

BRAGANTIA

Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas
INSTITUTO AGRONÔMICO

Vol. 4

Campinas, Setembro de 1944

N.º 9

INVESTIGAÇÕES SÔBRE A "TRISTEZA" DOS CITRUS

I. ALTERAÇÕES DA PRESSÃO OSMÓTICA

Coarací M. Franco
e
Oswaldo Bacchi

INTRODUÇÃO

Embora não acreditássemos, desde o início do aparecimento da "Tristeza" dos Citrus, em qualquer causa primária fisiológica, tal como deficiência de nutrição, etc., julgávamos que seriam úteis, pelo menos aos fitopatologistas, algumas observações sôbre a fisiologia comparada de plantas sãs e doentes. Assim foi, pois, que empreendemos o presente trabalho.

De qualquer forma, tudo o que constatarmos não passará do efeito de alguma moléstia infecciosa. O fato de a "Tristeza" aparecer em todos os tipos de solo e clima de nosso Estado, e atacar plantas que viveram dezenas de anos em pleno vigor ao lado de plantas novas, põe fora de cogitação qualquer causa fisiológica. Nenhuma incompatibilidade ou deficiência de nutrição explicaria aquêles fatos, sobejamente constatados.

Desde que a Tristeza sômente ataca plantas enxertadas sôbre cavalo de laranja azêda e, uma vez eliminado o cavaleiro doente, o cavalo brota e reconstitue uma laranjeira azêda sã, pensamos na existência de alguma anomalia, na região da união do cavaleiro com o cavalo.

Por êsse motivo, quisemos investigar, de início, se havia acúmulo de substâncias, quer minerais, quer orgânicas, abaixo e acima daquela região.

As dosagens dos elementos minerais, que foram executadas pela Secção de Química Mineral dêste Instituto, não mostraram nenhuma diferença que nos levasse a qualquer conclusão sôbre o acúmulo daqueles elementos na região do enxêrto. Foram dosados os seguintes elementos: K, P, N, Mg, Mn, Fe e Ca.

A pressão osmótica nos daria, então, informação segura sobre o acúmulo de substâncias orgânicas solúveis.

A fim de completar o nosso trabalho, estendemos as pesquisas às várias plantas utilizadas como cavalo e cavaleiro, e fizemos determinações da pressão osmótica, também nas folhas e nas raízes. Utilizamos-nos de plantas de diversos ensaios, na Estação Experimental de Limeira. Esse material foi ótimo, por terem todas as plantas aproximadamente a mesma idade (de 7 a 9 anos) e acharem-se sobre o mesmo solo.

MÉTODO DA DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO OSMÓTICA

Empregamos o método crioscópico, segundo a técnica descrita por W. Heinrich (1).

Passaremos a descrever, sumariamente, a técnica que empregamos, uma vez que serão encontrados detalhes no trabalho acima citado.

a) Tomada das amostras --- Para se trabalhar com este método, basta cerca de 1,5cc de suco, obtido de cerca de 10 gramas de substância vegetal fresca. Trabalhamos sempre com suco das folhas, da casca do caule e da raiz.

O material, colhido sempre em quantidade maior do que a necessária, era colocado em recipientes idênticos aos descritos e aconselhados por Heinrich. Estes constam de um tubo de vidro bem fechado por rolha de cortiça, colocado firmemente no interior de uma caixa de alumínio com a mesma forma e com tampa rosqueada.

A colheita de material era feita tão rapidamente quanto possível, a fim de evitar perdas de água por evaporação. Uma vez trazidos para o laboratório, os frascos eram aquecidos em banho-maria durante 20-30 minutos, com o objetivo de se eliminar a ação das enzimas e ao mesmo tempo obter uma esterilização parcial.

Tivemos o cuidado de proceder à colheita das amostras sempre na mesma hora do dia. Isto para evitar a influência que tem a hora da colheita do material sobre o teor em água no mesmo, o que é particularmente verdade no caso das folhas, que perdem mais água por transpiração nas horas mais quentes.

