

Contribuição para o conhecimento do Metabolismo do Nitrogênio em laranjeiras atacadas pela "tristeza"

M. MENEGHINI e K. SILBERSCHMIDT

Já através dos primeiros trabalhos (2, 1940), (10, 1942) dedicados entre nós ao estudo da doença dos Citrus, atualmente chamada "tristeza", podia-se depreender que as alterações fisiopatológicas do cavalo consistiam principalmente num de finhamento progressivo devido provavelmente a uma diminuição do afluxo de assimilados provenientes do enxerto, daí advindo tôdas as demais consequências do mal.

Para explicar essa redução do fornecimento de substâncias orgânicas pelo enxerto, admitiu-se que a zona de enxertia exercia em laranjeiras atacadas pela doença um "efeito de barreira" e que como consequência deveria ocorrer um acúmulo dessas substâncias acima da zona de enxertia. Esta idéia recebeu depois um forte apóio pelos resultados dos trabalhos de FRANCO e BACCHI (16, 1944), de SCHNEIDER, 29, 1941 e de SCHNEIDER, BITANCOURT e ROSSETTI (30, 1947).

Como KOSTOFF (19, 1931) e SILBERSCHMIDT (32, 33, 1933, 1934) em estudos anteriores efetuados com enxertias heteroplásticas de plantas herbáceas empregando métodos relativamente simples e bastante eficientes, encontraram uma acentuada acumulação de substâncias nitrogenadas acima da zona de enxertia e como, apesar da patente diferença entre êsses casos e o nosso, era até certo ponto lícito admitir que uma obstrução parcial da zona de enxertia poderia provocar uma alteração semelhante nas laranjeiras atacadas pela "tristeza", resolvemos, usando métodos semelhantes, realizar determinações quantitativas de N na casca do enxerto e do cavalo de plantas doentes e, ao lado destas, para efeito de comparação, idênticas determinações em plantas sadias.

Sabíamos, naturalmente, desde o início, que determinações de N só poderiam esclarecer uma parte do metabolismo total da planta e que é necessário estender os nossos estudos aos carboidratos.

Por ora, porém, desejamos, no presente trabalho, apresentar os resultados da primeira fase desses estudos que se baseiam nas determinações de N na casca de enxerto e cavalo de laranjeiras sadias e doentes.

MATERIAL E MÉTODO

Utilizamos-nos para os nossos estudos de material retirado de plantas aparentemente sadias e doentes dum pomar de laranjeiras de variedade Baianinha enxertada em laranjeira azêda da Estação Experimental de Limeira.

Trata-se de plantas que por ocasião das experiências, tinham 11 a 12 anos de idade e que eram originalmente muito uniformes. Logo acima e abaixo da zona de enxertia retiramos amostras de casca constituídas de pequenos retângulos de 3 a 4 cms. de base ao longo da zona de enxertia por 1,5 cm. de altura. Quando determinávamos também o teor de água, as amostras eram de comprimento duplo (6 a 8 cms.) divididas em 8 partes iguais. As 1.a, 3.a, 5.a e 7.a partes constituíam uma amostra para determinação de humidade e as demais se destinavam à determinação de Nitrogênio. (fig. 1).

Diante da distância entre a Estação Experimental e o laboratório, em geral iniciamos as análises, somente no dia seguinte ao de tomada de amostras. Durante a noite estas eram guardadas em geladeira até a manhã seguinte, quando então eram pesadas, trituradas e submetidas ao tratamento para precipitação das substâncias protéicas. Por diversas vezes porém, tirando amostras duplas como antes explicamos, uma foi submetida ao tratamento ainda no dia da colheita e a outra no dia seguinte. Verificamos assim que, de um dia para outro, altera-se a relação entre o que determinamos como N protéico e N não protéico. O primeiro aumenta às expensas do segundo (tabela 5). Visto porém essa modificação manifestar-se dum

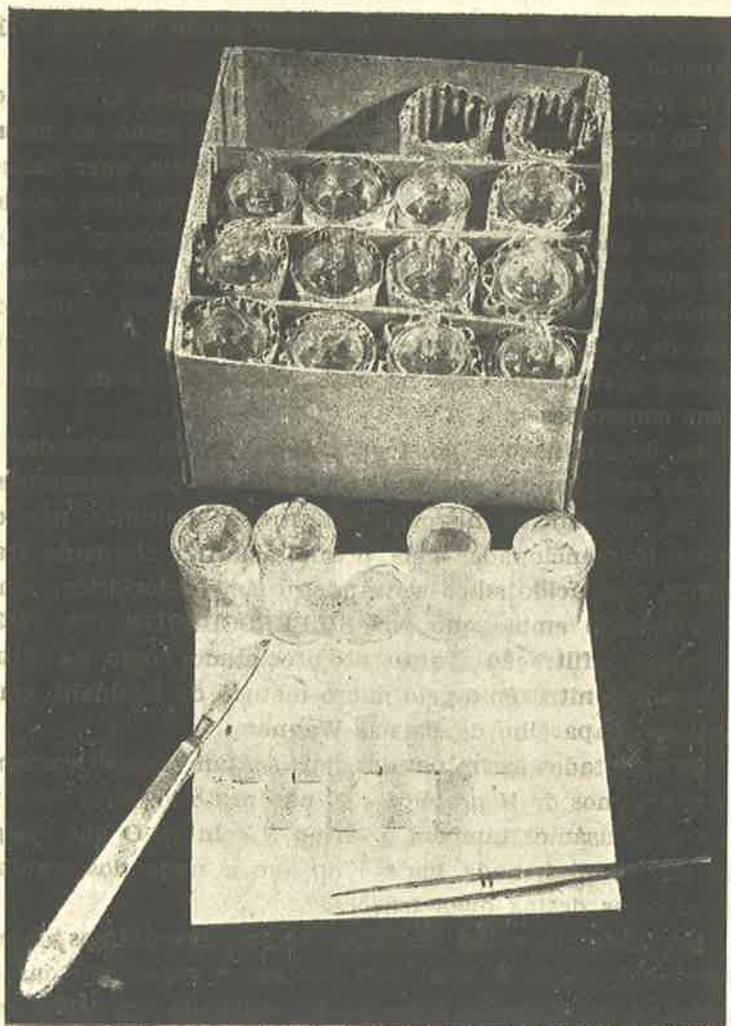


Fig. 1 — Pedacos retangulares de casca de laranja, que serviram como amostras para as nossas análises, ao lado de bisturi e pinça, com que foram destacados da árvore, e de pesa-filtros, em que foram acondicionados

modo semelhante em tôdas as amostras a serem comparadas, não acreditamos que o adiamento do início da análise provocou alterações dos resultados, que do nosso ponto de vista, sejam essenciais.

Se lançarmos mão dos resultados da tabela 5, as conclusões de nosso interesse para este trabalho serão as mesmas quer nos utilizemos dos dados da primeira série, quer daqueles da segunda. Por exemplo, chegaremos de qualquer modo à conclusão que na planta 1, sadia, há mais proteína no cavalo do que no enxerto e que neste há mais N não protéico que naquele. Naturalmente é limitado o valor desses dados, dum ponto de vista estritamente quantitativo, mas essa limitação não será perdida de vista na nossa discussão assim como nas nossas conclusões.

As determinações do teor d'água foram realizadas por meio de secagem das amostras a 100° C até pêso constante.

As substâncias nitrogenadas foram divididas nas duas frações já mencionadas pela precipitação da chamada fração protéica com ácido silico-wofrâmico e ácido clorídrico, conforme o método empregado por SILBERSCHMIDT (32, 1933) e subsequente filtração. Tanto no precipitado como no filtrado foi dosado o nitrogênio pelo micro-método de Kjeldahl, empregando-se o aparelho de Parnas-Wagner.

Os resultados assim obtidos representam respectivamente o que chamamos de N protéico e N não protéico. Para esta última fração usámos também o termo N solúvel. O que designamos por N total, nada mais é do que a soma dos resultados das análises destas duas frações.

No início do nosso trabalho, porém, executámos determinações diretas do N total sem realizar a separação nas duas frações já referidas. A digestão foi realizada em tôdas as séries de acôrdo com o método de Kjeldahl-Gunning-Arnold (90, 1945), que, como se sabe, não inclui a totalidade dos nitratos. Por isso, empregando amostras duplas, fizemos alguns ensaios para comparar os resultados que se obtêm com esse método e com o de Kjeldahl modificado para incluir o N dos nitratos (9, 1945).

Os resultados obtidos estão contidos na tabela 1. As diferenças entre as duas determinações além de serem pequenas não alteram o valor comparativo das nossas análises, razão esta pela qual não vemos inconveniente nenhum em chamar de "N total" aos resultados obtidos com o método de Kjeldahl-Cunning-Arnold.

APRESENTAÇÃO DOS DADOS EXPERIMENTAIS

Realizámos três séries de determinações do teor de N na casca de laranja no espaço de tempo, que decorreu de Agosto de 1944 a Novembro de 1945. Os resultados destas séries de análises são apresentados, em ordem cronológica, nas tabelas 2 a 6.

