

O valor diagnóstico de alterações das qualidades fisiológicas dos tubérculos para o reconhecimento do grau de de- generescência das batatinhas (*)

K. SILBERSCHMIDT (1)

E' chamada "degenerescência" — "degeneration" da literatura anglo-americana, "Abbau" da literatura alemã — a diminuição progressiva e irreversível da produção da batatinha, verificada frequentemente em culturas desta planta com a sucessão das gerações, obtidas por reprodução vegetativa a partir de tubérculos. Esta degenerescência é devida à disseminação crescente nas plantações de certas doenças de virus. Diante da existência de uma relação tão direta entre a degenerescência e a infecção das plantas por certas doenças de virus, não é de estranhar, que o único método seguro até agora idealizado, para a manutenção de um alto nível de sanidade nas gerações sucessivas de batatinhas, consiste em excluir da multiplicação todas as plantas que exibem sintomas de doenças de virus. Eletua-se, geralmente este processo da escolha ou seleção fitossanitária das plantas sadias da seguinte maneira: A descendência total em tubérculos de diversas plantas-mães, que tinham sido avaliadas como aproveitáveis na geração anterior, planta-se num campo isolado de outras cultura de batatinhas em fileiras separadas e arrancam-se os clones, que apresentam quaisquer sintomas de doenças de virus. Este método, já exposto por nós em vários trabalhos, é, sem dúvida, bastante eficiente, possui porém, ainda a grande desvantagem de levar muito tempo para a sua realização

(*) Recebido para publicação em 6-7-44.

(1) Tec. do Instituto Biológico de São Paulo.

E' claro que o comprador de sementes-tubérculos de batatinhas ou o técnico da vigilância portuária que tem que fiscalizar a entrada de batatinhas estrangeiras no país, deseje ter ao seu alcance um método que permita — já antes de se efetuarem as plantações — uma diferenciação imediata entre tubérculos sadios e degenerados.

Desta necessidade de distinção rápida entre tubérculos sadios e doentes nasceu a idéia — aventada já por muitos autores — de considerar as eventuais alterações anatómicas ou fisiológicas de tubérculos degenerados como pontos de partida para a sua separação das batatinhas sadias. Embora não tenha apresentado os métodos "relâmpagos" de diferenciação, até agora desenvolvidos o grau de segurança que pode ser alcançado com a seleção fitossanitária das plantas no campo, achamos os resultados de alguns destes métodos bastante promissôres, justificando-se, sinão a aplicação destes métodos na prática, pelo menos a sua inclusão nos programas da nossa experimentação. E' por isso que queremos expor aqui, em traços rápidos, alguns dos métodos, que foram propostos para possibilitar uma separação imediata entre tubérculos sadios e doentes de batatinhas.

Primeiro devemos expor, ainda que em poucas palavras, até onde a forma e o tamanho dos tubérculos permitem o reconhecimento de batatinhas degeneradas.

Esta questão é de certa importância prática porque os regulamentos para a certificação de tubérculos-sementes de batatinhas de muitos países — como por exemplo o do Canadá (30) e do Estado de Wisconsin, U. S. A. (29,1939) determinam a impugnação dos lotes de batatinhas que possuam alta porcentagem de tubérculos deformados e ponteagudos.

Primeiramente, quanto à relação existente entre degenerescência e deformação dos tubérculos, deve-se frisar, que as formas mais frequentes de deformação, tais como o embonecamento e o perfilhamento, são frequentemente caracteres de certas variedades de batatinhas, caracteres estes cujo aparecimento é favorecido ainda por determinados fatores atmosféricos e adálicos durante o período da formação dos tubérculos. Numa plantação de batatinhas da variedade Eigenheimer, por exemplo, devemos contar com a produção de alta porcentagem em tubérculos embonecados, quando à uma época de fortes precipitações atmosféricas se segue um prolongado período de seca. Portanto, diante da inexistência de uma relação simples entre estas deformações e a degenerescência das batatinhas, a verificação destes defeitos em nada ajuda a separação de tubérculos sadios e degenerados.

Já seria mais razoável acautelar-nos contra a importação de lotes de batatinhas que contêm alta porcentagem em tubérculos "ponteados". Isso porque existe nos Estados Unidos uma doença de vírus da batatinha, chamada "spindler-tuber", que lá é considerada como um dos fatores principais da degenerescência e que provoca como sintoma uma alteração da forma dos tubérculos. Mas visto que esta doença, ao que sabemos, não foi ainda verificada no Brasil e que batatinhas ponteadas podem formar-se também em plantas perfeitamente sadias, somos forçados a concluir que a forma dos tubérculos não fornece um índice bastante seguro para a separação de batatinhas sadias e degeneradas.

Passando agora para a caracterização dos métodos de diferenciação que se baseiam na verificação de alterações fisiológicas dos tubérculos degenerados, é mister confessar que muitos destes métodos são puramente empíricos e que os resultados de alguns deles são confusos e entre si contraditórios. Isso também não é de se estranhar, considerando o conceito ainda um tanto vago da "degenerescência", designação esta de um estado fisiopatológico causado provavelmente mais pela alteração de um conjunto de numerosos processos fisiológicos do que pela de um só.

De acordo com a natureza das estudadas alterações fisiológicas em tubérculos degenerados podemos dividir os métodos, até agora desenvolvidos, em vários grupos.

O primeiro destes grupos compreende os métodos baseados num aumento suposto ou real do poder oxidante dos sucos prensados de batatinhas degeneradas; num segundo grupo acham-se reunidos os que se baseiam justamente no alto poder redutor destes sucos. Outros processos, aqui também tratados em capítulos especiais, são fundados nas relações entre a degenerescência das batatinhas e o pH e finalmente no potencial oxi-redutor dos sucos. No último capítulo passaremos em revista rápida, os métodos que se relacionam com a alteração, em tubérculos degenerados, de outras qualidades fisiológicas.

Vamos ver agora quais os principais resultados obtidos até agora pelos adeptos destes diferentes métodos.

1) — O aumento da atividade oxidante de sucos de batatinhas degeneradas

Todos os métodos da diagnose do grau de degenerescência de batatinhas, que visam o estabelecimento de uma relação entre este fenômeno e o teor dos sucos em enzimas oxidantes, fundam-se nas considerações teóricas de *Woods*, A. F. (47, 1899) e *Heintzel*, K. (13, 1900) aventadas já na fase ini-

cial do desenvolvimento da virologia. Os mencionados autores, estudando folhas de fumo atacado pela doença mosaico, encontraram nelas um teor muito maior em enzimas oxidantes do que em folhas de plantas sadias.

Baseando-se nestas observações, os pesquisadores chegaram a considerar o excesso de enzimas oxidantes como causa de todas as alterações do metabolismo de plantas infeccionadas com doenças de vírus e *Heintzel* até admitiu que o próprio vírus não seria outra coisa sinão uma enzima oxidante.

Convém esclarecer, já antes de entrar na exposição dos diversos trabalhos sobre este assunto, que a terminologia usada, pelos autores anteriores para caracterizar as enzimas oxidantes, não corresponde mais aos conhecimentos atuais. Segundo *Wind F. Lile* (48 e 49, 1941/2 e 1943) o termo «oxidase», que é encontrado abundantemente na literatura anterior e que possui significação vaga, devia ser evitado. Convém, então, distinguir dois grupos de enzimas oxidantes, isto é, oxigenase e peroxidase. A oxigenase é o catalizador da oxidação de diversas substâncias polifenólicas por meio de oxigênio molecular, oxidação esta, que resulta em quinonas. Peroxidase é o catalizador da transformação oxidativa de um reativo incolor em um corante em presença de água oxigenada.

Neste conciso apanhado da literatura vamos-nos limitar a caracterizar apenas alguns métodos desenvolvidos para a determinação da «oxigenase». Nos trabalhos dedicados a este assunto, podemos distinguir — de acordo com os métodos empregados — dois grupos de pesquisas.

