

Acumulação e mobilização do amido em folhas de laranjeira atacada pela "tristeza"

K. SILBERSCHMIDT

do Instituto Biológico de S. Paulo

As laranjeiras atacadas pela "tristeza" caracterizam-se pelas suas folhas pequenas, cloróticas, pouco flexíveis, coriáceas, muitas vezes agrupadas em "tufos". Não raramente, a nervura principal adquire uma coloração amarelo dourada, que às vezes se estende às nervuras secundárias. Frequentemente também encontramos nas plantas doentes folhas levemente abauladas ao longo da nervura principal.

Há muito tempo, são conhecidos, em outras plantas, sintomas das folhas de um tipo semelhante, provocadas por certas doenças de vírus. Encontramos, por exemplo, folhas cloróticas, eretas, pouco flexíveis em plantas de beterraba ou de pessegueiro que sofreram ataques de doenças do grupo de "yellows". Também batatinhas, infectadas com a doença "enrolamento", possuem folhas pouco flexíveis, coriáceas e com a face ventral convexa.

Devido à grande importância econômica desta última doença, já numerosos autores tentaram averiguar, a que causas podem ser atribuídos os sintomas característicos do "enrolamento". QUANJER (14, 1913) conseguiu demonstrar a ocorrência de necroses no floema de batatinhas atacadas pela referida doença e concluiu que estas alterações anatômicas dos vasos crivados causassem uma acumulação anormal de carboidratos, principalmente de amido, nas folhas "enroladas". Tomando como ponto de partida estes resultados, ESMARCH (5, 1919) e NEGER (13, 1919) estudaram o processo de emigração de carboidratos de folhas, experimentalmente escureci-

das, de batatinhas que sofreram um ataque de "enrolamento". Verificou-se no curso destes estudos, que fôlhas de batatinhas "enroladas", mesmo após prolongado escurecimento, contêm, com efeito, mais amido do que fôlhas comparáveis de plantas sadias. Com o emprêgo de métodos mais quantitativos êstes resultados, relativos à doença "enrolamento" da batatinha, foram mais tarde completados por CAMPBELL (3, 1925), THUNG (19, 1928) e BARTON-WRIGHT and MC BAIN (1, 1932) e outros autores.

A acumulação excessiva de amido nas fôlhas foi, aliás, também apontada por vários autores, como por exemplo por ROSA (15, 1927), SHAPOVALOV and JONES (18, 1930) e LI-KHITÉ and DESAI (9, 1935), como sintoma bioquímico de outras doenças de virus, principalmente daquelas, incluídas no grupo dos "yellows".

Já numa época, em que não se sabia ainda que a doença "tristeza" da laranjeira era causada por um virus, achamos interessante iniciar estudos semelhantes àqueles executados por outros autores e referentes à doença "enrolamento da batatinha" — sôbre a mobilização do amido em fôlhas de laranjeira atacada pela "tristeza". O teste de amido aplicado à casca de laranjeira, descrito por BITANCOURT (2, 1944) que depois foi largamente empregado por ROSSETTI (16, 1945) e o teste idealizado por FAWCETT (6, 1945), possibilitam sem dúvida, um trabalho mais rápido, porém, não se relacionam diretamente com a técnica já aplicada em estudos de outras doenças de virus.

Preferimos, por isso, restringir as nossas observações a fôlhas, na esperança que tais estudos além de proporcionar alguns indícios úteis para a diagnose da "tristeza", poderiam contribuir para uma melhor compreensão das alterações fisiológicas, ocasionadas em fôlhas de laranjeira pela "tristeza".

MÉTODO

Fizemos uso do método desenvolvido para tais estudos por J. SACHS no século passado. Adatando-o ao nosso caso, com uma tesoura retiramos de fôlhas de laranjeira afetada

pela "tristeza" e de folhas comparáveis de plantas saudias, por meio de um corte, uma metade longitudinal, deixando as outras metades das folhas, ainda munidas da nervura principal e do pecíolo, prêsas na sua posição natural na árvore. A metade retirada e a escurecida de cada folha recebeu ainda uma marca em forma de cortes no bordo afim de facilitar mais tarde a identificação das folhas. As metades retiradas foram primeiramente submersas durante 2 minutos em água em ebulição e depois submetidas, num aparelho Soxhlet a uma extração de clorofila, por meio de álcool 96%. Depois d'êste tratamento, que levou geralmente 2-3 dias, as folhas apresentaram uma coloração branca ou creme. Estas metades de folhas foram então, retiradas do álcool, lavadas abundantemente com água e submersas durante algumas horas, numa solução aquosa de IIK (3 g de iodo iodeto de potássio, IIK, 100 c. de água destilada, e 1 g. de I). O amido, depositado nas folhas toma, sob a influência d'êste reagente, uma coloração azulada até preta.

As metades de folhas que ficaram prêsas na planta, foram escurecidas por meio de caixinhas de papelão preto, forte, cobertas de papel branco. Estas caixas, abertas num lado, para permitir a introdução da folha, estão no mesmo lado munidas de linguetas que servem de fêcho depois do ajustamento das caixas na árvore. Assim estas metades de folhas, ficaram durante vários dias ligadas à planta, mas protegidas contra a luz. Depois de um prazo variável de acôrdo com a finalidade da experiência, foram retiradas da árvore e submetidas ao mesmo tratamento que se aplicou às metades destacadas no início da experiência. Da diferença entre a coloração das duas metades da mesma folha foram tiradas conclusões a respeito da mobilização do amido durante o período de escurecimento.

A OBTENÇÃO DE RESULTADOS COMPARÁVEIS

Apesar da simplicidade do método, era necessário, para a obtenção de dados comparáveis, remover certas dificuldades que parcialmente se relacionavam com o método empregado e parcialmente com o material disponível de plantas.

Entre as dificuldades inerentes ao próprio método deve-

mos mencionar aqui a facilidade com que as metades, principalmente aquelas das fôlhas doentes, submetidas ao escurecimento, se destacaram espontâneamente durante a experimentação, impossibilitando assim o estudo da mobilização normal de amido. Tentámos vencer esta dificuldade reduzindo o mais possível o prazo de escurecimento das fôlhas, iniciando os ensaios de manhã cedo, quando já o teor inicial das fôlhas em amido é, em geral, menor. Isso também contribui para que se avalie com mais facilidade a diferença, no teor das fôlhas "doentes" e "sadias" em amido, antes do escurecimento. É porque fôlhas contendo uma regular quantidade de amido, se colorem fortemente após o tratamento com IIK, sem que uma maior ou menor abundância em amido se exprima com clareza pela intensidade da coloração. Levamos naturalmente em consideração que não se chega, pelo método por nós empregado, a resultados quantitativos. Dentro dêstes limites, porém, e tendo sempre em mente as possíveis fontes de êrro, apontadas por DENNY (4, 1930, pag. 819) achamos o método adequado para as nossas finalidades.