Na tabela 2 estão reunidos os dados que se referem à primeira parte do primeiro período das nossas experiências, de 18/8 a 3/10 de 1944, em que nos limitámos à determinação de N total. A tabela 3 refere-se ao final desse mesmo período. Os resultados nela contidos estão representados à parte apenas porque se referem a análises em que efetuámos determinações separadamente do N protéico e N não protéico.

Há entre as últimas análises representadas nessa tabela e as primeiras da tabela 4 um intervalo de aproximadamente 2 meses e meio. Não só por isso porém, esses resultados são por nós considerados separadamente, mas também porque representam períodos distintos do ponto de vista das condições de clima, distinção esta que como veremos repercutiu nos resultados. Os dados da tabela 4 estão separados daqueles da tabela 5 apenas porque ao efetuarmos as análises cujos resultados estão resumidos nesta última tabela, realizámos determinações em amostras duplas com a finalidade que já foi exposta na parte referentes aos métodos. No mais eles constituem um conjunto único de dados, representando um período relativamente uniforme e como tal foram considerados na nossa análise estatística.

A tabela 6 resume o resultado de análises realizadas entre 7/6 e 22/11 de 1945, separadas das últimas determinações da tabela 5 por um período de 3 meses. Esses resultados compre-

endem um período do ano de 1945 que do ponto de vista das estações, é semelhante àquele em que iniciámos as análises em 1944 e onde esperávamos que se revelassem novamente certos resultados que então havíamos verificado.

Finalmente na tabela 7, apresentamos os resultados da análise estatística que realizámos com todos êsses dados.

Percorrendo essa tabela no sentido vertical, encontraremos representadas separadamente, as séries de análises que realizámos. Percorrendo-a horizontalmente, encontraremos depois da coluna das legendas, quatro outras onde se indica o número de determinações realizadas para cada caso. Segue-se a seção I da tabela que se refere ao resultado das análises estatísticas realizadas com os dados expressos em porcentagem da substância fresca. Essa seção contém duas divisões. Numa encontra-se, nas duas primeiras colunas, a comparação entre as médias dos enxertos de plantas sadias e doentes e nas duas últimas a comparação entre as médias dos cavalos.

Noutra encontra-se a comparação entre enxerto e cavalo das plantas sadias e doentes separadamente.

Como tínhamos um interesse especial pelas diferenças porventura existentes entre enxerto e cavalo e como, em virtude das variações mais ou menos grandes que existem de planta para planta, elas poderiam não se revelar numa análise estatística na qual nos utilizamos diretamente dos dados expressos em porcentagem de substância fresca, resolvemos calcular para cada árvore a diferença entre enxerto e cavalo e exprimi-la como porcentagem do teor do cavalo.

As médias desses números estão nas colunas M e M' da seção II da tabela 7, junto aos respectivos valores de P para as diferenças entre essas médias e zero.

Tôdas as comparações dessa tabela compreendem duas colunas, uma para a diferença entre as médias (M-M') e outra para a probabilidade (P) com que essas diferenças podem ocorrer por mera influência do acaso. As diferenças com um valor de P menor que 0,05 e que por nós foram consideradas significativas, estão representadas em negrito.

As diferenças foram calculadas subtraindo num caso o teor

do cavalo daquele do enxêrto e noutro o teor das plantas doentes daquele das sadias. Valores negativos significam que o cavalo no primeiro caso e a planta sadia no segundo, são mais ricos do que o respectivo par em relação à substância em consideração. Fazem excessão desta regra, apenas os valores da penúltima coluna que representam diferenças entre diferenças.

Depois desta explicação geral vamos estudar mais detalhadamente os resultados de cada um dos períodos representados pelas nossas três séries de determinações.

No período compreendido entre 18 de setembro e 3 de outubro (tabela 2) verifica-se uma pequena mas constante superioridade do N total acima da zona de enxertia nas plantas doentes o que não se observa nas plantas sadias. Nestas últimas constata-se um teor igual nos dois componentes da enxertia e em alguns casos até um pouco mais alto no cavalo. Se consultarmos a tabela 7, seção I, verificaremos que a diferença entre as médias dos enxêrtos e cavalos das plantas doentes, em porcentagens de substância fresca, é bastante significativa. Da mesma maneira a média das diferenças entre enxêrto e cavalo em porcentagem do teor do cavalo (tabela 7, seção II) é significantemente diferente de 0. Não acontece o mesmo com as plantas sadias onde nenhuma dessas diferenças é significativa.

Passando para a tabela 3 que representa o final desse período que por sinal se caracterizou por intensa seca, verificaremos que a diferença a favor do enxêrto nas plantas doentes mostrou-se ainda significativa, mas apenas quando o teste de significância foi baseado nas diferenças entre enxêrto e cavalo expressas em porcentagem do teor do cavalo (tabela 7, seção II). A diferença que encontramos no N total a favor do enxêrto é devida principalmente à fração solúvel que é muito superior no enxêrto das plantas doentes (40,23% do teor do cavalo) e apresenta apenas uma pequena diferença sem significação, nas plantas sadias. É notável também que o N protéico, nesta série, encontra-se em quantidade um pouco superior no cavalo das plantas sadias. A significação dessa diferença, porém, só se revela quando os resultados são expressos

como diferenças em porcentagem do teor do cavalo (tabela 7 seção II).

A superioridade do N total no enxêrto das plantas doentes que ainda se verifica nos dados da tabela 3, deixa de se apresentar quase por completo nos dados das tabelas 4 e 5 ao mesmo tempo que algumas plantas sadias revelaram esta mesma superioridade, ao contrário do que ocorria antes. Em todo caso nem nas plantas sadias nem nas doentes quando consideramos o conjunto dos dados, a diferença entre enxêrto e cavalo é significativa (tabela 7).

Outra diferença entre êste período (tabelas 4 e 5) e o anterior (tabela 3) é que o N não protéico que se encontrava em quantidade superior sômente nos enxertos das plantas doentes, apresenta-se, agora também significativamente superior no enxêrto das plantas sadias. Desaparece, assim, uma diferença entre plantas sadias e doentes, que no período anterior era bastante significativa (tabela 7, seção II, duas últimas colunas). Nota-se que nesse período a superioridade em N protéico do cavalo das plantas sadias não é mais significativa.

Finalmente temos a considerar a última série de análises (tabela 6), realizadas de junho a novembro de 1945. Êsse período compreende os meses em que no ano anterior (1944), havíamos iniciado as nossas experiências. Pode-se ver dos dados desta tabela que reapareceu, na maioria das plantas por nós analisadas, uma pequena superioridade do enxêrto das plantas doentes em N total. Conforme se pode verificar na tabela 7, essa superioridade é de fato significativa. Porém essa significação apenas se revela quando se exprimem as diferenças entre enxêrto e cavalo em porcentagem do teor do cavalo (tabela 7 seção II). A diferença no N protéico das plantas sadias a favor do cavalo volta também a se apresentar e desta vez duma maneira mais significativa. Mesmo ao se compararem diretamente as médias do teor em porcentagem de substância fresca (tabela 7, seção I), essa diferença é significativa. O N não protéico contudo continua a mostrar superioridade também do cavalo das plantas sadias.

Nesta mesma série de experiências (tabela 6) determiná-

mos também a água. Pode-se verificar por essas determinações que enquanto não há praticamente diferença alguma entre enxerto e cavalo de plantas sadias, há uma nítida e significativa diferença negativa nas plantas doentes. Isto quer dizer que o cavalo nas plantas doentes é mais rico em água do que o enxerto. As possíveis causas desta diferença no teor em água de enxerto e cavalo de plantas doentes serão ainda expostas na parte deste trabalho dedicada à discussão. Aqui queremos apenas nos referir à possível importância desta diferença para a correta avaliação dos nossos resultados relativos ao teor em N. Poder-se-ia, de fato, levantar a questão, se não seria mais conveniente expressar todos os nossos dados em porcentagem de substância seca. Neste caso é possível, que algumas das diferenças que encontramos no nitrogênio, poderiam deixar de ser significativas. Acompanhando, porém, a maioria dos autores que se ocuparam com análises de material vegetal para estudos fisiológicos como por exemplo MOTHES, (27, 1931), achamos preferível conservar o peso fresco como unidade de referência. Poder-se-ia, até lembrar a possibilidade de exprimir os dados em porcentagem do teor em água, o que talvez do ponto de vista das relações biológicas, teria ainda maior interesse e neste caso as diferenças se acentuariam ainda mais. Contudo, qualquer que seja a unidade escolhida conforme se pode verificar nos dados das nossas tabelas, as conclusões, a que chegamos, não serão, a nosso ver, essencialmente alteradas.

Passaremos a tratar agora das diferenças existentes entre plantas sadias e doentes comparando os enxertos e os cavalos separadamente. Já o exame das nossas primeiras tabelas e principalmente o da tabela 6 mostra que em muitos casos as plantas doentes caracterizavam-se tanto no enxerto como no cavalo, por um menor conteúdo em nitrogênio do que as plantas sadias. A superioridade das plantas sadias atinge o nitrogênio protéico e solúvel. Verificamos, pela análise estatística (tabela 7, seção I, 1.a divisão) que a diferença entre planta sadia e doente é significativa, não só para o período a que se refere a tabela 6, mas mesmo para os períodos anteriores, onde

esta superioridade não era tão nítida. Isso quer dizer, que em quase todos os casos as plantas sadias se revelam mais ricas de que as plantas doentes em N protéico e conseqüentemente em N total. Pode-se ainda verificar que na primeira série de experiências as diferenças entre a média dos enxêrto (0,123) é menor que a diferença entre a média dos cavalos (0,203). Essa diferença diminui nas séries subsequentes, mas volta a ser grande na última série de determinações.