O primeiro grupo compreende os estudos que aproveitam, para a estimação da atividade oxidante de sucos de batatinhas, uma reação calorimétrica, que se efetua espontaneamente em sucos prensados de certas plantas e entre estas a batatinha, sem necessitar de um indicador artificial, acrescentado pelo experimentador. A reação, à qual nos referimos, e que se manifesta por um enegrecimento gradual dos sucos, é a oxidação por meio da enzima «tirozinase» e do oxigênio do ar, de certos aminoácidos, principalmente da tirozina, em substâncias de cor negra, «melaninas» e que devem ser consideradas como produtos da condensação e polimerização destes aminoácidos.

Outro grupo de pesquisadores prefere misturar os sucos com substâncias oxidáveis que não são próprias das plantas a serem examinadas e observar o curso desta oxidação ou pelo método gasométrico ou por meio de indicadores especiais.

Expondo os característicos dos métodos e os resultados das experiências que reunimos no primeiro grupo, queremos destacar apenas as pesquisas efetuadas com *sucos* prensados das plantas doentes.

Fazemos esta restrição, porque a comparação da velocidade do escurecimento dos tecidos lesados (— e não dos *sucos* prensados destes tecidos —) de batatinhas sadias e doentes, deu para diversos autores resultados contraditórios assim por exemplo para *Bechhold*, H. u. *Erbe*, F. (2, 1933), *Klinkowski*, M. (19, 1935), *Kaho*, H. (16, 1935 b), *Klump*, W. (20, 1935), *Bechhold*, H. u. *Erbe*, F. (3, 1936), *Kameraz*, A. J. e *Anikieff*, A. M. (17, 1937), *Folsom*, D. (8 1941).

Quanto ao estudo comparativo do teor em oxigenase de *sucos* prensados de tubérculos sadios e degenerados, um método apurado para tais experimentos foi desenvolvido por *Doby*, G. (7, 1911), em ensaios relativos à doença enrolamento da batatinha. O método por ele empregado visa a determinação da atividade da «tirozinase» contida no próprio extrato aquoso dos tubérculos. Com relação às substâncias oxidáveis, porém, *Doby* não leva em conta os aminoácidos já existentes no suco, acrescentando a cada amostra do extrato aquoso dos tubérculos uma determinada quantidade de uma solução de tirozina. Fazendo uso deste método, *Doby* verificou (pag. 329) que os tubérculos doentes geralmente possuem uma maior atividade de tirozinase do que os tubérculos correspondentes, provenientes de plantas sadias. Deve-se esclarecer ainda, que só tubérculos sadios e doentes da mesma variedade, da mesma origem e do mesmo estado de brotação foram comparados em seu poder oxidante. Um método semelhante ao desenvolvido por *Doby* foi descrito alguns decênios mais tarde por *Klump*, W. (20, 1935). Este método difere do processo empregado por *Doby* pelo fato de *Klump* pesquisar a oxidação dos próprios aminoácidos presentes no suco. *Klump* descreve o método por ele idealizado da maneira seguinte.

Trituram-se as batatinhas por meio de um ralador de vidro. Deposita-se num copo de 5 cm. de diâmetro e de 10 cm. de altura 30 gs. da massa assim obtida junto com 100 cc. de uma solução 1/15 M de monofosfato de potássio. Após eliminar cuidadosamente todas as bolinhas de ar da suspensão, mexendo-se o líquido e tirando-se a espuma da superfície com uma colher de vidro, deixa-se permanecer a prova na temperatura de 10°—12°C. 6 até 8 horas depois observa-se, o grau do escurecimento do líquido, por comparação com uma escala padrão de cores impressa ou por meio de um fotômetro.

Klump verificou, que nas condições de experimentação correspondentes à técnica antes exposta, o líquido sobrenadante da massa de batatinhas sadias mantém durante 6 horas um matiz quasi incolor, ao passo que o líquido sobreposto à massa de batatinhas degeneradas adquire, no mesmo lapso de tempo, uma cor pardo avermelhado, pardo-escuro e até preto-pardacenta. Os ensaios do mencionado pesquisador se referem a material pertencente a 6 diferentes variedades de batatinhas, examinado às vezes imediatamente depois da colheita e em outros casos após uma armazenagem de alguns meses.

E' verdade que o material estudado por *Klump* poderia ser ainda muito mais abundante e que os resultados precisariam ser também confirmados pelas observações de outros autores. Quer-nos parecer, porém, que valeria a pena, examinar, nas nossas condições, o valor deste método que é bastante simples.

Com isso passaremos à descrição dos trabalhos dos pesquisadores que preferem avaliar a atividade oxidante dos sucos por meio de uma reação de oxidação cuja intensidade é determinada por um indicador não preexistente nos próprios sucos.

Também neste capítulo vamos abstrair dos trabalhos nos quais o resultado da reação é estudado diretamente em cortes de tubérculos e não em sucos, por terem dado os ensaios com cortes resultados contraditórios nas pesquisas de *Grüss*, J. (12, 1907), *Schweizer*, G. (36, 1930), e *Kaho*, H. (16, 1935 b).

Referindo-nos aos experimentos realizados com sucos, devemos destacar, em primeiro lugar os trabalhos fundamentais, executados por H. H. *Bunzel* (6, 1914) com batatinhas sadias e outras atacadas pela doença «curly-dwarf». O processo adotado por *Bunzel* consistiu na determinação gasométrica do volume de oxigênio absorvido pelo suco em presença de certas substâncias oxidáveis, acrescentadas ao suco (por exemplo benzidina, pirogalol, floroglucina e outras). Todas as experiências de *Bunzel* referem-se à variedade de batatinhas chamada *Green Moutain*. No suco tanto de tubérculos como de folhas de plantas doentes foi verificada uma maior atividade oxidante maior do que nos sucos correspondentes de plantas sadias. Deve-se acentuar ainda que as diferenças entre as batatinhas sadias e doentes verificadas por *Bunzel* são consideráveis, permitindo uma nítida separação dos respectivos lotes.

Enquanto que *Marx, Th. e Merckenschlager, F.* (23, 1932) nos seus estudos comparativos sobre o teor em fenolase de batatinhas sadias e degeneradas, encontraram maiores quantidades desta enzima no suco dos tubérculos de plantas sadias, as experiências de *P. G. Rouzinoff* (33, 1930) que se referem a folhas e as de *Ruhland, W. e Wetzel, K.* (34, 1933), efetuadas com tubérculos, confirmaram—pelo menos parcialmente—as observações de *Bunzel* relativas à superioridade do poder oxidante de sucos obtidos de batatinhas degeneradas sobre o de batatinhas sadias

