

RUY DE ARAÚJO CALDAS

ENGENHEIRO AGRÔNOMO

ALGUNS ASPECTOS DA AÇÃO DO VÍRUS "VIRA-CABEÇA" EM TOMATEIRO
(*Lycopersicum sculentum*, Mill) **E A INFLUENCIA DO ESTADO**
NUTRICIONAL DA PLANTA NA MULTIPLICAÇÃO DO VÍRUS

Tese Apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universi-
dade de São Paulo, para obtenção do título
de "Magister Scientiae"

PIRACICABA

1967

E R R A T A

Página	Linha	Onde se Lê	Leia-se
2	29	observou	observaram
2	29	cigarrinhos	cigarrinhas
4	20	E e R	E e A
5	21	Bergmann (1962)	Bergmann e Boyle (1962)
5	22	encontrou	encontraram
5	29	<u>Nicotianum</u>	<u>Nicotiana</u>
8	4	<u>Phaseolus</u>	<u>Phaseolus</u>
12	16	Cotiledonares	Primárias
25		4.2.3	4.4.3
25		4.2.4	4.4.4
47	2	1:128o	1:128
58	22	in the the	in the

À MEMÓRIA

de meu tio

JOSÉ SIMÕES DA CUNHA

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Dr. DARCY MARTINS SILVA

Agradeço por tudo que fez
por mim, pela sua orienta-
ção segura e cheia de hu-
manismo.

Ao Dr. EURÍPEDES MALAVOLTA

A quem devo muito da minha
formação científica, exter-
no meus agradecimentos pe-
lo apôio total dado à pre-
sente tese.

E as seguintes pessoas e instituições

João Carlos de Oliveira
Marinez M. Alves de Lima
Odair Alves Bovi
Claudio Berreta
Celisa S. Monteiro
Gilberto D. de Oliveira
Juan A. M. Sebastianes
Roberto Coelho
Roberto Spíndola
José Aldo dos Santos

Prof. Walter R. Accorsi
Dr. Aldolfo Brunner Junior
D. Carminda Cruz Landim
Dr. Otto Jesu Crócomo
Dr. Almiro Blumenschein
Dr. Louis M. Neptune
Dr. Clovis P. de Abreu

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Instituto Butantã , Secção de Virulogia

Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas

Faculdade de Filosofia de Rio Claro , Depto. de Biologia.

I = N = D = I = C = E

	pag.
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 - Isolamento da Estirpe de VVC	4
2.2 - Influência dos Vírus na Composição dos Vegetais	4
2.3 - Influência do Teor de Nutrientes na Multiplicação de Vírus	5
2.4 - Efeito do Vírus Sobre o Pêso Sêco das Plantas	6
2.5 - Nutrição do Tomateiro	6
3 - MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 - Isolamento da Estirpe de VVC	8
3.2 - Estudo de Algumas Propriedades da Estirpe Estudada	8
3.3 - Ensaios de Nutrição do Tomateiro Relacionada com a Presença do VVC	10
3.4 - Análise Química	12
3.5 - Bioensaio para Determinação da Concentração do Vírus no Tomateiro , em Solução Nutritiva Completa e Deficiente	12
3.6 - Espécimes para Estudo das Modificações Estruturais	12
4 - RESULTADOS	
4.1 - Isolamento da Estirpe do Vírus "Vira-Cabeça"	14
4.2 - Determinação do Pêso Sêco de Plantas Doentes e Sadias	18
4.3 - Influência da Deficiência de Macronutrientes na Multiplicação do VVC	20
4.4 - Nutrição do Tomateiro	21
4.5 - Nutrição do Tomateiro Associada ao VVC	27
4.6 - Sintomas em Tomateiro Santa Cruz , IAC 2731 , Devidos a Estirpe de VVC Isolada	31

pag.

4.7 - Sintomatologia em Tomateiro Devida à Deficiência dos Macronutrientes e à Deficiência Associada ao VVC	32
4.8 - Observações ao Microscópio Ótico em Cortes de Folha de Tomateiros com Deficiência e com a Associação Vírus e Deficiência	35
4.9 - Exame de Cortes Ultrafinos de Folhas de Tomateiros com Deficiência e em Solução Completa com VVC	39
5 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	
5.1 - Isolamento da Estirpe de VVC	46
5.2 - Determinação do Pêso Sêco de Plantas Doentes e Sadias	47
5.3 - Deficiência de Macronutrientes Relacionadas com a Multiplicação do VVC	48
5.4 - Deficiência de Macronutrientes em Tomateiro	49
5.5 - Nutrição do Tomateiro Associada ao VVC	50
5.6 - Sintomas de Deficiência de Macronutrientes Associados à Infecção com VVC	52
5.7 - Observações ao Microscópio Ótico	53
5.8 - Exame de Células de Folha de Tomateiro ao Microscópio Eletrônico	53
6 - RESUMO E CONCLUSÕES	
6.1 - Resumo	56
6.2 - Conclusões	56
7 - SUMMARY	58
8 - BIBLIOGRAFIA	60
APÊNDICES	65

1 - INTRODUÇÃO

Os vírus de um modo geral são constituídos de uma capa protéica , recobrando uma cadeia de ácido nucléico. Aquêles que se multiplicam em células vegetais possuem, geralmente, cadeias de RNA . Os vírus animais, em geral, apresentam ácido nucléico do tipo DNA . Os dois grupos de vírus variam bastante quanto à complexidade estrutural, química e funcional. Os bacteriófagos, por exemplo, são dotados inclusive de um mecanismo ativo pelo qual injetam cadeias de DNA no interior das células bacterianas.

Não possuindo protoplasma e nem um mecanismo ativo de penetração, os vírus de planta requerem para se multiplicar duas condições básicas: um protoplasma vivo e uma "porta-de-entrada", motivo pelo qual utiliza-se abrasivo em trabalhos de inoculação mecânica. Dentre êstes vírus, há pouco mencionados, interessa-nos destacar aqui os vírus do "vira-cabeça" do tomateiro (VVC).

O VVC é conhecido na literatura inglesa como "Tomato Spotted Wilt Virus - TSWV" . Na nomenclatura de SMITH e na de HOLMES tem as seguintes denominações:

Lycopersicum Virus 3 , SMITH

Lethum australiense var. typicum , HOLMES

BLACK et al. (1952) conseguiram obter preparações, parcialmente , purificadas de VVC e constataram que as partículas tinham 90 x 120 m μ . Mais tarde, MARTIN (1964) obteve VVC em alto grau de purificação, conseguindo melhores resultados em microscopia eletrônica com suas preparações e com os cortes ultrafinos de ponta de raiz de tomateiro (Lycopersicum sculentum , MILL) , afetada pelo mesmo. BEST e KATE KAR (1964) sugerem também que a membrana que envolve o VVC , nas células hospedeiras, é de natureza lipídica exibindo pois uma organização um pouco diferente da grande maioria dos vírus de planta. KITAJIMA (1965) constatou que o vírus se encontra encapsulado dentro dos elementos do retículo endoplasmático (ER) e as partículas esféricas ou elípticas possuem um diâmetro em torno de 100 m μ . O mesmo autor, através de estudo em células de várias hospedeiras, observou que o vírus está sempre associado aos elementos do retículo e ao interior das membranas do envólucro nuclear. Devido a esta associação vírus e ER o referido autor sugere que o retículo endoplasmático deve ser o local onde se realiza ao menos parte da biossíntese do vírus.

A literatura anterior a 1930 já enumera o tomateiro e outras plantas como hospedeiras do VVC . Mas, sob o ponto de vista econômico, a referida virose se reveste de grande importância em culturas de tomateiro, embora tenha sido constatada em culturas de batatinha (Solanum tuberosum L.) , de fumo (Nicotiana tabacum L.) e de amendoim (Arachis hypogea L.) .

O controle do vírus tem sido tentado, mas até o momento nenhum resultado satisfatório foi constatado. Inseticidas sistêmicos foram utilizados com o objetivo de controlar a disseminação de seu principal vetor Thrips tabaci Lind. , além de algumas Frankniellas . No Brasil, FRAGA e COSTA (1950) , GALLO et al. (1960) e GALLO et al. (1961) , usaram vários sistêmicos, contudo, os resultados são bastante controversos e até o momento não são indicados como meio eficiente de controle do VVC . Mais recentemente, COSTA et al. (1964) , trabalhando com alguns sistêmicos, constataram que o Granutox - 5 reduzia a infecção de 42,0% (testemunha) para 9,7% (tratamento) . A produção ficou comprometida e os mesmos autores sugerem, que as doses elevadas empregadas nos experimentos foram responsáveis pelos efeitos fitotóxicos constatados. A literatura registra várias tentativas de obtenção de variedades resistentes, mas até o momento não se conhecem resultados inteiramente satisfatórios e convincentes.

Como a sintomatologia de vários vírus se assemelha a algumas deficiências minerais, é razoável levantar a hipótese de que plantas afetadas pelos mesmos possuam um mecanismo anormal de absorção, translocação ou aproveitamento dos nutrientes minerais. As variações ocorridas no teor de ácidos aminados e amidas foram constatados por SELMAN et al. (1961) em plantas de tomateiro afetadas pelo VVC. STEINBERG et al. (1950) e DIENER e WEAVER (1957) relataram também os efeitos dos vírus sobre suas hospedeiras. O primeiro observou acúmulo de ácidos aminados, enquanto o segundo notou aumento do teor de prolina e do ácido piperídico nas plantas doentes. Outros agentes como toxinas de insetos e mesmo compostos químicos podem provocar alterações na composição da planta referente não só a compostos minerais, como a orgânicos. Foi o que COSTA et al. (1960) observou com as toxinas de cigarrinhos (Empoasca fabae , HARRIS) em amendoim.

As estruturas celulares para serem formadas, dependem direta ou indiretamente dos nutrientes minerais. A deficiência de cálcio, por exemplo, provoca uma série de anomalias na infra-estrutura celular, especialmente na organização das membranas [MARINOS (1962)]. A deficiência de nitrogênio provoca um amarelecimento generalizado nas folhas, constatando-se modificações, mais ou menos, profundas na estrutura dos cloroplastos [THOMSON e WEIER (1962)]. Se postularmos que o vírus atua na célula como agente estranho, modificando o metabolismo dos nutrientes minerais, parece óbvio aceitar a ocorrência de distúrbios semelhantes aos de natureza puramente nutricionais.

Os vírus requerem para a sua biossíntese fosfato, açúcar e bases nitrogenadas que vão constituir as cadeias de ácidos nucleicos. Os ácidos aminados são necessários para a formação do seu envólucro protéico. Além destas exigências primárias, os vírus requerem da célula hospedeira uma série de cofatores, como Mg^{++} , K^+ , Mn^{++} e outros, para que se processem as reações enzimáticas responsáveis pelas biossínteses. Sabe-se da literatura que a multiplicação do vírus em plantas com deficiência de certos nutrientes se realiza menos intensamente que as normais. A literatura registra casos em que a infecção de VVC é quase nula em culturas de tomateiros deficientes em nitrogênio.

A presente tese tem por objetivo estudar a influência de uma estirpe de VVC, isolada pelo autor, no teor de macronutrientes do tomateiro; a relação entre deficiência de macronutrientes e multiplicação do vírus e as possíveis modificações na infra-estrutura celular devidos a infecção virótica. Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios da Cadeira nº 20, Química Biológica, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP e na Seção de Virulogia do Instituto Butantã, São Paulo, SP.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Isolamento de Estirpe de VVC

A ocorrência de estirpes de VVC tem sido relatada na literatura. MORRIS (1946) afirma que a moléstia conhecida como "vira-cabeça" do tomateiro, e devida a um complexo virótico de, no mínimo, cinco estirpes. Apresentam muita semelhança entre si, embora possam ser diferenciadas por uma série de métodos. O mesmo autor afirma que o ponto de inativação térmica de uma delas é da ordem de 42°C e da outra acima de 52°C.

De um modo geral tôdas as estirpes de VVC são bem instáveis perdendo, rapidamente, a atividade quando expostas ao ar atmosférico (2 horas de exposição), [GEOFFREY e BALD (1933)].

SAMUEL e BALD (1933) realizando trabalhos quantitativos com estirpes de VVC e TMV, submetidas a testes de envelhecimento e inativação térmica, usaram lesões primárias de Nicotiana glutinosa que exibiam características próprias com relação ao número de lesões obtidas e atividade virótica. BEST e GALLUS (1955) usando a técnica de lesões primárias, distinguiram duas estirpes de VVC: A e E. A estirpe A induz necrose apical sistêmica, necrose do caule e das folhas do tomateiro. Ao passo que E provoca apenas sintomas "verde-escuro" nas folhas, do tipo mosaico. O autor denomina A de severa e E de fraca.

Mais recentemente, BEST e HARIHARASUBRAMANIAN (1967) estudando, serologicamente, as estirpes do VVC, E e R, encontraram vários grupos antigênicos comuns, podendo porém, serem distinguidos por reações serológicas devidas a alguns grupos antigênicos diferentes.

2.2 - Influência dos Vírus na Composição dos Vegetais

A sintomatologia virótica, às vezes, se confunde com a de deficiência de nutrientes, podendo ocorrer uma influência do vírus na absorção, translocação e assimilação dos nutrientes. A literatura registra inúmeros casos de influência do vírus sobre a composição da planta.