Entre as dificuldades relacionadas com a escolha do material, queremos mencionar aqui aquelas que resultaram da necessidade, indicada pelos próprios ensaios, de comparar sempre a mobilização de amido em fôlhas da mesma idade, da mesma posição no ramo e na árvore (p.e. fôlhas apicais de uma haste basal), e da mesma exposição ao sol. Não era sempre muito fácil atender a tôdas essas exigências visto que geralmente as plantas doentes devidas à constante perda de fôlhas, são muito menos frondosas do que as sadias, tendo, além disso, as suas fôlhas em posição mais ereta.

Mesmo a escolha das árvores que serviram para êstes estudos comparativos, apresentou algumas dificuldades. Na primeira fase da nossa experimentação efetuamos os ensaios na plantação originalmente destinada a estudos sôbre adubação da Estação Experimental de Citricultura em Limeira. Tôdas as árvores da referida plantação são constituídas por enxertos de laranja doce "baianinha" (*Citrus sinensis* Osbeck) sôbre cavalos de laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) Quando ini-

ciámos as experiências, havia, neste pomar, além de plantas ainda aparentemente saudias, árvores em tôdas as fases de ataque pela "tristeza". Visámos, então, com os nossos ensaios, estabelecer uma comparação entre árvores doentes e outras aparentemente saudias. Só de vez em quando extendemos as nossas observações também a algumas laranjeiras "caipiras" de pé franco, situadas numa outra quadra da Estação Experimental de Limeira.

Na segunda fase do nosso trabalho — i. e. a partir de meados de 1947 — dispúnhamos já no nosso próprio Instituto de material apropriado para êstes ensaios. Já naquele tempo M. MENEGHINI tinha descrito um método (11, 1946) que permitiu a utilização de enxertias de "seedlings" de laranjeira para estudos sôbre a "tristeza" e tinha também conseguido a transmissão experimental da "tristeza" (12, 1946) para estas pequenas enxertias por meio de pulgões virulíferos provavelmente da espécie *Aphis tavaresi*. Já sabíamos, então também pelo trabalho de FAWCETT e WALLACE (7, 1946), que a "tristeza" pode ser transmitida por enxertia. Pudemos, assim, estudar a mobilização de amido em fôlhas destas pequenas enxertias (lar. doce sôbre azêda) experimentalmente infeccionadas com "tristeza" e ao mesmo tempo em enxertias análogas, mas cultivadas à prova de insetos e assim garantidamente saudias.

Finalmente, nesta segunda fase dos nossos estudos, pudemos completar as observações no pomar, plantado pelo Dr. A. A. BITANCOURT no campo experimental do Instituto Biológico (Parque Ibirapuera), onde se acham, lado a lado, laranjeiras de aspeto sadio por estarem enxertadas em cavalos de laranjeira caipira e outras nitidamente afetadas pela tristeza, tendo como cavalo laranjeira azêda. Queremos agradecer aqui ao Snr. CLOVIS DE MORAES PIZA, chefe da Estação Experimental de Limeira, como também ao Dr. A. A. BITANCOURT e Snr. M. MENEGHINI dêste Instituto, as facilidades que me proporcionaram para a utilização de plantas para estas experiências.

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Vamos dar inicialmente um exemplo dos resultados que conseguimos na primeira fase dos nossos estudos nos ensaios efetuados na Estação Experimental de Limeira.

Queremos nos referir em primeiro lugar à experiência de 6/6/46, para a qual escolhemos fôlhas de 3 diferentes árvores. A primeira destas árvores foi por nós considerada sadia já que as suas fôlhas caracterizavam-se por uma coloração verde escura. Apresentava esta árvore poucas pontas mortas. Nesta árvore 7 metades de fôlhas foram marcadas e escurecidas.

A segunda árvore, considerada por nós levemente doente, caracterizava-se por um número regular de pontas mortas e possuía muitas fôlhas pequenas, eretas; estas fôlhas porém não se apresentavam, na sua maioria, com clorose. Nesta árvore estudámos a mobilização do amido em 6 fôlhas. Finalmente incluímos ainda nas observações do mesmo ensaio 7 fôlhas de uma 3.ª árvore, considerada por nós como fortemente atacada pela "tristeza". Esta árvore, que já tinha perdido muita fôlha, carregava as poucas fôlhas restantes em tufos eretos. As fôlhas na sua maioria cloróticas, exibiam um forte esclarecimento da nervura principal.

Por ocasião da retirada da metade "testemunha" do limbo notámos para cada fôlha — além das indicações contidas na tabela 1 —, o comprimento da fôlha, a sua posição no ramo, a sua distância da zona de enxertia e a sua exposição ao sol. Já que não verificámos a existência de uma constante relação entre êstes fatores a velocidade da mobilização do amido, desistimos de reproduzir estas indicações na nossa tabela. Precisamos, porém, esclarecer, que a retirada das metades de fôlhas e o escurecimento das metades restantes foi executada entre meio dia e 3 horas de um dia claro, quente e que o escurecimento foi mantido durante 7 dias. Durante êste período só uma fôlha de cada uma das árvores doentes destacou-se espontaneamente e não foi mais tomada em consideração. A tabela 1 contém as indicações referentes às restantes 18 fôlhas. Esta tabela, como as seguintes, consiste de duas seções que se referem respectivamente às plantas sadias e doentes. As co-

lunas verticais de cada seção trazem indicações sobre número, coloração, idade da fôlha e sobre a intensidade da coloração que cada metade da fôlha apresentou após tratamento com IIK. Na escala por nós empregada xxxxx significam uma côr preta, o que se aplica a um matiz amarelo-claro. Os outros símbolos referem-se a colorações intermediárias. A ocorrência duvidosa ou apenas visível de amido está marcada nas tabelas por ±, uma coloração intermediária entre as classes x e xx por x(x). As indicações da última coluna representam apenas estimativas da diferença entre a coloração das duas metades de uma fôlha, podendo servir como índices aproximados da mobilização do amido durante o período de escurecimento.