A discrepância entre os resultados conseguidos pelos diferentes autores torna-se compreensível, se levarmos em consideração as conclusões, às quais *Pfankuch, E. e Lindau, G.* (27, 1935) chegaram nas suas experiências. O método escolhido por estes dois autores corresponde em muitos pontos, à técnica de *Bunzel*. Determinou-se a absorção de oxigênio verificada numa estufa com agitação elétrica e com instalação para manutenção de temperatura constante (25°) por uma mistura de 3 cc. de suco prensado de batatinhas descascadas, de 5 cc. de hidroquinona de 2,2% e de 5 cc. de um tampão de fosfato de pH=5,8. Para cada prova foi usado o suco de um só tubérculo. Submetendo ao exame do teor em oxigenase, por meio deste método, batatinhas sadias e degeneradas recentemente colhidas da variedade *Parnassia*, os autores puderam verificar nos sucos de batatinhas doentes uma atividade oxidante nitidamente superior. As diferenças no valor da oxigenase entre tubérculos sadios e doentes eram tão acentuadas, que não era preciso calcular médias para verificá-las. A comparação dos dados de absorção de oxigênio, determinados para os sucos de qualquer par de batatinhas sadias e degeneradas, era suficiente para demonstrar a superioridade, no teor em oxigenase, dos tubérculos provenientes de plantas doentes. É verdade que os autores não obtiveram resultados tão nítidos com outras variedades de batatinhas, e que até os tubérculos da variedade *Parnassia* não exibiram diferenças nítidas na sua atividade oxidante, quando examinados após alguns meses de armazenagem. Não podemos concordar, porém, se os autores acham poder inferir deste último resultado, que a diferença no teor em oxigenase nunca constitui um índice bastante constante para a diferenciação entre batatinhas sadias e doentes. Pelo contrário, as observações de *Pfankuch* e *Lindau* fornecem um poderoso fundamento experimental à idéia de que sucos de tubérculos degenerados—pelo menos de certas variedades—possuem uma maior atividade oxidante do que os dos tubérculos sadios, desde que as determinações

se realizem com tubérculos estando em fase de dormência, propicia para a demonstração destas diferenças, e que eles sejam estritamente comparáveis entre si. Estas restrições, longe de anular o valor diagnóstico deste índice, estabelecem justamente a ligação entre o conceito da degenerescência e os processos fisiológicos que se realizam dentro dos tubérculos e que provocam, entre outros efeitos, também o de alterar a atividade oxidante dos sucos. O índice desta atividade, é, desta maneira, um valor dinâmico e não, como muitos autores anteriores acreditavam, um caráter estático. Queremos dizer com isso que a atividade das enzimas oxidantes provavelmente esteja sujeita a grandes oscilações nos tubérculos tanto de plantas doentes assim como das sadias. Mas esta suposição não impede a possibilidade de a diferença da capacidade oxidante de sucos de tubérculos sadios e doentes ser *constante e apreciável* numa determinada fase do desenvolvimento dos tubérculos. Seria então, uma das finalidades de futuros trabalhos neste campo, determinar com exatidão a fase do desenvolvimento dos tubérculos e as condições externas, em que a diferença na capacidade oxidante entre tubérculos sadios e doentes atinge a maior amplitude.

Resumindo as observações dos autores que até agora se ocuparam com este assunto, podemos dizer, que estes trabalhos já contribuíram evidentemente para fortalecer a suposição de um aumento da atividade oxidativa de sucos provenientes de tubérculos degenerados. Não se deve por outro lado, aqui omitir uma restrição que se refere à especificidade desta reação enzimática. O aumento da capacidade oxidante de tubérculos degenerados teria enorme valor diagnóstico, se ele fosse provocado unicamente pelos agentes causadores da degenerescência. Parece, porém, que um aumento de oxidase e, em outros casos da peroxidase, pode ser observado também em consequência de outras doenças das plantas.

Queremos citar aqui apenas as indicações de *Nagy, R., Peterson, W. H. e Riker, A. J.* (24, 1937) relativas a um aumento do teor em enzimas oxidantes em plantas infeccionadas com *Bacterium tumefaciens* e as de *Suchorukoff, K. e Strogonoff, B.* (39, 1937) que se referem ao elevado teor em peroxidase de plantas de algodão infeccionados com o fungo parasitário *Verticilium alboatrum*. Desta maneira achamos possível que o aumento da atividade oxidante dos sucos seja um dos caracteres gerais do metabolismo patológico das plantas.

2) — O aumento da atividade redutora de sucos de batatinhas degeneradas.

Como já foi exposto no parágrafo anterior, não devemos admitir que a atividade enzimática em tubérculos tenha um valor constante durante todo o desenvolvimento destes órgãos de reserva. Pelo contrário, podemos inferir dos resultados das observações referidas na literatura, que este valor está sujeito a grandes variações durante as fases sucessivas da formação e maturação dos tubérculos. Assim, não é de se estranhar que também uma qualidade aparentemente oposta àquela antes referida, quer dizer o aumento da atividade *redutora* dos sucos, fosse considerada por muitos autores como índice característico da degenerescência das batatinhas. Para que isso seja melhor compreendido, devemos ter sempre em mente o fato de ser o suco prensado de órgãos vegetais uma mistura artificial de múltiplas substâncias, que na célula viva se acham separadas e cuja interação no suco dá margem, ao mesmo tempo, a processos de oxidação e de redução.

Para medir a velocidade dos processos de redução que se realizam no suco de tubérculos de batatinhas, já foram empregados diversos métodos, alguns dos quais bastante complicados como por exemplo os propostos por *Rouzinoff*, P. G. (33, 1930). Os melhores resultados foram conseguidos até agora com o processo da determinação do tempo necessário para descoloração de uma solução de azul de metileno em presença do suco de batatinha. No curso do processo de redução em que as enzimas redutoras, chamadas «dehidrases» têm um papel decisivo, este corante, agindo como fixador de hidrogênio, transforma-se em um corpo incolor. Conforme os resultados de observação de alguns autores, a descoloração do azul de metileno efetua-se com maior velocidade em presença de suco de tubérculos degenerados do que sob o efeito do suco de batatinhas sadias. Falaria, então, este resultado em favor de um aumento em «dehidrases» do suco de plantas degeneradas. Damos a seguir a descrição da técnica elaborada por *Wartenberg*, H. e *Lindau*, G. (44, 1936), que é fundada em estudos experimentais de *Bernheim*, F. (4, 1928).

Por meio de um ralador de vidro prepara-se uma pasta de batatinhas antes descascadas e bem lavadas com água destilada. Purifica-se este suco passando-o por meio de um espremedor de fruta através de um pedaço de pano. Em cada um de dois tubos de ensaio, despejam-se agora 5 cc. deste suco e 2 cc. de uma solução de 0,5% de acetaldeído, que age neste caso como doador do hidrogênio. O primeiro tubo

recebe, além disso, 3 cc. de uma solução alcalina, o outro tubo a mesma quantidade de uma solução ácida azul de metileno. Estas soluções preparam-se diluindo 63,9 e 32,0 mg. do corante em 1 litro de um tampão de fosfato de pH 8,04 e 5,28 respectivamente. Após deixar borbulhar uma corrente de nitrogênio através dos tubos de ensaio contendo a mistura do suco de tubérculos e do corante, passase essa mistura para pequenos tubos que são finalmente fechados hermeticamente com rolhas. O momento do fechamento dos tubos constitui o início da observação da descoloração. Esta descoloração efetua-se geralmente apenas em meio alcalino. Desta maneira, a mistura do suco de tubérculos com a solução ácida do azul de metileno serve apenas comobase da comparação que possibilita verificar o grau progressivo da descoloração da solução alcalina.

Fazendo uso deste método, os autores conseguiram verificar diferenças nítidas entre os sucos provenientes de tubérculos sadios e doentes, sempre na suposição de que foram submetidos à comparação tubérculos da mesma variedade e do mesmo grau de maturação. A descoloração do azul de metileno efetuou-se sempre com maior rapidez sob a influência dos sucos de batatinhas *degeneradas*. Os autores, fazendo um estudo crítico das fontes de erro, que o método acarreta, chegaram ao resultado que as condições da armazenagem dos tubérculos (temperatura, duração e outros fatores) exercem influência sobre a atividade redutora dos sucos. Mesmo assim, atribuem, com razão, um certo valor diagnóstico ao seu método com tanto que cada tubérculo a ser examinado seja comparado com outro da mesma variedade de grau de degenerescência já conhecido.

Estes resultados de *Wartenberg e Lindau*, obtidos com tubérculo sadios e doentes de 6 diversas variedades de batatinhas, receberam valiosa confirmação pelas pesquisas de *Topékha*, E. F. (40, 1936). Este autor russo comparando as qualidades bioquímicas de tubérculos colhidos de plantas sadias com as de batatinhas provenientes de plantas atacadas por «enrolamento» e outras doenças de vírus, verificou que os sucos de tubérculos doentes superam os dos testemunhas sadios no teor em desidrase. Também neste caso o autor serviu-se, para a demonstração da diferença existente entre batatinhas sadias e doentes, do método da averiguação do tempo necessário para a descoloração de azul de metileno, provando que este processo se realiza com maior velocidade sob a influência de suco de tubérculos doentes.

