

# 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

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

---

### 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 de duas 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 esclerên-

quima, 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 um contributo 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

---

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

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 in adventitious root ontogenesis, are now presented.

Concerning stem anatomy, the results achieved so far, allow to conclude that no significant 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 correlated with the great differences observed in the rooting ability of semi-hardwood cutting of this olive cultivars.

## INTRODUÇÃO

A estacaria semi-lenhosa é actualmente a mais utilizada para a propagação da oliveira (*Olea europaea* L.). A propagação tradicional por estacaria lenhosa, com o enraiza-

mento das estacas a fazer-se directamente no local definitivo, apresenta, além de outros inconvenientes, a necessidade de muito material vegetal. A utilização de estacas semi-lenhosas superou esse inconveniente, mas, a promoção do enraizamento exige cuidados especiais como sejam, o tratamento das estacas com reguladores de crescimento e a utilização de estufas de enraizamento com condições capazes de permitir a manutenção de uma película contínua de água nas folhas e o aquecimento da base das estacas, por forma criar as melhores condições à formação do sistema radicular adventício.

Em oliveira, a concentração endógena de auxinas é um factor limitante ao enraizamento (del Rio *et al.*, 1986 citado por Oliveira *et al.*, 2003), sendo normalmente necessária a sua aplicação exógena. O ácido indol-3-butírico é a auxina sintética mais utilizada para induzir a formação de raízes adventícias nesta espécie. Para além de ser condicionado pelos níveis endógenos de auxinas, o enraizamento em oliveira também varia bastante com a cultivar utilizada. Em referências à variedade 'Galega vulgar' Leitão (1986) destaca a sua fraca capacidade de propagação por estaca semi-lenhosa. Pelo contrário encontram-se cultivares como a 'Cobrançosa', onde sem dificuldade são atingidas taxas de formação de raízes adventícias próximas dos 70%. Em cultivares como a "Galega vulgar", só muito esporadicamente se consegue ultrapassar os 10% de estacas enraizadas.

Estas diferenças na capacidade de enraizamento levaram a que, desde a década de cinquenta, alguns autores tenham sugerido que características anatómicas tais como a espessura e continuidade do anel de esclerênquima, sejam parcialmente responsáveis pelo potencial de enraizamento das diferentes cultivares de oliveira (Ciampi e Gellini, 1958; Beakbane, 1961; Sachs *et al.*, 1964;

Qrunfleh *et al.*, 1994). Também diferenças nos níveis endógenos de reguladores de crescimento, em diferentes épocas do ano (Bhella e Roberts, 1975; Blakesley *et al.*, 1991), assim como as suas variações durante o processo de enraizamento (Ságee *et al.*, 1992), têm sido apontadas como capazes de influir directamente na capacidade de enraizamento de diferentes espécies. Estudos histológicos sobre os tecidos directamente envolvidos no processo de diferenciação das raízes adventícias, têm sido desenvolvidos por vários autores (Rodríguez *et al.*, 1988; Skolidis *et al.*, 1990; Biricolti *et al.*, 1994), sem que no entanto seja possível apresentar uma conclusão generalizável a um número alargado de espécies. Deste modo, tal como referem (Troncoso *et al.*, 1999), o processo de enraizamento de variedades recalcitrantes, está longe de estar resolvido, e, um conhecimento das alterações ocorridas a nível histológico e bioquímico durante, poderá fornecer informações importantes para a sua compreensão.

O presente estudo, que advém da observação das diferenças nas taxas de enraizamento entre as cultivares ‘Cobrançosa’ e ‘Galega vulgar’, procura diferenças tanto na anatomia do caule como na ontogénese das raízes adventícias das duas cultivares acima referidas, com o objectivo de ajudar a compreender a diferença de comportamento destas relativamente ao enraizamento por estacaria semi-lenhosa.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se estacas semi-lenhosas das cultivares “Galega vulgar” e “Cobrançosa”, provenientes da zona média de ramos do ano, foram obtidas de lançamentos recolhidos no campo de pés-mãe dos Viveiros Plansel S.A., e apresentando cada uma das estacas 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 das estacas foram então imersas numa solução de Ácido Indol-3-Butírico (AIB) a 3500 ppm durante 20 segundos. As estacas foram colocadas numa 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 seccionamento em micrótomo 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 estudos de micropropagação *in vitro* com a cultivar “Galega vulgar”, tendo-se também retirado destes amostras para os estudos histológicos.