Deve-se notar que embora o cavalo da planta doente se empobreça mais, o enxêrto também sofre uma redução sensível no teor em nitrogênio. Isto significa que a acumulação do nitrogênio no enxêrto das plantas doentes é apenas relativa, visto que o que se verifica é um empobrecimento geral da planta que, em muitos casos, é mais acentuado no cavalo. Com relação à água, por outro lado se verifica um empobrecimento geral que também é maior no cavalo. Enquanto o enxêrto em conseqüência da doença aumenta o seu teor em água em porcentagem de substância fresca, em média, de 1,4 (tabela 7), o cavalo apresenta um enriquecimento de 4,1, que além disso é mais significativo do que aquêle do enxêrto.

Num apanhado rápido podemos resumir os nossos resultados da seguinte maneira :

A) Diferenças entre enxêrto e cavalo.

a) O teor em N total mostrou-se nas primeiras análises um pouco maior no enxêrto do que no cavalo das plantas doentes. Essa superioridade desapareceu em seguida. Posteriormente tornou a revelar-se porém duma maneira menos acentuada. As plantas sadias apresentaram no enxêrto como no cavalo o mesmo teor.

b) O N protéico, com exceção do período de 17/10 e 8/11 de 1944, sempre se apresentou superior no enxêrto, tanto das plantas doentes como sadias. No mencionado período essa diferença só se revelou nas plantas doentes.

c) O N protéico apresentou-se frequentemente com maior teor no cavalo das plantas sadias do que no enxêrto. Essa di-

ferença é muito mais acentuada na última série de determinações. As plantas doentes não apresentam tal diferença.

d) A água é encontrada em maior teor no cavalo das plantas doentes. Nas plantas sadias não há diferenças entre esses dois componentes da enxertia.

B) Diferenças entre plantas sadias e doentes.

a) Nas plantas que ficaram doentes verifica-se um nítido empobrecimento geral em N protéico, não protéico, e consequentemente em N total. O empobrecimento é mais acentuado no cavalo.

b) Nas plantas doentes nota-se um aumento geral do teor em água. Esse aumento porém, é nitidamente maior no cavalo.

DISCUSSÃO

Ao tentar confrontar os dados por nós obtidos com indicações encontradas na literatura, precisamos primeiramente esclarecer quais os fenômenos estudados em outras plantas que julgamos comparáveis com os observados por nós em laranjeiras atacadas pela "tristeza".

Desde os trabalhos de FAWCETT & WALLACE (15, 1946) que demonstraram a transmissibilidade por enxertia da doença "quick decline" da laranjeira e de MENECHINI (26, 1946), que conseguiu transmitir experimentalmente por meio de afídios a "tristeza", doença muito semelhante ou idêntica à primeira, esta moléstia é incluída no grupo das doenças de vírus. Portanto acreditamos que o estudo das perturbações do metabolismo observadas por vários autores em plantas de diversas espécies, provocadas por doenças de vírus, possa ao lado dos nossos resultados, concorrer para o esclarecimento da fisiologia das plantas atacadas pela "tristeza".

Mas também, por outro lado, — desde as primeiras investigações relacionadas com esta doença — sabemos que a laranjeira doce só exhibe nítidos sintomas de tristeza quando enxertada sobre laranjeira azêda. Esta ligação obrigatória entre a manifestação da doença e determinadas combinações de en-

xêrto e cavalo revelada principalmente pela falta de renovação das raízes e o fato de o cavalo apresentar nas plantas doentes um definhamento progressivo, fez supor, desde logo, que a doença de qualquer maneira interferisse com a normal translocação de substâncias assimiladas do enxerto para o cavalo. A idéia baseada nestas considerações de que a zona de enxertia no caso de plantas doentes representasse uma espécie de "barreira" para a corrente de assimilação, recebeu ultimamente um forte apóio pela verificação da ocorrência de características necroses dos vasos crivados na zona de enxertia e nos seus arredores, verificação esta feita por SCHNEIDER (28, 29, 1946) para a doença "quick decline" e por SCHNEIDER, BITANCOURT E ROSETTI (30, 1947) para a "tristeza". Diante destes resultados devemos aduzir, para melhor interpretar os nossos dados relativos ao metabolismo de laranjeiras atacadas pela tristeza, também as indicações da literatura que se referem a translocação de substâncias em caules através de "barreiras" fisiológicas. Nota-se um tal efeito de "barreira" em certas combinações de enxertias heteroplásticas ou mesmo em plantas de pé franco, nas quais se aplica uma incisão anular na casca (ou remoção de um anel de casca). Da vasta literatura, que de acôrdo com estas considerações poderia servir para facilitar a compreensão dos nossos dados experimentais, só pouquíssimas indicações são estritamente comparáveis com as nossas observações. Isso provém, em grande parte, da escolha peculiar das amostras nos nossos ensaios. Queremos mais uma vez lembrar, que as nossas análises se referem a plantas perenes, árvores de um pomar já formado e que as amostras analisadas não eram outra coisa senão pequenas tiras retangulares, de casca destas árvores. A maioria dos autores, porém, que se dedicou ao estudo da translocação em enxertias ou em plantas submetidas a incisões anulares, escolheu para êstes estudos plantas anuais, analisando hastes inteiras ou pelo menos cortes completos das hastes que incluíram não só a casca mas também o cilindro central. É claro que ao comparar os resultados destes autores com os nossos, devemos levar em consideração as diferenças, resultantes da diversidade do material

e da técnica. Apesar das limitações que desta maneira se impõem acreditamos poder tornar algumas das nossas observações mais compreensíveis, confrontando-as com os resultados obtidos por outros autores.

1) Há na base do enxerto de plantas doentes uma acumulação de N ?

Como foi exposto na parte deste trabalho dedicada à descrição dos resultados, verificamos, na primeira e — em menor escala — na última série dos nossos estudos, nas plantas doentes uma ligeira mas significativa superioridade em N total do enxerto sobre o cavalo, diferença esta que nas plantas sadias não se observa.

A verificação de uma tal superioridade no N total do enxerto doente sobre o cavalo correspondia francamente às nossas expectativas. Desde que FRANCO e BACCHI (16, 1944) tinham demonstrado que o suco tirado da casca da base de enxertos de laranjeira atacada pela tristeza possui um valor osmótico mais elevado do que o do cavalo, consideramos provável que também substâncias nitrogenadas assim como os carboidratos contribuíssem para este valor. Falavam também a favor da possibilidade de uma acumulação de N acima da zona de enxertia as indicações de KOSTOFF (19, 1931) e SILBERSCHMIDT (32, 33, 1933, 1934), que em estudos sobre a translocação de substâncias nitrogenadas em enxertias heteroplásticas tinham encontrado uma elevada acumulação de N acima da zona de enxertia.

Inicialmente não estranhamos a existência desta superioridade, que corresponde à idéia da zona de enxertia entre laranjeira doce e laranjeira azêda exercer, em consequência da infecção pela tristeza, um "efeito de barreira". Estranhamos, sim, o pequeno valor numérico desta superioridade e que mesmo este tendia a desaparecer cada vez mais na segunda fase dos nossos estudos. É preciso porém não esquecer que KOSTOFF assim como SILBERSCHMIDT tinham trabalhado com plantas herbáceas e utilizado cortes completos dos caules para as análises, cortes estes compreendendo tanto a casca como o

cilindro central. Não podemos por isso considerar os resultados destes autores diretamente comparáveis com os nossos.

Conseguimos, porém, tirar algumas conclusões mais diretamente relacionadas com os nossos dados, das referências da literatura dedicada ao fenômeno da translocação em caules que sofreram, para fins experimentais, uma incisão anular da casca. Isto, porque muitos autores que se ocuparam com este assunto, estudaram os efeitos da interrupção experimental da translocação sobre floema e xilema separadamente. Assim, por exemplo, já BARTON WRIGHT (1, 1930), condensando os conhecimentos da época, distingue entre a reação da casca e do cilindro central ao explicar (pag. 125) :

“Ringing the stems causes an accumulation of nitrogen in both bark and wood above a ring and decrease in both below a ring”.