No Brasil, COSTA e CARVALHO (1965) determinaram que o vermelhão do algodoeiro, causado por vírus, reduzia em média, de 23,0% o teor de MgO ; 13,1% o de K₂O e 16,0% o de CaO . Os mesmos autores encontraram que o vírus do amarelo baixeiro do tomateiro (VAB) reduzia de 11,0% o teor de N ; 25,0% o de P ; 19,0% o de Ca ; 20,0% o de Mn e um aumento de Fe da ordem de 21,0% . Ainda, com referência ao VAB , verificaram que as folhas baixas do tomateiro, com sintomatologia que faz lembrar a deficiência de Mg , possuem um menor teor de Mg (20,0%) em relação às sadias. CALDAS et al. (1967.a) constataram que o VAB não afeta o teor total desse nutriente, mas a sua distribuição na planta.

COOK e GOHEEN (1961) , citado por MALAVOLTA (1965) , mostraram haver semelhança entre os sintomas de falta de K e aqueles provocados pela presença do vírus "leaf roll" da videira. Em ambos os casos ocorria sempre redução no teor de K , mas diferiam entre si na relação K/Mg dos pecíolos. No caso da virose, o nível de K no pecíolo é alto e o de Mg baixo, ao contrário do que ocorria em plantas deficientes.

HAAG et al. (1967) encontraram que em plantas cítricas afetadas pela "tristeza", a distribuição de radiofósforo (³²P) era bastante alterada. CALDAS et al. (1967.b) notaram que há menor absorção de fosfato (³²P) em plantas afetadas pelo VVC .

BERGMAN (1962) , estudando a influência do TMV na composição das folhas do tomateiro, encontrou que os teores de P , K , Ca, Mg e B não sofreram variações significante. Ao passo que, os teores de Mn , Fe e Al reduziram , significativamente. Notou grande variação nos teores de Cu e Zn , cuja redução era da ordem de 50% .

2.3 - Influência do Teor de Nutrientes na Multiplicação de Vírus

Com referência a este tópico, raros são os trabalhos encontrados na literatura. WELKIE et al. (1958) relatam o benéfico efeito da deficiência em Mn para a multiplicação do vírus do mosaico comum do fumo em Nicotinum tabacum.

SELMAN e GRANT (1957) , estudando a influência do teor de N sobre a multiplicação do VVC , observaram que o teor do vírus aumenta com o suprimento de N , mesmo além do ótimo para crescimento da planta.

2.4 - Efeito do Vírus Sobre o Pêso Sêco das Plantas

DIENER (1963) lembra que os efeitos de muitos vírus s faz sentir como consequência de um envelhecimento prematuro das plantas infectadas. Esse efeito ao que tudo indica se reflete no pêso sêco das mesmas.

O VVC do tomateiro causa modificações profundas na fisiologia da planta. GRIEVE (1943) mostrou que o mesmo causa significativa depressão no pêso sêco, área foliar, desenvolvimento da fôlha e conteúdo de água. O mesmo autor sugere que o efeito sobre o pêso sêco total, seja devido a destruição parcial da eficiência assimilatória do tecido; sobre o pêso total, pela destruição de hormônios de crescimento.

2.5 - Nutrição do Tomateiro

A literatura registra uma volumosa informação sobre a nutrição do tomateiro, principalmente, a respeito da absorção, translocação e utilização de macronutrientes.

BEESON et al. (1944), cultivando tomateiro em solução nutritiva, estabeleceram uma série de correlações que podem ser assim resumidas:

- a) a concentração de Ca^{++} nos tecidos reduz com o aumento de
- b) a concentração de Ca^{++} está relacionada, negativamente com o suprimento de Ca^{++} ;
- c) a concentração de fosfato está correlacionada, positivamente com o teor de Mg^{++} ;
- d) as concentrações de S e N não tem nenhuma relação com o suprimento dos outros nutrientes.

A interação P e Mg foi estudada por CONROY e LAMBE (1962), constataram que ao aplicar P e calcário, ocorria sintomas de deficiência de Mg, em tomateiro. Observou também que a aplicação de P, reduzia os teores de N e K na fôlha.

A "concentração de saturação" dos íons bivalentes Ca e Mg no tomateiro, é relativamente baixa, da ordem de 10 a 20 eq. mg/l, não aumentando o teor destes íons nos tecidos com o aumento de suas concentrações, além daquele valor. [OS-

Sobre o K , sabe-se que em baixas concentrações deste ion, os teores de Ca , P e Mg são geralmente mais elevados [WALL (1940.a)]. A literatura registra inúmeras observações sobre a influência de K no metabolismo orgânico do tomateiro.

Em plantas deficientes de K , WALL (1940.b) observou acumulação de NH_3 , amida e amino-compostos, enquanto o teor de proteína decaía.

Com referência à marcha de absorção de nutrientes pelo tomateiro, HESTER (1939) constatou que, em torno de 90 dias ocorria um aumento de 72% no seu peso total e absorvia $2/3$ dos nutrientes. Pelo exame dos gráficos fornecidos pelo autor, observa-se que o P é relativamente mais absorvido, durante o segundo mês, seguido pelo Mg , ao contrário dos demais macronutrientes.

A sintomatologia de deficiência de macronutrientes no tomateiro, parece já bem estabelecida pela literatura, inclusive WOOLEY (1957) propôs uma chave de sintomas de deficiência de micro e macronutrientes, resumindo uma série de observações de outros autores.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Isolamento da Estirpe de VVC

A partir de fôlhas de tomateiro infectadas pelo VVC , de plantações do município de Piracicaba (SP) , inocularam-se várias plantas testes, dentre estas, tomateiro (Lycopersicum sculentum , MILL , Var. Santa Cruz) , fumo (Nicotiana tabacum, L. Var. Turca) e fejoeiro (Phaseolus vulgaris, L. Var. Manteiga) , comprovando assim a natureza do vírus, pela sintomatologia nas várias hospedeiras.

O vírus foi conservado na casa de vegetação em plantas de beldroega (Portulaca oleracea, L.) . Para isolamento de uma estirpe de VVC , efetuaram-se diluições do suco infeccioso proveniente de beldroega e procederam-se a subseqüentes inoculações alternadas, em fejoeiro manteiga e fumo.

Da primeira inoculação em fejoeiro foi isolada uma lesão clorótica circular, resuspendida em tampão fosfato e inoculado em fumo, variedade turca. Após a sistematização do mesmo em fumo, seguiram-se inoculações em fejoeiro manteiga, usando sempre suco diluído. Esse ciclo de inoculações alternadas foi repetido seis vezes. Após o terceiro ciclo de inoculações, já se podia observar bastante uniformidade na forma e aparência das lesões em fejoeiro e fumo. Três outros ciclos foram levados a efeito, visando assegurar eficiente isolamento da estirpe.

3.2 - Estudo de Algumas Propriedades da Estirpe Estudada

3.2.1 - Teste de Dessecamento

Fôlhas de tomateiro afetadas pelo VVC , em estágio de sistematização, foram colhidas e armazenadas à temperatura ambiente (27°C) . Com intervalos de 24 horas, efetuaram-se inoculações mecânicas com o suco do referido material , em Nicotiana glutinosa, fumo Var. turca e fejoeiro manteiga.

O suco inoculado foi extraído, usando tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 , na proporção de uma parte de fôlhas para oito de "buffer" e o abrasivo utilizado foi carborundo com granulação da ordem de 300 "mesh".

O presente teste tem o objetivo de verificar até quantos dias após a colheita de fôlhas de tomateiro, o vírus ainda permanece infectivo nas mesmas.

3.2.2 - Teste de Inativação Térmica

O suco infeccioso foi extraído de folhas de tomateiro, segundo dados descritos, anteriormente, e submetidos a diferentes temperaturas, durante 10 minutos: 25°C (temperatura ambiente), 35°C, 45°C, 50°C e 60°C. Para se obter a temperatura de trabalho, montou-se um conjunto de tubos de parede fina em banho-maria com a temperatura desejada. Os referidos tubos, com mais ou menos 9 mm. de diâmetro, foram mantidos à temperatura desejada, durante 15 minutos, para efeito de equilíbrio térmico. Após os tratamentos durante 10 minutos, os tubos contendo suco infeccioso foram imediatamente resfriados em um sistema água-gêlo.

O suco assim tratado foi inoculado em Nicotiana glutinosa, fumo e feijoeiro manteiga. Após o aparecimento das lesões, os dados foram protocolados, levando-se em conta o número de folhas inoculadas.

O presente teste tem por objetivo verificar a temperatura, em torno da qual, há inativação do VVC pela ação do calor.

3.2.3 - Teste de Envelhecimento

A extração do suco infeccioso foi feita segundo técnicas já descritas, anteriormente. O mesmo foi, então, armazenado à temperatura ambiente (25°C) em tubos de ensaio. Com intervalos de 1 hora, inocularam-se as já referidas plantas testes. Após aparecimento de sintomas de VVC, as observações experimentais foram protocoladas. Os testes foram conduzidos até 12 horas após a extração do suco.

A finalidade deste ensaio é conhecer o período de tempo, após extração do suco infeccioso em tampão fosfato 0,05 M pH 7,0, em que o vírus permanece infectivo, à temperatura ambiente.

3.2.4 - Determinação do Ponto Final de Diluição

O suco extraído, conforme descrição anterior, foi submetido à diluições sucessivas desde 1:1, 1:16 até 1:2.048 (razão 0,5), usando solução fosfato 0,05 M pH 7,0 como tamponante e diluente. O conteúdo de cada tubo de ensaio, correspondente a determinada diluição, foi inoculado nas três plantas testes usadas nos ensaios anteriores. Os dados foram protocolados, após aparecimento dos sintomas de VVC.

O objetivo deste ensaio é testar a maior diluição do suco que é capaz de infectar a planta teste. Este teste permite estimar a concentração do vírus na planta hospedeira.

3.3 - Ensaio de Nutrição do Tomateiro Relacionada com a Presença do VVC

3.3.1 - Germinação das Sementes e Cultivo das Plantas

As sementes de tomate (Lycopersicon esculentum, MILL, Var. Santa Cruz, I.A.C. 2731) foram germinadas em caixas de madeira contendo sílica lavada. A germinação ocorreu 12 a 14 dias após o semeio. As mudinhas foram irrigadas com solução de HOAGLAND e ARNON 1/10 diluída.

Vinte e cinco dias após a germinação foram transferidas para solução nutritiva de HOAGLAND 1/5 diluída, aguardando aí até montagem do ensaio.

3.3.2 - Montagem do Ensaio

O presente experimento foi realizado em três épocas diferentes, usando solução nutritiva, de HOAGLAND e ARNON, sendo constituído dos seguintes tratamentos: Completo (C), Completo com Vírus (C + VVC), Meio-Completo (1/2 C), Meio-Completo com Vírus (1/2 C + VVC), Deficiente em Nitrogênio (= N), Deficiente em Nitrogênio com Vírus (= N + VVC), Deficiente em Fósforo (= P), Deficiente em Potássio (= K), Deficiente em Potássio com Vírus (= K + VVC), Deficiente em Cálcio (= Ca), Deficiente em Cálcio com Vírus (= Ca + VVC), Deficiente em Magnésio (= Mg), Deficiente em Magnésio com Vírus (= Mg + VVC), Deficiente em Enxofre (= S), Deficiente em Enxofre com Vírus (= S + VVC) e Deficiente em P com vírus.

Cada tratamento foi montado numa bacia plástica com 20 litros de capacidade, contendo 10 plantas, sendo que cada repetição constituía-se de 5 plantas reunidas. Sobre cada bacia colocou-se uma tampa de Duratex contendo orifícios para introdução das mudas e adaptação de tutores.

Para montagem dos experimentos, as mudas da solução 1/5 diluída, com 14 a 20 cm de altura (6 a 8 pares de folhas), foram transferidas para os respectivos recipientes. Aí permaneceram em solução 1/2 diluída de 10 a 12 dias antes de se iniciar os tratamentos com deficiência, para aumento de peso seco, confor

me dados de ensaios preliminares. Os vários tratamentos levados a efeito dentro da casa de vegetação foram inteiramente casualizados.

Durante os vários ensaios, foram observados os seguintes cuidados:

- a) as soluções nutritivas foram renovadas de 12 em 12 dias, sendo que o volume (20 litros) da solução nutritiva, de cada tratamento, foi completado de 2 em 2 dias;
- b) durante os ensaios as mudas foram pulverizadas com Cupravit na razão de 1,5 g por litro, usando Novapal como espalhante=adesivo;
- c) o Folidol a 0,1% foi empregado como defensivo;
- d) as tampas de cada recipiente, contendo as plantas, foram viradas, diariamente, com a finalidade de mudá-las de posição;
- e) para evitar frutificação, as flôres foram retiradas a medida em que apareciam.

3.3.3 - Inoculação do VVC

O suco infeccioso foi extraído, conforme descrições feitas em 3.2. Para inoculação mecânica, empregou-se carborundo 300 "mesh", como abrasivo.

Foram inoculados de 4 a 6 pares de fôlhas, sendo 2 a 3 superiores e 2 a 3 inferiores, 5 a 10 dias antes de surgirem os primeiros sintomas visíveis de deficiência.

3.3.4 - Colheita do Material

Após a sistematização do vírus, nos diversos tratamentos, o material foi colhido, geralmente, 15 a 20 dias após a inoculação.

As plantas de cada tratamento foram divididas em dois grupos, constituindo-se cada um, numa repetição.

