois não só ocupa 21% da área florestal do país (DGF, 1993), como a produção anual de cortiça representa mais de 55% do total produzido no mundo (DGF, 1990). Actualmente, o principal objectivo do melhoramento genético do sobreiro continua a ser o aumento da produção da cortiça, em quantidade e qualidade. Natividade (1934) refere que: *...a simples escolha para reprodução, de landes provenientes de sobreiros produtores de boa cortiça, não oferece qualquer garantia de êxito, antes se pode considerar um trabalho estéril*. Esse facto deve-se à intrínseca alogamia e consequente heterozigocidade do sobreiro, que pode conduzir a uma grande diversidade da descendência. A obtenção de plantas boas produtoras de cortiça para arborização constitui o objectivo primordial da cultura do sobreiro. No entanto, as técnicas de propagação vegetativa aplicadas a esta espécie, nomeadamente quando se trata de exemplares adultos deverão ser optimizadas.

No presente trabalho pretendeu-se observar a evolução anatómica e histológica da base das estacas em enraizamento, ao longo de 20 dias após pré-tratamentos de escurecimento. Doud & Carlson (1977) em ramos estiolados de macieira observaram um menor grau de esclerificação e uma maior capacidade de enraizamento, do que os ramos que cresceram à luz. Convém referir a afirmação de Beakbane (1961) segundo a qual um anel contínuo de fibras perivasculares pode constituir uma barreira ao desenvolvimento das raízes. Num estudo anatómico efectuado com *Quercus robur* L. *in vitro*, San-José *et al.* (1992) demonstraram que os primórdios radiculares se formam, geralmente, ao nível deste anel, aproveitando as suas descontinuidades. Outros ensaios feitos com espécies lenhosas sugerem que as baixas percentagens de enraizamento podem estar associadas a barreiras mecânicas, embora não seja de excluir que as dificuldades de enraizamento devam estar associadas em primeiro lugar, às condições fisiológicas e genéticas que induzem a iniciação dos primórdios (Hartmann & Kester, 1983; Lovell & White, 1986; Fjell, 1987). Alguns investigadores afirmaram que este tipo de modificações anatómicas, especialmente a proliferação de células de parênquima, são necessárias para que se possam iniciar os primórdios radiculares (Blazich & Heuser, 1979). Mackenzie *et al.* (1986) referiram que o aparecimento de alterações profundas e de formação de *callus* na estaca parece ser um requisito para a formação de raízes e observaram a regeneração da região cambial antes do aparecimento das células iniciais dos primórdios radiculares.

### **Material e métodos**

As plantas-mãe foram submetidas durante um mês a um pré-tratamento de **escurecimento** conhecida por *blanching* (Maynard & Bassuk, 1988), que consiste no envolvimento da parte do caule que será a futura base da estaca por uma banda preta. Neste caso foi utilizada uma fita de PVC, com 19 mm de largura. Antes da colocação da fita e no pré-tratamento que incluiu a aplicação de AIB (0,5%), o local do caule escolhido para a futura base da estaca foi devidamente pincelado com o regulador de crescimento.