Embora tivéssemos observado, em trabalho prévio, que a influência da exposição sobre a pressão osmótica era insignificante, colhemos sempre o material de vários pontos ao redor da planta, a fim de obtermos uma amostra média. No caso das folhas, estas eram ainda colhidas sempre na mesma altura da copa, pois a pressão osmótica varia com a altura em que se acha a folha na planta.

b) Obtenção do suco — Para a obtenção do suco, servimo-nos de uma prensa hidráulica, "Kleiman", para laboratório. A amostra era envolvida em um pedaço de pano de algodão, não muito espesso, e submetida à pressão de 300 atmosferas. Esta pressão era mantida durante 10 minutos. A determinação crioscópica era feita imediatamente, a fim de evitar perdas de água, por evaporação.

c) Determinação do ponto de congelação e pressão osmótica — Para esta operação, empregamos um microcrioscópio de Drucker-Burian, cujo termômetro possui uma escala marcando de $+0,5^{\circ}\text{C}$ a $5,5^{\circ}\text{C}$, com divisões de 1-50 graus centígrados. A figura 1 ilustra êsse aparelho. O vaso **a** contém uma mistura de gelo e sal, na qual está mergulhado um frasco de forma especial **b**. Entre êste e o outro frasco **c**, da mesma forma, porém menor, fica uma câmara de ar que tem por fim uniformizar a temperatura no interior do mesmo frasco **c**, que contém o suco a ser determinado o ponto de congelação. A extremidade do termômetro fica mergulhada no suco até cerca de 2 mm acima do seu bulbo. A alça metálica **e** presta-se para agitar, de quando em vez, a mistura de gelo e sal, enquanto que a outra alça menor **f**, de platina, serve para agitar o suco durante o resfriamento.

Para maior rapidez, o frasco **c**, contendo o suco, é super-congelado em um segundo vaso contendo mistura de gelo e sal, até à temperatura de -4°C . Enquanto isto, agita-se lentamente a alça de platina. Alcançada esta temperatura, é êle retirado, enxuto muito rapidamente com um pano, e colocado no interior do frasco **b**. Pela mesma abertura, atravessada pela haste de platina, introduz-se no suco um tubo capilar, com cerca de 10 cm de comprimento, contendo água congelada. (Êstes capilares são preparados da seguinte maneira: mergulham-se as suas pontas em água destilada, para que esta suba no seu interior por capilaridade. Em seguida são colocados, com as extremidades no interior de um tubo de ensaio fechado com rôlha de cortiça, através de aberturas feitas nessa mesma rôlha. Êste tubo de ensaio é, então, pôsto na mistura de gelo e sal, sendo aí conservado. A água no interior dos capilares se congela).

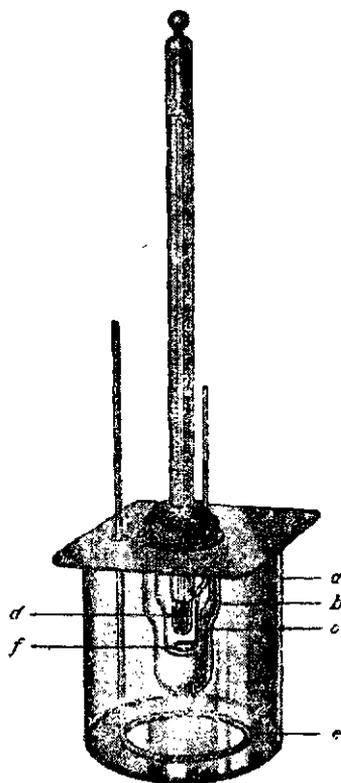


Figura 1
Microcrioscópio Drucker-Burian

Em contacto com os minúsculos cristais de gelo da extremidade do capilar, o suco se congela rapidamente. Retira-se imediatamente o capilar e agita-se enérgicamente o suco com a alça de platina. Com a rápida congelação do suco que estava super-congelado, o termómetro sobe bruscamente, permanecendo parado por algum tempo em uma determinada temperatura, após o que cai lentamente. Lê-se a temperatura máxima na qual a coluna termométrica esteve parada e anota-se. Esta temperatura acha-se próxima à do ponto de congelação do suco. Para exemplo, digamos que é $-1,37^{\circ}\text{C}$.

Retira-se o frasco **c**, contendo o suco, o qual é aquecido ao ar ou entre uma das mãos, ao mesmo tempo que se agita a alça de platina **f**. Com isto levamos o suco até completa fusão.