Mas o método de medição do tempo de descoloração de azul de metileno não é o único processo até agora empregado para demonstrar o maior teor em enzimas redutoras de tubérculos doentes. *Wartenberg, H. Klinkowski, M.* (45, 1937) elaboraram um método, cujo princípio consiste na observação da descoloração de certa quantidade de iodo acrescentada a uma mistura de partes iguais de solução de amido e de suco prensado de batatinhas. A coloração preto-azulada que a mistura sempre exhibe logo depois de se iniciar a interação dos diversos líquidos, desaparece muito mais depressa, se o suco provem de batatinhas degeneradas do que no caso de êle se originar de tubérculos sadios. Sem exagerar o valor diagnóstico do seu método, os autores inferem das suas observações executadas com material vasto e muito variado a respeito da sua origem, que a atividade redutora do suco prensado de tubérculos doentes é maior do que a de batatinhas sadias (45, p. 107).

Outro método, que possui a vantagem de poder ser executado com exatidão quantitativa, foi desenvolvido por *Smith, A. M. and Paterson, W. Y.* (37, 1937). Este processo consiste na determinação exata do teor do suco de batatinhas em vitamina C. (ácido ascórbico). O ácido ascórbico é um composto químico que mesmo em solução neutra apresenta forte atividade redutora. Para a avaliação quantitativa desta substância, os autores fazem uso do indicador específico 2:6 diclorofenol-indofenol, que possui coloração fortemente azul e que se transforma, sob a influência da vitamina C, em um composto incolor. Para determinações em série, os autores recomendam a aplicação do processo seguinte:

Tiram-se com um furador de rolha 3 cilindros de um tubérculo, que são agitados, durante 1 minuto, em 2 cc. de uma solução de ácido tricloracético a 2%. A mistura depois é titulada com a solução 0,005 m do indicador 2:6 diclorofenol-indofenol. Fazendo uso deste método, os autores verificaram que a quantidade de substâncias redutoras eliminada pelos cilindros de tubérculos atacados por mosaico é consideravelmente maior do que a obtida dos cilindros correspondentes de tubérculos sadios.

Resultados semelhantes, embora não tão nítidos e apropriados para fins diagnósticos, já tinham sido obtidos por *Pfankuch, E.* (28, 1935) que recomenda efetuar, antes da titulação de ácido ascórbico, a redução da parte da vitamina que existe no suco de batatinhas em forma oxidada. Parece, em todo caso, que o método de determinação de vitamina

C em estudos comparativos com batatinhas sadias e degeneradas merece ser mais conhecido e divulgado.

E' verdade que as pesquisas de outros autores, por exemplo de *Newton*, W. (25, 1928), *Marrx, Th.* e *Merkenschlager*, F. (23, 1932) e *Kaho* H. (16, 1935) não confirmaram os resultados dos citados trabalhos que falam a favor de um aumento da atividade redutora de sucos de batatinhas doentes. Mas se levarmos em consideração o que antes expusimos, sobre a grande variabilidade do sistema enzimático dos tubérculos, conforme o seu estado de maturação e as condições de armazenagem, não podemos estranhar que os autores ocasionalmente obtivessem resultados negativos ou até contraditórios. Além disso, o resultado negativo provém em muitos casos do fato de terem alguns pesquisadores estudado a atividade redutora dos sucos sem acrescentar-lhes um doador de hidrogênio. Assim existe a possibilidade de ter faltado naquelas experiências para a realização das reduções — apesar da existência das enzimas — a quantidade necessária de hidrogênio. Por todas estas razões, não duvidamos que os resultados positivos dos trabalhos aqui referidos correspondam à realidade e que, de fato, a atividade redutora dos sucos originários de tubérculos degenerados — pelo menos durante uma certa fase da maturação — é maior do que a das testemunhas sadias.

Será, então, uma tarefa grata para futuras pesquisas verificar qual a fase da maturação de tubérculos mais apropriada para estes estudos e qual o exato valor diagnóstico deste método. Achamos possível, julgando de acordo com as escassas indicações da literatura neste campo, que também outras doenças da batatinha possam provocar um aumento da atividade redutora dos sucos. A esse respeito queremos citar como exemplo apenas o trabalho de *Goffart*, H. (11, 1939).

Mesmo assim, o desenvolvimento de um método de indubitável valor diagnóstico para o reconhecimento de batatinhas degeneradas nas bases estabelecidas por *Wartenberg* e *Lindau* não nos parece estar fora das possibilidades da futura experimentação.

3) — Modificações da acidez atual dos sucos

Diante da relação estreita existente entre a atividade redutora dos sucos e a acidez efetiva deles (— acidez esta indicada pelo valor do pH —) é facilmente compreensível que muitos autores procuraram verificar, se há diferenças apreciáveis no pH dos sucos de tubérculos sadios e doentes e se estas diferenças podem ser aproveitadas como índices da degenerescência.

Merece ser destacado, a este respeito, o fato de que *Boas*, F. (5) já em 1918, apesar de estar naquela época ainda pouco conhecida, entre os botânicos, a técnica da determinação de pH, averiguou pequenas porém nítidas diferenças no grau de acidez entre os sucos de batatinhas sadias e degeneradas. Comparando o material sadio e doente obtido das folhas e hastes de diversas variedades de batatinhas, ele verificou que, com uma única exceção, os sucos das plantas sadias acusavam um pH ligeiramente mais ácido do que os das plantas doentes. Na variedade de batatinhas chamada «Klara», por exemplo, foi provado que o suco de hastes sadias possuía um pH de 5,64, ao passo que o pH do suco de hastes doentes mostrou um valor de pH = 5,82. Por este exemplo já se pode ver que as diferenças, apesar de apresentarem um grande interesse teórico, não são bastante expressivas para facilitar a diferenciação rápida entre batatinhas sadias e degeneradas.

Estes resultados de *Boas*, não obstante as dúvidas manifestadas por alguns autores, foram, nos seus pontos essenciais confirmados pelas observações de *Robertson*, J. M. e *Smith*, A. M. (31, 1931).

Estes dois autores efetuando estudos relativos à influência de diversas doenças de virus sobre o pH dos sucos de tubérculos de batatinhas, chegaram à conclusão, que os tubérculos provenientes de plantas atacadas por «enrolamento» possuem um pH ligeiramente mais alto e os obtidos de plantas mosaicadas um pH mais baixo do que tubérculos sadios. Nos dois casos porém, as modificações do pH foram muito pouco pronunciadas.

Mais tarde, relativamente ao mesmo assunto foram realizadas pesquisas exaustivas por *Wartenberg*, H., *Hey*, A. e *Tahsin* A. (42, 1935). Estes autores, dispendo de um material abundante, abrangendo as mais diversas variedades de batatinhas, verificaram que, de fato, os sucos obtidos de tubérculos sadios se distinguem dos obtidos de batatinhas doentes geralmente por um valor de pH ligeiramente mais baixo. Os autores frisam, por outro lado, que é necessário examinar grande número de tubérculos para poder provar a existência desta diferença. Nestas condições, a observação interessante de uma maior acidez dos sucos de tubérculos sadios não pode ser facilmente aproveitada como método de uma diagnose rápida da degenerescência de tubérculos de batatinhas.