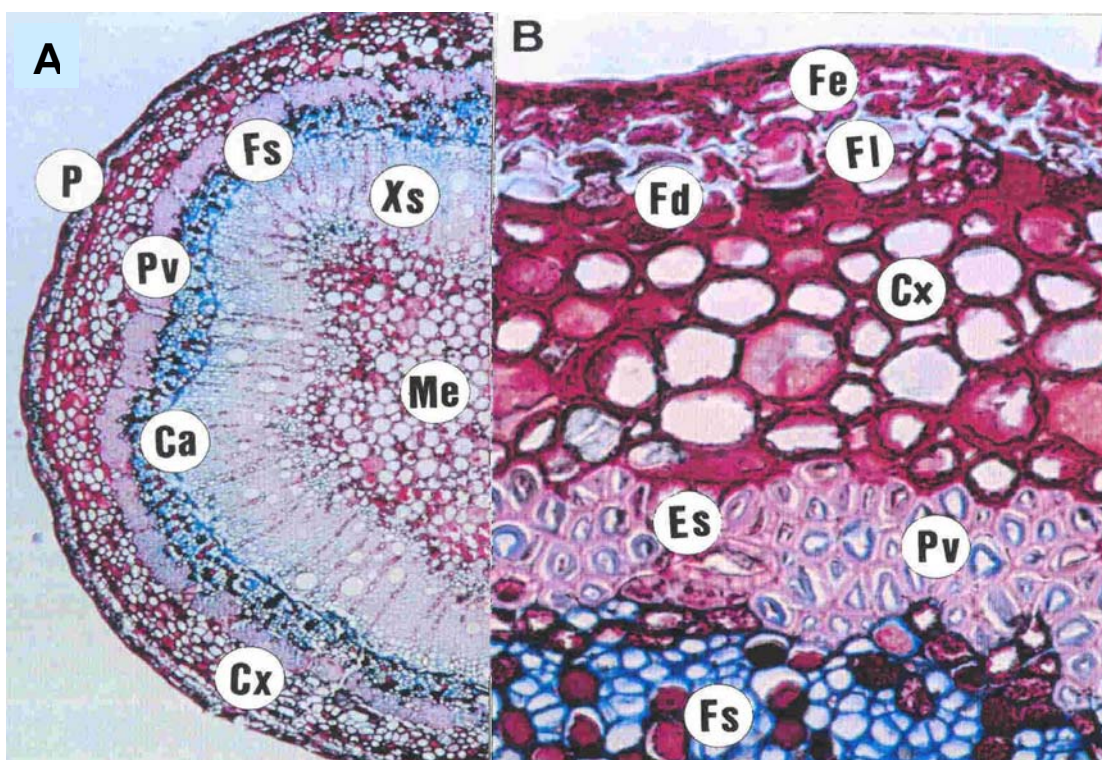
Após o escurecimento, as estacas com cerca de 7 cm foram sujeitas a um corte na base, em bisel, tendo ficado cada uma com pelo menos dois pares de folhas e imersas na solução anti-fúngica. O tratamento com AIB a 0,5% em pó à base da estacas foi feita a metade das estacas de cada pré-tratamento das plantas-mãe. Como suporte do enraizamento foi utilizado um saco denominado *Melfert* com 400 cm<sup>3</sup> de substrato, constituído por uma mistura de perlite e turfa (3:1 v/v).

Ao longo do período de enraizamento foram realizadas seis colheitas de material ao longo (0, 3, 6, 10, 14 e 20 dias). Recolheu-se o centímetro basal de cada estaca que foi lavado em água destilada e dividido em duas amostras de 5 mm. As amostras foram fixadas em solução de Navashin's modificada (Jensen, 1962) durante pelo menos 24 horas e foram lavadas em água durante o mesmo período de tempo. Em seguida foram incluídas em soluções de polietilenoglicol 1500 D.P., de concentração crescente: a 20%, durante 24 horas a 60°C, depois por duas vezes a 100%, de 12 horas cada. Os cortes, de 10 µm de espessura, foram obtidos com um micrótomo deslizante. Utilizou-se uma fita gomada para manter o corte íntegro e que foi posta em contacto com a superfície a cortar. O conjunto dos cortes aderentes à fita gomada, foram lavados em água para retirar o meio de inclusão, após o que foram colados à lâmina com glicerina gelatinada do Kaizer.

Antes da coloração, retirou-se a fita gomada e passaram-se os cortes em xilol, durante pelo menos 45 minutos. Após secagem ao ar, passaram-se posteriormente por etanol a 100%, durante um minuto, seguido de uma passagem rápida na mesma substância. Os cortes foram depois rehidratados em etanol a 50%, durante um minuto e passagem rápida. Por fim ficaram em água destilada, durante o mesmo tempo, também seguido de passagem rápida, antes de serem imersos numa solução aquosa a 0,5% de Crisoidina/Pironina Y. O tempo óptimo neste corante foi de 6 minutos, passando-se seguidamente por água destilada antes de se efectuar a contra-coloração com uma solução aquosa a 1% de Astra Blau, durante 7 minutos. Os cortes foram novamente desidratados antes da montagem com Euparal verde, efectuando-se as passagens inversas em etanol a 50 e a 100%.