Estas conclusões foram ainda grandemente ampliadas pelos estudos prolongados e detalhados que MASKELL and MASON (22-25, 1929-1930) dedicaram ao problema da translocação de N em caules do algodoeiro através de incisões anulares da casca. É verdade que também estes estudos referem-se a uma planta herbácea, e não como os nossos, a uma árvore. A comparação dos resultados desses estudos com as nossas observações é, porém, facilitada, porque os autores dos trabalhos em questão determinaram separadamente, o teor em N da casca e do cilindro central do algodoeiro. O que nos parece principalmente notável nos resultados de MASKELL e MASON é a diferença que estabelecem entre a translocação de açúcares e de N. Ao passo que para os primeiros o floema representa a via quase exclusiva de condução, o N pode ser conduzido também no lenho. Assim por exemplo, já no primeiro trabalho estabelecem (21, 1929) que o teor do lenho em N é igual ao da casca e que variações no fornecimento se fazem sentir mais naquele do que nesta. Num trabalho posterior (24, 1930) eles esclarecem, que a velocidade do transporte longitudinal de N é pequena em comparação com a rapidez com que o N é translocado dos vasos crivados para outros tecidos e vice-versa. Assim explicar-se-ia, porque MASKELL and MASON observaram às ve-

vezes, menor acumulação de N do que de açúcares na casca acima da zona de incisão. Resultados semelhantes foram também obtidos por BONNER (3, 1944), que encontrou em tomates, cujo caule num trecho anular tinha sido tratado com vapor superaquecido, uma acumulação muito mais acentuada de açúcar que de N acima do anel.

Existe naturalmente sempre a possibilidade de que uma acumulação moderada de substâncias nitrogenadas acima de zonas de interrupção de translocação seja parcialmente mascarada pela acumulação maior de carboidratos pelo menos nos casos, em que este possível erro não seja evitado pelo processo do cálculo dos resultados.

De qualquer maneira pode-se concluir da literatura sobre a translocação em plantas, cujo caule foi por intervenção experimental subdividido em duas zonas não mais ligadas entre si por células vivas da casca, que o transporte de carboidratos neste caso sofre alterações mais patentes do que o das substâncias nitrogenadas.

Também na literatura sobre a translocação longitudinal em enxertias heteroplásticas das plantas perenes encontraremos indicações que confirmam esse ponto de vista.

Assim, por exemplo COLBY (8, 1935) comparando a influência de diversas variedades de cavalo sobre a acumulação de substâncias em macieiras, chega à conclusão de que o teor em N dos caules, pelo menos durante algumas estações do ano, é bastante constante e independente do cavalo empregado. KENCH (18, 1939), igualmente estudando o efeito de diversos cavalos sobre o metabolismo da macieira, verificou que só um dos tipos de cavalos experimentados provocou um aumento no teor de N do enxerto e mesmo neste caso o aumento evidenciou-se no lenho e não na casca.

Precisamente em plantas não anuais uma interrupção de floema não parece provocar uma grande acumulação de N acima da zona da lesão. Assim ENGARD (12, 1939), estudando em varas de framboezas (*Rubus idacus* L. x *R. strigosus* Michx) o efeito de incisões anulares da casca, encontrou acima destes anéis uma grande acumulação de carboidratos e uma acumu-

lação muito leve de substâncias nitrogenadas. Ele até chega à conclusão (12, pag. 32) que não há, na casca (da framboeza) uma definida translocação longitudinal de N orgânico nem para cima nem para baixo. Todas estas indicações demonstram que a translocação de N em plantas perenes, ou pelo menos não anuais, é um processo complexo, cuja direção é sujeita a variações periódicas e que pode realizar-se por diversas vias. Achamos interessante considerar a importância destas variações periódicas da translocação do nitrogênio em plantas lenhosas um pouco mais detalhadamente. Baseámo-nos, até agora, sempre na suposição, que as substâncias nitrogenadas, formadas pela planta, fossem translocadas, embora às vezes em pequena quantidade, no sentido basipetal. Alguns autores, porém, que se ocuparam com a translocação de N em árvores, por exemplo LOOMIS (20, 1934) verificaram que em algumas estações do ano, em árvores parte do N orgânico é sintetizada na raiz e translocada, em sentido acropetal, pelo floema para os órgãos necessitados. É verdade que as pesquisas de LOOMIS foram em outras condições externas e com árvores da zona temperada (macieira, *Pupulus nigra*, *Acer negundo*). Mas também o trabalho de CAMERON e COMPTON (4, 1945), dedicado especialmente ao estudo da distribuição de N em laranjeira, alude às dificuldades de apreciar, no seu verdadeiro sentido, as flutuações de N na casca da laranjeira.

Não nos parece impossível, por isso, que também na laranjeira, pelo menos, em certas estações do ano, N orgânico seja translocado na casca no sentido acropetal, e que este transporte seja impedido e retardado na zona de enxertia de plantas atacadas pela tristeza. Talvez estas flutuações periódicas na direção de transporte de N contribuam também para que a acumulação desta substância acima da zona de enxertia fique aquém da nossa expectativa.

Chegam, certamente, estas poucas referências para mostrar a grande complexidade do processo de translocação de N em árvores. Nas nossas experiências, em que analisamos apenas o teor em N de tiras da casca, efetivamente só pudemos analisar uma parte deste processo. Não queremos, por isso, ti-

rar conclusões demasiadamente amplas do fato de não termos encontrado uma considerável acumulação de N na casca da base de enxertos de laranjeiras atacadas pela tristeza. Em todo caso, êste nosso resultado está de acôrdo com as observações de outros autores que se ocuparam com a influência de cavalos heteroplásticos ou de incisões anulares sôbre a translocação de N, principalmente em plantas perenes. Fica para explicar ainda, porque a leve acumulação de N, que tínhamos averiguado na primeira fase dos nossos estudos, desapareceu em seguida para voltar a manifestar-se, embora em escala menor, na última série dos nossos ensaios. Podemos imaginar que tenham contribuído para êste resultado tanto as flutuações anuais do metabolismo da planta como também as fases progressivas da doença. Não dispomos, porém, ainda de dados experimentais suficientes, para poder avaliar a influência de cada um dos fatores.

2) Distribuição das diversas frações de N no enxêrto e no cavalo

Os dados condensados nas nossas tabelas 3, 6 e 7 demonstram claramente que as diferenças — embora pequenas e inconstantes — no teor em N de laranjeiras doentes entre enxêrto e cavalo — a favor do primeiro — eram devidas principalmente à fração solúvel. Nas análises que fazem parte da nossa primeira série de ensaios (tabelas 3 e 7) verificámos uma nítida superioridade nesta fração dos enxêrtos sôbre os cavalos exclusivamente nas plantas doentes. Em outras épocas, porém, (tabelas 4, 6 e 7) encontrámos, também nas plantas sadias mais N solúvel no enxêrto do que no cavalo. A êsse respeito (interessante notar que SILBERSCHMIDT (32, 1933, p. 744) nos seus estudos sôbre a acumulação de N na base de enxertos heteroplásticos de Solanáceas herbáceas tinha encontrado no N protéico a fração principalmente responsável pela acumulação do N total. Também BONNER (3, 1944, pag. 552) tinha verificado que em tomateiros submetidos numa zona anular ao efeito de vapor superaquecido, o N protéico acumulou acima

desta zona em maior escala do que as outras frações de N. É verdade que os referidos autores escolheram plantas herbáceas para os seus estudos. Mas não nos parece que esta é a única razão da falta de concordância dos resultados desses autores com os nossos dados.

Isto porque já MASKELL and MASON (24, 1930, pag. 265) não aconselham considerar constante a proporção entre as frações de N. Eles esclarecem que a velocidade da conversão das frações de N pode ser maior do que a do transporte longitudinal destas frações. Nas experiências efetuadas pelos referidos autores em algodoeiros, que tinham sofrido numa determinada zona do caule incisões anulares da casca, eles encontravam às vezes N protéico, às vezes N cristalóide como frações responsáveis pela acumulação de N acima da zona de enxertia.

Lembram como possível causa da conversão de proteína em N solúvel a diminuição da concentração em açúcares e mencionam, por outro lado, a falta de água como possível causa de uma conversão no sentido contrário. Já estas considerações indicam que é um conjunto de muitos fatores que determinam qual a fração N que será encontrada em excesso.

Entre estes fatores deve ser levada em consideração também, como ENGARD (12, 1939) explica, a proporção, no tecido analisado, entre células parenquimáticas e meristemáticas, cheias de protoplasma, e as já diferenciadas. Talvez uma consideração desta ordem sirva para explicar porque nas nossas análises encontramos nos cavalos de plantas sadias (tabela 7, seção 1, subdivisão 1, 2 e seção 2), com certa frequência, mais proteína do que no enxerto, ao passo que os cavalos doentes nos quais provavelmente muitas células já tinham morrido, não continham em geral mais proteína do que os enxertos. Chegaremos talvez a uma melhor compreensão da distribuição das frações de N nos dois componentes de laranjeiras ao tentar analisar, nos seguintes itens, algumas outras diferenças que averiguámos entre plantas doentes e sadias.

3) O baixo teor em N nas plantas doentes.