Cada planta foi sub-dividida em pinas, pecíolos, caules e raízes, cujos pesos foram anotados. As amostras foram lavadas em HCl diluído e duas vezes em água destilada. Assim preparadas, foram acondicionadas em sacos de papel (tipo comercial) e secadas em estufa de ventilação forçada a 70-75 C. O material permaneceu na estufa até constância de peso, anotando-se novamente o peso, em seguida moído e acondicionado em saquinhos plásticos que foram mantidos em dessecador.

3.4 - Análise Química

O nitrogênio foi analisado pelo método semi-micro de KJELDAHL e o NH_3 liberado foi titulado com H_2SO_4 0,01 N .

Para determinação dos demais macronutrientes, foi feita uma digestão nitro-perclórica, empregando-se 1 g de material seco e completando o volume do extrado para 100 ml . Para análise de P , K e S foram seguidas as indicações descritas por MALAVOLTA (1964) .

A análise de Ca e Mg foi feita por quelatometria, segundo GLÓRIA et al. (1965) .

3.5 - Bioensaio para Determinação da Concentração do Vírus no Tomateiro, em Solução Nutritiva Completa e Deficiente

Para efeito de se estudar a influência do teor de macronutrientes na multiplicação do VVC , foram realizados dois ensaios semelhantes aos anteriores. Em ambos, o vírus foi inoculado logo após o início do aparecimento de sintomas de deficiência em tomateiro.

Com o aparecimento de sintomas sistêmicos, foram retiradas 4 amostras em cada tratamento. Cada amostra foi preparada e inoculada em 4 plantas de feijoeiro manteiga, ou seja, 8 pares de folhas cotiledonares por amostra. Logo após o surgimento de lesões cloróticas bem definidas, estas foram contadas e determinaram-se o número de lesões por cm^2 de área foliar.

3.6 - Espécimes para Estudo das Modificações Estruturais

3.6.1 - Lâminas para Observações ao Microscópio Ótico

Foram realizados cortes transversais na porção do limbo, com sintomas de deficiência associada ao VVC e montados em glicerina e água.

3.6.2 - Espécimes para Observações ao Microscópio Eletrônico

O material foi fixado, ora em ósio 1% tamponado , ora em $KMnO_4$ 2% nao tamponado. A desidratação foi feita em série crescente de álcool, quando para

inclusão em Metacrilato ; em acetona para inclusões em EPON - 812 .

O material incluído foi cortado em ultramicrotomo Porter Blum MT - 1 , colorido para microscopia eletrônica, quando necessário, com ácido fosfotungstico ou com nitrato de uranila.

As observações do "specimen" foram feitas no Microscópio Eletrônico E - 1 , do Instituto Butanta , SP.

4 - RESULTADOS

Nos resultados em que foram realizados análises de variância, teste de média (Tukey) e cálculo do coeficiente de variação (C. V.), serão apresentados apenas os valores de F de tratamentos, quadrado médio residual (Q M R), o valor da diferença mínima significativa (Δ) e o de C. V.. Quando o valor de F estiver encimado por um asterisco (*) significa que há diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade e com dois (**), ao nível de 1% de probabilidade.

4.1 - Isoamento da Estirpe do Vírus "Vira-Cabeça"

A intensidade de infecção do VVC nas plantas testes empregadas (Nicotiana glutinosa, fumo e feijoeiro) foi representada pelo número de lesões por fôlha ou avaliado, arbitrariamente, pelo número de sinais positivos (+).

4.1.1 - Teste de Dessecamento

Os dados obtidos estão reunidos à Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de infectividade do VVC, proveniente de fôlhas de tomateiro, em feijoeiro manteiga, Nicotiana glutinosa e fumo, cujas fôlhas foram armazenadas à temperatura ambiente (27°C) e amostradas em intervalos de 1 dia.

Dias de Dessecamento	Resultados Observados nas Plantas Testes		
	Feijoeiro	<u>N. glutinosa</u>	Fumo
0	+++++	++++	++
1	+++	++	+
2	++	+	+
3	+	+	+
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-

4.1.2 - Teste de Inativação Térmica

Os dados das médias de dois ensaios realizados, estão agrupados na Tabela 2 e os resultados da análise estatística, estão no rodapé da mesma.

Tabela 2 - Efeito do aumento de temperatura na inativação do VVC em suco infeccioso, proveniente de folhas de tomateiro, estudado em feijoeiro manteiga, Nicotiana glutinosa e fumo.

Temperatura (tratamentos)	Observações em					
	Número Médio de Lesões Cloróticas por Folha de Feijoeiro		<u>Nicotiana glutinosa</u>		Fumo	
	1º Ensaio	2º Ensaio	1º Ensaio	2º Ensaio	1º Ensaio	2º Ensaio
25°C (temp. amb.)	313	327	+++	+++	++	++
35°C	76	43	++	++	+	+
40°C	89	34	++	++	+	+
45°C	3	2	+	+	+	+
50°C	-	-	-	-	-	-
55°C	-	-	-	-	-	-
60°C	-	-	-	-	-	-

Q M R = 484,12

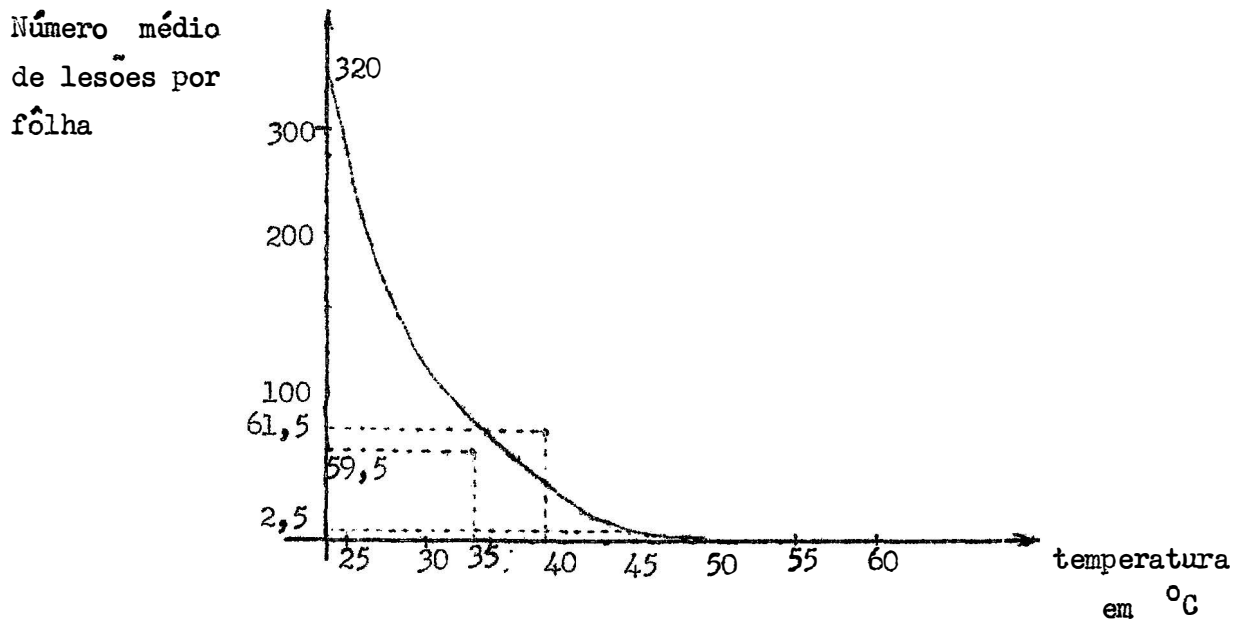
$\Delta = 189,26$

F (tratamento) = 15 **

C. V. = 19,84%

Representando os dados médios, em feijoeiro, da Tabela 2 em um sistema cartesiano, obtém-se o gráfico que se segue:

Gráfico 1 - Curva que relaciona o número de lesões cloróticas por fôlha de feijoeiro manteiga, em função da temperatura a que o suco infeccioso foi submetido.



4.1.3 - Ponto Final de Diluição

O resumo dos dados experimentais se encontra na Tabela 3. Os dados obtidos da análise de variância e teste de Tukey se encontram no rodapé da mesma.

4.1.4 - Teste de Envelhecimento

Os resultados obtidos em N. glutinosa, fumo e feijoeiro manteiga revelaram que o suco infeccioso permanece infectivos até 8 a 9 horas após extração.

Tabela 3 - Resultados obtidos em Nicotiana glutinosa, feijoeiro manteiga e fumo com suco infeccioso contendo VVC, proveniente de tomateiro, e sofrendo diluições sucessivas.

Diluição do suco infeccioso	Resultados em					
	<u>Nicotiana glutinosa</u>		Fumo		Feijoeiro manteiga	
	1º Ensaio	2º Ensaio	1º Ensaio	2º Ensaio	1º Ensaio	2º Ensaio
Contrôle	+++++	+++++	++++	++++	280	260
16	++++	++++	+++	+++	76	65
32	+++	+++	++	++	22	8
64	++	++	+	+	8	4
128	+	+	+	+	3	1
256	+	+	+	+	-	-
512	+	+	-	-	-	-
1024	-	-	-	-	-	-
2048	-	-	-	-	-	-

Q M R = 28,75

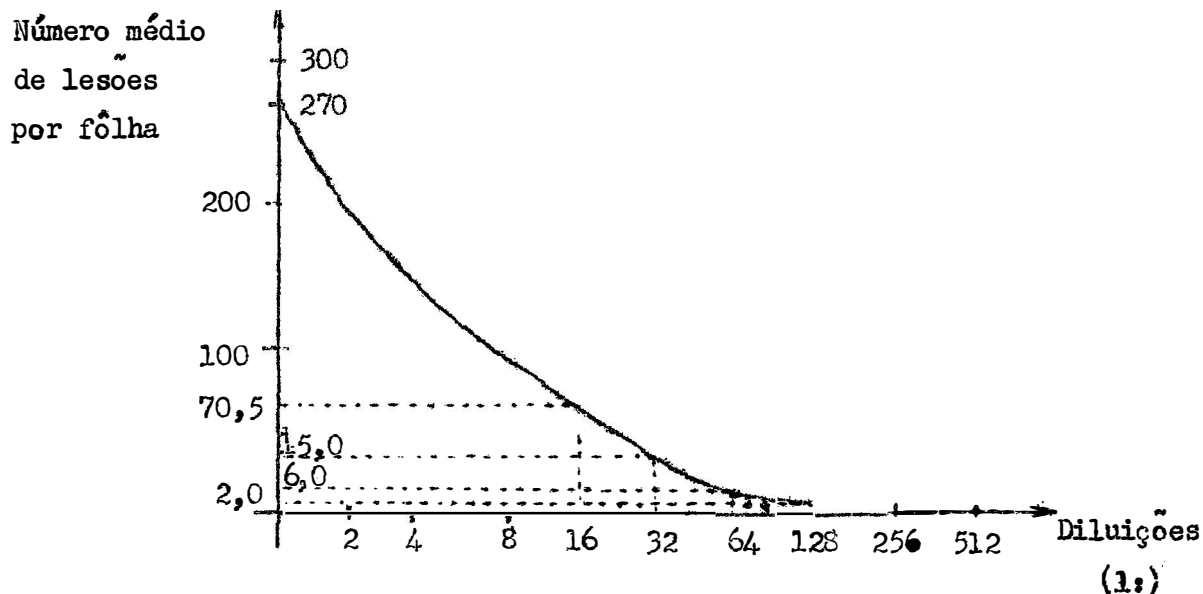
Δ = 23,91

F (tratamento) = 910,74**

C. V. = 7,50% .

Colocando os dados da Tabela 3 num sistema cartesiano, obtém-se o seguinte gráfico:

Gráfico 2 - Curva que relaciona o número de lesões cloróticas por fôlha de feijoeiro em função das diluições sucessivas.



4.2 - Determinação do Pêso Sêco de Plantas Doentes e Sadias (*)

Os dados de unidade se referem aquêles obtidos nos ensaios de deficiência de macronutriente, em tomateiro, relacionados com a presença do vírus do "vira-cabeça". Três ensaios para estudo de deficiência foram realizados, sendo que os dois últimos na mesma época que os de deficiência associada ao VVC. Para efeito de comparação de plantas doentes e sadias, serão reunidos apenas os resultados do 2º e 3º ensaios, com excessão do tratamento - Ca.

(*) Plantas doentes no presente experimento significam plantas infectadas pelo VVC e sadias aquêlas sem VVC.

4.2.1 - Teores de Umidade nas Diversas Partes de Plantas Sadias

Os dados dos diversos tratamentos dos dois últimos ensaios foram analisados, estatisticamente, não ocorrendo diferença significativa entre tratamentos nas várias partes das plantas sadias.

4.2.2 - Teores de Umidade nas Diversas Partes de Plantas Doentes

Análise estatística dos dados revelou que em pinas e raízes não há diferença significativa entre tratamentos, razão pela qual êsses dados foram omitidos.

Mas em pecíolos e caules há diferença estatística entre as médias dos vários tratamentos.

Em Pecíolos e Caules

O resumo dos dados está na Tabela 4 e os valores de Q M R , F de tratamento , Δ e C. V. estão no rodapé da mesma.

Tabela 4 - Porcentagem de umidade de pecíolos e caules de plantas de tomateiro afetados pelo VVC .