## Resultados

Na Figura 1 podemos observar a estrutura de uma estaca, antes de qualquer pré-tratamento. Na Figura 1-A observa-se a *periderme* (P), uma estrutura com funções de protecção; o *córtex* (Cx) constituído por células parenquimatosas, grandes, deixando entre si espaços intercelulares e contendo algumas delas cristais ou material taninoso.



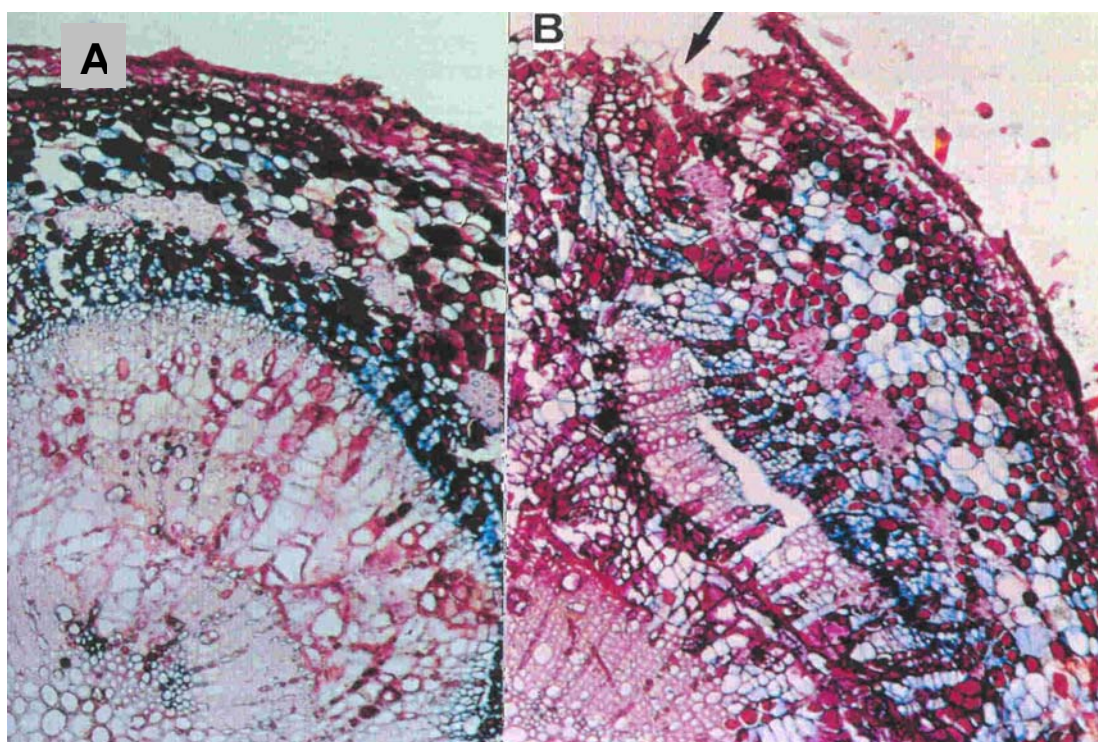
**Fig. 1** - Secção transversal da base de uma estaca que não foi submetida a nenhum tratamento, no dia zero. **(A)** Observe-se a periderme (P), o córtex (Cx), as fibras perivasculares (Pv), o floema secundário (Fs), o câmbio (Ca), o xilema secundário (Xs) e a medula (Me). 62x. **(B)** Em detalhe, o felema (Fe), a felogene (Fl), a feloderme (Fd) e o esclerito (Es). 208x.