TABELA 1
(Experiência de 6-13|6|1946)

Mobilização de amido em fôlhas de plantas doentes e aparentemente sadias de laranjeira doce, enxertada sobre laranjeira azêda, na Estação Experimental de Limeira

do grupo	Planta denominação	N.º da fôlha	coloração da fôlha	idade da fôlha	intensidade da coloração com IIK		provável mo- bilização de amido
					da metade "testemunha" da fôlha	da metade escurecida da fôlha	
sadio	A)	1)	verde-escura	média	xxx	O	xxx
		2)	verde-escura	nova	xxx	O	xxx
		3)	verde-escura	nova	xxxx	xx	xx
		4)	verde-escura	nova	xxx	±	xx
		5)	verde-escura	média	xxx	x	xx
		6)	verde-escura	nova	xxxx	x	xxx
		7)	verde-escura	nova	xxxxx	x(x)	xxx(x)
doente	B) levemente doente	1)	verde-escura	nova	xxxxx	xxxx	x
		2)	clorótica	nova	xxx(x)	±	xxx
		3)	bem clorótica	nova	xx	±	x
		4)	verde-escura	nova	xxx(x)	x	xxx
		5)	verde-escura	nova	xxxxx	xxx	xx
doente	C) bem doente	6)	clor., escl. nerv.	nova	xxxxx	xxxx	x
		7)	clorótica	média	xxxxx	x	xxxx
		8)	clor., escl. nerv.	nova	xxxxx	xxxx	x
		9)	clorótica	nova	xxxxx	xxx	xx
		10)	clorótica	nova	xxxx	xxx(x)	±
		11)	lig. clorótica	nova	xxxxx	xxx(x)	x(x)

Examinando a penúltima coluna de cada seção desta tabela verifica-se, em primeiro lugar, que a mobilização do amido, em folhas de laranjeiras, exige às vezes muito tempo. Encontramos em várias folhas, ainda depois de um escurecimento de 7 dias, grande quantidade de amido. Ao comparar as três árvores, que foram incluídas neste ensaio, podemos verificar, sem dificuldade, que as folhas da planta C (bem doente) continham após o escurecimento ainda mais amido do que as das duas outras plantas. É interessante notar que a planta que se achou na fase inicial do ataque, distingue-se quanto ao seu comportamento apenas pouco da planta considerada sadia. Parece portanto — de acôrdo com o resultado dêste ensaio — que a mobilização do amido nas folhas mostra alterações consideráveis só em plantas que se acham em determinadas fases do desenvolvimento da doença. Se nos restringíssemos às observações ilustradas pelos símbolos da penúltima coluna, poderíamos facilmente chegar à conclusão, que a diferença apontada entre as folhas da planta C (bem doente) e as das outras duas plantas se refere estritamente à velocidade do transporte do amido durante o escurecimento. Apoiar-se-ia esta conclusão simplesmente no fato de conterem as folhas de plantas doentes, após 7 dias de escurecimento, ainda mais amido do que as de laranjeiras sadias. Esta conclusão, porém, seria só justificada, se tivéssemos certeza que as folhas no início da experiência tivessem apresentado o mesmo teor em amido. Um exame da coluna anterior, que se refere à intensidade da coloração das metades “testemunhas” das folhas, demonstra, que com frequência as folhas das plantas doentes já antes do escurecimento reagiram mais fortemente ao tratamento com IIK do que as plantas sadias. Isso pode ser, sem dúvida, a consequência de um retardamento na mobilização de amido em folhas doentes. Mas além disso devemos também admitir a possibilidade de se formar já em condições de iluminação normal mais amido nas folhas de laranjeiras atacadas pela “tristeza” do que em plantas sadias. Não permite a nossa experiência decidir a questão qual dessas causas ou se talvez um conjunto delas seja responsável pelas diferenças por

nós observadas no teor em amido entre fôlhas "sadias" e "doentes". É interessante notar aqui que já CAMPBELL (3, 1925) nos seus estudos sôbre o metabolismo de batatinhas atacadas pelo "enrolamento" levantou esta questão sem decidí-la.

Passando agora a relatar os resultados das demais experiências que executámos nesta primeira fase dos nossos estudos, queremos nos referir apenas a um ensaio anterior, realizado em 17|4|46, também na Estação Experimental de Limeira. Estudámos, na experiência em questão, a mobilização do amido em 5 fôlhas de laranjeira caipira de pé franco em comparação com a de 3 fôlhas de laranjeira doente (baianinha enxertada sôbre azêda), também durante um período de escurecimento de 7 dias. Os resultados concordam largamente com os da experiência já descrita, mostrando, porém, diferenças mais acentuadas entre plantas sadias e doentes do que registámos no ensaio anterior. Ao passo que nas 5 fôlhas da planta sadia após o escurecimento, nem havia mais traços de amido, duas das três fôlhas da planta doente reagiram intensamente com IIK. Parece, porém, que também neste ensaio, já o teor inicial das fôlhas doentes em amido era maior do que o das fôlhas sadias.

Depois de um intervalo de quase um ano, demos início à segunda fase dos nossos estudos observando a mobilização do amido nas fôlhas de pequenas plantas de laranjeira doce (caipira (*Citrus sinensis* Osbeck) enxertadas sôbre laranjeira azêda (*Citrus aurantium* L). Uma parte das plantas, que se encontravam em estufa à prova de insetos, tinha sido povoada, alguns meses antes, com afídios virulíferos. Estas plantas, experimentalmente infectadas, se apresentavam por ocasião da realização das nossas experiências com fôlhas cloróticas, retorcidas, cujas nervuras apresentaram uma coloração amarelo-dourada. As plantas que não tinham sido experimentalmente infectadas com o vírus da "tristeza", conservaram um número maior de fôlhas verdes, bem expandidas. Reunimos, na tabela 2, os resultados das nossas experiências de 28|4 e 5|5|47. A organização desta tabela corresponde à da tabela 1, com a diferença que a tabela 2 contém mais uma coluna indicando

para cada fôlha, o número de dias de escurecimento. O acréscimo desta coluna tornou-se necessário, porque na segunda experiência, que serviu ainda a outras finalidades, as fôlhas sadias ficaram mais tempo cobertas pelas caixas do que as doentes. Em vista do resultado dos nossos ensaios não acreditamos, porém, que esta pequena diferença no período de escurecimento prejudique sèriamente a comparabilidade dos resultados.

TABELA 2

(Experiência de 6/5/1947)

Mobilização de amido em fôlhas de pequenas enxertias de laranjeira doce sôbre azêda, sadias (plantas A-C) ou experimentalmente infecionadas com "tristeza" (plantas (D-F.)

Planta do grupo	denominação	Dias de escurecimento	N.º da fôlha	coloração da fôlha	idade da fôlha	intensidade da coloração com IIK		provável mobilização de amido
						da metade "testemunha" da fôlha	da metade escurecida fôlha	
sadio	A)	8	1)	verde-clara	nova	xxxxx	O	xxxxx
		8	2)	verde-clara	nova	xxxxx	O	xxxxx
	B)	4	3)	verde-escura	nova	xxxx(x)	±	xxxx
	C)	6	4)	verde-escura	média	xxxxx	±	xxxx
doente	D)	7	1)	cl., esc. nerv.	nova	xxxxx	xxxxx	O
	E)	5	2)	escl. nervura	nova	xxxxx	xxx(x)	x
		5	3)	escl. nervura	média	xxxxx !	xxxx	x
	F)	6	4)	cl., esc. nerv	média	xxxxx	xxxx	x

Pode-se verificar nesta tabela que como nas experiências anteriores as fôlhas doentes — em contraste com as sadias — ainda após o escurecimento contêm apreciáveis quantidades

de amido. Esta diferença no teor em amido entre as folhas de plantas sadias e doentes no fim da experiência merece ser destacada porque nestes ensaios ao iniciar o escurecimento não se notou grande diferença na coloração das folhas tratadas por IIK entre os dois grupos. Por outro lado, se nos ensaios realizados no campo sempre existe o perigo de o fato das plantas sadias serem mais frondosas causar um maior sombreamento das suas folhas de sorte que estas receberiam menos luz do que as folhas escassas das plantas doentes, nas experiências relativas às pequenas enxertias, cultivadas na estufa, não se pode falar desta possível fonte de erros. É por isso que atribuímos grande importância à confirmação dos resultados anteriores, obtidos no campo, por estes ensaios efetuados em condições diferentes com plantas muito mais jovens.