Tratamentos	Teores Percentuais nas Diversas Partes da Planta					
	Pecíolos			Caules		
	2º Ensaio	3º Ensaio	Médias	2º Ensaio	3º Ensaio	Médias
C + VVC	91,68	90,46	91,07	88,85	89,07	88,96
1/2 C + VVC	91,50	91,97	91,72	91,31	89,63	90,47
- N + VVC	85,49	88,16	86,81	87,02	84,29	85,65
- P + VVC	91,58	91,55	91,56	90,04	90,70	90,37
- K + VVC	90,27	89,43	89,85	88,21	88,48	88,34
- Mg + VVC	89,93	90,93	90,43	89,51	89,01	89,26
- S + VVC	91,55	90,65	91,10	90,70	89,29	89,49

F (tratamento) = 6,14*

Δ = 4,00

Q M R = 0,9317

C. V. = 1,07%

F (tratamento) = 7,24*

Δ = 4,24

Q M R = 1,9100

C. V. = 0,98%

4.2.3 - Comparação Entre as Porcentagens de Umidade de Plantas Doentes e Sadias

Foram analisadas as variações dos teóres de umidade de pinas , pecíolos , caules e raízes de plantas doentes em relação aos teóres de plantas sadias.

Não houve diferença estatística entre os teóres de pecíolos , caules e raízes de plantas sadias em comparação com as plantas infectadas com VVC . As diferenças foram constatadas apenas em pinas.

Os dados são apresentados na Tabela 5 seguindo os mesmos critérios adotados anteriormente.

Tabela 5 - Teores médios de umidade de pinas de plantas doentes comparados com plantas sadias

Tratamentos	Pinas	
	Doentes	Sadias
C	87,60	93,71
1/2 C	87,40	88,58
- N	88,26	88,34
- P	82,79	87,24
- K	84,91	85,20
- Mg	85,38	89,78
- S	86,52	87,42
Médias	86,12	88,61

Q M R = 2,96 F (entre plantas doentes

C. V. = 3,38% e sadias) = 7,32*

4.3 - Influência da Deficiência de Macronutrientes na Multiplicação do VVC

As médias obtidas no 1º e 2º ensaios estão reunidas na Tabela 6 .

Tabela 6 - Dados do número de lesões cloróticas por cm² de fôlha de feijoeiro, quando inoculada com suco infeccioso proveniente de tomates, cultivados em solução completa e com deficiência de macronutrientes.

Tratamentos	Lesões Cloróticas por cm ² de Fôlha de Feijoeiro		
	1º Ensaio	2º Ensaio	Médias
C	1,708	2,367	2,037
1/2 C	1,897	1,719	1,808
- N	0,017	0,030	0,024
- P	0,137	0,077	0,107
- K	0,015	0,024	0,019
- Ca	0,090	0,083	0,086
- Mg	0,283	0,346	0,318
- S	0,104	0,053	0,079

Q M R = 0,032

F (tratamento) = 44,99**

Δ = 0,75

C. V. - 31,80% .

Sendo as médias dos tratamentos deficientes bem menores em relação aos tratamentos C e 1/2 C, foi feita análise de variância e teste de Tukey, apenas para os casos de deficiência. A análise de variância deu como resultados os seguintes dados:

Q M R = 0,0009

F (tratamento) = 26,78**

Δ = 0,1196

C. V. = 28,40%

4.4 - Nutrição do Tomateiro

Foram conduzidos três ensaios de nutrição com tomateiro sem vírus, sendo que os dois últimos foram realizados na mesma época dos ensaios de deficiência associada à infecção com VVC.

Com referência aos ensaios de deficiência de macronutrientes, foram realizadas análises estatísticas dos dados das três épocas e separadamente das duas finais. O objetivo deste procedimento é verificar se os dados dos três ensaios se comportaram, semelhantemente, aos dos dois últimos que foram realizados simultaneamente com os dois ensaios de deficiência associada ao "vira-cabeça". Pelas análises de variância e teste de médias (Tukey), foi constatado que reunindo os três ensaios com tomateiros sem vírus, ou os dois últimos, os dados possuem comportamento semelhante.

Para estabelecer algumas relações entre macronutrientes e seus efeitos sobre tomateiro, reuniram-se os três ensaios levados a efeito. Das informações obtidas serão apresentadas nesta tese apenas as que pareceram ser de maior interesse. O resumo geral dos dados de plantas sadias e doentes estão colocados nos apêndices I, II, III, IV e V.

Os resultados que mereceram um estudo mais minucioso, encontram-se nas Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11.

4.4.1 - Determinações do N, Ca e S em Pinas

Tabela 7 - Dados médios das porcentagens de N, Ca e S de plantas sadias, obtidos em três ensaios.

Tratamentos	Teôres de Macronutrientes em Pinas (%)							
	Nitrogênio				Cálcio			
	1º Ens.	2º Ens.	3º Ens.	Médias	1º Ens.	2º Ens.	3º Ens.	Médias
C	4,84	4,08	4,31	4,41	3,05	3,76	3,47	3,46
1/2 C	3,46	4,87	4,33	4,22	2,69	2,82	2,90	2,80
- N	2,52	2,95	2,79	2,75	1,53	1,40	1,31	1,41
- P	5,04	4,19	4,03	4,45	3,15	3,00	2,59	2,54
- K	4,52	4,32	4,80	4,54	4,39	4,35	4,16	4,30
- Ca	3,21	3,85	3,52	3,52	1,31	1,54	1,25	1,39
- Mg	4,77	4,20	4,43	4,46	2,73	2,37	2,35	2,48
- S	4,55	4,15	4,42	4,37	2,78	4,06	2,83	3,22

Resultados das Análises Estatística para Nitrogênio

Q M R = 0,1759
 F (tratamento) = 6,73 **
 Δ = 1,20
 C. V. = 10,20%

Resultados das Análises Estatística para Cálcio

Q M R = 0,0929
 F (tratamento) = 31,76 **
 Δ = 0,90
 C.V. = 11,10%

Tratamentos	Teores de Macronutrientes em Pinas (%)			
	Enxôfre			
	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	Médias
C	0,63	1,53	1,60	1,25
1/2 C	0,55	1,13	1,16	0,94
- N	2,76	3,26	3,22	3,08
- P	0,85	1,46	1,58	1,29
- K	0,50	1,27	1,22	0,99
- Ca	0,94	0,82	0,64	0,80
- Mg	0,77	1,02	1,23	1,01
- S	0,35	0,41	0,29	0,35

Q M R = 0,0536
 Δ = 0,65

F (tratamento) = 36,54 **
 C. V. = 19,00%

4.4.2 = Determinação de K em Pecíolos

O teor de potássio nos pecíolos em comparação com as demais partes da planta, merece ser destacado e os dados estão resumidos na Tabela 8 .

Tabela 8 - Teores médios de K das várias partes da planta, em três épocas diferentes.

Tratamentos	Teores Médios de Potássio em Porcentagem			
	Pinas	Pecíolos	Caules	Raízes
C	4,66	8,08	6,01	3,10
1/2 C	4,25	6,95	5,64	2,35
- N	4,89	7,45	4,58	3,45
- P	5,21	7,75	5,60	2,87
- K	1,15	2,03	1,95	0,66
- Ca	3,70	8,51	6,96	2,48
- Mg	5,61	9,13	7,10	3,36
- S	4,15	7,34	5,66	3,16

Outro aspecto de interesse e que será analisado é o do teor de Mg em pecíolos. As porcentagens de Mg encontram-se na Tabela 9 .

Tabela 9 - Teores médios de Mg em pecíolos de plantas sadias, dos ensaios realizados em três épocas.

Tratamentos	Teores Médios de Magnésio em Pecíolos (%)			
	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	Médias
C	0,37	1,14	0,84	0,78
1/2 C	0,23	0,51	0,74	0,49
- N	0,42	0,65	0,53	0,54
- P	0,58	0,78	0,90	0,75
- K	1,00	1,45	1,48	1,31
- Ca	1,07	1,03	0,98	1,02
- Mg	0,09	0,36	0,27	0,24
- S	0,49	0,88	0,78	0,72

Resultados das Análises Estatísticas para Magnésio

Q M R = 0,0207 F (tratamentos) = 15,79**
Δ = 0,40 C. V. = 19,60%

4.2.3 - Determinação de K em Caule

O teor de K do tratamento em que se omitiu N também merece ser destacado. Os dados à respeito estão resumidos na Tabela 10.

Tabela 10 - Teores médios de K em caules de plantas sadias, em ensaios realizados em três épocas.

Tratamentos	Teores Médios de Potássio em Caules em %			
	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	Médias
C	6,60	5,70	5,75	6,01
1/2 C	3,97	6,75	6,20	5,64
- N	5,05	4,20	4,50	4,58
- P	7,00	5,30	4,50	5,60
- K	1,90	2,45	1,50	1,95
- Ca	7,35	7,05	6,40	6,96
- Mg	8,95	6,00	6,35	7,10
- S	6,15	5,20	5,65	5,66

Q M R = 0,8984 F (tratamento) = 8,75**
Δ = 2,74 C. V. = 17,44%

4.2.4 - Determinação do N, P e Mg em Raízes Deficientes

Os teores de N no tratamento - P, o de P em - N e o de Mg em - K estão reunidos à Tabela 11, devido julgar-se importante tal destaque.

Tabela 11 - Teores de N, P e Mg em raízes de plantas sadias, nos ensaios realizados em três épocas.

Tratamentos	Teores de Macronutrientes em Raízes (%)							
	Nitrogênio				Fósforo			
	1º Ens.	2º Ens.	3º Ens.	Médias	1º Ens.	2º Ens.	3º Ens.	Médias
C	4,88	3,55	3,54	3,99	0,56	1,13	0,72	0,80
1/2 C	3,97	3,95	4,40	4,10	0,40	0,98	0,58	0,65
- N	2,27	2,53	2,29	2,36	1,54	1,96	1,72	1,74
- P	4,10	3,16	3,31	3,52	0,25	0,34	0,19	0,26
- K	3,90	3,35	3,89	3,71	0,85	1,19	0,56	0,86
- Ca	4,12	3,69	3,34	3,71	0,72	1,43	0,95	1,03
- Mg	4,43	3,15	3,45	3,67	0,49	1,12	0,73	0,78
- S	4,69	2,90	4,38	3,99	0,70	1,21	0,80	0,90

Q M R - 0,1961

Q M R - 0,0154

(tratamento) = 4,63**

F (tratamento) = 38,25**

Δ - 1,30

Δ = 0,35

C. V. = 12,18%

C. V. = 14,10%

Tratamentos	Magnésio			
	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	Médias
C	0,21	0,29	0,38	0,29
1/2 C	0,12	0,36	0,26	0,28
- N	0,24	0,12	0,16	0,14
- P	0,28	0,25	0,22	0,25
- K	0,77	0,46	0,40	0,54
- Ca	0,09	0,09	0,19	0,12
- Mg	0,12	0,19	0,26	0,19
- S	0,31	0,59	0,13	0,34

Resultados de Análises Estatísticas do Teor de Magnésio

Q M R = 0,0177

Δ = 0,40

F (tratamento) = 2,88**

C. V. = 49,22% .

4.5 - Nutrição do Tomateiro Associada ao VVC

As relações observadas no item 4.4 com referência à nutrição das plantas sadias dos três ensaios reunidos, ou dos dois últimos, foram seguidas, de um modo geral pelas plantas doentes. Algumas diferenças foram constatadas e os dados que merecem ser estudados, serão apresentados logo a seguir.

4.5.1 - Algumas Variações sob o Aspecto Nutricional das Plantas Doentes, em Relação as Plantas Sadias do 2º e 3º Ensaios.

Teor de Fósforo nas Pinas

Os dados em porcentagem de fósforo em plantas doentes e sadias estão agrupados na Tabela 12 .

Tabela 12 - Porcentagens de fósforo em plantas doentes e sadias, obtidas no 2º e 3º ensaios.

Tratamentos	Teores Percentuais de Fósforo em Pinas de Plantas Doentes e Sadias						
	Plantas Sadias			Plantas Doentes			
	2º Ensaio	3º Ensaio	Médias	2º Ensaio	3º Ensaio	Médias	
C	0,89	0,71	0,80	0,87	0,61	0,74	
1/2 C	0,85	0,78	0,82	0,79	0,68	0,74	
- N	1,17	0,87	1,02	1,00	0,90	0,95	
- P	0,23	0,13	0,18	0,29	0,21	0,25	
- K	1,25	0,78	1,02	0,95	0,76	0,86	
- Ca	0,61	0,65	0,63	0,54	0,80	0,67	
- Mg	0,89	0,88	0,88	0,81	0,73	0,77	
- S	0,96	0,90	0,93	0,83	0,52	0,68	

Resultados das Análises Estatísticas
para Plantas Sadias

Q M R = 0,0141
F (tratamento) = 10,74**
 Δ = 0,46
C. V. = 15,10%

Resultados das Análises Estatísticas
para Plantas Doentes

Q M R = 0,0148
F (tratamento) = 5,76*
 Δ = 0,52
C. V. = 17,20%

Teor de Enxôfre nas Pinas

A Tabela 13 fornece os dados dos teôres de enxôfre de plantas doentes e sadias.

Tabela 13 - Porcentagens de enxôfre durante o 2º e 3º ensaios, em pinas de plantas doentes e sadias.