Na parte interior do córtex e exterior ao floema secundário podemos observar o anel de *fibras perivasculares* primárias (Pv). No *floema secundário* (Fs), destacam-se células de parênquima nos raios contendo material taninoso. O *câmbio* (Ca) é bem evidente, na transição para o *xilema secundário* (Xs). Neste tecido observam-se com nitidez os vasos largos de Primavera, pois é uma espécie de porosidade em anel, e também os raios unisseriados com algumas células de parênquima. No centro podemos observar a *medula* (Me) que ocupa uma porção considerável do cilindro vascular, constituída de células de parênquima, grandes e arredondadas, também com substâncias taninosas com a aparência de massas granulares. Observe-se na Figura 1-B, um pormenor da microfotografia anterior. Pode notar-se que a periderme é constituída pela *felogene* (Fl), um meristema secundário e pelos tecidos originados por este: a *feloderme* (Fd), em geral com uma só camada de células e o *felema*



*Simpósio de Propagação Vegetativa de Espécies Lenhosas*. Castelo Branco, 18 a 20 Abril de 1996, pp. 170-180.

(Fe), com poucas camadas de células, dispostas em fiadas radiais, compactas e de paredes suberificadas, contendo quantidades consideráveis de material taninoso. De quando em quando aparecem *escleritos* (Es), células diferenciadas a partir de células de parênquima, volumosas e em geral isodiamétricas, em que a deposição da parede secundária faz evidenciar o aparecimento de pontuações. Com esta idade e desenvolvimento do material, o número de escleritos presentes é diminuto.



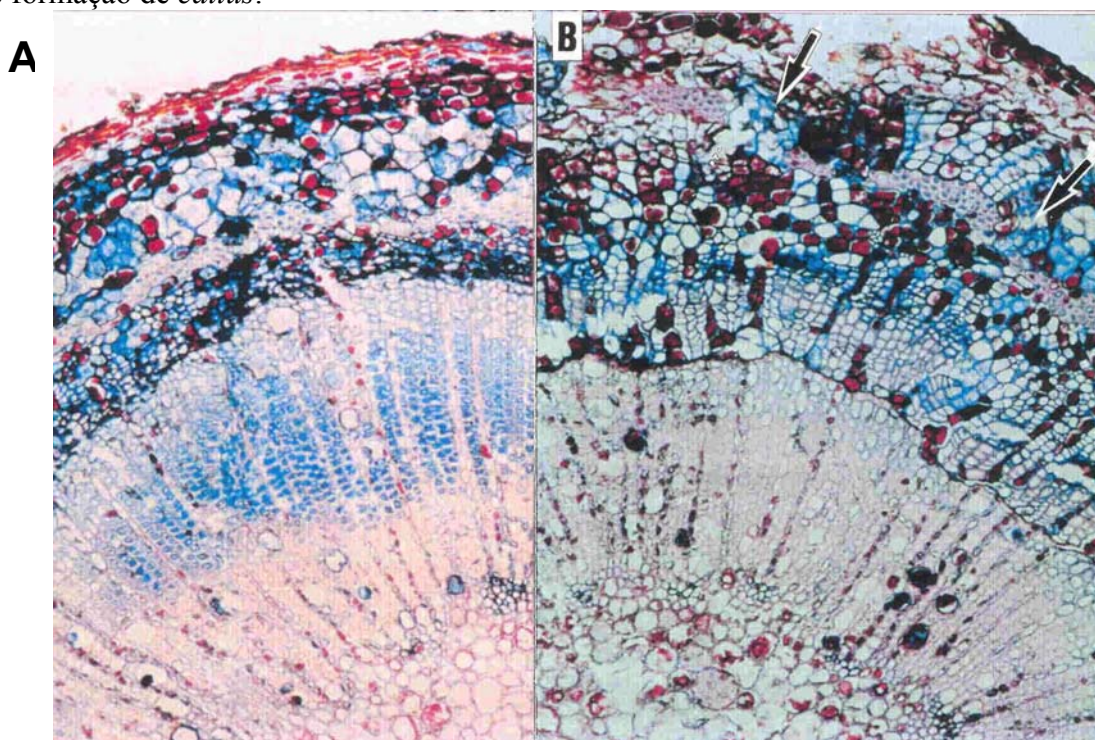
**Fig. 2 - (A)** Secção transversal da base da estaca sujeita ao tratamento *Com Banda*. 104x. **(B)** Secção transversal da base da estaca sujeita ao tratamento *Banda+AIB*. 83x. Amostras recolhidas no dia zero. Observe-se a alteração da estrutura mais acentuada em **(B)**; ver texto.