Da mesma forma também uma outra qualidade dos sucos de tubérculos degenerados, isto é o seu maior poder

tampão, valor este estudado por *Wartenberg*, H. (46, 1937), se presta pouco para a imediata avaliação prática. Mesmo assim, não foram perdidos, do ponto de vista prático, todos estes estudos relativos à verificação de diferenças no grau de acidez existentes entre os tubérculos sadios e doentes. É porque estes experimentos facilitaram a elaboração de um método para a determinação do potencial de oxi-redução dos sucos, método este considerado atualmente o mais promissor para atender a necessidade de uma separação eficaz e rápida de tubérculos sadios e degenerados.

4) — Modificação do potencial de oxi-redução dos sucos

Já nos capítulos anteriores tivemos ocasião de nos referir à grande variabilidade da maioria dos valores bioquímicos que são considerados como índices do estado de degenerescência das batatinhas. Frisamos que o valor destes índices não só depende do estado de maturação dos tubérculos escolhidos para o exame, mas que o próprio suco durante a sua conservação é sujeito a alterações conforme as reações que se realizam nele entre as diversas substâncias que o compõem.

Nasceu da compreensão da grande flutuação dos resultados, que se obtém com a maioria destes métodos, o esforço de muitos autores para desenvolver um processo, que permitisse chegar a resultados mais constantes e mais diretamente relacionados com o estado fitossanitário das batatinhas. Pode-se considerar, como fruto deste esforço, o método da determinação do potencial de oxi-redução que, na opinião de diversos autores, corresponde mais a estas exigências. A diferença fundamental entre os valores conseguidos com este último método e os resultados de outros processos, por exemplo daqueles que visam a determinação da atividade oxidante de um suco, foi claramente definida por *Wartenberg*, H. e *Lindau*, G. (44, 1936, p. 302).

Segundo estes autores, o valor da atividade oxidante de um suco é um índice da *velocidade* num determinado momento de uma reação cinética. O potencial de oxi-redução por outro lado, é o índice do equilíbrio a que chega uma reação reversível quando estaciona.

O método primeiramente descrito por *Hey*, A. (14, 1932) encontrou maior divulgação entre os fitopatologistas especialmente devido a um referato de *Appl*, O. (1, 1934) e foi objeto de grandes e acurados trabalhos teóricos de *Wartenberg*,

H., *Hey*, A. e *Urhan*, O. (41,1935) e de *Wartenberg*, H., *Hey*, A. e *Tahsin*, A. (42,1935). A seguinte descrição concisa do método de determinação do potencial de oxi-redução de sucos prensados de batatinhas segue a técnica dos mencionados autores e de *Klump*, W. (20, 1935.)

Prepara-se separadamente para cada tubérculo, por meio de um ralador de vidro, uma massa de uma batatinha que foi antes descascada e cuidadosamente lavada com água de torneira e com água destilada.

A massa, tirada do ralador com água destilada, despeja-se num copo de vidro de 3-4 cm. de diâmetro e de 7-8 cm. de altura interna

Deve-se manter uma tal proporção entre água e raspa de batatinhas que após a precipitação das partículas suspensas, $\frac{2}{5}$ da altura do vidro são tomadas pela massa e mais $\frac{2}{5}$ pelo líquido sobrenadante. O $\frac{1}{5}$ restante do copo fica vazio.

Logo após preparar a suspensão, mistura-se com uma colher de vidro o conteúdo de cada copo e retira-se a espuma que cobre a superfície do líquido por conter grande quantidade de ar, que poderia, mais tarde, prejudicar a determinação.

Deixando agora os copos dispostos sobre a mesa do laboratório sem perturbar o processo normal de precipitação das partículas, observa-se depois de algum tempo na maioria deles a formação de uma camada preta que pouco a pouco vai cobrindo a superfície do líquido. É indispensável a formação desta camada preta, constituída pelas «melaninas», para a exata determinação do potencial. As amostras, nas quais não há lugar a formação de melanina e onde esta nem acrescentando-se 1-2 cc. de solução de tampão de fosfato pode ser provocada, devem ser consideradas impróprias para as determinações e eliminadas.

Após verificar a formação das melaninas, introduz-se um electrodo de platina (— antes cuidadosamente lavado com ácido sulfúrico —) no conteúdo do vidro de maneira a ficar a lâmina de platina completamente coberta pelos detritos dos tecidos de batatinha sem mergulhar, porém, na camada inferior, composta de amido.

A parte até agora descrita do processo executa-se com vantagem de tarde. Durante a noite, todo o dispositivo — inclusive o electrodo — permanece numa geladeira onde é mantida uma temperatura de cerca de 10°C. Na manhã seguinte, se estabelece, por meio de uma ponte de cloreto de potássio

saturado em água, uma ligação entre o vaso contendo a suspensão da massa de tubérculos e um outro que representa um electrodo de calomelanos.

Desta maneira, constitue-se um «elemento» composto de uma metade de tensão constante (o electrodo de calomelanos) e da outra de tensão variável (o electrodo de platina em suspensão de partículas de batatinhas). A diferença entre a tensão dos dois electrodos pode-se determinar intercalando um ionômetro no fio de condução entre os dois electrodos.

Deve-se frisar, mais uma vez, que não se visa com a aplicação deste método simplesmente a determinação do pH da suspensão de batatinha. Se êsse fosse o fim da nossa experimentação, poder-se-ia formar o «elemento» e obter um valor electrométrico pouco tempo após o preparo do suco.

Tratando-se, porém, no nosso caso, da determinação do potencial de oxi-redução, a nossa tarefa consiste em averiguar um valor do potencial que se mantém constante, durante pelo menos 3 horas. Eis a razão porque o electrodo de platina mergulhando na suspensão da massa de batata deve permanecer durante a noite toda na geladeira. Eis a razão também, porque mesmo na manhã seguinte não se pode aceitar como definitivo simplesmente o primeiro valor do potencial determinado por meio do ionômetro. Antes pode-se dizer, sem exagero, que o valor absoluto deste potencial «inicial» não interessa. Repetindo, porém, as determinações de 10 em 10 minutos, podemos verificar que o potencial sofre, durante cerca de uma hora, sucessivas alterações, atingindo finalmente um valor que, nos casos favoráveis permanece constante, durante algumas horas. Conforme *Klump*, a manutenção de um valor constante do potencial de oxi-redução pode ser ainda facilitada guardando-se os sucos em frascos de Kitasato, com vácuo parcial, e cobrindo a superfície do líquido com óleo de parafina puro.

Em todo caso o valor constante do potencial de oxi-redução foi verificado por *Hey*, *Wartenberg*, *Appel*, *Klump* e outros, como servindo de base para uma distinção bastante satisfatória entre batatinhas sadias e degeneradas. Averiguou-se, pois, em milhares de experiências que as suspensões de partículas de tubérculos de batatinhas degeneradas tendem a atingir valores mais negativos de potencial do que as suspensões correspondentes de batatinhas sadias. A dificuldade nestes ensaios consistiu na justa avaliação do grau de degenerescência das batatinhas, cujo potencial foi submetido a exame. Afim de possibilitar, no mesmo tubérculo,

a verificação do grau de degenerescência e do valor do potencial, foi elaborado já por *Hey*, A. (14, 1932) um simples método que passou a ser empregado também nas experiências subsequentes de *Köhler*, E. e *Hey*, A. (21, 1935) e *Wartenberg*, H. e *Hey*, A. (43, 1936). O método consiste apenas em dividir por um corte longitudinal, o tubérculo em duas metades, das quais uma, plantada em um vaso com terra, dá origem a um novo pé, cujo desenvolvimento na estufa é cuidadosamente observado, ao passo que a outra é submetida imediatamente ao exame do potencial. Trabalhando com este método, *Hey*, A. no seu primeiro trabalho, constatou que aos valores do potencial de Ec-100m V. até Ec-150m V. corresponderam plantas sadias e que, por outro lado, os tubérculos, cujo potencial era mais negativo do que Ec-200m V. deram origem a plantas nitidamente doentes. Tubérculos cujo potencial correspondia a um valor intermediário entre Ec-150m V. e Ec-200m V. forneceram plantas que às vezes se aproximaram mais da classe das plantas sadias e em outros casos mais da das plantas doentes. Foi denominado, por isso, «zona crítica» este trecho da escala dos potenciais.