Tratamentos	Porcentagens de Enxôfre em Pinas de Plantas Doentes e Sadias					
	Plantas Sadias			Plantas Doentes		
	2º Ensaio	3º Ensaio	Médias	2º Ensaio	3º Ensaio	Médias
C	1,53	1,60	1,56	1,21	1,31	1,26
1/2 C	1,13	1,16	1,14	1,38	1,27	1,32
- N	3,26	3,22	3,24	2,62	3,30	2,96
- P	1,46	1,58	1,52	1,29	1,50	1,39
- K	1,27	1,22	1,24	0,80	0,90	0,85
- Ca	0,82	0,64	0,73	0,61	0,85	0,73
- Mg	1,02	1,23	1,12	0,88	1,27	1,08
- S	0,41	0,29	0,35	0,49	0,30	0,40

Q M R = 0,0082
F (tratamento) = 178,86**
 Δ = 0,35
C. V. = 6,70%

Q M R = 0,3803
F (tratamento) = 3,11
C. V. = 49,30%

Teor de Cálcio nos Pecíolos

Os teôres de cálcio nos pecíolos de plantas doentes e sadias estão resumidos na Tabela 14 .

Tabela 14 - Porcentagens de Cálcio em pecíolos de plantas doentes e sadias, obtido no 2º e 3º ensaios.

Tratamentos	Porcentagens de Cálcio em Pecíolos de Plantas Doentes e Sadias					
	Plantas Sadias			Plantas Doentes		
	2º Ensaio	3º Ensaio	Médias	2º Ensaio	3º Ensaio	Médias
C	2,42	1,97	2,20	2,12	1,44	1,78
1/2 C	2,10	1,60	1,85	1,76	1,63	1,70
- N	0,70	0,16	0,43	0,30	0,38	0,34
- P	1,48	1,17	1,32	1,78	1,34	1,56
- K	2,00	2,53	2,26	3,09	2,32	2,71
- Ca	1,06	0,80	0,93	0,86	0,66	0,76
- Mg	2,06	2,24	2,15	1,88	1,76	1,82
- S	2,56	1,58	2,07	2,30	1,50	1,90

$$Q M R = 0,1073$$

$$Q M R = 0,0569$$

$$F (\text{tratamento}) = 8,66^{**}$$

$$(\text{tratamento}) = 18,52^{**}$$

$$\Delta = 1,33$$

$$\Delta = 0,99$$

$$C. V. = 19,80\%$$

$$C. V. = 15,20\%$$

4.5.2 - Teôres de Macronutrientes de Plantas Doentes em Comparação com as Sadias

As análises de variância dos teôres de N , P , K , Ca , Mg e S nas pinas não revelaram nenhuma diferença significativa entre plantas doentes e plantas sadias.

Em pecíolos, caules e raízes ocorreram algumas alterações que se rão expostas a seguir.

A - Em pecíolos ocorreram algumas diferenças nos teôres de N e K , cujos dados são apresentados na Tabela 15 .

Tabela 15 - Porcentagem de N e K de plantas doentes comparadas com os teôres de plantas sadias.

Tratamentos	Teores de Nitrogênio e Potássio em Pecíolos de Plantas Doentes e Sadias (%)			
	Porcentagem de Nitrogênio		Porcentagem de Potássio	
	Doentes	Sadias	Doentes	Sadias
C	2,01	1,44	7,32	6,32
1/2 C	1,87	1,78	6,88	6,50
- N	1,25	0,96	7,10	5,78
- P	1,98	1,54	7,35	6,10
- K	2,15	1,80	2,25	1,45
- Ca	2,04	1,94	8,65	6,30
- Mg	2,04	1,56	8,25	7,00
- S	1,80	1,86	7,42	6,25
Médias	1,87	1,61	6,90	5,71

Q M R = 0,0242

Q M R = 0,1724

F = 13,19**

F = 32,28**

C. V. = 8,88%

C. V. = 6,58%

B - Em caules e em raízes ocorreram variações nos teôres de Nitrogênio e os dados estão contidos na Tabela 16 .

Tabela 16 - Porcentagens de nitrogênio em caules e raízes de plantas doentes e sadias, no 2º e 3º ensaios.

Tratamentos	Porcentagens de Nitrogênio em			
	Caules		Raízes	
	Doentes	Sadias	Doentes	Sadias
C	2,32	1,96	3,97	3,54
1/2 C	1,98	1,70	3,56	4,18
- N	1,36	1,06	2,76	2,39
- P	1,90	1,72	3,47	3,24
- K	2,36	1,83	4,10	3,62
- Ca	2,30	2,12	3,55	3,52
- Mg	2,32	1,90	3,79	3,30
- S	1,94	2,10	3,49	3,64
Médias	2,06	1,79	3,58	3,43

$$Q M R = 0,214$$

$$Q M R = 0,0175$$

$$F (\text{tratamento}) = 12,76^{**}$$

$$F (\text{tratamento}) = 5,67^*$$

$$C. V. = 7,58\%$$

$$C. V. = 3,77\%$$

4.6 - Sintomas em Tomateiro Sta Cruz, IAC 2731, Devidos a Estirpe de VVC Isolada

Em todos os casos observados constataram-se inicialmente, um clareamento das nervuras das pinas superiores e concomitantemente, um enrolamento das mesmas. Este processo caminha de cima para baixo.

Simultaneamente notou-se o aparecimento de pontuações necróticas nas folhas que caminharam de baixo para cima e da região internerval para as nervuras.

Em estado um pouco avançado da virose ocorreram pontuações necróticas no caule, no pecíolo e notadamente na intersecção das pinas com o pecíolo.

4.7 - Sintomatologia em Tomateiro Devida à Deficiência dos Macronutrientes e à Deficiência Associada ao VVC

A - Nitrogênio (N)

Oito dias após a colocação das plantas em solução nutritiva incompleta, observou-se o início de amarelecimento das folhas inferiores. Após doze dias o amarelecimento generalizou-se. Os caules e os pecíolos apresentaram um diâmetro bem mais reduzido que os das plantas submetidas aos demais tratamentos. O sistema radicular começou a se tornar mais alvo.

Com vinte dias as folhas inferiores, já bem amarelecidas, começaram a cair.

No final, observou-se que as plantas tornaram-se "estioladas", com caule bem fino, e pinas bem menores em relação às normais. Todas as 80 plantas observadas apresentaram um sistema radicular bem "alvo". Os pecíolos também tornaram-se verde claros e as nervuras exibiam um leve arroxamento.

A' - = N + VVC

Em adição à sintomatologia anterior observaram-se manchas necróticas nas folhas inoculadas, mas não foi observado nenhum caso de sintoma sistêmico do VVC.

B - Fósforo (P)

Os sintomas de deficiência se mostraram a partir das folhas mais inferiores. Notou-se um clareamento das mesmas a partir dos bordos, doze dias depois de serem as plantas colocadas em soluções incompletas. As folhas inferiores começaram a amarelecer. O sistema radicular tornou-se marron-escuro, fato êsse constatado em todas as plantas estudadas.

As folhas superiores tomaram um aspecto verde escuro, enquanto as inferiores mostraram alguns pontos necróticos, seguindo a queda das mesmas.

As folhas tornaram-se arroxeadas de baixo para cima e de fora para dentro do limbo, ficando, no final, uma faixa verde ao longo da nervura principal.

B' = - P + VVC

A omissão do P neste tratamento provocou sintomas semelhantes de deficiência de - P .

A sintomatologia do VVC se caracterizou por uma infecção sistêmica pouco acentuada. O necrosamento foi bem acentuado nas folhas inferiores, acarretando uma grande queda das mesmas, de baixo para cima.

No final teve-se a impressão de regeneração da planta, quanto à infecção virótica.

C - Potássio (K)

Somente após 12 a 15 dias em solução incompleta, as plantas começaram a apresentar um leve clareamento nos bordos e com alguns pontos necróticos nas folhas mais inferiores.

No final, os bordos se necrosaram e o amarelecimento caminhou de fora para dentro das pinas, podendo ficar a vizinhança da nervura principal um pouco esverdeada. As nervuras apresentaram-se completamente claras.

C' = - K + VVC

Observou-se uma sistematização do VVC semelhante a das plantas completas, embora em muito menor grau. O necrosamento das nervuras foi bem mais acentuado, em relação às deficiências de K, sem vírus. Observaram-se poucos casos de necrose do caule e nenhum de morte da planta. Os sintomas de deficiência de uma maneira geral foram semelhantes ao caso anterior.

D - Cálcio (Ca)

Oito dias após, ou mesmo antes, dependendo da época do ano, começaram a aparecer os primeiros sintomas que se caracterizaram por uma descoloração dos bordos das pinas superiores e um recurvamento do limbo. As folhas inferiores tenderam a uma coloração verde mais intensa, dando a impressão desde cedo, de um encarquilhamento.

Cerca de 10 dias após estas observações iniciais, notou-se um início de podridão das gêmeas e as folhas mais novas (dois pares completos) se apresentaram com pontos necróticos (semelhante a sistematização do VVC em tomateiro). A clorose das pinas superiores se estendaram para as folhas mais inferiores.

Depois de 14 a 15 dias as fôlhas vão se tornando coriáceas.

Após 20 dias, o necrosamento das fôlhas se acentuou e caminhou pelas nervuras. Iniciou-se então o processo de podridão apical das raízes.

Em seguida, acentuaram-se o necrosamento, encarquilhamento e aspecto coriáceo das fôlhas, processo êsse que se estendeu por tóda a planta. A podridão tomou conta de tódo sistema radicular.

No final, as fôlhas mais inferiores apresentaram manchas esverdeadas com fundo amarelado. As nervuras secundárias tornaram-se claras. A morte da planta geralmente ocorre de cima para baixo.

D' - = Ca + VVC

Não se conseguiu distinguir, nitidamente, as plantas doentes das saudáveis, a não ser por algumas poucas lesões necróticas foliares nas regiões inoculadas.

E - Magnésio (Mg)

Com 12 dias em solução incompleta, as plantas deficientes em Mg mostraram as fôlhas de baixo um pouco flácidas. Em seguida, exibiam um encurvamento dos limbos em tórno da nervura principal, além de um leve escurecimento dos mesmos (marrom pálido).

No final, observou-se o sintoma clássico de clorose internerval e nervuras esverdeadas. Certas áreas dos bordos das fôlhas mostraram-se esverdeadas, permanecendo assim até o final do experimento.

Em casos bem avançados de deficiência, apresentaram um necrosamento que se iniciou na base da fôlha.

E' - = Mg + VVC

Os sintomas sistêmicos do VVC foram observados, apenas naquelas fôlhas sem o amarelecimento internerval típico. As fôlhas superiores apresentaram-se com um pálido clareamento das nervuras. Idênticos sintomas de deficiência do Mg também foram observadas nas plantas doentes.

F - Enxôfre (S)

As fôlhas verdes do terço médio das plantas, mostraram-se com algumas áreas amareladas, apenas depois de 25 dias em solução incompleta. O amarelecimen

to que gradualmente se generalizou, começou pela parte inferior da planta. As nervuras tornaram-se muito claras, notando-se nas adjacências da nervura principal uma área verde pálida.

P' = S + VVC

Como no caso de deficiência de fósforo com vírus (- P + VVC), ocorreram várias lesões necróticas nas folhas inoculadas, embora os sintomas de sistematização do VVC nas pinas mais novas fossem semelhantes às das plantas completas. Não foi observado necrosamento do caule. Sintomas de deficiência de S também foram constatadas no presente caso.

4.8 - Observações ao Microscópio Óptico em Cortes de Folha de Tomateiros com Deficiência e com a Associação Vírus e Deficiência

Os resultados dos exames do material montado em glicerina e água foram os seguintes:

A - Testemunha (C)

Os cloroplastos de forma globosa são os dominantes. Em algumas regiões do mesófilo foram encontrados alguns cloroplastos fusiformes, alongados e mesmo poliédrico.

Gôta lipídica presente, esférica e de posição frequentemente central.

A' - Testemunha com Vírus (C + VVC)

Nestas preparações observou-se início de clorose nos cloroplastos, embora as formas fossem semelhantes à da testemunha quando em estágio inicial de infecção.

Em regiões da folha mais afetadas, os cloroplastos mostraram-se alterados em forma e tamanho (diminuído), além de amarelados.

As gôtas lipídicas mantêm o mesmo aspecto e posição na célula.

Os tecidos vasculares não se apresentaram com coloração marron, encontrada em certos casos de deficiência.

B - Deficiência de Nitrogênio (= N)

A carência de N conduz a um acúmulo progressivo de amido nos cloroplastos, os quais perdem a coloração verde; modificam-se na forma e tamanho (aumentando), transformando-se em amiloplastos.

As gotas lipídicas são bem reduzidas em relação aos demais tratamentos.

B' - Deficiência de Nitrogênio com Vírus (= N + VVC)

Os cloroplastos tornam-se amarelados, iniciando um processo necrótico. O teor de amido é bem reduzido, ocorrendo em poucos cloroplastos.

Em folhas mais afetadas as alterações citoplasmáticas são bem acentuadas. As observações ao nível histológico revelaram diversas fases do processo necrótico.

As gotas lipídicas são bem maiores que no tratamento anterior (= N) .

C - Deficiência de Fósforo (= P)

A falta de fósforo acarreta um processo clorótico progressivo, sem afetar, no início, o estroma plastidal. Em zonas de clorose mais acentuada, os cloroplastos se modificam: ora em contorno irregular, ora tornando-se mais alongadas.

O amido nos plastos aumenta à medida em que a clorose se acentua.

A gota lipídica foi também observada nesse caso, apresentando-se semelhante as das células normais.

C' - Deficiência de Fósforo com Vírus (= P + VVC)

A ação clorótica é mais acentuada em relação ao tratamento anterior (= P) e com modificações plasmáticas mais acentuadas.