Como já antes explicámos, executámos, também nesta segunda fase do nosso trabalho, alguns ensaios em laranjeiras de campo. Escolhemos, para estas experiências, plantas de laranjeira doce (*Citrus sinensis Osbeck*) enxertadas sobre laranjeira azêda (*Citrus aurantium L.*) e fortemente atacadas pela "tristeza", que comparámos com plantas da mesma variedade (*Citrus sinensis Osbeck*), enxertadas sobre laranjeira caipira (*Citrus sinensis Osbeck*) e por isso não apresentando nenhum sintoma desta doença. A primeira experiência desta série foi executada em 21/7/47. Efetuámos a retirada das amostras e o escurecimento das metades restantes das folhas esta vez pela tardinha, a partir das 16 horas e meia. O prazo de escurecimento era, como nas experiências anteriores de campo, de 7 dias. A tabela 3 contém as indicações necessárias para a caracterização das plantas e das folhas deste ensaio.

TABELA 3

(Experiência de 21-28/7/1947)

Mobilização de amido em folhas de laranjeiras sadias, enxertadas sobre laranjeira doce (plantas A e B) e doentes, enxertadas sobre laranjeira azêda (plantas C, D e E) do Campo Experimental (Parque Ibirapuera) do Instituto Biológico

do grupo	Planta denominação	N.º da folha	coloração da folha	idade da folha	intensidade da coloração com IIK		Provável mobilização de amido
					da metade «desempenha» da folha	da metade da escurcida da folha	
sadio	A) pl. grande	1)	verde-escura	média. bem nova	xxx	O	xxx
		2)	verde-clara	média	xxxxx	xxx	xx
		3)	verde-escura		xxx(x)	O	xxx(x)
	B) pl. pequena, 135 cm.	4)	verde-escura	média	xxx	O	xxx
		5)	verde-escura	média	xxx	x(x)	x(x)
		6)	verde-escura	média	xxx	O	xxx
doente	C) Moderadamente doente, pequena, 122 cm, fl. esparsas, a- marelas	1)	verde-amarela	média	xxxx	x(x)	xx(x)
		2)	verde-amarela	média	xxxx	xx	xx
	D) Moderadamente doente pequena, 82 cm, fl. verdes com nervuras amarelas.	3)	verde-amarela	média	xxxx	x(x)	xx(x)
		4)	verde-amarela	nova	xxxx	xxx	x
	E) bem doente 175 cm.	5)	verde-cinza	média	xxx(x)	x	xx(x)
		6)	verde-esmaecida (esc. ner.)	média	xxx	O	xxx

Também neste ensaio as folhas de plantas doentes, após o escurecimento continham ainda nitidamente mais amido do que as de plantas sadias. Ao passo que as folhas "sadias", mantidas 7 dias à prova de luz, 4 deixaram completamente de reagir ainda com IIK, só numa das 6 folhas "doentes" o amido tinha sido inteiramente mobilizado. Esta folha "doente", cujo comportamento diferiu do das demais, pertencia a uma planta que se achava num estado tão adiantado da doença, que possivelmente esta já tinha afetado a sua capacidade de assimilação. Quer nos parecer assim, que para observar grandes diferenças entre plantas sadias e doentes a respeito da mobilização do amido nas folhas, convém escolher laranjeiras que estão nem na fase inicial nem na fase final da doença, mas sim nos estados intermediários de ataque. Também ficou patente nesta experiência, num grau ainda mais acentuado de que nos ensaios anteriores de campo, que já no início da experiência as folhas das plantas atacadas pela "tristeza" se apresentavam muito mais ricas em amido do que as das laranjeiras sadias. Já referimo-nos, por ocasião da explicação da tabela, 1, às várias possíveis interpretações deste fenômeno. — Finalmente queremos ainda chamar a atenção a alguns detalhes, embora talvez de importância secundária. A folha 2 da planta A e 4 da planta B eram mais novas e com consequência disso também mais tenras do que as demais. Estas duas folhas aceitavam o reagente com grande avidez, apresentando um matiz bastante escuro, mesmo depois de submetidas ao escurecimento. Quer nos parecer, por isso, que as folhas novas, para o observador menos avisado, possam aparentar facilmente maior teor em amido do que lhe deve ser em realidade atribuído. Fomos, por esta observação, fortalecidos na opinião de que sempre folhas da mesma idade devem ser comparadas. Um outro detalhe que achamos dever mencionar é o fato de per-

tencerem algumas das folhas que mais amido conservaram durante o escurecimento, como as folhas 2 da planta C e 4 da planta D, a ramos basais. Poderia ser que na proximidade da zona de enxertia se intensifique a acumulação de amido.

O fenômeno entretanto, foi observado, às vezes, também em folhas inseridas em hastes apicais como aconteceu por exemplo com a folha 3 da planta D.

Estas conclusões foram em grande parte, confirmadas pelos resultados de um ensaio que executámos no mesmo pomar em 4-8-47. Também neste ensaio as folhas ficaram escurecidas durante 7 dias. A retirada das amostras, porém, efetuou-se, neste ensaio, já às 15 horas, quer dizer 2 horas antes do que na experiência anterior. Incluímos no ensaio de 4-8-47 6 folhas provenientes de 3 plantas "sadias" (— enxertadas sobre cavalos de laranjeira caipira) e 6 outras pertencentes a 2 plantas doentes (— enxertadas sobre cavalos de laranjeiras azêda). Em 3 pares de folhas seguimos o método anterior, retirando, antes do escurecimento, uma metade longitudinal do limbo sem a nervura principal. Nos três pares restantes de folhas, porém, experimentámos um outro procedimento, retirando antes do escurecimento, por corte transversal, a parte apical da folha, incluindo o respectivo trecho da nervura principal, e deixando coberta pela caixinha de papelão, a parte basal. Tentámos êste processo na expectativa de que o corte, neste caso, interferisse menos na fisiologia normal da folha e que esta estivesse em menor grau sujeita ao perigo do destacamento espontâneo. Sem que tivéssemos observado uma discrepância fundamental entre os resultados obtidos com êstes dois métodos, achamos mais acertado o nosso processo original da escolha de amostras.