Deixando de dispensar a nossa atenção apenas à compara-

ção entre enxerto e cavalo das nossas laranjeiras analisadas, passaremos a encarar cada planta como unidade e considerar as diferenças que observamos no teor em N entre as plantas nitidamente atacadas pela tristeza e as classificadas por nós como sadias. A este respeito são principalmente ilustrativos os dados da nossa tabela 6, que mostram claramente uma inferioridade, às vezes acentuada, do teor em N nas plantas doentes em comparação com as sadias. Esta inferioridade das plantas doentes em N total não tinha — é verdade — nas séries anteriores (tabela 2-5) tão fortemente chamado a nossa atenção. A análise estatística dos nossos dados, porém revela (tabela 7, seção 1, subdivisão 1) que as plantas sadias, em tôdas as nossas séries, caracterizam-se por um teor significativamente maior em N total do que as plantas doentes. Esta diferença entre laranjeiras doentes e sadias embora se apresente nítida também nos enxertos, mostra-se de maneira ainda mais acentuada nos cavalos. Resumindo, para explicação destes resultados, algumas referências de literatura sobre alterações provocadas no metabolismo de plantas por doenças de virus, podemos lembrar aqui que a influência destas doenças sobre o metabolismo dos carboidratos é frequentemente oposta àquela sobre o das substâncias nitrogenadas, de maneira que em certas condições um aumento em carboidratos estaria correlacionado com uma diminuição em N. Tais alterações — aumento de carboidratos e diminuição do N — podem ser encontradas segundo os trabalhos de CAMPBELL (5, 1925), DUNLAP, (11, 1930) e COCKERHAM (7, 1933), principalmente nas doenças do tipo de "Yellow", ao passo que as doenças do tipo "mosaico" produziriam nas plantas afetadas efeitos opostos. Quanto à doença "tristeza" da laranjeira, ela parece segundo o seu quadro sintomatológico ter mais relação com as doenças do tipo "Yellow" do que do tipo mosaico. WYND (35, 1943, pag. 456) no resumo do seu apanhado crítico sobre alterações do metabolismo em plantas infeccionadas com virus conclui que usualmente nelas o teor em N total é menor do que em plantas sadias. Refere-se o mencionado autor ainda a três possíveis causas desta diminuição das quais uma, o aumento dos carbo-

idratos, que, aliás, só seria responsável por uma diminuição relativa do N, já foi lembrada por nós no primeiro item desta discussão. Como outras possíveis causas do baixo teor em N de plantas doentes WYND enumera um enfraquecimento, sob a influência da doença, da capacidade dessas plantas de transportar N solúvel e finalmente a possibilidade da perda do N ou de NH_3 , em forma de gás, pela intensa atividade redutora de organismos secundários, que invadiriam as plantas já infectadas por vírus.

No caso de laranjeiras atacadas pela "tristeza" seria provavelmente a segunda destas causas, quer dizer um impedimento no transporte de N que seria responsável pelo baixo teor das plantas nesta substância. Menciona ainda WYND que frequentemente em plantas que sofrem infecções por vírus, a proporção entre N protéico e solúvel é alterada em favor do último. Quer-nos parecer que também esta conclusão de WYND recebe uma certa confirmação pelos nossos dados.

Sabendo, porém, até agora muito pouco sobre as alterações gerais do metabolismo que a doença "tristeza" provoca nas laranjeiras, não queremos dar um valor demasiado às analogias no metabolismo entre esta e outras doenças de vírus, já mais amplamente estudadas, principalmente porque em nenhum dos casos citados, a doença de vírus está estritamente relacionada com a enxertia como na "tristeza".

Independentemente, porém, da questão, se no nosso caso a influência da "tristeza" sobre o teor em N seja exercida diretamente ou se primeiramente a zona de enxertia sofre alterações que repercutiriam mais tarde em outras partes da planta o resultado é muito semelhante ao que se observa em outras plantas atacadas por doenças de vírus e consiste num empobrecimento geral em N. Este empobrecimento da planta doente em N talvez possa ser aduzido para explicar porque na ligeira acumulação de nitrogênio que encontramos às vezes na base do enxerto doente a fração protéica participou menos do que a fração solúvel. De um lado poder-se-ia pensar num enfraquecimento, referido por WYND para diversas doenças de vírus, da capacidade das células para a síntese de proteínas. Por

outro lado sabemos dos trabalhos de numerosos autores, por exemplo de ENGARD (12, 1939) que a conversão de N solúvel em proteína só se realiza em partes da planta, com um alto teor em N solúvel assim como com carboidratos. No caso das laranjeiras atacadas pela tristeza é provável que na base do enxerto haja uma grande acumulação de carboidratos. O teor em N, porém, nesta zona, como aliás provavelmente na planta toda, é relativamente baixo, em consequência do ataque pela tristeza. Assim sendo, mesmo acima da zona da enxertia, não se encontram as condições indispensáveis para a formação de proteína quer dizer uma quantidade bastante elevada de N solúvel.

4) A Influência da doença sobre o teor em água.

Nos dados da tabela 6, que se referem às análises executadas no inverno de 1945, acham-se incluídos também os resultados das determinações do teor em água das nossas amostras. Por eles se verifica com grande nitidez, que enquanto nas plantas sadias há pouca ou nenhuma diferença no teor em água entre os dois componentes da enxertia, nas plantas doentes, o cavalo supera o enxerto consideravelmente no seu teor em água. A análise estatística (tabela 7) mostra que a diferença no teor em água tanto entre plantas doentes e sadias como também entre enxerto e cavalo das plantas doentes é significativa.

Quanto à importância destas observações, queremos fazer notar que elas constituem, em primeiro lugar, uma certa confirmação dos resultados de FRANCO e BACCHI (16, 1944). Esses autores verificaram (lug. cit. pag. 550) que a pressão osmótica em plantas sãs, de laranjeira Baía enxertada sobre azêda, acima e abaixo da região da enxertia é a mesma, ao passo que em plantas doentes esta pressão abaixo da região da enxertia é muito menor do que em cima.

Pode-se concluir da concordância destes dois grupos de observações que na planta doente o cavalo possui um menor peso em substância seca do que o enxerto e que a diferença deste peso seco a favor do enxerto consiste pelo menos grandemente, em substâncias osmoticamente ativas. As nossas ob-

servações já antes referidas indicam que entre elas às substâncias nitrogenadas só se deve atribuir um papel secundário.

Resta-nos ainda esclarecer, de que maneira, a nosso ver, se originou nas plantas doentes a diferença no teor em água, entre enxerto e cavalo. Podemos admitir que esta diferença é consequência do "efeito de barreira" que a zona de enxertia representa não só para a descida da seiva elaborada mas provavelmente também para a subida da seiva bruta, que, não obstante se realizar principalmente pelo lenho, deve repercutir na casca.

Parece portanto que não só a translocação no floema com a qual nos ocupamos nos capítulos anteriores é dificultada, na zona de enxertia, mas também que o transporte no xilema encontra nela obstáculos semelhantes.

Achamos necessário frisar aqui mais uma vez que na laranjeira doce enxertada sobre laranjeira azêda a zona de enxertia manifesta êste "efeito de barreira" só após e em consequência do ataque pela tristeza, já que em plantas sadias destas enxertias não notámos fenômenos como seja a diferença no teor de água nos dois componentes da planta enxertada. As plantas doentes portanto, adquirem ao patentear o "efeito de barreira" da zona de enxertia, caracteres que as tornam comparáveis com as enxertias designadas na literatura geralmente pelo termo "incompatíveis".

Assim por exemplo, CHANG (6, 1938), em estudos realizados com diferentes combinações de Rosáceas frutíferas verificou que os enxertos considerados "incompatíveis" continham menos água do que os compatíveis.

Em ensaios do mesmo autor que serviram para determinar a condutibilidade da zona de enxertia para água averiguou-se que as combinações "incompatíveis" só deixam passar a metade do volume de água das combinações compatíveis. Devemos observar semelhantes, referentes, porém, neste caso, a combinações de enxertias entre macieiras, a WARNE and RABY (34, 1939). Forçaram êstes autores, sob pressão constante, água através de pedaços de caule de 15 cm. Para estas experiências foram escolhidos pedaços comparáveis do enxerto e do cavalo e

outros que incluíram justamente a zona de enxertia. Nesta zona a condutibilidade era sempre menor do que no enxêrto e porta-enxêrto. Um valor especialmente baixo de condutibilidade foi demonstrado para a zona de enxertia de tôdas as combinações em que foi usado o cavalo M IX, que tem a propriedade de provocar nanismo nos enxertos.

Achamos êstes poucos exemplos suficientes para mostrar que em combinações do enxêrto e cavalo, chamados na literatura "incompatíveis", a zona de enxertia representa de fato, uma espécie de barreira não só para a corrente de assimilação que aflui para o cavalo das fôlhas do enxêrto, mas também para a corrente ascendente que usa como via o xilema, originando-se nas raízes e movimentando-se em direção às fôlhas.

Parece-nos interessante considerar, também, no caso de laranjeiras atacadas pela tristeza esta possibilidade do impedimento parcial, na zona de enxertia, da corrente ascendente, porque os autores, que até agora se ocuparam com o estudo de translocação em laranjeiras atacadas pela tristeza, talvez com excessão de FAWCETT (13, 1945), pensaram mais no efeito de "barreira" do floema.

O fato porém, demonstrado pelos dados da nossa tabela 6, de que em plantas doentes o cavalo possui maior teor em água do que o enxêrto faz supor que também a êste respeito há uma certa analogia entre as enxertias consideradas na literatura "incompatíveis" e as laranjeiras infeccionadas com tristeza.