Refrigera-se novamente o frasco **c**, com o suco, no segundo vaso com mistura de gelo e sal, conforme já nos referimos atrás. Desta vez, porém, leva-se este frasco **c** para o interior do frasco **b**, antes que o suco atinja o ponto de congelação. Aí, agitando-se muito lentamente com a alça de platina **f**, é ele super-congelado até a temperatura de 1°C abaixo do ponto de congelação observado na primeira leitura. Alcançada essa temperatura, que de acôrdo com o nosso exemplo acima seria de $-2,37^{\circ}\text{C}$, injeta-se um capilar congelado no suco, retirando-o logo em seguida. Move-se enérgicamente o agitador de platina **f**, enquanto a coluna de mercúrio do termómetro sobe. Lemos, desta vez, digamos $-1,31^{\circ}\text{C}$. Repete-se então todo o processo, mas injetando-se o suco com o capilar na temperatura de $-2,31^{\circ}\text{C}$ (1°C abaixo do segundo ponto de congelação encontrado na leitura anterior). Dando esta determinação uma diferença maior do que $0,006^{\circ}\text{C}$, em comparação com a anterior, deve o processo ser novamente repetido. Uma vez obtido o ponto de congelação exato do suco, uma simples tabela nos dará, em atmosferas, a pressão osmótica correspondente.

Deixamos de transcrever aquí essa tabela, por se achar no trabalho já citado (1) e existir também impressa em vários compêndios de constantes físico-químicas.

Certos cuidados devem ser tomados enquanto se fazem as determinações do ponto de congelação. Assim, não se deve usar o mesmo capilar senão nas determinações da mesma amostra. Ao se trocar de amostra deve o crioscópio ser muito bem lavado e enxuto com pano muito limpo, ou, se houver excesso de material, lavá-lo uma última vez, com uma pequena quantidade do suco com o qual se vai trabalhar. O frasco **a** do crioscópio, bem como o segundo frasco usado para as super-congelações, devem ser envoltos em pano, a fim de que a mistura refrigerante de gelo e sal dure o máximo.

Todo o cuidado deve ser tomado a fim de não cair sal no suco, pois isto falsificaria os resultados obtidos.

RESULTADOS OBTIDOS

Resumimos no quadro I os resultados gerais obtidos em tôdas as variedades e combinações estudadas.

QUADRO I
PRESSÃO OSMÓTICA

Quadro geral dos resultados

Plantas N.º	VARIEDADES E COMBINAÇÕES	REGIÕES NAS PLANTAS			
		Fólha	Caule acima do enxêrto	Caule abaixo do enxêrto	Raiz
1-2-3	Laranja azêda de pé franco. Plantas sãs	21,24	13,39 (*)	13,78 (*)	15,33
18-19	Laranja caipira de pé franco. Plan- tas sãs	15,02	12,62 (*)	12,32 (*)	19,49
20-21	Limão eureka de pé franco. Plantas sãs	15,22	8,59 (*)	8,23 (*)	13,48
22-23	Laranja pêra de pé franco. Plantas sãs	16,00	11,98 (*)	11,80 (*)	14,41
16-17	Limão eureka enxertado sôbre laranja azêda. Plantas sãs	16,72	9,90	10,48	11,56
24-25	Laranja baianinha enxertada sôbre caipira. Plantas sãs	17,30	10,92	11,60	13,80
4-5-6	Laranja Bahia enxertada sôbre azêda. Plantas sãs	18,73	13,25	13,37	18,20
9-12	Laranja Bahia enxertada sôbre azêda. Plantas pouco doentes	18,61	13,91	13,50	21,57
14-15	Laranja Bahia enxertada sôbre azêda. Plantas mais ou menos doentes	20,10	16,22	10,14	8,95
7-13	Laranja Bahia enxertada sôbre azêda. Plantas mais ou menos doentes	20,10	16,22	10,14	8,95
8-10-11	Laranja Bahia enxertada sôbre azêda. Plantas bastante doentes	16,81	12,45	8,71	9,30

(*) Nestes casos de pés francos, as amostras nos caules foram tiradas em alturas correspondentes àquelas tomadas acima e abaixo do enxêrto.

Nem todos êsses dados entrarão em discussão, uma vez que muitos dêles não se mostraram de interêsse para o nosso estudo.

Aquêles referentes às plantas utilizadas no capítulo seguinte, onde discutiremos os resultados, acham-se com mais pormenores nos quadros II a VI. Nêles poderemos avaliar as variações havidas em cada caso, entre as determinações da pressão osmótica em amostras de árvores diferentes. Nos casos de interêsse, tôdas essas variações foram objeto de análises estatísticas e, no capítulo a seguir, diremos sôbre a sua significação.

Para maior clareza, construímos o gráfico 1, onde vemos com maior evidência as alterações encontradas na pressão osmótica das árvores doentes.