Quanto aos resultados dêste ensaio, observámos novamente, que já no início da experiência as folhas "doentes" continham mais amido do que as folhas "sadias". Em consequência do escurecimento, a maioria das folhas "sadias" deixou de apresentar apreciáveis quantidades de amido, ao passo que todas as folhas doentes com uma única excessão que talvez se explique pelo método menos favorável de retirada das amostras, tomaram, após tratamento com IIK, ainda uma coloração bem escura. Esta confirmação dos nossos resultados anteriores merece ser destacada, porque nesta experiência tomámos cuidado especial para a escolha de "pares" de folhas, que em relação à posição no ramo e na planta e à exposição ao sol eram realmente comparáveis. Queremos ainda mencionar que no caso de uma folha doente (— pertencente a uma árvore em adiantado estado de doença) o tratamento com IIK indicou a presença de maior quantidade de amido depois do escurecimento do que no início da experiência. Parece então que neste caso, que é o único entre todos por nós observados, o escurecimento provocou um afluxo de açúcares para a folha em questão. Que êste efeito do escurecimento de folhas isoladas (— não de ápices de brotos —) sobre a translocação dos carboidratos é excepcional, pode ser inferido não só das nossas próprias observações mas ainda das experiências de MASON T. G., MASKEL E. J. & PHILLIS E. (10, 1936, pag. 82), que observaram uma importação de carboidratos em folhas escurecidas de algodão só em plantas com incisões anulares na base do tronco.

Resta apenas esboçar os resultados dos ensaios executados no ano de 1948, ainda no mesmo pomar. Êstes ensaios, que foram iniciados respectivamente em 28-5, 7-6 e 16-6-48, podem se reunir num grupo só, já que em todos êles a retirada das metades — "testemunhas" das folhas e o escurecimento das

metades restantes foi efetuada às 8 horas da manhã, quando as folhas apenas receberam luz difusa e estavam ainda cobertas de orvalho. Visamos esclarecer, com este início matutino das experiências, a influência exercida sobre a mobilização do amido nas folhas, pelo escurecimento natural da noite. Além disso, como já foi exposto na introdução, achamos de bom aivite escolher para o início das observações um estado das folhas, em que elas se caracterizam por um teor relativamente baixo em amido.

No primeiro destes três ensaios, as folhas das plantas doentes destacaram-se durante uma tempestade espontaneamente das árvores. Podem ser, por isto, neste ensaio, avaliados apenas os índices do teor inicial das folhas em amido. Neste particular demonstraram as nossas observações, que mesmo de manhã cedo, 4 das 5 folhas das plantas doentes continham um teor apreciável de amido, ao passo que só uma das 5 folhas de plantas sadias, aliás uma folha muito nova, reagiu fortemente com o corante, indicando as demais a existência somente de ligeiros traços de amido.

Vamos nos referir com maior detalhe ao ensaio de 7-6-48, cujos resultados acham-se reunidos em tabela 4 (veja também fig. 2)

TABELA 4

(Experiência de 7-11/6/1948)

Mobilização de amido em folhas de laranja sadia (A), enxertada sobre laranja doce, e de plantas doentes (B e C), enxertadas sobre laranja azêda, do Campo Experimental Parque Ibirapuera) do Instituto Biológico

Planta	denominação	N.º da folha	coloração da folha	idade da folha	intensidade da coloração com IIK		prova de mobilização de amido
					da metade "testemunha" da folha	da metade escurécida da folha	
sadio	A) sadia	1)	verde-escura	média	xxx	o	xxx
		2)	verde-escura	média	xxx	±	xx
		3)	verde	nova	xxx(x)	±	xxx
		4)	verde-escura	média	xx	o	xx
doente	B) fortemente atacada, 216 cm. de altura, com pouca fôlha	1)	bem amarela	média	xxxxx	xx	xxx
		2)	verde, esc. ner.	média	xxx	±	xx
		3)	amar. es. nerv.	média	xxxxx	xx(x)	xx(x)
		4)	v. cl. es. nerv.	média	xxxxx	x	xxxx
	C) regularmente atacada, 100 cm. de altura, bastante fôlhas, pequenas, verdes, com esclarecimento das nervuras.	5)	verde-clara	média	xxxxxx	x(x)	xxxx
		6)	v. (so lig. cl.)	média	xxxxxx	xxxxx	x
		7)	v. lig. clor.	média	xxxxxx	xxxx(x)	x

Para evitar, nesta experiência, o destacamento espontâneo das folhas mantivemo-las 4 dias escurecidas.

Como na série anterior de observações, também neste ensaio as folhas das plantas doentes caracterizavam-se, já ao iniciar a experiência, por um teor mais elevado de amido do que as das plantas sadias. Parece que estas últimas — pelo menos nas condições do inverno paulista — durante a noite normalmente mobilizam grande parte do seu “estoque” em amido (fig. 2). Possivelmente fazem exceção desta regra as folhas bem novas, que geralmente mesmo nas horas da manhã encontramos repletas de amido a não ser que elas iniciem a assimilação numa hora mais matutina do que as folhas mais velhas. Em todo caso chegaram os 4 dias de escurecimento experimental para provocar nas 4 folhas sadias examinadas o desaparecimento do amido (veja fig. 2).

As folhas “doentes” por outro lado, responderam, já no início da experiência, fortemente ao tratamento com o reagente IIK, tomando, sem exceção, uma coloração preta. Mantiveram, então, estas folhas, após o escurecimento normal da noite, grande quantidade, senão o total, do seu estoque acumulado de amido. Mesmo depois do escurecimento experimental de 4 dias, conservou-se ainda apreciável quantidade de amido nas folhas. Uma especial lentidão em mobilizar o amido notámos nas folhas 5, 6 e 7 da árvore C, caracterizada por um ataque de “tristeza” forte, mas mesmo assim provavelmente menos grave do que o da laranjeira B.

Pelo menos na época, em que executámos o ensaio, a árvore C tinha um número maior de folhas do que a laranjeira B e não apresentava também nas suas folhas sintomas tão acentuados de clorose como os que observámos nas folhas 1 e 4 da árvore B. Achamos interessante destacar este fato, porque já por ocasião da experiência 4-8-47 fomos levados a admitir que com relação à mobilização de amido nas folhas, as árvores moderadamente atacadas pela “tristeza” distinguem-se mais das laranjeiras sadias do que as plantas que se acham no estado inicial ou final da doença.

Em todo caso, vimos, na experiência de 7-6-48, numa grande parte das folhas, provenientes de árvores doentes, que

o período de escurecimento de 96 horas não chega para fazer desaparecer completamente os depósitos de amido nas folhas. Por isso resolvemos repetir esta experiência, deixando esta vez as folhas, à prova de luz, durante 7 dias.

Os resultados deste ensaio mais recente, estão reunidos na tabela 5 (fig. 3).