Devemos, porém, frisar que a analogia entre êstes exemplos de "incompatibilidade" referidos na literatura e os nossos dados não é completa. Demonstram os autores dos referidos trabalhos que o teor em água de um enxêrto ligado a um cavalo com êle "incompatível" é inferior ao teor em água dêste mesmo enxêrto combinado com um cavalo "compatível". Não se preocuparam, por outro lado, os mencionados autores com as modificações do teor em água que o cavalo sofre sob a influência de enxertos compatíveis ou incompatíveis. As nossas observações, porém, se referem justamente ao fato de que os cavalos de laranjeira ligados com enxertos doentes — o que corres-

ponderia às combinações "incompatíveis" dos citados autores — caracterizaram-se por um teor consideravelmente maior em água, não só quando comparado com o respectivo valor dos enxertos, mas mesmo com o de cavalos de laranjeira sadia. Para explicar este fenômeno com mais clareza, queremos mais uma vez frisar que tanto nas mencionadas enxertias "incompatíveis" como nas laranjeiras atacadas pela tristeza, o teor em água do enxerto é inferior ao do cavalo. Parece, porém, que no primeiro caso este desequilíbrio provém mais de um déficit de água no enxerto e no segundo de um aumento de água no cavalo. Algumas análises, condensadas na nossa tabela 6, demonstraram que até os **enxertos** de muitas plantas doentes superam no seu teor em água os de plantas sadias e a análise estatística (tabela 7, seção 1, subdivisão 1) confirma que mesmo os enxertos das plantas doentes continham significativamente mais água do que aquêles das plantas sadias. Portanto, provavelmente nas plantas doentes além de um possível aumento do teor d'água no cavalo devido ao efeito da barreira sobre a seiva ascendente, um aumento generalizado no conteúdo em água que talvez possa ser explicado de outra maneira.

Poder-se-ia tratar neste caso de uma alteração de metabolismo causada por doença de vírus. É verdade que WYND (35, 1943) no seu apanhado crítico da literatura sobre fenômenos do metabolismo relacionados com a infecção de plantas por vírus chegou à conclusão, que geralmente as plantas doentes contêm maior teor em substância seca. Mais recentemente, porém, SELMAN (31, 1945) estudou em tomateiros as relações existentes entre infecção por vírus e transpiração e resume também num apanhado rápido a literatura referente à influência que as doenças de vírus exercem sobre o teor em água das plantas atacadas.

Depreende-se deste apanhado que doenças desta natureza em alguns casos provocam um aumento, em outros uma diminuição da transpiração. Não queremos deixar de mencionar em todo caso, que KAHO (17, 1935) verificou em batatinhas "degeneradas" pelo efeito de doenças de vírus um aumento da permeabilidade para água das membranas nas células dos tubérculos.

TABELA I

Resultados obtidos com o método Kjeldahl-Gunning-Arnold (A) e o método de Kjeldahl modificado para incluir N dos nitratos (B)

Amostras de cascas de plantas do pomar do Instituto Biológico de São Paulo.

Planta	N total o/o da substância fresca		B - A	
	A	B		
1 — Doente	Enxêrto	0,460	0,478	0,018
	Cavalo	0,366	0,361	—0,005
2 — Doente	Enxêrto	0,509	0,531	0,022
	Cavalo	0,388	0,402	0,014

TABELA 2

N total em amostras de casca de laranjeiras sadias e doentes, colhidas de Agosto a Outubro de 1944

Plantas	Data	Componente	N total o/o Substância fresca
1 — Sadia	18-8-44	Enxêrto	0,75
		Cavalo	0,75
2 — Sadia	18-8-44	Enxêrto	0,63
		Cavalo	0,62
3 — Sadia	18-8-44	Enxêrto	0,86
		Cavalo	0,86
4 — Doente	18-8-44	Enxêrto	0,71
		Cavalo	0,64
5 — Doente	18-8-44	Enxêrto	0,67
		Cavalo	0,57

(Conclui na página seguinte)

Plantas	Data	Componente	N total o/o Substância fresca
6 — Doente	18-8-44	Enxêrto	0,64
		Cavalo	0,61
7 — Doente	18-8-44	Enxêrto	0,62
		Cavalo	0,56
8 — Doente	18-8-44	Enxêrto	0,57
		Cavalo	0,52
9 — Doente	18-8-44	Enxêrto	0,62
		Cavalo	0,54
10 — Quase morta	18-8-44	Enxêrto	0,88
		Cavalo	0,66
1 — Sadia	12-9-44	Enxêrto	0,86
		Cavalo	0,86
2 — Sadia	12-9-44	Enxêrto	0,63
		Cavalo	0,62
3 — Doente	12-9-44	Enxêrto	0,71
		Cavalo	0,64
4 — Doente	12-9-44	Enxêrto	0,57
		Cavalo	0,52
1 — Sadia	3-10-44	Enxêrto	0,63
		Cavalo	0,63
2 — Sadia	3-10-44	Enxêrto	0,81
		Cavalo	0,87
3 — Sadia	3-10-44	Enxêrto	0,77
		Cavalo	0,81
4 — Sadia	3-10-44	Enxêrto	0,89
		Cavalo	0,94
5 — Doente	3-10-44	Enxêrto	0,62
		Cavalo	0,51
6 — Doente	3-10-44	Enxêrto	0,70
		Cavalo	0,61
7 — Doente	3-10-44	Enxêrto	0,57
		Cavalo	0,54
8 — Doente	3-10-44	Enxêrto	0,63
		Cavalo	0,58

TABELA 3

N protéico e não protéico em amostras de casca de laranjeiras sadias e doentes colecionadas de Outubro a Novembro de 1944

Planta	Data	Componente	N % substância fresca		
			protéico	não protéico	total
1 — Sadia	17-10-44	Enxêrto	0,455	0,107	0,562
		Cavalo	0,477	0,150	0,627
2 — Sadia	17-10-44	Enxêrto	0,570	0,190	0,760
		Cavalo	0,605	0,225	0,830
3 — Doente	17-10-44	Enxêrto	0,414	0,124	0,538
		Cavalo	0,420	0,093	0,513
4 — Doente	17-10-44	Enxêrto	0,465	0,130	0,595
		Cavalo	0,486	0,106	0,592
5 — Doente	17-10-44	Enxêrto	0,458	0,149	0,607
		Cavalo	0,432	0,097	0,529
1 — Sadia	8-11-44	Enxêrto	0,480	0,19	0,67
		Cavalo	0,530	0,19	0,72
2 — Sadia	8-11-44	Enxêrto	0,52	0,20	0,72
		Cavalo	0,53	0,21	0,74
3 — Sadia	8-11-44	Enxêrto	0,50	0,18	0,68
		Cavalo	0,50	0,15	0,65
4 — Doene	8-11-44	Enxêrto	0,42	0,19	0,61
		Cavalo	0,44	0,13	0,57
5 — Doente	8-11-44	Enxêrto	0,38	0,16	0,54
		Cavalo	0,36	0,11	0,47

TABELA 4

N protéico e não protéico em amostras de casca de laranjeiras sadias e doentes colhidas em Janeiro e Fevereiro de 1945

Planta	Data	Componente	N % substância fresca		
			protéico	não protéico	total
1 — Sadia	23-1-45	Enxertia Cavalo	0,590	0,188	0,780
			0,618	0,150	0,768
2 — Sadia	23-1-45	Enxertia Cavalo	0,559	0,145	0,704
			0,433	0,107	0,740
3 — Sadia	23-1-45	Enxertia Cavalo	0,453	0,155	0,698
			0,602	0,100	0,702
4 — Doente	23-1-45	Enxertia Cavalo	0,587	0,145	0,732
			0,582	0,110	0,700
5 — Doente	23-1-45	Enxertia Cavalo	0,520	0,100	0,620
			0,653	0,061	0,714
1 — Sadia	20-2-45	Enxertia Cavalo	0,535	0,109	0,644
			0,572	0,085	0,657
2 — Sadia	20-2-45	Enxertia Cavalo	0,585	0,146	0,736
			0,610	0,114	0,724
3 — Doente	20-2-45	Enxertia Cavalo	0,531	0,085	0,616
			0,449	0,064	0,563
4 — Doente	20-2-45	Enxertia Cavalo	0,495	0,068	0,563
			0,470	0,065	0,535

TABELA 5

N protéico e não protéico em amostras de casca de plantas doentes e sadias, colhidas em 8 de Março de 1945

1.a Série — Análises iniciadas no mesmo dia da colheita da amostra.