PRESSÃO OSMÓTICA
*Laranja Baía enxertada sôbre azêda em
 diversos estados sanitários*

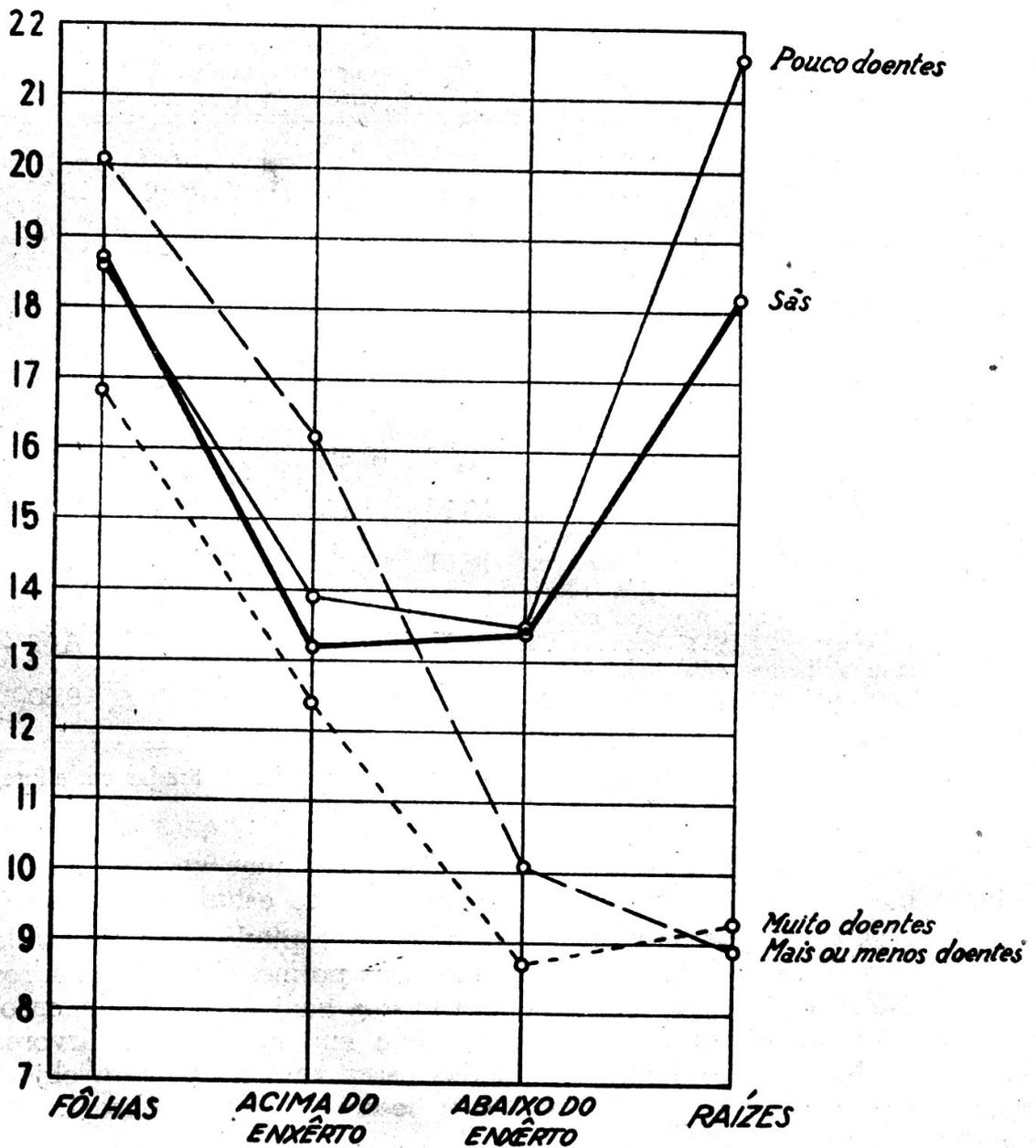


Gráfico 1

QUADRO II

PRESSÃO OSMÓTICA

Laranjeira Bahia enxertada sobre azêda — Plantas sãs

Planta N.º	Amostra N.º	REGIÕES NAS PLANTAS			
		Fôlha	Caule acima do enxêrto	Caule abaixo do enxêrto	R a i z
4	1	18,16	13,48	13,48	20,32
	2	18,16	12,64	14,08	17,56
	3	18,40	13,96	14,32	18,28
	Média	18,24	13,36	13,96	19,36
5	1	19,00	13,96	13,12	17,32
	2	19,00	13,24	12,76	15,28
	3	18,40	13,48	13,24	19,00
	Média	18,80	13,56	13,04	17,20
6	1	19,12	13,00	13,48	18,52
	2	19,12	12,76	13,00	17,56
	3	19,24	12,76	12,88	18,04
	Média	19,16	12,84	13,12	18,04
Média geral das 9 amostras das 3 plantas		18,73	13,25	13,37	18,20