TABELA 5
(Experiência de 16-23/6/1948)

Mobilização de amido em folhas de planta sadia (A), enxertada sobre laranjeira doce, e de planta doente (B), enxertada sobre laranjeira azêda, do Campo Experimental (Parque Ipirapuera) do Instituto Biológico

Planta do grupo	denominação	No da folha	coloração da folha	idade da folha	intensidade da coloração com IJK		provável mobilização de amido
					da metade "esclerótica" da folha	da metade da esclerótica da folha	
sadio	A) sadia	1)	verde-clara	média	xx	o	xx
		2)	verde-clara	média	x(x)	o	x(x)
		3)	verde	média	xx	o	xx
		4)	verde-escura	média	xxx(x)	o	xxx
		5)	verde-escura	média	xxx	o	xxx
doente	B) Regularmente atacada (= C da tabela 4)	1)	clorótica	média	xxx	x	xx
		2)	lev. clorótica	média	xxxx	xx(x)	x(x)
		3)	clorótica	média	xxx	x(x)	x(x)
		4)	lev. clorótica	média	xxxx(x)	x	xxx(x)
		5)	lig. clorótica	média	xxx(x)	xx(x)	x

Deve-se esclarecer, em primeiro lugar, que a planta "B", que nesta experiência forneceu as folhas doentes, é a utilizada sob a letra "C" no ensaio anterior. Também na atual experiência, tôdas as folhas desta planta submetidas ao exame, mostraram um nítido impedimento na mobilização do amido, (fig. 3). Embora, neste caso, o escurecimento se estendesse por um período de 7 dias, tôdas as folhas doentes acusaram, ainda no fim da experiência, uma forte reação com IIK, contrastando com as folhas sadias, que após o mesmo tratamento se mostravam completamente livres de amido. Esforçámo-nos, neste ensaio, para escolher sempre "pares" de folhas "sadias" e "doentes", bem comparáveis entre si a respeito da sua exposição ao sol. Conseguimos, por exemplo no caso dos números "4" escolher folhas bastante semelhantes, ambas exposto ao sol de oeste o parênquima de paliçada. Realmente, no início da experiência, achamo menos acentuada do que nos ensaios anteriores a diferença sempre a favor das "doentes" — no teor em amido entre as folhas "sadias" e "doentes". No fim do ensaio, porém, esta diferença era muito marcada, levando-nos a admitir que realmente o impedimento na mobilização do amido em folhas de laranjeira atacada pela "tristeza" exprime-se também na velocidade deste processo, durante um escurecimento experimental. Só queremos ainda acrescentar que também neste ensaio, as folhas "doentes" em que mais amido se conservou depois do escurecimento, (N.os 2 e 5) pertenciam a ramos basais (fig. 3).

DISCUSSÃO

Antes de tirar, dos nossos resultados, conclusões de um caráter mais geral, queremos lembrar mais uma vez os limites, que nos foram impostos pelo método empregado e pelo material disponível. No interesse da obtenção de resultados entre si comparáveis, restringimo-nos, geralmente, à escolha de folhas pequenas e formadas pelo menos alguns meses antes do início nos ensaios. Além disso, muitas das nossas observações foram executadas na época seca, no inverno, porque nos meses do verão, com as suas chuvas torrenciais, teria sido ainda maior

o perigo do destacamento espontâneo das fôlhas durante o escurecimento. Apesar das lacunas que por isso apresentam as nossas observações, achamos que podemos compará-las com as de outros autores que estudaram as alterações do metabolismo, causadas por certas doenças de vírus.

Queremos referir-nos principalmente aos estudos efetuados com uma técnica semelhante à nossa por ESMARCH (5, 1919), sobre a mobilização de amido em fôlhas de batatinhas atacadas pelo "enrolamento". Verificou este autor que as fôlhas de plantas sadias, após um escurecimento de 19 a 68 horas (conforme a idade das fôlhas) se apresentaram livres de amido, ao passo que as de plantas doentes continham ainda quantidades consideráveis de amido depois de 6 e às vezes até depois dos 12 dias. Parece então que os efeitos bioquímicos por nós observados em fôlhas de laranjeiras atacadas pela "tristeza" são semelhantes, embora talvez menos pronunciados, do que os ocasionados pelo "enrolamento" em fôlhas da batatinha. É fortalecida a impressão de uma grande analogia entre os efeitos bioquímicos destas duas doenças ainda por outros resultados que ESMARCH assim como NEGER (9, 1919) obtiveram nos estudos sobre o "enrolamento" da batatinha. Verificaram eles, por exemplo, que existe uma certa proporcionalidade entre o grau do impedimento da mobilização do amido e o tipo do sintoma, demonstrado pela fôlha. As fôlhas não "enroladas" de plantas doentes mobilizam o amido com maior facilidade do que as "enroladas". Também estas observações apresentam muitos pontos em comum com os resultados dos nossos ensaios. Verificamos por exemplo, nas nossas últimas 5 séries de observações, que as fôlhas de plantas de laranjeira doce, enxertadas sobre porta-enxertos de caipira (*Citrus sinensis* Osbeck) e que não exibiram sintomas de "tristeza", não mostraram impedimento na mobilização de amido. Já que estas plantas no pomar estavam bem próximas das laranjeiras doentes (enxertadas sobre laranjeira azêda (*Citrus aurantium* L) e facilmente acessíveis aos insetos-vetores do vírus, parece-nos provável que também estas plantas contêm vírus (sem, porém, exibir sintomas). A velocidade da mobili-

zação do amido está, então, provavelmente também no nosso caso, relacionada com o grau das alterações patológicas caracterizadas pelo tipo dos sintomas, e não simplesmente com a presença do vírus nas fôlhas. Finalmente foi também já por ESMARCH chamada a atenção sobre um outro fenômeno, frequentemente por nós observado, i.e. o maior teor em amido das fôlhas doentes mesmo antes do escurecimento. NEGER (9, 1919) chegando a êste respeito a resultados muito semelhantes aos de ESMARCH, ainda acrescenta que as fôlhas "enroladas" se caracterizam não só por um teor mais elevado em amido, mas também por uma distribuição menos uniforme do amido sobre o limbo. Também em fôlhas "doentes" de laranjeira tivemos, Ys vezes, a ocasião de observar manchas densas de amido dentro de áreas desprovidas desta substância.

Julgamos suficientes êstes exemplos para demonstrar que há, de fato, uma grande analogia a respeito da mobilização de amido entre fôlhas de batatinha afetada pela doença "envolvimento" e as de laranjeira atacada pela "tristeza". Esta analogia não é de se estranhar, já que também em laranjeiras atacadas pela "tristeza", ocorrem, embora apenas na zona de enxertia, necroses de flôema, como foi demonstrado por SCHNEIDER, BITANCOURT e ROSSETTI (17, 1946).

Não queremos deixar de frizar, porém, que esta analogia nem sempre é completa. Assim, por exemplo, considera ESMARCH a mobilização do amido sempre menos impedida nas fôlhas novas do que nas velhas das plantas doentes. Diante da estreita ligação, existente entre êste impedimento e a severidade dos sintomas, é bem compreensível esta posição excepcional das fôlhas novas, já que os sintomas do "enrolamento" mostram-se com preferência, nas fôlhas velhas, basais. Na "tristeza" da laranjeira, porém, não existe uma relação constante entre nitidez de sintomas e posição da fôlha no ramo, e, conseqüentemente, observamos frequentemente (tab. 1 e 3) casos de impedimento pronunciado na mobilização do amido em fôlhas apicais.