Nota-se uma tendência de aglutinação dos cloroplastos, exibindo um processo de descoloração mais acentuado. Além destas observações, ocorrem alterações semelhantes ao do tratamento = P . Os plastos parecem mais alterados e apresentam um maior acúmulo de amido.

As gotas de lipídeos são de tamanhos os mais variados, ao contrário, do tratamento anterior.

D - Deficiência de Potássio (- K)

Desde o início do processo clorótico há modificações nos cloroplastos e na forma das células do mesófilo cujas paredes se mostram um tanto onduladas.

Observa-se uma disposição anormal da clorofila, dando um aspecto poroso ao cloroplasto. O tamanho e disposição dos plastos são os mais variáveis possíveis, possuindo inclusive tamanho muito diminuto.

As gotas lipídicas são muito raras.

Em algumas células do parênquima da nervura principal há acúmulo de corpúsculos em forma piramidal, de bastonete e outros não bem definidos que tomam to

da a célula. A natureza dos corpúsculos não foi identificada.

D' - Deficiência de Potássio com Vírus (- K + VVC)

O aspecto dos cloroplastos é semelhante ao anterior (- K).

Nas ,

áreas cloróticas aparecem alterações bastantes acentuadas na forma e tamanho dos plastos. As paredes celulares ~~estão dupladas e são mais frequentes~~ que no caso anterior.

Nas células do mesófilo e do parênquima da nervura principal há aglomeração dos já referidos corpúsculos.

E - Deficiência de Cálcio (- Ca)

As modificações se intensificam nos cloroplastos e tecidos vasculares da nervura principal. O tamanho dos cloroplastos são bem reduzidos, em relação ao normal (C), as dimensões são bem variáveis. A conformação das mesmas variam desde bastonete até granular, conferindo à célula um aspecto granuloso. A clorose nos cloroplastos é quase generalizada.

Os tecidos vasculares da nervura principal e das secundárias possuem uma tonalidade marron, devido a um conteúdo pardacento.

As gotas lipídicas ocorrem uma por célula e são de diâmetro bastante variável.

Ocorre alguma retenção de gases no mesófilo.

E' - Deficiência de Cálcio com Vírus (- Ca + VVC)

As modificações gerais são semelhantes à deficiência de cálcio, sem vírus. Há uma maior redução no tamanho dos cloroplastos.

A gôta lipídica tem superfície e aparência porosa e há muito maior retenção de gases no mesófilo.

F - Deficiência de Magnésio (- Mg)

Há um esmaecimento uniforme e progressivo dos cloroplastos, mas a forma se mantém a mesma.

O aspecto histológico do mesófilo é normal e os tecidos vasculares se mostram com aspecto normal.

Não foi constatada a presença de gôta lipídica.

F' - Deficiência de Magnésio com Vírus (- Mg + VVC)

Há certas alterações no mesófilo, as células se mostram irregulares, deformadas e com paredes flácidas.

O processo clorótico se encontra bem avançado, afetando a forma e o tamanho dos cloroplastos que são menores e um tanto irregulares.

A nervura principal se apresenta contraída e há retenção de gases no mesófilo.

G - Deficiência de Enxôfre (- S)

Há uma clorose uniforme, acompanhada de alterações nos cloroplastos, dando a impressão de se fragmentarem em 2 a 3 corpúsculos aciculados (em forma de grão de arroz), revestidos de amido. Com o avançar da deficiência, os cloroplastos tornam-se esbranquiçados e há modificação no estroma.

Estas alterações são visíveis no paliçádico. Há ausência de gôta lipídica.

G' - Deficiência de Enxôfre com Vírus (- S + VVC)

Há um esmaecimento dos cloroplastos revestidos de amido mas sem apresentar forma acicular. Há também aglomeração de cloroplastos que chegam a formar massas amorfas.

A gôta lipídica ocorre com pouca frequência e é de tamanho bem reduzido.

4.9 - Exame de Cortes Ultrafinos de Fôlhas de Tomateiro com Deficiência e em Solução Completa com VVC

4.9.1 - Tratamento Completo (C)

A figura 1 mostra detalhes de parede celular, cloroplasto e mitocôndria de uma célula de planta cultivada em solução completa. Nota-se o grão de amido do cloroplasto, o estroma bastante denso e grana regulares.

4.9.2 - Tratamento Completo com VVC (C + VVC)

Na figura 2 observa-se um detalhe de uma célula de fôlha de tomateiro afetada pelo VVC, com o cloroplasto um pouco mais rico em grãos de amido, estroma menos denso, as partículas de VVC dentro do ER, lamelas desenvolvidas e bem distintas, grana reduzidas, mitocôndria e parede celular aparentemente normal.

4.9.3 - Deficiência de Nitrogênio (- N)

A figura 3 mostra um detalhe de um conjunto de cloroplastos de fôlhas com deficiência de nitrogênio. Observa-se um grande acúmulo de amido. Aparentemente desprovido de lamela, estroma e grana. Pela fotografia nota-se que a parede celular é pouca espessa.

4.9.4 - Tratamento com Deficiência de Fósforo (- P)

Pela figura 4 observa-se um detalhe de corte ultrafino em fôlhas de tomateiro com deficiência de fósforo. As lamelas dos cloroplastos são bem desenvolvidas, às vezes, nota-se regiões ainda contendo grana anormais, a membrana que envolve o cloroplasto apresenta-se dilacerada; com certa frequência observa-se grãos de amido.

4.9.5 - Deficiência de Potássio (- K)

A figura 5 mostra os detalhes de uma célula de fôlhas de tomateiro cultivado em solução deficiente de potássio. Nota-se que a célula está em estado de desorganização geral, parede celulósica, aparentemente, normal; poucas lamelas nos

cloroplastos, ausência de grana e presença de alguns corpúsculos talvez de natureza lipídica.

4.9.6 - Deficiência de Cálcio (- Ca)

Pela figura 6 constata-se que a deficiência de Ca induz na célula uma desorganização geral, com falhas na continuidade da parede celular e membranas.

Nos cloroplastos observa-se que as lamelas se concentram na periferia dos mesmos, ausência de grana e membranas pouco definidas. Presença de alguns grãos, provavelmente, de natureza lipídica.

4.9.7 - Folha de Tomateiro com Deficiência de Magnésio (- Mg)

Pela figura 7 verifica-se que a deficiência de Mg em tomateiro provoca certas modificações nos cloroplastos. Pelo detalhe mostrado na figura, constata-se a presença de grandes grãos de amido, lamelas desenvolvidas entre grana, as granas reduzidos em tamanho em relação ao controle e a presença de certos grânulos de óleo e corpúsculos osmiofílicos.

4.9.8 - Folhas de Tomateiro com Deficiência de Enxôfre (- S)

A figura 8 ilustra em detalhe de uma célula de folha de tomateiro cultivado com omissão de enxôfre. Semelhante ao tratamento - Ca, observa-se, uma desorganização generalizada dos cloroplastos e presença constante de "ilhotas", não identificadas, nas paredes celulares.

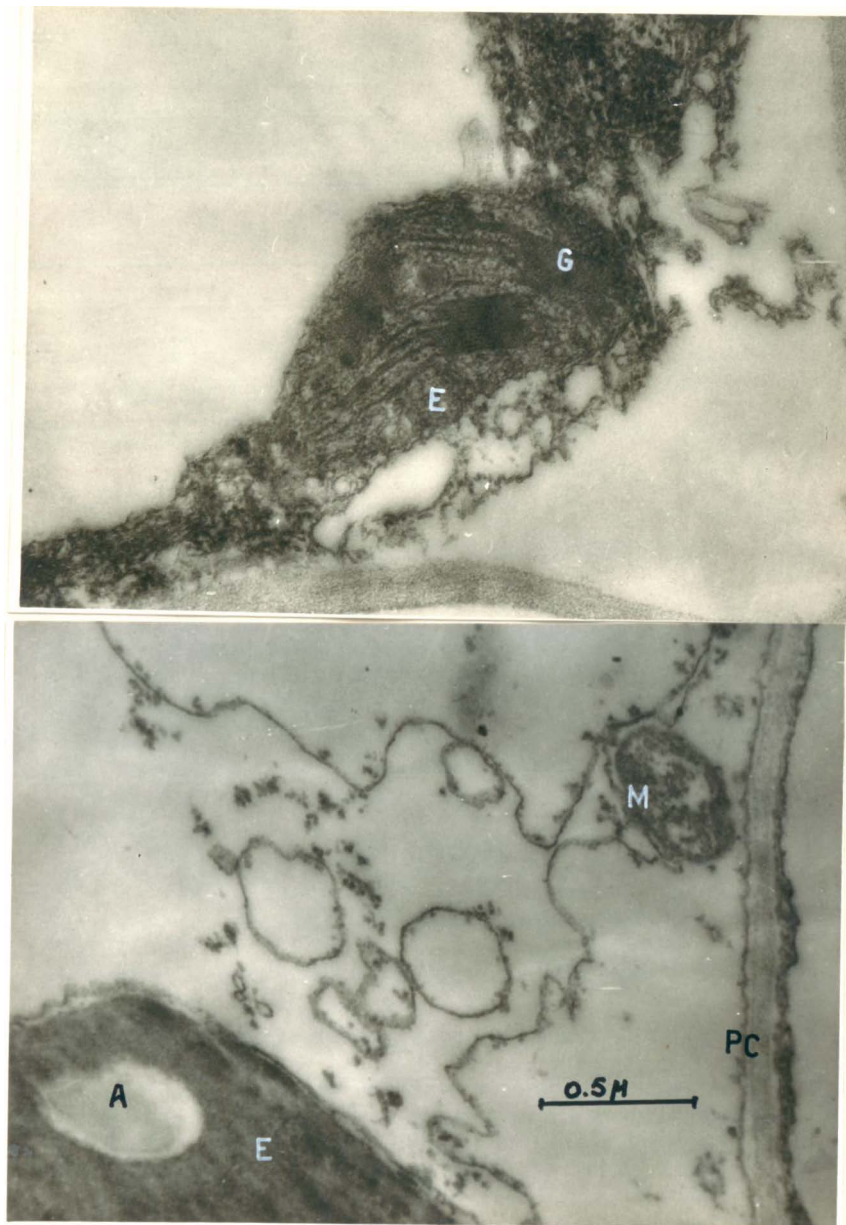


Fig. 1 - Detalhe de uma célula de fôlha de tomateiro do tratamento C .
Nota-se um cloroplasto com estroma denso (E) , grão de amido
(A) , mitocôndria (i.) , parede celular (PC) . 20.000 X .

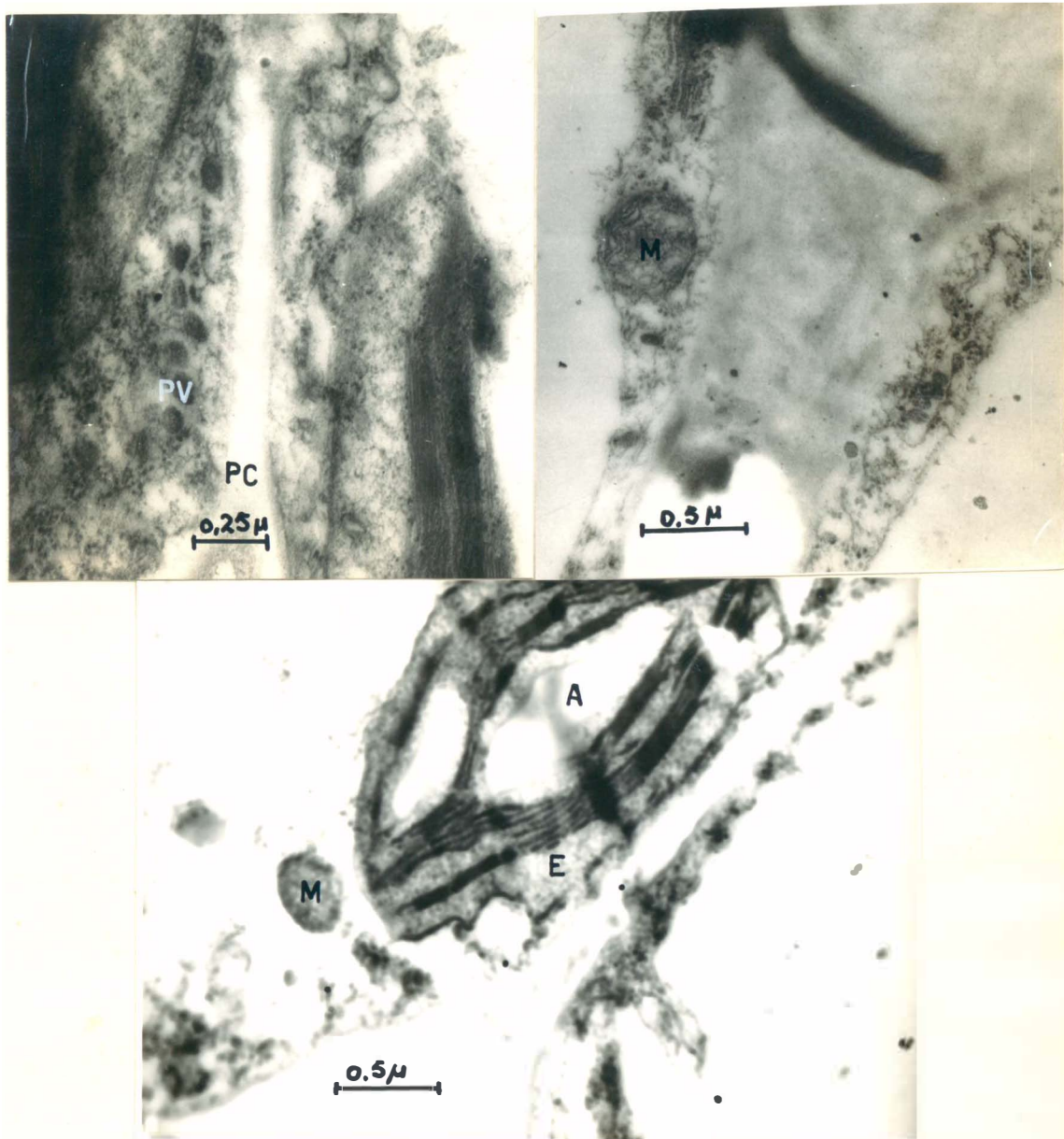


Fig. 2 - Detalhe de uma célula de fôlha de tomateiro do tratamento C + VVC .
Observa-se um cloroplasto com estroma pouco denso (E) , grão de amido (A) ,
partículas de VVC (PV) no interior do ER , mitocôndria (M) e parede celular (PC) .
8.000 X .