Na Figura 2-A, podemos observar a estrutura alterada de uma estaca antes de ser posta a enraizar, após o pré-tratamento *Com Banda*. Observam-se alterações a nível das células do xilema, nomeadamente nas dimensões dos seus elementos e poucas interrupções a nível do anel de fibras perivasculares. A Figura 2-B evidencia uma modificação muito mais acentuada da estrutura de uma estaca, no dia zero, após ter sido sujeita ao pré-tratamento *Banda+AIB*. Podemos verificar interrupções muito mais frequentes do anel de fibras perivasculares; alteração ao nível do xilema e do câmbio, que deixa de estar bem definido; proliferação das células do córtex com alguma invasão de taninos e alteração a nível da periderme, com início de formação de *callus* (seta).

Na Figura 3-A, podemos observar a estrutura alterada de uma estaca, submetida ao pré-tratamento *Sem Banda* e ao tratamento com 0,5% de AIB, ao fim de 20 dias de ensaio. A estrutura encontra-se ainda mais ou menos coesa mas com início de alterações a nível do

*Simpósio de Propagação Vegetativa de Espécies Lenhosas*. Castelo Branco, 18 a 20 Abril de 1996, pp. 170-180.

câmbio e também do xilema. O anel de fibras perivasculares é nítido mas mais fino que a testemunha no dia zero (Fig. 1). A Figura 3-B é uma microfotografia de um corte transversal de um estaca sujeita ao pré-tratamento *Com Banda* e ao tratamento com AIB antes de ser posta a enraizar, depois do mesmo tempo. Pode observar-se uma alteração profunda da estrutura, com parte do anel de fibras perivasculares ainda bem evidente, mas com interrupções frequentes (setas); ausência de um câmbio bem definido e periderme com início de formação de *callus*.