Pesquisas posteriores de outros autores confirmaram que os tubérculos de plantas degeneradas se caracterizam geralmente por valores consideravelmente mais negativos de potencial do que tubérculos sadios. Mostrou-se porém, que a «zona crítica» não compreende sempre o mesmo trecho da escala dos valores de potencial. A localização exata dos limites das zonas de potencial, às quais correspondem plantas «doentes», «duvidosas» e «sadias», muda de acordo com a variedade de batatinhas, duração e temperatura de armazenagem e com outros fatores externos. Estas relações foram estudadas principalmente por *Wartenberg*, H. e *Hey*, A. (43, 1936) e *Friedrich*, H. (9, 1937). Por isso só tubérculos da mesma variedade, colhidos na mesma época e submetidos durante a armazenagem às mesmas condições externas podem ser comparados entre si no que diz respeito ao valor do seu potencial.

Nas experiências até agora expostas os resultados obtidos com o método de determinação do potencial de oxidação foram sempre controlados por outro método, independente.

Resta-nos ainda explicar de que maneira se procede, quando se deseja fazer um prognóstico sobre o grau de degenerescência de uma origem de batatinhas de estado fitossanitário desconhecido. Neste caso, a finalidade de um ensaio potenciométrico consiste em esclarecer qual a provável por-

centagem dos tubérculos da amostra, que poderá ser encontrada na zona «doente», «sadia» e «crítica». Para se poder manifestar com absoluta certeza a respeito desta distribuição dos tubérculos nas diferentes classes, dever-se-ia examinar o potencial da suspensão de todos os tubérculos da amostra. É claro que um estudo tão demorado e dispendioso não pode servir para fins práticos. Por isso, *Wartenberg* e *Hey* recomendam executar as determinações do potencial só com um número de tubérculos suficiente para servir de base a um cálculo estatístico da distribuição dos valores nas três classes.

Sugerem os mencionados autores, que se escolham inicialmente 40 tubérculos de cada lote para as determinações do potencial. De acordo com a amplitude da variação (X) dos valores encontrados nesta amostra pequena, calcula-se depois o número suplementar de tubérculos, que deverão ainda ser submetidos ao exame, empregando a fórmula:

$$n = \left(\frac{1}{5} x\right)^2$$

Na discussão do uso desta fórmula, os autores expõem que o fim do cálculo neste caso não consiste em obter certeza matemática a respeito de dados já apurados de uma experiência, mas apenas em proporcionar ao interessado um meio para facilitar o prognóstico do êxito da cultura a ser efetuada com a amostra em questão.

Queremos frisar mais uma vez, que o bom resultado deste método, e com isso a significação científica do «prognóstico» sobre o grau de degenerescência de uma amostra de batatinhas, depende essencialmente da avaliação criteriosa, por parte do experimentador, de todos os fatores que podem influenciar na obtenção dos valores dos potenciais. Para algumas variedades de batatinhas o método não pode ser empregado devido à falta de formação de melaninas, nas suspensões feitas com tubérculos destas variedades. Entre as variedades aproveitáveis parece que as precoces se prestam especialmente bem para serem submetidas a este método. Outras restrições do campo de aplicação deste método estão relacionadas com certas falhas da correlação geralmente existente entre o valor do potencial do tubérculo e o grau da degenerescência da planta. Em alguns casos a amplitude da «zona crítica» é tão grande que não se consegue uma justa avaliação do estado fitossanitário da amostra de tubérculo em questão. Em outros casos, o resultado das determinações dos potenciais parece indicar que a amostra examinada consta de tubérculos perfeitamente sadios. A obser-

vação das plantas obtidas destes tubérculos, revela, porém, a ocorrência, nas folhas, de leves sintomas de mosaico. Isso provém do fato mencionado por *Köhler*, E. (22, 1937) que certas doenças de vírus como o «enrolamento» se projetam mais nos valores do potencial do que as doenças brandas deste grupo como por exemplo o mosaico simples.

Mas apesar de todos estes «defeitos» do método, queremos parecer que os resultados com ele conseguidos são muito promissores e que os valores do potencial podem ser considerados, de fato, em muitos casos como índices da degenerescência.

Até um certo ponto comparáveis com estes resultados, embora teoricamente bem diferentes são algumas observações de outros autores, efetuadas também com métodos electrométricos, mas que visam a determinação do potencial que se verifica entre as duas extremidades de um só tubérculo. Em oposição ao método idealizado por *Wartenberg* e *Hey*, investiga-se neste novo processo, o potencial no tubérculo vivo e não o potencial de oxi-redução em suspensões de partículas em água. A diferença do potencial entre os dois polos de um tubérculo foi verificada por *Ruhland*, W. e *Michael*, G. (35, 1936) ser geralmente menor em tubérculos degenerados do que em tubérculos sadios da mesma variedade. Em experiências semelhantes, também executadas em tubérculos inteiros, mas com uma técnica diferente, *Folson*, D. (8, 1941) verificou a existência de uma ligeira correlação positiva entre a intensidade da corrente elétrica — que passa entre dois electrodos fincados no tecido do tubérculo a uma distância de 8 mm. um do outro — e as doenças «enrolamento», «spindle-tuber» e «mild mosaic».

Assim várias observações, oriundas de diversos autores e obtidas com métodos bastante divergentes, confirmam que os fatores responsáveis pela degenerescência das batatinhas se projetam frequentemente, embora de maneira nem sempre perfeitamente compreensível, nos valores do potencial dos tubérculos.

Não queremos terminar este capítulo dedicado principalmente à descrição do método da determinação do potencial de oxi-redução sem lembrar a provável conexão teórica existente entre este conceito e os da actividade «oxidante» e «reduzidora», dos sucos sobre os quais tratamos nos capítulos anteriores. Já no trabalho de *Pfankuch*, E. e *Lindau*, G. (127, 1935) foi demonstrado que os vários métodos fisico-químicos (idealizados para averiguar o grau de degenerescência das batatinhas nada mais representam do que tentativas de aproxi-

mação a índices da alteração que o metabolismo oxi-redutor sofre em consequência da infecção dos tubérculos com certas doenças de virus. Não há dúvida que todos os diversos índices poderão, com o maior aperfeiçoamento dos métodos, dar resultados satisfatórios. Atualmente, porém, parece que entre os diversos processos estudados, o da determinação do potencial de oxi-redução em sucos possui o maior valor diagnóstico.

5) — Outras modificações de qualidades fisiológicas dos tubérculos degenerados

Numerosos autores já defenderam a hipótese de que as doenças responsáveis pela degenerescência da batatinha prejudicavam as propriedades fundamentais da célula e que estas alterações da fisiologia celular produziam reações características, aproveitáveis para fins de diagnose.

Uma das qualidades fundamentais da célula que conforme a opinião de vários autores sofre profundas alterações em consequência da «degenerescência» é a «permeabilidade» do protoplasma.

Devemos a *Kaho*, H. (15, 1935a) estudos comparativos sobre a permeabilidade das células de cilindros de tecido, retirados respectivamente de tubérculos «sadios» e «degenerados».

Na avaliação da exosmose destes cilindros *Kaho* baseou-se em determinações da condutibilidade elétrica da água em que de um lado os cilindros «sadios», por outro lado os cilindros «doentes» tinham permanecido durante várias horas. Nestes ensaios o autor verificou que a permeabilidade do plasma dos tubérculos degenerados é nitidamente maior do que a de tubérculos sadios. Numa repetição destas experiências seria talvez interessante medir a condutibilidade elétrica diretamente no tecido dos tubérculos e não na água de conservação dos cortes obtidos dos tubérculos. Poder-se-ia fazer uso, para estes estudos, do aparelho idealizado por *Personius*, C. J. e *Sharp*, P. F. (26, 1938).