2.a Série — Análises iniciadas no dia seguinte

Planta	Componente	Série	N % de substâncias frescas		
			protéico	não protéico	total
1 — Sadia	Enxêrto	1.a	0,413	0,157	0,570
		2.a	0,478	0,096	0,564
	Cavalo	1.a	0,490	0,122	0,612
		2.a	0,512	0,084	0,597
2 — Sadia	Enxêrto	1.a	0,572	0,168	0,740
		2.a			
	Cavalo	1.a	0,520	0,126	0,646
		2.a	0,550	0,092	0,642
3 — Sadia	Enxêrto	1.a	0,500	0,180	0,680
		2.a	0,543	0,144	0,687
	Cavalo	1.a	0,503	0,148	0,651
		2.a	0,553	0,105	0,658
4 — Doente	Enxêrto	1.a	0,480	0,120	0,600
		2.a	0,515	0,098	0,613
	Cavalo	1.a	0,477	0,080	0,557
		2.a	0,492	0,070	0,562
5 — Doente	Enxêrto	1.a	0,426	0,081	0,507
		2.a	0,434	0,064	0,498
	Cavalo	1.a	0,441	0,068	0,509
		2.a	0,451	0,034	0,485
6 — Doente	Enxêrto	1.a	0,438	0,104	0,542
		2.a	0,469	0,072	0,541
	Cavalo	1.a	0,445	0,065	0,510
		2.a	0,451	0,060	0,511

TABELA 6

N protéico e não protéico em amostras de casca de laranjeiras sadias e doentes, colhidas de Junho a Novembro de 1945

Planta	Data	Componente	N % substância fresca			
			protéico	não protéico	total	Água
1 — Sadia	7-6-45	Enxérto	0,625	0,162	0,787	49,5
		Cavalo	0,646	0,154	0,800	49,3
2 — Sadia	7-6-45	Enxérto	0,597	0,198	0,795	48,8
		Cavalo	0,601	0,130	0,731	50,0
3 — Sadia	7-6-46	Enxérto	0,669	0,293	0,882	50,4
		Cavalo	0,672	0,206	0,878	50,3
4 — Doente	7-6-45	Enxérto	0,451	0,112	0,563	52,3
		Cavalo	0,468	0,078	0,546	54,0
5 — Doente	7-6-45	Enxérto	0,428	0,101	0,529	52,2
		Cavalo	0,435	0,080	0,515	53,5
6 — Doente	7-6-45	Enxérto	0,446	0,075	0,521	52,9
		Cavalo	0,422	—	—	54,8
1 — Sadia	2-8-45	Enxérto	0,505	0,173	0,678	50,2
		Cavalo	0,524	0,148	0,672	50,1
2 — Sadia	2-8-45	Enxérto	0,557	0,169	0,726	51,0
		Cavalo	0,604	0,128	0,732	50,6
3 — Sadia	2-8-45	Enxérto	0,610	0,182	0,792	—
		Cavalo	0,657	0,138	0,795	—
4 — Doente	2-8-45	Enxérto	0,486	0,106	0,592	51,2
		Cavalo	0,480	0,093	0,573	54,1
5 — Doente	2-8-45	Enxérto	0,484	0,119	0,603	52,2
		Cavalo	0,477	0,070	0,547	54,0
6 — Doente	2-8-45	Enxérto	0,439	0,077	0,516	—
		Cavalo	0,479	0,065	0,544	—

(Conclui na página seguinte)

Planta	Data	Compo- nente	N o/o Substância fresca			
			protéico	não protéico	total	Água
1 — Sadia	13-9-45	Enxêrto	0,539	0,154	0,693	51,6
		Cavalo	0,631	0,094	0,725	51,6
2 — Sadia	13-9-45	Enxêrto	0,550	0,104	0,654	49,5
		Cavalo	0,580	0,095	0,683	48,2
3 — Sadia	13-9-45	Enxêrto	0,580	0,117	0,697	48,7
		Cavalo	0,608	0,093	0,701	49,1
4 — Sadia	13-9-45	Enxêrto	0,522	0,096	0,618	49,5
		Cavalo	0,615	0,081	0,696	49,5
5 — Doente	13-9-45	Enxêrto	0,408	0,063	0,471	54,0
		Cavalo	0,393	0,056	0,449	56,1
6 — Doente	13-9-45	Enxêrto	0,486	0,084	0,570	52,7
		Cavalo	0,473	0,092	0,565	54,8
7 — Doente	13-9-45	Enxêrto	0,401	0,060	0,461	53,5
		Cavalo	0,427	0,050	0,477	54,8
8 — Doente	13-9-45	Enxêrto	0,466	0,081	0,547	51,1
		Cavalo	0,482	0,062	0,544	54,4
1 — Sadia	22-11-45	Enxêrto	0,48	0,11	0,59	51,8
		Cavalo	0,53	0,11	0,64	51,8
2 — Sadia	22-11-45	Enxêrto	0,57	0,14	0,71	49,4
		Cavalo	0,60	0,13	0,73	49,8
3 — Sadia	22-11-45	Enxêrto	0,53	0,18	0,71	51,6
		Cavalo	0,55	0,13	0,68	51,4
4 — Sadia	22-11-45	Enxêrto	0,58	0,17	0,75	49,2
		Cavalo	0,63	0,14	0,77	49,2
5 — Doente	22-11-45	Enxêrto	0,50	0,12	0,62	48,5
		Cavalo	0,47	0,07	0,54	54,4
6 — Doente	22-11-45	Enxêrto	0,41	0,06	0,47	48,4
		Cavalo	0,39	0,07	0,46	53,2
7 — Doente	22-11-45	Enxêrto	0,40	0,05	0,45	48,8
		Cavalo	0,40	0,04	0,44	52,8
8 — Doente	22-11-45	Enxêrto	0,41	0,04	0,47	51,9
		Cavalo	0,40	0,04	0,44	57,2

SUMMARY

Contribution to the knowledge of the N-metabolism in "tristeza"-diseased orange trees.

N. Meneghini e K. Silberschmidt

1) The present study comprises the results of quantitative determinations of the N-content of the bark of healthy and spontaneously "tristeza"-diseased orange trees of an orchard. Each determination included an analysis of the N-content of the stock as well as of the scion. As samples for the analysis always were chosen equal, rectangular patches of the bark. (fig. 1).

2) Our determinations have been performed in the period extending from August 1944 to November 1945. Within this time we carried out three series of experiments with an interval of a few months from each other.

Owing to this fact and to the relative uniformity of the results obtained in each series of experiments, we present their results in chronological order and in separate tables. Table 1, which is independent of this order, just shows that the $\text{NO}_3\text{-N}$, only partly covered by the Kjeldahl method, in our case is so small, that it may be disregarded for computing the figures of total N. Tables 2 and 3 refer to our first series of experiments, table 4 and 5 summarize the results of our second group of determinations and table 6 presents the figures obtained in our last group of experiments. A statistical analysis of all our results is given in table 7.

That table is composed of two sections. In the first section all figures (i. e. the differences in N- and water-content between healthy and diseased plants as well as those between scion and stocks) are considered as percentages of the fresh weight, whereas in the second section the contents (in N and water) of the scions are accounted as percentages of the contents (in the same substances) of the stocks.

Séries	Tabelas	Data	Fração	n				Sadia-P	
				Sadias		Doentes		Enxêrtos	
				Enx.	Cav.	Enx.	Cav.	M - M'	P
1.a	2	18-8-944							
		12-9-944	N total	9	9	12	12	0,123	<0,01
		3-10-944							
	3	17-10-944	N protéico	5	5	5	5	0,078	0,01 a 0,02
		8-11-944	N não prot.	5	5	5	5	0,023	0,2 a 0,3
			Total	5	5	5	5	0,100	0,02 a 0,05
2 a	4 e 5	23-1-945	N protéico	8	8	7	7	0,041	0,2 a 0,3
		20-2-945	N não prot.	8	8	7	7	0,056	<0,01
		8-3-945	Total	8	8	7	7	0,097	0,01 a 0,02
3 a	6	7-6-945	N protéico	14	14	14	14	0,122	<0,01
		2-8-945	N não prot.	14	14	14	13	0,071	<0,01
		13-9-945	Total	14	14	14	13	0,193	<0,01
		22-11-945	Água	13	13	13	13	— 1,4	0,02 a 0,05

TABELA 7

Análises estatísticas dos resultados contidos nas tabelas 2-6

Por % de substância fresca						(Seção I)		Diferença entre % do teor	
Cavalos		Enxêrto-Cavalo				Sadias			
M'	P	M - M'	P	M - M'	P	M	P		
03	<0,01	— 0,015	0,7 a 0,8	0,065	<0,01	— 1,41	0,2 a 0,3		
01	<0,01	— 0,023	0,4 a 0,5	0,00	—	— 4,34	0,05		
78	<0,01	— 0,012	0,6 a 0,7	0,043	0,01	— 5,79	0,5 a 0,6		
79	<0,01	— 0,035	0,4 a 0,5	0,044	0,1 a 0,2	— 5,31	0,1 a 0,2		
59	0,05 a 0,1	— 0,031	0,2 a 0,3	— 0,013	0,7 a 0,8	— 5,35	0,05 a 0,1		
16	<0,01	0,037	<0,01	0,027	0,02 a 0,05	30,5	<0,01		
05	0,01 a 0,02	0,007	0,8 a 0,9	0,013	0,8 a 0,9	0,99	0,6 a 0,7		
30	<0,01	— 0,037	0,02 a 0,05	0,00	—	— 6,28	<0,01		
50	<0,01	— 0,028	0,02 a 0,05	0,017	0,05	19,96	<0,01		
00	<0,01	— 0,010	0,7 a 0,8	0,017	0,4 a 0,5	— 1,56	0,2 a 0,3		
	<0,01	0,00	—	— 2,7	<0,01	0,24	0,6 a 0,7		

3) In our first experiments (table 2, which represents part of the results obtained in our first series), we restricted to determinations of the total N-content. Later on (table 3-6) we analyse the content of every sample in proteic-and not proteic N. In those cases we obtained the figures of the total N by summing up the results for those two fractions.