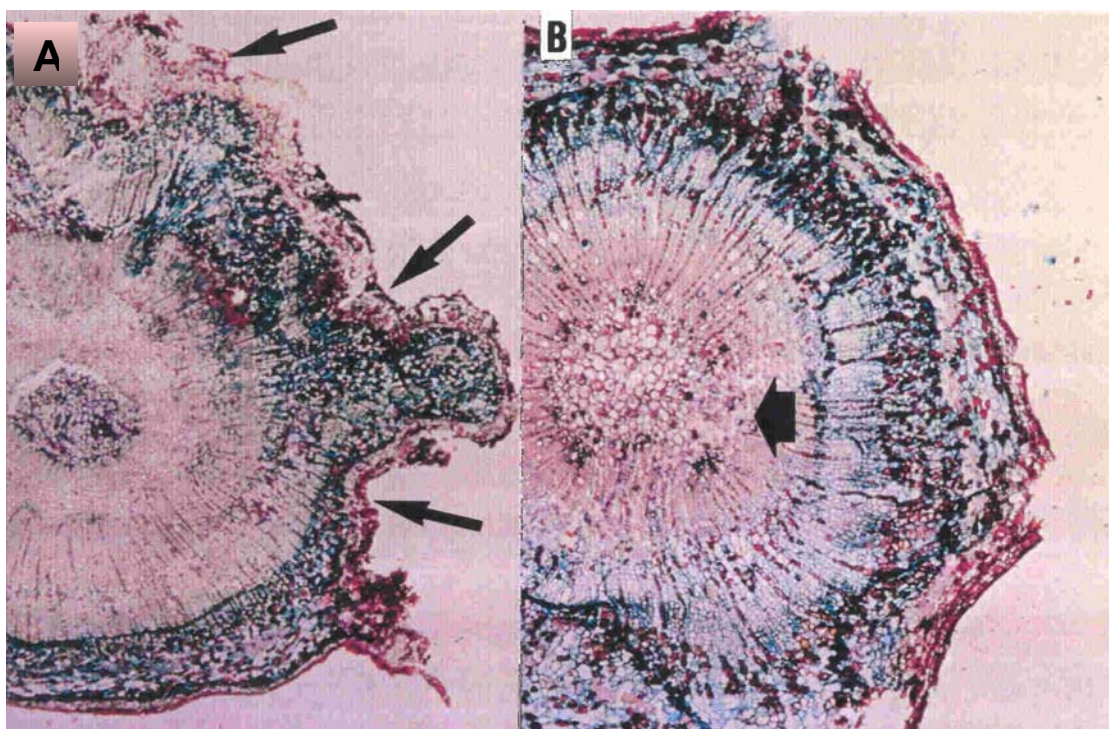


**Fig. 3 - (A)** Secção transversal da base da estaca sujeita ao tratamento *Sem Banda* e 0,5% de AIB. 62x. **(B)** Secção transversal da base da estaca sujeita ao tratamento *Com Banda* e aplicação de 0,5% de AIB, antes da estaca ser posta a enraizar. 104x. Amostras recolhidas no dia 20. Observe-se a alteração da estrutura mais acentuada em **(B)**; ver texto.

Na Figura 4-A, podemos observar a secção transversal de uma estaca submetida ao pré-tratamento *Banda+AIB* sem tratamento com AIB antes da estaca ser posta a enraizar, ao fim de 20 dias na bancada de enraizamento. Observa-se uma alteração profunda da estrutura com formação de *callus* (setas) e com os tecidos sem coerência. A Figura 4-B é uma microfotografia de um corte transversal de um estaca sujeita ao mesmo pré-tratamento de escurecimento e ao tratamento com AIB antes da estaca ser posta a enraizar, depois do mesmo tempo na bancada de enraizamento. A estrutura da estaca perdeu quase por completo o seu padrão normal: observam-se interrupções a nível do anel das fibras perivasculares, xilema apenas lenhificado na zona junto à medula (seta), desaparecimento, em parte, da periderme; proliferação das células meristemáticas do córtex, sem separação nítida em relação ao floema e ausência de um só câmbio bem definido.



Neste ensaio verificaram-se diferenças profundas entre as estacas submetidas aos pré-tratamentos de *Banda+AIB* e *Banda* e as testemunhas, *Sem banda*. As estacas sujeitas aos dois primeiros tratamentos mostram alterações estruturais logo no dia zero do enraizamento. No entanto, as estacas tratadas com *Banda+AIB*, são aquelas onde se observam maiores alterações anatómicas, desde mais cedo, em especial alterações na camada de fibras perivasculares, que se torna mais ténue e descontínua.



**Fig. 4** - Secções transversais da base das estacas sujeitas ao tratamento *Banda+AIB*. **(A)** Sem aplicação de 0,5% de AIB. 41x. **(B)** Com aplicação de 0,5% de AIB. 21x. Amostras recolhidas no dia 20; ver texto.

Observa-se que o início da alteração da estrutura da estaca se dá, em geral, na zona do nó, ou seja, na zona correspondente à formação do gomo adventício e inserção do pecíolo. As alterações estruturais na zona do entrenó aparecem mais tarde, excepto para o tratamento *Banda+AIB* e tratamento com AIB, em que se dão alterações mesmo na zona fora do nó, a partir do dia 6.