QUADRO III

PRESSÃO OSMÓTICA

Laranjeira Bahia enxertada sobre azêda — Plantas bastante doentes

Planta N.º	Amostra N.º	REGIÕES NAS PLANTAS			
		Fôlha	Caule acima do enxêrto	Caule abaixo do enxêrto	R a i z
8	1	16,60	13,00	9,154	9,514
	2	16,96	12,40	8,793	8,432
	3	17,32	13,96	8,552	9,394
	Média	16,96	13,12	8,83	9,11
10	1	18,84	12,52	9,274	9,875
	2	16,36	12,16	8,793	9,394
	3	16,84	12,16	8,672	8,552
	Média	16,68	12,28	8,91	9,27
11	1	16,96	12,16	8,432	10,48
	2	16,36	11,56	8,793	8,432
	3	17,08	12,16	7,951	9,635
	Média	16,80	11,96	8,39	9,51
Média geral das 9 amostras das 3 plantas		16,81	12,45	8,71	9,30

QUADRO IV
PRESSÃO OSMÓTICA
Laranjeira azêda de pé franco

Planta N.º	Amostra N.º	REGIÕES NAS PLANTAS			
		Fôlha	Caule acima do enxêrto (*)	Caule abaixo do enxêrto (*)	R a i z
1	1	20,44	15,52	15,76	18,28
	2	20,44	14,08	14,32	16,36
	3	21,76	14,56	15,16	17,68
	Média	20,88	14,72	15,06	17,44
2	1	22,12	13,00	12,40	13,48
	2	21,64	12,88	12,04	12,52
	3	22,36	12,40	13,00	13,12
	Média	22,04	12,76	12,46	13,04
3	1	20,56	12,88	13,60	16,60
	2	20,92	12,64	13,24	15,40
	3	20,92	12,52	14,32	14,56
	Média	20,80	12,68	13,72	15,52
Média geral das 9 amostras das 3 plantas		21,24	13,39	13,78	15,33

QUADRO V
PRESSÃO OSMÓTICA
Laranjeira caipira de pé franco

Planta N.º	Amostra N.º	REGIÕES NAS PLANTAS			
		Fôlha	Caule acima do enxêrto (*)	Caule abaixo do enxêrto (*)	R a i z
18	1	14,92	12,52	12,04	18,64
	2	14,08	12,64	12,04	18,04
	3	14,92	12,64	11,20	17,56
	Média	14,64	12,60	11,76	18,06
19	1	15,40	13,24	13,48	21,64
	2	15,40	11,92	13,24	20,32
	3	15,40	12,76	11,92	20,80
	Média	15,40	12,64	12,88	20,92
Média geral das 6 amostras das 2 plantas		15,02	12,62	12,32	19,49

(*) Nestes casos de pés francos, as amostras nos caules foram tiradas em alturas correspondentes àquelas tomadas acima e abaixo do enxêrto.

QUADRO VI

PRESSÃO OSMÓTICA

Laranjeira baianinha enxertada sôbre caipira

Planta N.º	Amostra N.º	REGIÕES NAS PLANTAS			
		Fôlha	Caule acima do enxêrto	Caule abaixo do enxêrto	R a i z
24	1	18,04	10,60	11,08	12,28
	2	17,56	9,875	10,72	12,88
	3	16,48	11,08	9,635	11,92
	Média	17,36	10,52	10,48	12,36
25	1	16,84	11,80	11,20	14,20
	2	17,32	11,08	12,28	15,76
	3	17,56	11,08	11,68	15,76
	Média	17,24	11,32	12,72	15,24
Média geral das 6 amostras das 2 plantas		17,30	10,92	11,60	13,80

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Dentre as conclusões obtidas, destaca-se o seguinte : em plantas sãs, de laranja Bahia enxertada sôbre azêda, a pressão osmótica logo acima e logo abaixo da zona da enxertia é a mesma, sendo as médias 13,25 e 13,37, respectivamente. Em plantas doentes, porém, a pressão osmótica logo abaixo da região da enxertia é muito menor do que acima. A análise da "variance" deu resultado altamente significativo para as médias 12,45 e 8,71, encontradas, respectivamente, acima e abaixo da região da enxertia. Na raiz, a queda da pressão osmótica é ainda muito mais acentuada. Discutimos aquí apenas os dados das plantas sãs e bastante doentes, pois que a apreciação dos estados intermediários da doença é muito incerta.