A diferença fundamental, porém, entre a "tristeza" da laranjeira e o "enrolamento" da batatinha reside na depen-

dência, no caso da "tristeza", do aparecimento de sintoma da doença da escolha de um determinado tipo de cavalo. Nos estudos sobre o "enrolamento" da batatinha comparam-se folhas de plantas sadias e doentes, ambas de pé franco. Todos os ensaios sobre a "tristeza" foram executados necessariamente com folhas de plantas enxertadas. Está, assim, em laranjeiras atacadas pela "tristeza", em jôgo mais um fator, cuja importância para o processo da mobilização do amido nas folhas, por ora é difícil avaliar.

Por fim, resta-nos ainda fazer um julgamento sobre a eventual importância das nossas observações. Não parece-nos provável que o caráter fisiológico da "acumulação de amido nas folhas" possa facilitar grandemente a diagnose da "tristeza" por acreditarmos que este caráter acompanha, mas não antecede, os sintomas morfológicos. Por outro lado achamos elucidativa a grande semelhança existente a respeito da mobilização do amido nas folhas, entre a "tristeza" de um lado e o "enrolamento" da batatinha e certas doenças de vírus, pertencentes ao grupo "yellow", por outro lado. Contribui, talvez, esta semelhança para facilitar a compreensão dos efeitos fisiológicos da "tristeza" para a classificação da "tristeza" dentro de um determinado grupo de doença de vírus.

A verificação, no caso do "enrolamento" da batatinha, da acumulação de amido nas folhas serviu de ponto de partida para outras pesquisas fisiológicas, por exemplo as executadas por HARTISCH (8, 1934), que revelaram a intensificação, sob a influência da doença, da atividade de enzimas que resultam na formação de dextrina. Parece-nos, que também folhas de laranjeira atacada pela "tristeza" representem um material muito apropriado e ainda pouco explorado para tais estudos.

SUMMARY

The accumulation and mobilisation of starch in the leaves of "Tristeza"-diseased orange-trees.

- 1) The speed of starch-mobilization in oranges leaves is valued by comparing the color produced by the iodine reagent IKI in two longitudinal leaf-halves, respectively be-

- fore and after a period of experimental darkening, in accordance with J. Sachs' "half-leaf" method.
- 2) During the period of experimental darkening one leaf-half, including the midrib, remains attached to the twig, but is covered with a light-tight paste-board box.
 - 3) In our first group of experiments (table 1 and fig. 1) we compared the starch mobilization in the leaves of apparently healthy and of spontaneously "tristeza"-affected orange-trees (— both of them grafted on sour orange stocks —) in the orchard of the Experimental Station at Limeira (State of São Paulo). Already before the experimental darkening, which was maintained during 7 days, the diseased leaves contained more starch than the healthy ones. After the darkening, period, many of the healthy leaves were starch-free, whereas most of the diseased leaves — although having also lost part of their starch — continued displaying considerable quantities of this substance.
 - 4) A few experiments on the starch mobilization in leaves of small orange-plants, grafted on sour orange and experimentally infected with "tristeza" disease, (table 2) showed again, that the leaves of diseased plants after periods of darkening, contain more starch than healthy ones.
 - 5) For our final experiments (table 3, 4 and 5, fig 2 and. 3) we chose leaves of an orchard of the experimental field of the Biological Institute in São Paulo. In this orchard there are rows of healthy-looking orange trees, grafted on stocks of sweet orange, next to rows of diseased plants, grafted on sour orange. Studying comparatively the starch mobilization in leaves of these two groups of plants, we found greater differences between them than in our first experiments. After an experimental darkening of 7 days, with few exceptions, all the "healthy" leaves were starch-free, whereas the leaves of "tristeza"-diseased plants still contained large amounts of starch we found the speed of starch-mobilization especially low in leaves attached to basal shoots and sometimes also in young leaves.
 - 6) In the discussion we refer to the observation of other authors: SCHMIDT (5, 1919) and NEGER (13

1919), who found a starch accumulation in the leaves of potato plants, affected with "leafroll" and in those of other plants attacked by "yellow" diseases. We point out the bearing of our observations on the understanding of the physiological changes occurring in "tristeza"-diseased orange-trees and on the classification of this disease.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BARTON-WRIGHT E. and A. M'BAIN — 1932 — Studies in the physiology of the virus diseases of the potato: a comparison of the carbohydrate metabolism of normal with that of leaf-roll potatoes.
Trans. Royal Soc. Edinburg 57 : 309-349.
- 2) BITANCOURT, A. A. — 1944 — Um teste para a identificação precoce da tristeza dos Citrus.
Biológico 10 : 169-175.
- 3) CAMPBELL, E. G. — 1925 — Potato leaf roll as affecting the carbohydrate, water and nitrogen content of the host.
Phytopath. 15 : 427-430.
- 4) DENNY, F. C. — 1930 — The Twin-leaf method of studying changes in leaves.
Amer. Journal of Bot. 17 : 818-841.
- 5) ESMARCH, F. — 1919 — Zur Kenntnis des Stoffwechsels in blattrollkranken Kartoffeln.
Zschrft. f. Pflanzenkrht. 29 : 1-20.
- 6) FAWCETT, H. S. — 1945 — A starch test for quick decline.
The California Citrograph 31 : 122.
- 7) FAWCETT, H. S. & J. M. WALLACE — 1946 — Evidence of the virus nature of Citrus quick decline.
The Calif. Citrog. 32 : 50 & 88-89.
- 8) HARTISCH, J. — 1934 — Stoffwechselphysiologische Untersuchungen über die Blattrollkrankheit der Kartiffelplanze.
Planta, 22 : 692-719.
- 9) LIKHITÉ V. N. and G. H. DESAI — 1935 — Starch accumulation in stensiosed Cotton plants.
Curr. Sci. 3 : 356