4) With regard to the influence of "tristeza" disease on the N-content of the bark of scion and stock, in the first part of our first group of experiments we found a slight but significant superiority of total N in the scion of diseased trees, whereas in healthy plants there was no noticeable difference in the N-content of scion and stock (table).

5) Continuing our observations, we verified (table 3) that the non-proteic fraction of N is to a great extent responsible for this slight difference in the content of total N between scion and stock of "tristeza"-diseased orange-trees, which was then smaller than in the beginning, though still significant (table 7).

6) In the course of the second series of observations (table 4 and 5) we failed to confirm the occurrence of significantly higher figures of total N in the scion than in the stock of diseased plants. Still this slight superiority in the N content of the scion over the stock was found more commonly in diseased than in healthy plants. Whenever it occurred, the higher content of the scion in non-proteic N accounted for the difference of the total N. In our last series of determinations (table 6) the difference in the content of total N between scions and stocks of diseased plants — in favour of the scions — appeared again, although in lesser degree. Nevertheless the difference in the N-content between scion and stock of diseased plants was also in this case statistically significant (table 7).

It may be worth mentioning that these experiments have been performed during the same season of the year-but twelve months later-than those condensed in table 3 and with which they show some similarity.

7) The differences in the N-figures between scions and stocks of diseased plants were never high enough to justify

the supposition of a real accumulation of N-substances above the graft zone.

8) Besides making this comparison between the N-content of scion and stock we also tried to compare the figures of N determined in healthy plants with those found in diseased orange trees. In this respect we verified (table 2-6) that the diseased plants contain distinctly less N than the healthy ones. This statistically significant (table 7) difference between healthy and "tristeza"-diseased plants can be observed in the scions as well as in the stocks, but is higher in the latter.

9) Whereas the water-content of the two graft-components in healthy orange-trees proved to be equal or, at least, not significantly different, the stocks of diseased plants were found to contain more water than the scions (table 6). Accordingly it seems, that the graft zone of "tristeza"-diseased orange trees offers a certain difficulty to the passage of the transpiration flow from the stocks to the scions, which is also reflected in the lower figures of the water-content of the bark of the scion compared with the stock. Item 10 shows, however, that other causes must be also taken into consideration.

10) A comparison of the water-content of healthy and "tristeza"-diseased plants shows (table 6 and 7), that the orange trees affected with "tristeza" hold significantly more water than the healthy ones. This difference is particularly marked between the stocks, but proves correct also for the scions (table 7).

11) In the discussion we try to contrast our observations with references of the literature on metabolic phenomena associated with virus infection as well as on food translocation in heteroplastic grafts.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BARTON — WRIGHT E. C. — 1930 — Recent advances in plant physiology, J. and A. Churchill, pg. 352.
- 2 — BITANCOURT A. A. — 1940 — A doença dos Citrus no vale do Paraíba. O Biológico 6 : 268-269.
- 3 — BONNER J. — 1944 — Accumulation of various substances in girdled stems of tomato plants. Am. Journal of Bot. 31 : 551-55.
- 4 — CAMERON S. H. and COMPTON O. C. — 1945 — Nitrogen in bearing orange trees. Proc. Amer. Soc. for Hort. Science 46 : 60-68.
- 5 — CAMPBELL E. G. — 1925 — Potato leaf roll as affecting the carbohydrate, water, and nitrogen content of the host. Phytopath. 15 : 427-30.
- 6 — CHANG WEN — TSAI — 1938 — Studies in incompatibility between stock and scion, with special reference to certain deciduous fruit-trees. Jour. of Pomol 15 : 267-325.
- 7 — COCKERHAM, G. — 1933 — Variations in the total nitrogen-content of normal and leaf-roll potatoes. Proc. of the Leeds Philos. Soc. (Scientific Section) II, 8 : 375-82.
- 8 — COLBY H. — 1935 — Stock-scion chemistry and the fruiting relationships in apple trees. Plant Phys. 10 : 483-498.
- 9 — DOOLITTLE R. E. and OTHERS — 1945 — Official and tentative methods of analysis of the Association of official Agricultural Chemists. Washington D. C., 932 pg. 6th edition.

- 10 — DRUMMOND — GONÇALVES R. — 1942 — A doença dos Citrus no vale no Paraíba : O Biológico VIII : 199-207.
- 11 — DUNLAP A. A. — 1930 — The total nitrogen and carbohydrates, and the relative rates of respiration in virus-infected plants. Americ. Journ. of Botany 17 : 348-357.
- 12 — ENGARD CH. J. — 1939 -- Translocation of nitrogenous substances in the Cuthebert raspberry. The Bot. Gaz. 101 : 1-34.
- 13 — FAWCETT H. S. — 1945 — A starch test for quick decline. The California Citrograph 30 : 122.
- 14 — FAWCETT H. S. — 1946 — Quick decline studies. The California Citrograph, 31 : 198-199, 207, 210 — 15.
- 15 — FAWCETT H. S. and WALLACE J. M. — 1946 — Evidence of the virus nature of Citrus quick decline. Calif. Citrogr. 32 : 88-89.
- 16 — FRANCO C. M. e O. BACCHI — 1944 — Investigações sobre a "tristeza" dos Citrus. Bragantia 4 : 541-552.
- 17 — KAHO H. — 1935 — Zur Physiologie der Kartoffeln. Über die Permeabilität des Knollengewebes der vitalen und der abbaukranken Kartoffeln. Phytopathol. Zeitscher. VIII : 157-164.
- 18 — KENCH J. E. — 1939 — The seasonal cycles of ash, carbohydrate and nitrogenous constituents in the terminal shoots of apple trees and the effect of five vegetatively propagated root-stocks on them. III. Nitrogenous constituents. Jour. of Pomol. 16 : 346-63.
- 19 — KOSTOFF D. — 1931 — Studies on the acquired immunity in plants. Svedenia po Zembedelieto. Ogodina 12 : 47-68.

- 20 — LOOMIS W. E. — 1939 — The translocation of nitrogen in woody plants. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 32 : 61-64 — Refer. Biol. Abstr. 1936, 10 : 1641.
- 21 — MASKELL E. J. and MASON T. G. — 1929 — Studies on the transport of nitrogenous substances in the cotton plant II. Observations on concentration gradient. Ann. of Bot. 43 : 615-52.
- 22 — MASKELL E. J. and MASON T. G. — 1929 — Studies on the transport of nitrogenous substances in the cotton plant I. Preliminary observations on the downward transport of N in the stem. Ann. Bot. 43 : 205-231.
- 23 — MASKELL E. J. and MASON T. G. — 1930 — Studies on the transport of nitrogenous substances in the cotton — plant III. The relation between longitudinal movement and concentration gradients in the bark. Ann. of Bot. 44 : 1-29.
- 24 — MASKELL E. J. and MASON T. G. — 1930 — Studies on the transport of nitrogenous substances in the cotton plant IV. The interpretation of the effects of ringing, with special reference to the lability of the nitrogen compounds of the bark. Ann. of Bot. 44 : 233-269.
- 25 — MASKELL E. J. and MASON T. G. — 1930 — Studies on the transport of nitrogenous substances in the cotton plant V. Movement to the boll. Ann. Bot. 44 : 657-688.
- 26 — MENEGHINI M. — 1946 — Sobre a natureza e transmissibilidade da doença "tristeza" dos Citrus. O Biologico 12 : 285-287.
- 27 — MOTHESS K. 1931 — Zur Kenntnis des N — Stoffwechsels höherer Pflanzen. 3. Beitrag — Planta 12 : 686-731.

- 28 -- SCHNEIDER H. and FAWCET H. S. et al -- 1946 -- Quick decline studies, a progress report. Calif. Citrograph **31** : 198-199, 207, 210 215.
- 29 -- SCHNEIDER H. -- 1946 -- Sieve-tube necrosis in orange-trees affected by quick decline during the spring season. Phytopath. **37** : 364.
- 30 -- SCHNEIDER H., A. A. BITANCOURT, and V. ROSSETTI -- 1947 -- Similarities in the pathological anatomy of quick -- decline and tristeza -- diseased orange trees. Phytopath. **37** : 845.
- 31 -- SELMAS I W. -- 1945 -- Virus infection and water loss in tomato foliage. Journal of Pomodogy and Hort. Sciences **XXI** : 146-54.
- 32 -- SILBERSCHMIDT K. -- 1933 -- Beiträge Zur Kenntnis der Stoffwechselfgemeinschaft zwischen Pfropfpartnern. Planza **19** : 239-780.
- 33 -- SILBERSCHMIDT K. -- 1934 -- Weitere Versuche über die N-Verteilung in Pfropfungen und Stecklingen. Planza **22** : 1-22.
- 34 -- WARNE L. G. G. and RABY J. -- 1939 -- The water conductivity of the graft union in apple trees, with special reference to malling rootstock No IX. J. of Pomol. **16** : 389-399. Ref. em Ber. üb. d. wiss. Biol. **50** : 187, 1939.
- 35 -- WYND F. L. -- 1943 -- Metabolic phenomena associated with virus infection in plants. The Botanical Review **9** : 395-465.