Parece que o cavalo morre, portanto, por falta de alimentação ; em conseqüência, o cavaleiro também morre. O interessante é que a morte do cavalo é provocada pelo próprio cavaleiro, conforme nos prova o fato de o cavalo brotar são, quando se elimina o cavaleiro doente.

É bem fundada a hipótese de Webber (2) de existir na laranjeira doce um vírus para o qual o cavalo de laranjeira azêda é sensível.

Outra conclusão de menor importância que também podemos tirar dos dados apresentados é que a laranjeira azêda de pé franco tem uma pressão osmótica, nas fôlhas, muito superior à da laranjeira caipira-

As médias 21,24 e 15,02 encontradas, para a pressão osmótica, respectivamente, nas folhas das laranjeiras azêda e caipira de pés francos, são altamente significantes, conforme nos provou a análise da "variance". Elas representam, mesmo, os extremos na série de variedades e combinações estudadas.

Parece que o cavaleiro induz alteração na pressão osmótica do cavalo, o que era de se esperar, uma vez que no cavalo circula seiva elaborada nas folhas do cavaleiro.

Examinando-se os dados, vemos que a laranjeira caipira de pé franco tem uma pressão osmótica, na raiz, de 19,49, enquanto que, servindo de cavalo para a laranja baianinha, passa a ter 13,80.

Também a laranjeira azêda de pé franco tem pressão osmótica, na raiz, de 15,33 atmosferas e, quando serve de cavalo para a laranjeira Bahia, passa a ter 18,20.

A análise da "variance", porém, não mostrou haver diferença estatística entre estas médias. Parece-nos, contudo, ser isto devido ao pequeno número de plantas estudadas. Para conclusões positivas sobre esta influência do cavaleiro na pressão osmótica do cavalo, seria necessário estudar um número maior de plantas. Isto, porém, não nos foi possível por termos utilizado, como já dissemos na introdução do presente trabalho, plantas pertencentes a ensaios e o sacrifício de maior número de árvores acarretaria a perda dos referidos ensaios.

Desde que a pressão osmótica nos dá idéia das substâncias solúveis, as próximas pesquisas deverão ser sobre a quantidade de amido, reserva insolúvel, existente nas diferentes partes de plantas sãs e doentes. Do confronto desses dois resultados, talvez surja alguma indicação mais segura sobre a causa imediata da queda da pressão osmótica no cavalo.

SUMÁRIO

1. Em plantas sãs, de laranjeira Bahia enxertada sobre azêda, a pressão osmótica acima e abaixo da região da enxertia é a mesma.
2. Em plantas doentes, a pressão osmótica abaixo da região da enxertia é muito menor do que acima. Na raiz, a diferença da pressão osmótica entre plantas sãs e doentes é ainda mais acentuada.
3. A pressão osmótica das folhas da laranjeira azêda de pé franco é muito superior à das folhas da laranjeira caipira.
4. O cavaleiro parece produzir alteração na pressão osmótica do cavalo, algumas vezes elevando-a e outras abaixando-a.

S U M M A R Y

1. In healthy plants, of Bahia oranges budded on sour orange stock the osmotic pressure above and below the union of stock and scion is the same.

2. In diseased plants, the osmotic pressure below the union is much smaller than above. The difference of this pressure between roots of healthy and diseased plants is still more evident.

3. The osmotic pressure of the leaves of an unbudded sour orange tree is much superior than that of the caipira orange.

4. The scion seems to produce alteration on the osmotic pressure of the stock, sometimes raising and sometimes lowering it.

L I T E R A T U R A C I T A D A

1. **Von Heinrich, Walter.** Die kryoskopische Bestimmung des osmotischen Wertes bei Pflanzen. Abderhalden, Hand. Biol. Arbeitsmethoden **XI** : 353-371. 1939.
2. **Webber, H. J.** A doença da "tristeza" de porta-enxêrto de laranjeira azêda. *O Biológico* **IX** (10) : 345-355. 1943.