Outra evidência é a alteração que se verifica no anel de fibras perivasculares que rodeia o floema. Para o pré-tratamento *Banda+AIB* e tratamento com AIB, verifica-se que a partir do dia 3 surgem discontinuidades nesse anel, que se vão acentuando ao longo do tempo, até que a partir do dia 14 praticamente não se observa essa estrutura. A partir desse dia e especialmente no dia 20, observa-se uma grande proliferação das células de floema e córtex, em particular as células parenquimatosas e ainda alteração ao nível do câmbio que deixa de ser nítido e único (Fig. 4-B).

*Simpósio de Propagação Vegetativa de Espécies Lenhosas*. Castelo Branco, 18 a 20 Abril de 1996, pp. 170-180.

Para o pré-tratamento *Sem Banda* e tratamento com AIB não provoca alterações muito diferentes da sua não aplicação. No entanto, para os pré-tratamentos *Com Banda* e *Banda+AIB*, verifica-se que a aplicação de AIB provoca alterações mais profundas, do que no tratamento anterior. Isto pode significar que o escurecimento torna a estaca mais receptiva ou sensível à aplicação da auxina, em pó, antes da estaca ser posta a enraizar.

### **Discussão**

Através da observação microscópica do material, que se apresenta nas Figuras 1 e 2, verificou-se existirem diferenças profundas nas secções basais das estacas sujeitas aos diferentes pré-tratamentos de escurecimento efectuados previamente ao enraizamento. Vieitez & Vieitez (1974), utilizando o castanheiro, obtiveram percentagens de enraizamento mais elevadas quando para o escurecimento de duração mais prolongada do que o tratamento testemunha (sem escurecimento). Rinallo *et al.* (1987) também usaram o castanheiro e verificaram que as estacas submetidas ao tratamento prévio de escurecimento mostravam primórdios radiculares e uma percentagem de enraizamento mais elevada relativamente às estacas testemunha. Com efeito, a observação microscópica das estacas sujeitas aos diferentes tratamentos revelou alterações mais precoces nas amostras referentes aos tratamentos com escurecimento, com ou sem aplicação de AIB na fita preta, e uma nítida rediferenciação dos tecidos, para além da modificação ao nível do anel de fibras perivasculares.

As características anatómicas verificadas e apresentadas nas Figuras 3-B e 4, são semelhantes às encontradas em rebentos de castanheiro sujeitos à exclusão da luz na sua base (escurecimento), sobretudo a nível da região perifloémica, pois no controle o anel de fibras e escleritos é contínuo enquanto que nos rebentos tratados, o anel perifloémico se apresenta interrompido, quase sem escleritos diferenciados e com abundante produção de células parenquimatosas (Vieitez & Vieitez; 1974; Rinallo *et al.*, 1987). As mesmas alterações foram observadas em estacas de aveleira tratadas com AIB além de um aumento na largura radial do floema (Rodriguez *et al.* 1988).

Para o sobreiro, a antecipação das alterações estruturais quando acompanhada de um aparecimento mais precoce de primórdios radiculares, pode ser um passo fundamental para o aumento da percentagem de enraizamento, já que uma das restrições para o aumento do número de estacas enraizadas é a grande duração do período de enraizamento e a dificuldade em manter as estacas em boa condição fisiológica durante todo o tempo em que as raízes não se formam. Nas secções transversais das estacas observadas não foi possível identificar o aparecimento dos primórdios radiculares. Tal facto pode dever-se a vários factores: i) formação, em geral, de poucas raízes por estaca, ii) duração insuficiente do ensaio com a retirada das últimas amostras ao fim de 20 dias, e iii) baixas percentagens de enraizamento obtidas ao fim de um mês (Ribeiro, 1993). Dos resultados obtidos pode concluir-se que é



*Simpósio de Propagação Vegetativa de Espécies Lenhosas*. Castelo Branco, 18 a 20 Abril de 1996, pp. 170-180.