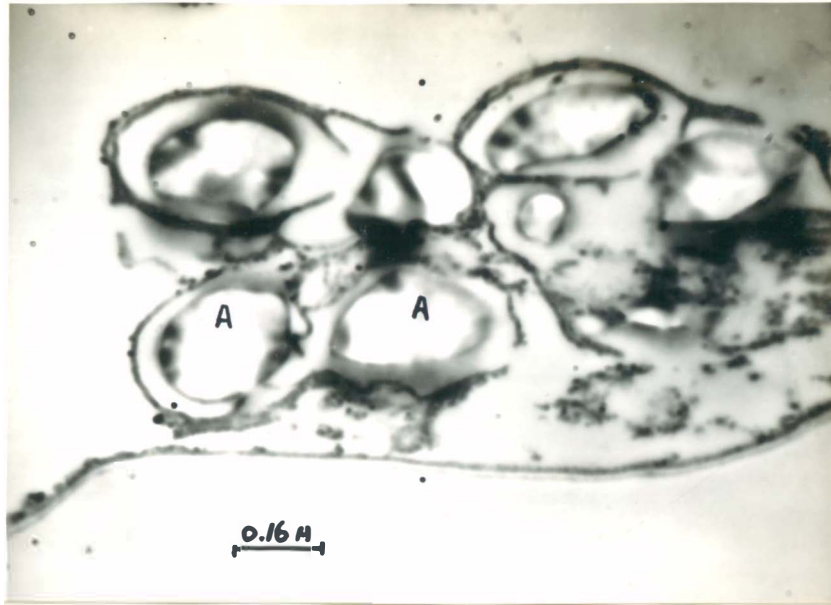


Fig. 3 - Detalhe de uma célula de fôlha de tomateiro do tratamento - N .
Os cloroplastos são ricos em grãos de amido (A) . 20.000 X .

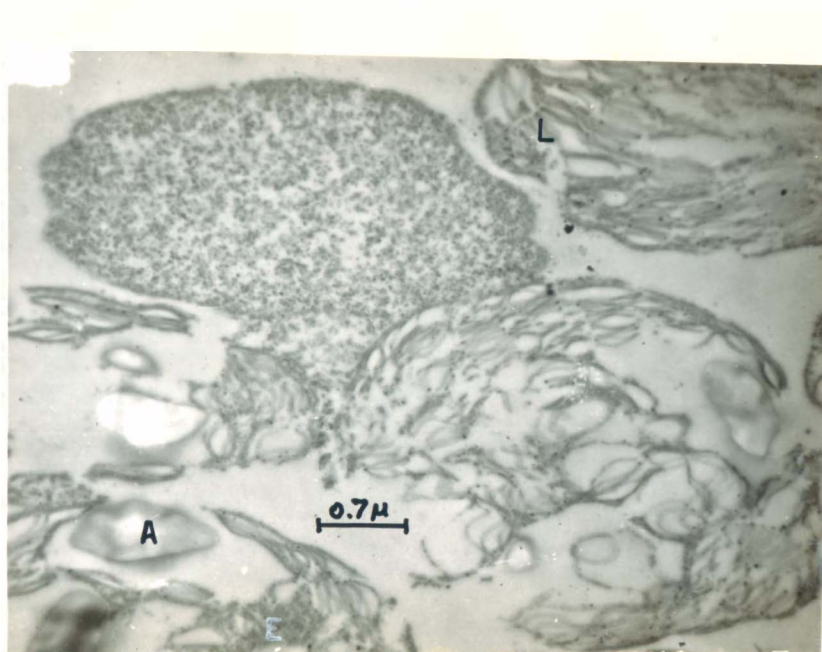


Fig. 4 - Detalhe de uma célula de fôlha de tomateiro do tratamento - P , sendo observado cloroplastos ricos em grãos de amido (A) , lamelas (L) e estroma (E) . 20.000 X .

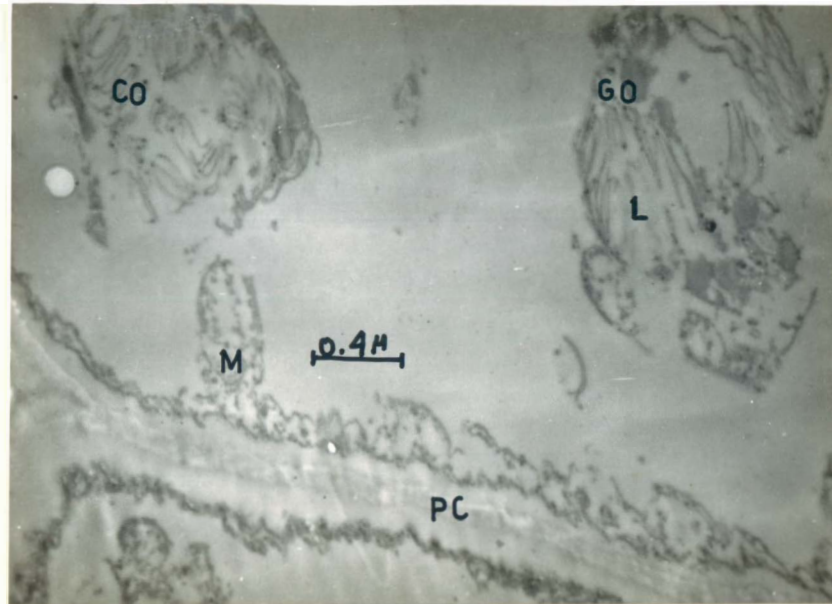


Fig. 5 - Detalhe de uma célula de fôlha de tomateiro do tratamento - K , sendo observado alguns cloroplastos com lamelas em estado de desorganização (L) , alguns corpúsculos osmiofílicos (CO) , mitocôndria (M) , parede celular (PC) e alguns grânulos de óleo (GO) . 8.000 X .

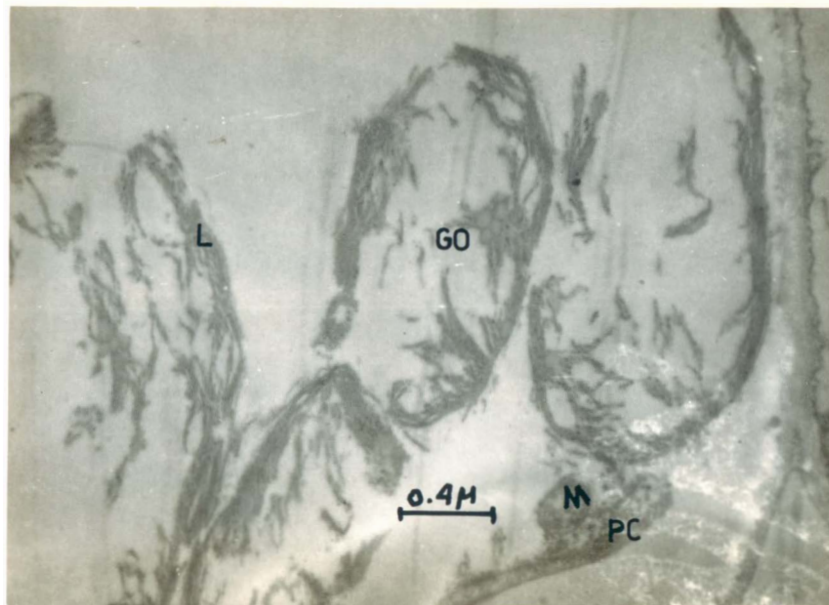


Fig. 6 - Detalhe de uma célula de fôlha de tomateiro do tratamento - Ca , mostrando cloroplastos em desorganização geral e com lamelas acumulando-se na periferia (L) , mitocôndria (M) e alguns grânulos, aparentemente de óleo (GO) e parede celular descontínua (PC) . 8.000 X .

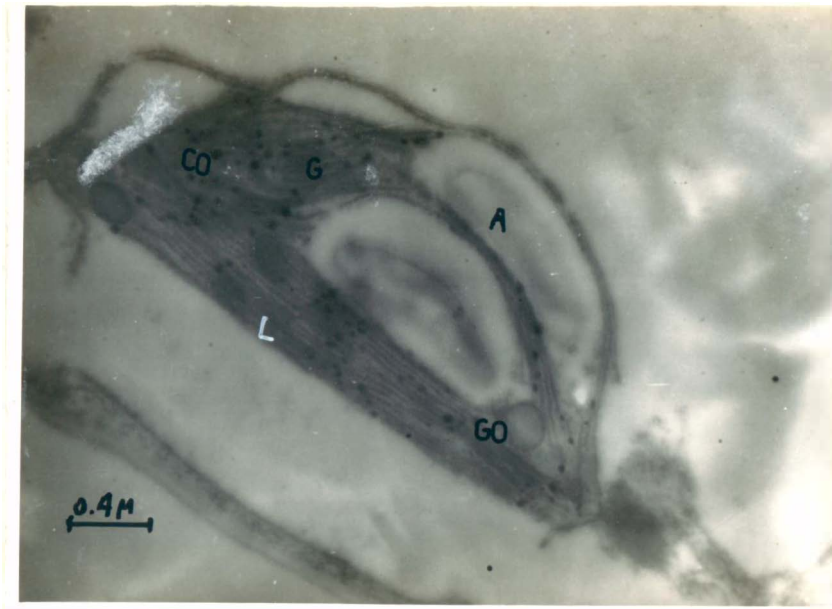


Fig. 7 - Detalhe de uma célula de fôlha de tomateiro do tratamento - Fig , em que se observa um cloroplasto com grãos de amido (A) , lamelas bem definidas (L) , alguns corpúsculos, aparentemente, osmiofílicos (CO); um pouco de grana (G) e alguns grânulos de óleo (GO) . 20.000 X .



Fig. 8 - Detalhe de uma célula de fôlha de tomateiro do tratamento - S , mostrando um cloroplasto em estado de desorganização generalizada (C) e "ilhas" na parede celular (IP) . 8.000 X .

5 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 - Isolamento da Estirpe de VVC

Estudos realizados com os vírus que ocorrem na natureza têm revelado que os mesmos se compõem de diversas estirpes.

Não raro também têm sido constatadas flutuações na composição do complexo virótico provocando a substituição de uma estirpe predominante por outra. Tais flutuações podem induzir variações metabólicas e provocar modificações do quadro sintomatológico das plantas hospedeiras.

O isolamento de uma estirpe, pois, teve a finalidade de reduzir os efeitos desse fator que tornaria mais complexo o presente estudo de interações vírus-hospedeiro.

A estirpe isolada, segundo métodos já descritos foi estudada com respeito a diversas propriedades e os resultados dos ensaios serão discutidos a seguir.

Com relação à sintomatologia em tomateiro, N. glutinosa e fumo, foi observado que a mesma se aproxima mais do tipo severo de uma das estirpes isolada e descrita por BEST e GALLUS (1955). Em tomateiro, o VVC isolado caracterizou-se pelo aparecimento de necrose nas folhas e caules, culminando em muitos casos com a morte da planta.

As lesões primárias da estirpe estudada se caracterizaram pela formação de áreas necróticas e sólidas, com um crescimento relativamente rápido em fumo e N. glutinosa. Tais lesões eram bastantes uniformes após o 3.^o ciclo de isolamento, parecendo livres de outras estirpes que provocam formação de lesões necróticas em círculos concêntricos ou círculos em linhas interrompidas.

No teste de resistência ao dessecamento, encontrou-se que no 3.^o dia após a colheita das folhas, o vírus já havia perdido seu poder infectivo. A literatura não registra dados precisos a respeito. SMITH (1957), por exemplo, relata apenas que o VVC é muito sensível ao dessecamento.

O ponto de inativação térmica, durante 10 minutos, encontrado gira em torno de 45^oC. Ainda SMITH (1957) cita que a temperatura de inativação térmica é ao redor de 42^oC, ao passo que, pelos dados de MORRIS (1946) vê-se que estes valores são variáveis de acordo com a estirpe, oscilando de 42^oC a 52^oC.

O ponto final de diluição, determinado em feijoeiro manteiga foi da ordem de 1:1280 , a partir de suco infeccioso de tomateiro, extraído na razão de uma parte de fôlha (em pêsô) para oito de solução tamponante (em volume). A única informação encontrada na literatura, foi a de SMITH (1957) que cita valores variando de 1:10.000 a 1:100.000 . No entanto, existe uma omissão quanto às condições em que os experimentos foram conduzidos. É óbvio aceitar que o ponto final de diluição é função de uma série de fatores, dentre êstes podem ser citados: natureza da fonte de inóculo , condições fisiológicas da planta teste , temperatura e luz do ambiente.