No caso dos estudos de micropropagação *in vitro* 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.

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.

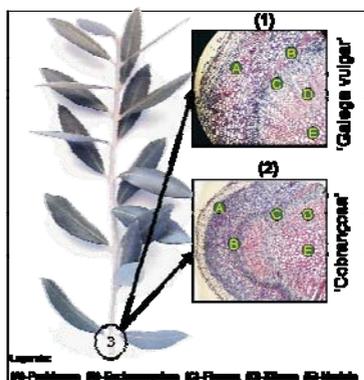
Na cultivar “Cobrançosa”, as observações efectuadas, mostram que as raízes adventícias têm a sua origem no câmbio vascular ou nos tecidos adjacentes (Figura 2-B), característica que é comum às espécies de fácil enraizamento. Já na cultivar ‘Galega vulgar’, os campos morfogénicos radicais surgem no tecido parenquimatoso do *callus* de cicatrização (Figura 3-B), situação que, como refere Hamann (1998) e confirmam Ono *et al.* (1996), em ensaios desenvolvidos em *Coffea sp.*, e Pérez-Francés *et al.*, (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 normalmente aceite que o seu desenvolvimento não está directamente relacionado

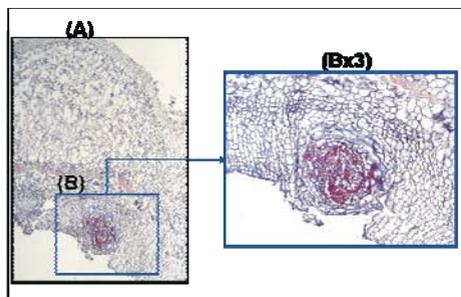
com a formação das raízes adventícias. Em ‘Galega vulgar’, níveis de correlação superiores a 90%, foram por nós observados para a relação entre as variáveis formação de *calli* de cicatrização/taxa de enraizamento (dados não apresentados). Estas altas correlações entre as duas variáveis verificaram-se tanto no enraizamento de estacaria semi-lenhosa como na micropropagação, parecendo indicar que a formação de calose basal estar intimamente ligada ao enraizamento.

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* (Figura 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 ‘Cobrançosa’ carecer de um maior numero de observações, parece ser possível concluir que a maior ou menor dificuldade na formação de raízes adventícias nestas duas cultivares de oliveira não está 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.

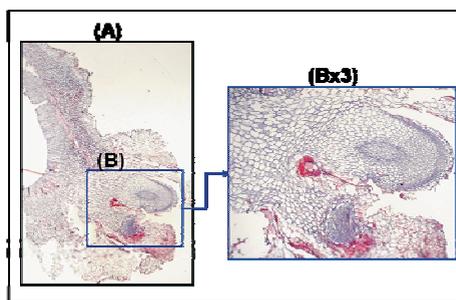


**Figura 1** - Aspecto da anatomia do caule em corte transversal, obtido na zona basal (3) de estacas das duas cultivares em estudo. Note-se a presença do anel de esclerênquima (B) em ambas as cultivares, sendo de realçar em ambos os casos, que pela sua descontinuidade, dificilmente se poderá considerar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

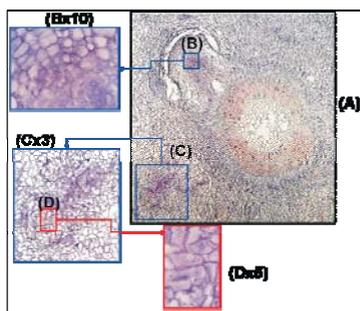


**Figura 2** - Corte transversal da base de uma estaca semi-lenhosa da cultivar “Cobraçosa”, 20 dias após a sua colocação na bancada de enraizamento. Com origem na região cambial, destaca-se a presença de um campo morfogénico da raiz (B), em fase inicial do seu desenvolvimento