necessário analisar a anatomia das estacas durante um período mais longo. Vieitez e colaboradores (1980) acompanharam durante 27 dias as alterações anatómicas da base de estacas provenientes de plantas de castanheiro com dois meses, postas a enraizar após tratamento com AIB e ANA. Os autores observaram a formação de primórdios ao fim de 5 dias assim como a diferenciação de novo xilema. Ao fim de 11 dias os primórdios tinham a sua forma bem definida e após 14 dias algumas das raízes tinham emergido e as outras já tinham atingido a zona do córtex. As plantas de castanheiro utilizadas eram três meses mais jovens do que as plantas de sobreiro utilizadas, embora seja possível que existam diferenças mais profundas entre o castanheiro e o sobreiro relativamente ao período de tempo requerido para o início da formação dos primórdios radiculares.

### Referências

- Beakbane A.B. 1961. Structure of the plant stem in relation to adventitious rooting. *Nature*. 192(4806):954-955.
- Blazich F., Heuser C.W. 1979. A histological study of adventitious root initiation in mung bean cuttings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104(1):63-67.
- DGF (Direcção Geral das Florestas, ed.), 1990. A propos du liège ...M.A.P.A. Lisboa.
- DGF (Direcção Geral das Florestas, ed.), 1993. A distribuição da floresta em Portugal Continental. Áreas florestais por distritos. *Estudos e Informação*. 303.
- Doud J.L., Carlson R.F. 1977. Effects of etiolation, stem anatomy and starch reserves on root initiation of layered *Malus* clones. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102(4):487-491.
- Fjell I. 1987. Structure and development of adventitious roots in *Salix caprea* and *S. caprea* x *S. viminalis*. *Nord. J. Bot.* 7(3):311-323.
- Hartmann H.T. Kester D.E. 1983. Plant propagation: principles and practices. 4th ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs.
- Jensen, 1962. *Botanical histochemistry*. W.H.Freeman and Company. S.Francisco.
- Lovell P.H., White J. 1986. Anatomical changes during adventitious root formation. In *New Root Formation in Plants and Cuttings*, M.B. Jackson, ed., pp. 111-140, Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht.
- Mackenzie K.A.D., Howard B.H., Harrison-Murray R.S. 1986. The anatomical relationship between cambial regeneration and root initiation in wounded winter cuttings of apple rootstock M.26. *Ann. Bot.* 58:649-661.
- Maynard B.K., Bassuk N.L. 1988. Etiolation and banding effects on adventitious root formation. In *New root Formation in Plants and Cuttings*, M.B. Jackson, ed., pp.29-46, Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht.
- Natividade J.V. 1934. Cortiças. Contribuição para estudo do melhoramento da qualidade. *Publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas*. 1(1):1-143.
- Ribeiro M.M. 1993. Ensayo de enraizamiento de estaquillas del alcornoque (*Quercus suber* L.) *Congreso Forestal Español*. 2:233-238. Xunta de Galicia. Pontevedra.
- Rinallo R., Gellini R., Fabbri A. 1987. Studies on rhizogenesis in *Castanea sativa* Mill. cuttings. *Adv. Hort. Sci.* 1:27-33.
- Rodriguez A., Albuerne M., Sanchez-Tamés R. 1988. Rooting ability of *Corylus avellana* L.: macromorfological and histological studies. *Scientia Horticulturae*. 35:131-142.
- San-José M.C., Vidal N., Ballester A. 1992. Anatomical and biochemical changes during root formation in oak and apple shoots cultured *in vitro*. *Agronomie*. 12:767-774.

*Simpósio de Propagação Vegetativa de Espécies Lenhosas*. Castelo Branco, 18 a 20 Abril de 1996, pp. 170-180.

Vieitez A.M., Vieitez E. 1974. Efecto de la etiolación en la rizogénesis de *Castanea sativa* Mill. *Anales de Edafología y Agrobiología*. 33:955-956.

Vieitez A.M., Ballester A., Garcia M.T., Vieitez E. 1980. Starch depletion and anatomical changes during the rooting of *Castanea sativa* Mill. cuttings. *Scientia Horticulturae*. 13:261-266.