Com uma técnica muito mais simples, mas menos elegante realizaram também *Ruhland*, W. e *Michael*, G. (35, 1936) estudos sobre a permeabilidade do plasma de tubérculos degenerados, estudos estes que confirmaram inteiramente os resultados de *Kaho*.

Acreditam os mencionados autores que a substância das células dos tubérculos de plantas degeneradas sofreu — justamente em consequência da infecção com as doenças de virus — alterações fundamentais de maneira a se mostrar mais sensível a qualquer modificação dos fatores externos. Como uma das

expressões desta alteração da substância celular, é considerado pelos mencionados autores, o aumento da permeabilidade das células. Nesta alteração patológica da substância celular de tubérculos degenerados *Ruhland* e *Michael* baseiam a elaboração de um teste que corresponderia perfeitamente às exigências de simplicidade, mas cuja real eficiência não nos parece ainda bastante garantida. Consiste o método indicado pelos mencionados autores simplesmente em cortar um tubérculo em duas metades e em cobrir a superfície da metade basal com um excesso de sal de cozinha. Ao tratar desta maneira tubérculos de plantas sadias degeneradas, verifica-se, que devido à maior permeabilidade celular, estes últimos perdem mais rapidamente a turgescência e se transformam em uma massa uniforme de consistência fôfa e de cor cinzenta. Nos tubérculos das plantas sadias, por outro lado, nota-se, nas mesmas condições, uma diferenciação entre a parte normal, não alcançada pelo efeito da solução hipertônica, e uma parte plasmolisada, que toma — conforme os citados autores — uma cor preta e não cinzenta. Antes de poder recomendar este método para fins diagnósticos, acreditamos, que seja necessário efetuar com ele estudos experimentais com centenas de diversas amostras de batatinhas sadias e doentes. Esta nossa opinião céptica é também fortemente apoiada pelas observações de *Folson*, D. (8, 1941) que não conseguiu, aplicando um outro método, igualmente baseado em supostas diferenças de permeabilidade, separar tubérculos sadios de outros encerrando respectivamente os virus de «enrolamento», «spindle tuber», «mosaico rugose» e «mosaico simples».

Não esgotamos ainda nem de longe a exposição das diversas qualidades fisiológicas dos tubérculos baseados nas quais vários autores ensaiaram métodos de diagnose do grau de degenerescência das batatinhas. Entre estas qualidades fisiológicas, supostas com ou sem razão por diversos autores de variar com o grau de degenerescência das batatinhas, queremos mencionar aqui apenas ainda a resistência à penetração de narcóticos, a velocidade da perda de peso durante a armazenagem, a intensidade da respiração, e alguns caracteres fisiológicos, encontrados em ensaios empíricos e cuja natureza às vezes nem foi bem definida, como por exemplo a qualidade estudada por *Friedrich*, H. (10, 1938).

Interessante é a informação que bem recentemente *Ross*, A. F. (32, 1943) dá sobre trabalhos atualmente em andamento numa das maiores estações experimentais dos Estados Unidos, trabalhos estes que visam a verificação do virus do

«enrolamento» em tubérculos. Dois testes, cujo princípio no mencionado trabalho não foi descrito, deram resultados satisfatórios, pelo menos com algumas variedades de batatinhas. Conforme *Ross*, ambos os testes são tão simples que não há dificuldade em submeter diariamente 1.000 tubérculos a cada um destes processos.

Com isso vamos terminar a exposição dos métodos idealizados até agora para a diagnose rápida de degenerescência em tubérculos. Não foi nossa intenção expor neste trabalho, com a mesma minúcia, todas as propostas que já foram aventadas para facilitar a diferenciação entre tubérculos sadios e doentes. Quisemos, pelo contrário, destacar aqui alguns métodos considerados por nós mais promissores, baseados em princípios teoricamente interessantes e que também do ponto de vista prático merecem a nossa atenção.

O problema da seleção fitossanitária de sementes de batatinhas está atualmente no Brasil em foco. Todos os processos que possam ajudar a vencer o caminho espinhoso da determinação exata e rápida das plantas sadias devem ser experimentados e encarados com simpatia. Talvez seja justamente agora a época de experimentar alguns dos métodos aqui expostos no Brasil, onde eles até agora não foram adotados e onde eles nos poderão ajudar a facilitar a produção, no espaço de tempo mais curto possível, de um estoque satisfatório de tubérculos-sementes sadios, estoque este tão necessário para suprir a atual falta de sementes nos centros de cultivo e para garantir, também no após guerra, a nossa independência da importação de outros países de um produto, que se pode cultivar, correspondente às mais rigorosas exigências de qualidade, sob as condições climáticas do Brasil.

L I T E R A T U R A

- 1) *APPEL*, O. — Vitality and Vitality determination in potatoes. — *Phytopath.* 24, 482-494, 1934.
- 2) *BECHHOLD*, H. und *ERBE*, F. — Zur Biologie der Kartoffel. XVI Mit. Arbeiten der Biolog. Reichsanstalt 20, 111-139, 1933.
- 3) *BECHHOLD*, H. und *ERBE*, F. — Versuche zur Aufklärung des Mechanismus der «Kupferprobe» zur Feststellung des Kartoffelabbaues. *Phytopathologische Zeitschrift* 9, 259-296, 1936.
- 4) *BERNHEIM*, F. — The aldehyde oxidase of the potato. *Biochemical Journal* 22, 344-352, 1928.

- 5) — *BOAS*, F. — Beiträge zur Kenntnis des Kartoffelabbaues
Zeitschrift f. Pflanzenkrankheiten **29**, 171-176, 1919.
- 6) *BUZEL*, H. H. — Oxydases in healthy and in curly-dwarf.
potatoes.
Journal of Agricult. Res. **2**, 373-404, 1915.
- 7) *DOBY*, G. — Biochemische Untersuchungen über die Blat-
trollkrankheit der Kartoffel I und II Zeitschrift f.
Pflanzenkrankheiten **21**, 10-17 u. 321-336, 1911.
- 8) *FOLSOM*, D. — Results of testing some laboratory methods
for possible use in the detection of virus diseases
in Potato tubers.
Bull. Me. Agric. Exp. Sta. **407**, pp. 83-104, 1941.
- 9) *FRIEDRICH*, H. — Studien über die Zusammenhänge
zwischen der Lagerungstemperatur gesunder und
kranker Kartoffelknollen und dem Redoxpotential
ihrer Gewebebreie.
Phytopath. Zschr. **10**, 559-377, 1937.
- 10) *FRIEDRICH*, H. — Eine neue Farbreaktion zur Diagno-
se des Abbaugrades der Kartoffelknolle.
Phytopath. Zeitschrift **11**, 202-206, 1938.
- 11) *GOFFART*, H. — Das Problem der Nematodenkrankheit
der Kartoffel.
Arb. aus d. Biol. Reichsanstalt f. Land- und Forst-
wirtschaft **22**, 321-338, 1939.
- 12) *GRÜSS*, J. — Abhandlungen über Enzymwirkungen. Zei-
tschrift. f. Pflanzenkrankheiten **17**, 65-79 u. 193-223,
1907.
- 13) *HEINTZEL*, K. — Contagioese Pflanzenkrankheiten ohne
Microben unter besonderer Berücksichtigung der
Mosaikkkrankheit der Tabaksblätter. Inauguraldis-
sertation Erlangen 1900.
- 14) *HEY*, A. — Die Diagnose des Abbaugrades von Kartof-
felknollen durch elektrometrische Messung.
Vorl. Mitt.-Arbeiten aus d. Biologischen Reichsan-
stalt f. Land- u. Forstwirtschaft **20**, 79-90, 1932.
- 15) *KAHO*, H. — Zur Physiologie der Kartoffel I. Über die
Permeabilität des Knollengewebes der vitalen und
der abbaukranken Kartoffeln.
Phytopathol. Zschr. **8**, 157-164, 1935a.
- 16) *KAHO*, H. — Zur Physiologie der Kartoffel II.
Ein Beitrag zur Diagnose abbaukranker Knollen.
Phytopathol. Zschr **8**, 323-335, 1935b.