Quanto ao primeiro aspecto, o facto de na ‘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 de



**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)



**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

esperar 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 na ‘Galega vulgar’ a presença de traqueídeos xilémicos (Figura 4-D), estruturas que segundo Lovell & White (1986 citado por Pérez-Francés *et al.*, 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 existentes entre a “Galega vulgar” e a “Cobrançosa”, bastante evidentes nas observações efectuadas, poderão ser uma explicação para a diferente capacidade de enraizamento das duas cultivares. 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 (Ono *et al.*, 2006 citado por Pereira 2003). 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

- Beakbane, A.B. 1961. Structure of the plant stem in relation to adventitious rooting. *Nature*, **192(4806)**:954-955. London.
- Bhella H.S. & Roberts, A.N.. 1975. Bud and cambial activity in Douglas-fir as related to stem cutting rootability. *Forest Science*, **21**: 269-275.
- Biricolti, S. & Fabbri., A. 1994. Adventitious rooting in chestnut: An anatomical investigation. *Scientia Horticulturae* Amsterdam, **59(3-4)**: 197-205.
- Blakesley D., Weson, G.D. & Hall. J.F. 1991. The role of endogenous auxin in root initiation. *Plant Growth Regulation*, Dordresh, **10**: 341-353.
- Ciampi, C. & Gellini, R. 1958. *Nuovo G. Bot. Ital.*, **65**, 417
- 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.
- Leitão, F. 1982. *A propagação da Oliveira*. ‘Série Olivicultura’, nº4, Lisboa. Direcção Geral de Planeamento e Agricultura – Ministério da Agricultura, Comércio e Pescas, 1982.
- Lovell, P.H. & White. J. 1986. Anatomical changes during adventitious root formation. In Jackson M.B. (ed) *New root*

- formation in plants and cuttings, pp. 111-140. Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht.
- Ono, E.O., Rodrigues, J.D. & de Pinho, S.Z. 1996. Action of auxins and/or boron, in the process of root formation in cuttings of coffee (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo). *Boron In Agriculture*, Wigginton. **16**, n.2, p. 14-14.
- Oliveira, A.F., Pasqual, M. Chalfun, N.N.J. Regina, M.A. & Rincón, C. del R. 2003. Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob efeito de diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutírico. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras. **27**, n1, pp.117-125.
- Pereira, M. 2003. *Propagação via estacas apicais, caracterização morfológica e molecular de Jaboticabeiras (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.
- Qrunfleh, M.M., Y. Rushdi, T. Musmar & L. Rushdi, 1994. Root formation of the 'Nabali' olives with Uniconazole and Indolebutyric Acid. *Diresat*, **21B**: 71-79.
- Rodríguez, A. & M. Albuerne. 1988. Rooting ability of *Corylus avellana* L.: Macromorphological and histological study. *Scientia Horticulturae* **35**(1-2): 131-142.
- Sachs, R.M., Loreti, F. & De Bie, J. 1964. Plant rooting studies indicate sclerenchyma tissue is not restricting factor. *California Agriculture*, Oakland, **18**, n.9, pp.4-5.
- Sagee, O., M. Raviv, S. Medina, D. Becker, & A. Cosse. 1992. Involvement of rooting factors and free IAA in the rootability of citrus species stem cuttings. *Sci. Hort.* **51**: 187\_195.
- Skolidis, K., W. Hartmann & R. Stosser. 1990. Influence of etiolation on callus and root development of hardwood cuttings of *Prunus cerasifera*. *Erwerbsobstbau*, **32**(6): 163-165.
- Troncoso, A., J. Linan, M. Cantos, M.M. Acebedo, & H.F. Rapoport. 1999. Feasibility and anatomical development of an *in vitro* olive cleft-graft. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **74**: 584-587.