- 10) MASON, F. G., E. J. MASKELL and E. PHILLIS — 1936 — Further studies on transport in the cotton plant.
III. Concerning the independence of solute movement in the phloem.
Memoirs of the Cotton Research Station, Trinidad, B.
25-58.
- 11) MENEGHINI, M. — 1946 — Enxertias de “seedlings” de Citrus para fins experimentais.
Biológico 12 : 285-287.
- 12) MENEGHINI, M. — 1946 — Sobre a natureza e transmissibilidade da doença “tristeza” dos Citrus.
Biológico 12 : 285-287.
- 13) NEGER F. W. — 1919 — Die Blattrollkrankheit der Kartoffeln.
Zsch. Pflanzenkrh. 29 : 27-48.
- 14) QUANJER, H. M. — 1913 — Die Necrose des Phlœms der Kartoffelpflanze, die Ursache der Blattrollkrankheit.
Med. R. H. Land-Tuin en Boschbouwschool 6 : 41-80.
- 15) ROSA F. T. — 1927 — Chemical changes accompanying the western yellow blight of tomato.
Plant. Phys. 2 : 163-169.
- 16) ROSSETTI, V. — 1945 — O teste do iôdo na identificação da “tristeza” dos Citrus.
Biológico, 11 : 13-21.
- 17) SCHNEIDER, H., A. A. BITANCOURT and V. ROSSETTI — 1947 — Similarities in the pathological anatomy of Quick-decline-and Tristeza-diseased-orange trees.
Phytopath. 37 :364.
- 18) Shapovalov M. and. H. A. JONES — 1930 — Changes in the composition of the tomato plant accompanying different stages of Yellows.
Plant Physiology 5 : 157-165.
- 19) THUNG T. H. — 1928 — Physiologisch onderzoek met betrekking tot the virus der bradrolziekte van de aardappelplant, *Solanum tuberosum* L.
Tijdschr. over Plantenziekten 34 : 1-74.

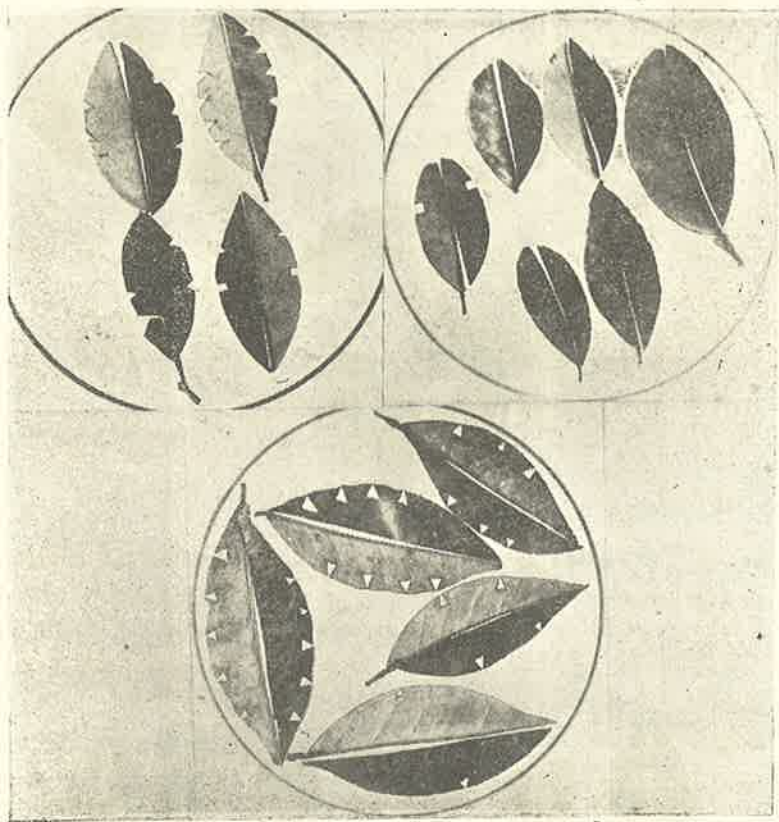


FIG. 1 — Comparação da mobilização do amido nas fôlhas 1-5 (corte triangular invertido) da planta A, sadia, e nas fôlhas 1, 2, 3, 5 (corte triangular) da planta B, doente, e nas fôlhas 6-11 (corte simples, não destacado) da planta C, doente, na experiência de 6-13|6|1946.

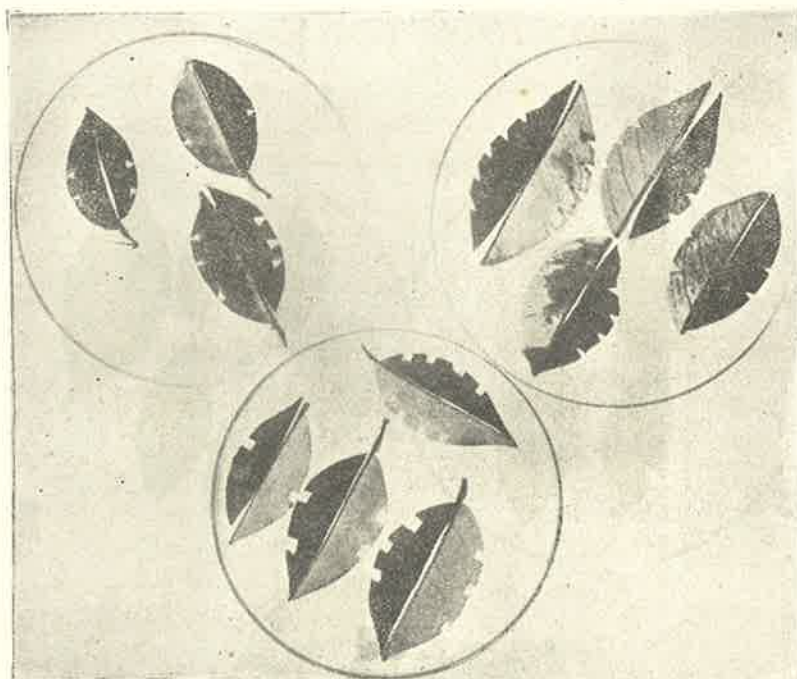


FIG. 2 — Comparação da mobilização de amido nas fôlhas 1-4 (corte re-
tangular) da planta A, sadia, e nas fôlhas 1-7 (corte triângu-
lar) das plantas B e C doentes, da experiência de 7-11|6|1948.

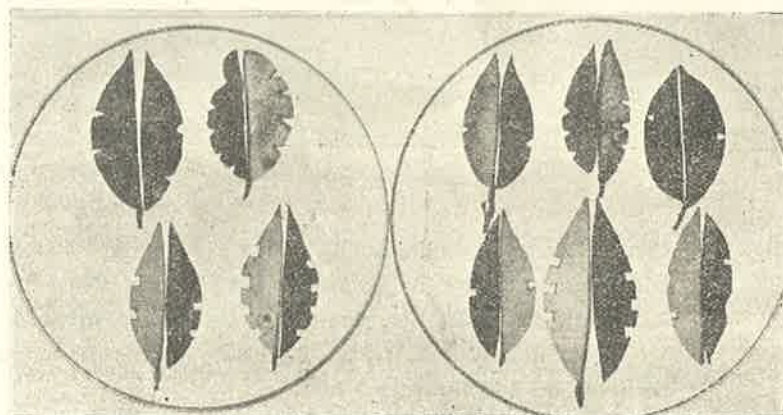


FIG. 3 — Comparação da mobilização do amido nas fôlhas 1-5 (corte re-
tangular), da planta A, sadia, e nas fôlhas 1-5 (corte triân-
gular), da planta B, doente, da experiência de 16-23|6|1948.