- 17) **KAMERAZ**, A. J. and **ANIKIEFF**, A. M. — Investigation of degeneration in the potato by *Bechhold* and *Erbs* method.
Bull. appl. Bot. Select. Ser II, pp. 201-214, 1937.
Citado em Review of Applied Mycology XVI p. 553, 1937.
- 18) **KLINKOWSKI**, M. — Die Kartoffelknolle als Objekt der Abbauforschung.
Pflanzenbau 9, 419-429, 1933.
- 19) **KLINKOWSKI**, M. — Die Bechholdsche Kupferprobe als diagnostisches Hilfsmittel zur Beurteilung des Gesundheitszustanden von Kartoffelknollen.
Phytopathol. Zeitschrift 8, 421-455, 1935.
- 20) **KLUMP**, W. — Methodische Untersuchungen zur Feststellung des Abbaugrades der Kartoffel.
Inauguraldissertation Bonn, 40 pag. 1935.
- 21) **KOEHLER**, E. und **HEY**, A. — Untersuchungen an Kartoffelproben über die Beziehungen zwischen Knollenpotential und Virusbefall.
Zentralblatt f. Bakterial II, 91, 256-267, 1935.
- 22) **KOEHLER**, E. — Über den gegenwärtigen Stand der Erforschung des Kartoffelabbaus.
Forschungsdienst 4, 81-90, 1937.
- 23) **MARX**, TH. und **MERKENSCHLAGER**, F. — Zur Biologie der Kartoffel.
Beobachtungen und Untersuchungen über den Verlauf des Kartoffelabbaues.
Arbeiten aus d. Biologischen Reichsanstalt f. Land- und Forstwirtschaft 19, 413-492, 1932.
- 24) **NAGY**, R., **PETERSON**, W. H. & **RIDER**, A. J. — Comparison of enzymes in crown-gall and non-inoculated plant tissue.
Abs. in Phytopathology XXVII, 2, p. 136, 1937.
- 25) **NEWTON**, W. — Report of the Dominion Field Laboratory of Plant Pathology.
University of British Columbia, Vancouver B. C. Rept. Dominion Botanist for the year 1928, Div. of Botany, Canadá.
Dept. of Agric. 202-204, 1929, citado em Rev. Appl. Myc. IX, 474, 1930.
- 26) **PERSONIUS**, C. J. and **SHARP**, P. F. — Permeability of potato-tuber tissue as influenced by heat.
Food Research 3, 525-538, 1938.
- 27) **PFANKUCH**, E. und **LINDAU**, G. — Zur Biochemie des

- Kartoffelabbaues II Biochemische Zeitschrift 277, 129-138, 1935.
- 28) **PFANKUCH**, E. — Zur Biochemie des Kartoffelabbaues III, Mit. Ascorbinsäure, Glutathion und Zucker. Biochem. Zschr. 279, 115-130, 1935.
- 29) ——— Provision of the Seed Potato Certification Service in Wisconsin. Issued November 1939.
- 30) ——— Regulations governing the production of Canadian certified seed potatoes. Department of Agriculture Ottawa—Canadá.
- 31) **ROBERTSON**, J. M. and **SMITH**, A. M. — A study of the hydrogen ion concentration of the potato tuber Biochemical Journal 25, 763-769, 1931.
- 32) **ROSS**, A. F. — Tests for leafroll virus in tubers. The Maine Agricultural Experiment Station Orono, Maine. Bulletin N°. 420, p. 429, 1943.
- 33) **ROUZINOFF**, P. G. — Some data on the physiology of Potato leafroll. Morbi Plantarum, Leningrad XIX. pp. 148-159, 1930. citado em Review of Appl. Myc. X, p. 400, 1931.
- 34) **RUHLAND**, W. und **WETZEL**, K. — Zur sogenannten Blattrollkrankheit der Kartoffel. Sächsische Akademie der Wissenschaften. Mathem. — physik. Klasse 85, 141, 1933.
- 35) **RUHLAND**, W. und **MICHAEL**, G. — Zur Physiologie des sogen Kartoffelabbaues. Sächsische Akademie der Wissenschaften, Math. — Phys. Klasse 88, 3-10, 1936.
- 36) **SCHWEIZER**, G. — Ein Beitrag zur Ätiologie und Therapie der Blattrollkrankheit bei der Kartoffelpflanze. Phytopath. Zeitschrift 2, 557-591, 1930.
- 37) **SMITH**, A. M. and **PATERSON**, W. Y. — The study of variety and virus disease infection in tubers of Solanum tuberosum by the Ascorbic acid test. Biochem. Journal, 31, 1992-1999, 1937.
- 38) **STEPHAN**, J. — Die Oxydasen in der phytopathologischen Literatur. Zeitschrift f. Pflanzenkrank. 43, 1-13, 1933.
- 39) **SUCHORUKOFF**, K. and **STROGONOFF**, B. — The activators of peroxidase in sick plants. C. R. Acad. Sci. U. R. S. S., N. S. XV, 563-565, 1937.

- citado em *The Review of Appl. Mycology* XVI, 808, 1937.
- 40) **TOPEKHA**, E. F. — *Biochemistry of Potato virus diseases.*
Bull. appl. Bot. Select. XIV, 53-67, 1936.
citado em *Rev. of Appl. Myc.* XVI, 706, 1937.
- 41) **WARTENBERG**, H. **HEY**, A. und **URHAN**, O. — Die Elektrometrische Pflanzgutwertbestimmung der Kartoffelknolle.
Arbeiten d. Biol. Reichsanstalt f. Land- und Forstwirtschaft I. Mit. 21, 331-362, 1935.
- 42) **WARTENBERG**, H. **HEY**, A. and **TAHSIN**, A. — Untersuchungen über die Azidität des Gewebekreises der Kartoffelknolle II. Arb. aus d. Biol. Reichsanstalt f. Land- und Forstwirtschaft 21, 499-516, 1935.
- WARTENBERG**, H. und **HEY**, A. — Die elektrometrische Pflanzgutwertbestimmung der Kartoffelknolle. IV. Mitteilung. Das Redoxpotential der Gewebekreisaufschlammung als Kennziffer des Abbaues.
Phytopath. Zschr. 9 531-569, 1936.
- 44) **WARTENBERG**, H. und **LINDAU**, G. — Studien über die «Dehydrasewirkungen» gesunder und abbaukranker Kartoffelknollen.
Phytopathol. Zeitschr. 9, 297-324, 1936.
- 45) **WARTENBERG**, H. und **KLINKOWSKI**, M. — Eine «Jodprobe» zur Pflanzgutwertbestimmung der Kartoffel.
Phytopathol. Zeitschr. 10, 107-109, 1937.
- 46) **WARTENBERG**, H. — Über die Pufferung der Pressäfte abbaukranker und gesunder Knollen der Kartoffel.
Phytopath. Zschr. 10, 43-56, 1937.
- 47) **WOODS**, A. F. — The destruction of chlorophyll by oxidizing enzymes.
Centralbl. f. Bakteriologie 2. Abt. 5, 745-754, 1899.
- 48) **WYND**, F. **LYLE** — Certain activities of normal and mosaic infected tobacco plants.
Journal of General Physiology, 25, 649-661, 1941/2.
- 49) **WYND**, F. **LYLE** — Metabolic Phenomena associated with virus infection.
The Botanical Review, 9, 395-465, 1943.