Nas condições do experimento o suco infeccioso permaneceu ativo 8 a 9 horas após a extração em solução tamponante, o que difere quanto aos dados de SMITH (1957) .

Ao que tudo indica, no final do processo de isolamento, o complexo do VVC procedente de uma lavoura do Município de Piracicaba parecia reduzido a uma estirpe dotada de ponto de inativação térmica, ponto final de diluição, de resistência ao dessecamento e de armazenamento baixo, como seria de se esperar de um vírus instável.

5.2 - Determinação do Pêsô Sêco de Plantas Doentes e Sadias

A literatura consultada não registra dados quantitativos da influência do VVC sôbre o teor de umidade de plantas de tomateiro. Apenas GRIEVE (1943) faz um leve relato a respeito da ação do referido vírus sôbre o pêsô sêco , área foliar e conteúdo de água do tomateiro.

Procurando conduzir experimentos um pouco mais ordenados, foram realizados alguns ensaios com plantas afetadas pelo VVC e com a associação vírus-deficiência. Os teores de umidade das pinas, pecíolos, caules e raízes de vários tratamentos foram determinados e os resultados que mereceram uma análise mais acurada , estão resumidos nas Tabelas 4 e 5 .

Os dados da Tabela 4 indicam que o teor de umidade de pecíolos de tomateiro com deficiência de N afetado pelo VVC é menor do que de tomateiros doentes cultivados em soluções C e 1/2 C ou com omissão de fósforo e enxôfre.

As análises estatísticas, pois, parece indicar que a presença do vírus em plantas deficientes em N é decisivo na redução do teor de umidade da sua hospedeira. Fato semelhante não se encontra nas doentes e deficientes de outros macronutrientes, e nem no tratamento - N apenas.

A diferença de umidade entre plantas doentes e sadias só se faz sentir nas pinas. Pela Tabela 5 constata-se que de um modo geral, o teor de umidade das plantas afetadas pelo VVC é menor do que as sadias. A explicação para esse fato experimental carecem de estudos mais minuciosos, entretanto de uma maneira geral essa redução da umidade nos tecidos deve refletir um desequilíbrio entre transpiração e absorção de água provocado pelo VVC .

5.3 - Deficiência de Macronutrientes Relacionada com a Multiplicação do VVC

Poucos são os trabalhos realizados no sentido de se conhecer a influência da deficiência dos macronutrientes sobre a multiplicação do VVC .

Apenas SELMAN e GRANT (1957) constataram que em plantas cultivadas com deficiência de Nitrogênio, a multiplicação ao VVC foi bem afetada. Os mesmos autores determinaram que plantas de tomateiro cultivadas em solução nutritiva contendo 15,8 ppm de N produziram 23,5 lesões por metade de fôlha de N. glutinosa , enquanto que as cultivadas com 948 ppm deram 159,0 lesões. Observaram também que a sistematização do vírus foi bastante afetada pelo teor de N , fato este demonstrado anteriormente, por DUFRENOY (1937).

Outras informações foram colhidas da literatura, mas os trabalhos encontrados são raros e pouco sistemáticos. Procurando estudar este aspecto , foram conduzidos experimentos cujos resultados estão resumidos no ítem 4.3 (Tabela 6).

A análise dos dados revelou que a multiplicação do vírus "vira-cabeça" nos tratamentos C e 1/2 C foi bem mais acentuada do que nos tratamentos com omissão de macronutriente. Dentre os tratamentos levados a efeito o de deficiência de Mg foi o que menos afetou a multiplicação do VVC , nas condições em que o experimento foi conduzido, não temos dados que nos permitam generalizar esta informação, pois, vários fatores estão envolvidos.

5.4 - Deficiência de Macronutrientes em Tomateiro

Um dos objetivos da presente tese é determinar as alterações no teor de macronutrientes das plantas afetadas pelo VVC em relação aos controles.

Antes de atingir o objetivo colimado foi necessário estudar os teores de macronutrientes em plantas cultivadas em solução com deficiência dos mesmos.

A subdivisão das plantas em pinas, pecíolos, caules e raízes teve a finalidade de constatar as variações quanto ao conteúdo de macronutrientes em cada uma delas para assim obter elementos que permitissem determinar, em que parte da planta ocorre maior influência do vírus.

Muitos dados foram determinados com essa finalidade. Dentre êles, selecionados os das Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11, considerados os mais interessantes.

As análises estatísticas dos dados, já referidos, indicaram algumas relações obtidas nos ensaios realizados em três épocas e que serão relatados a seguir.

5.4.1 - Em pinas, observou-se que o teor de Nitrogênio no tratamento - Ca é reduzido em relação aos demais. Contudo, no tratamento - N e a porcentagem de S é alta, e no tratamento - K o macronutriente que apresenta maior teor é Ca.

5.4.2 - Nos pecíolos o teor de K é geralmente bem mais elevado do que nas demais partes da planta. Ainda mais, o conteúdo de Mg é aumentado no tratamento deficiente de K, exibindo uma correlação negativa entre os dois nutrientes, fato já conhecido na literatura.

5.4.3 - As observações nas raízes podem ser assim resumidas:

- a - O teor de N no tratamento - P é baixo;
- b - O teor de P em - N é alto;
- c - A porcentagem de Mg no tratamento - K é aumentada.

5.4.4 - Nos caules verifica-se que a porcentagem de K no tratamento - N é reduzida, parecendo existir uma influência do nitrogênio na absorção de K.

Na sua grande maioria, os resultados apresentados neste ítem estão de acordo com os relatados na literatura, contudo, em alguns casos não se observou perfeita concordância.

A redução do teor de N nas pinas e no tratamento - Ca talvez possa ser explicados por modificações ocorridas no sistema de absorção e translocação do nutrientes. É bom lembrar que as observações protocoladas durante os ensaios mostraram que o sistema radicular do tratamento - Ca entra em um processo de degenerescência bem acentuada. HAYNES e ROBBINS (1948) já tinham observado que o cálcio era um elemento essencial para a formação do sistema radicular.

O aumento da porcentagem de S na ausência de nitrogênio talvez seja devido a maior absorção daquele ânion na ausência deste, ou então, pelo fato de que a grande absorção de S (SO_4^{--}) se verificou antes das plantas serem colocadas em meio deficiente de N. A primeira parece ser mais razoável, visto que CONROY e LAMBE (1962) verificaram um comportamento semelhante com referência à redução de N (NO_3^-) devida ao aumento de P (H_2PO_4^-) em tomateiro.

A correlação negativa entre K e Mg já foi verificada. COOK e GOHEEN (1961) estudaram-na em videira com vírus do "leaf roll".

As demais correlações estabelecidas não foram encontradas na literatura consultada. É bom salientar que as informações da literatura em muitos casos são de experimentos em condições diferentes do presente ensaio e as prováveis variações talvez sejam devidas a este fato.

5.5 - Nutrição do Tomateiro Associada com o VVC

As observações discutidas no ítem anterior foram em linhas gerais as mesmas constatadas nos tratamentos com VVC. Algumas variações ocorridas serão discutidas a seguir.

Os dados obtidos não puderam ser confrontados com os de literatura devido a ausência de informações a respeito.

As informações das Tabelas 12 e 13 nos levam a crer que os teores de P e S nas pinas são alterados quando as plantas são afetadas pelo "vira-cabeça". No primeiro caso a média de P do tratamento - P difere das demais, ao

passo que, nas doentes só existe diferença, estatisticamente significativa entre aquela e as medias de P nos tratamentos - N e - K . No caso de S é provável que não tenha havido diferença significativa entre tratamentos devido à influência do VVC sobre o metabolismo orgânico ou inorgânico. Este fato embora não analisado, estatisticamente, foi sempre observado durante os vários ensaios, ocorrendo inclusive uma redução do teor de S das pinas.

Pelos resultados contidos na Tabela 14 , verifica-se que o comportamento do teor de Ca nas pinas em plantas doentes difere um pouco das sadias. No caso de tomateiros não infectados pelo VVC , verifica-se que as médias de - Ca e - N são menores do que as de C e - K , ao passo que no segundo caso, apenas são menores em relação a - K . Parece ocorrer no presente caso uma redução do teor de cálcio de plantas cultivadas em solução completa quando o vírus se multiplicou nas mesmas.

Outras diferenças observadas concentraram-se nos pecíolos, caules e raízes, cujos resultados estão registrados nas Tabelas 15 e 16 .

Os teores de N e K nos pecíolos de plantas doentes, geralmente, são mais elevados do que nos controles. Nos caules e raízes, das plantas com VVC , apenas o teor de N é aumentado.

A respeito das observações deste tópico serão feitos alguns comentários com o objetivo de tentar uma explicação para os fatos experimentais constatados.

- a - A não ocorrência de grandes variações entre plantas doentes e sadias talvez seja devida ao fato de que a ação do vírus é drástica e que em geral se fez sentir num período relativamente curto de tempo;
- b - É possível que maiores variações sejam detectadas, somente, com referência a nutrientes como o N (NO_3^-) e K (K^+) que são absorvidos quase que num fluxo contínuo, durante os primeiros meses de vida da planta;
- c - É de se esperar que os nutrientes que são absorvidos com maior velocidade no início de ciclo vegetativo do tomateiro apresentem pouca ou nenhuma variação em plantas afetadas pelo VVC em comparação com as sadias, quando o vírus for inoculado, tardiamente.

5.6 - Sintomas de Deficiência de Macronutrientes Associados à Infecção com VVC

As observações dos sintomas de deficiência de macronutrientes tiveram a finalidade de estabelecer um quadro de sintomatologia característico da variedade com a qual se trabalhou e das condições em que os experimentos tiveram lugar.

Comparando as observações dos três ensaios de deficiência com as relatadas por WOOLEY e BROYER (1957), pode-se afirmar que, de um modo geral, não diferem. Apenas algumas pequenas variações foram notadas e provavelmente, sejam devidas aos fatores há pouco relatados. Os referidos autores não estudaram as características das raízes de plantas deficientes.

No presente caso foi observado que as raízes com deficiência de N, se apresentaram alvas, e as com omissão de fósforo, com coloração marron-escuro. A deficiência de Ca causou um definhamento e podridão generalizados das raízes.

Os mecanismos de aparecimento dos sintomas de VVC em plantas cultivadas em solução completa se assemelha à descrições de outros autores, dentre as quais destacamos as de COSTA (1948).

Associando os dois fatores, deficiência e vírus, a literatura consultada não enumera nenhum estudo a respeito a não ser o caso já citado de lesões locais em tomateiro com deficiência de nitrogênio.

De todas as observações, algumas merecem ser destacadas. A associação do tratamento - P e vírus provocou nas plantas uma grande queda de folhas com áreas necrosadas, dando no final um aspecto de regeneração das mesmas, quanto a infecção virótica. As indicações de observação sintomatológica são de que a deficiência de P reduziu a sistematização do vírus, e, após a queda das folhas, as plantas se apresentaram como que regeneradas do ataque virótico.

O tratamento - K mais vírus foi responsável por um necrosamento bem acentuado dos tomateiros, mostrando que as ações dos dois agentes parecem se somar nos seus efeitos.

5.7 - Observações ao Microscópio Ótico

Fazendo uma análise geral dos dados, pode-se inferir que as transformações devidas às deficiências de macronutrientes foram constatadas, mais frequentemente, nos cloroplastos, nos tecidos vasculares, em membranas e paredes. Algumas destas observações puderam ser averiguadas mais, detalhadamente, ao microscópio eletrônico.

As alterações nos cloroplastos, em caso de omissão de macronutrientes, fizeram sentir quanto ao conteúdo de amido, forma e tamanho dos mesmos, chegando ao ponto de se transformarem em amiloplastos, fato sempre observado no tratamento - N .

As eficiências de K e Ca , principalmente, afetaram sobremaneira o sistema vascular da nervura principal. Por outro lado, a omissão de K afetou a parede celular, tornando-a ondulada. Este fato talvez seja devido a influência que tem o potássio no metabolismo de carboidratos, afetando a biossíntese de polissacarídeos. WALL (1940) já acentuava a influência do K no metabolismo daqueles compostos.

Associando deficiência e vírus, certas diferenças foram evidenciadas e algumas serão enumeradas. Assim no tratamento C em comparação com C + VVC , ocorreram transformações ao nível de cloroplastos. A presença de gota lipídica em (- N + VVC) , (- K + VVC) e (- S + VVC) , em comparação com os respectivos controles, foi notada com maiores dimensões e em maior número, o que nos leva a crer que o vírus possa ter atuado no metabolismo dos lipídeos.

5.8 - Exames de Células de Folha de Tomateiro ao Microscópio Eletrônico

5.8.1 - Dos Tratamentos C e (C + VVC)

Modificações nos cloroplastos e aumento do número de mitocôndrias, em relação ao controle, foram observados em plantas infectadas pelo VVC .

O amarelimento dos cloroplastos constatados pela microscopia ótica, talvez seja devido em parte a um acúmulo de amido, o que foi observado nos exames ao microscópio eletrônico.

Como já é conhecido, as plantas afetadas por vírus tendem a respirar mais e sendo os mitocôndria as organelas onde, o ciclo de Krebs e a Cadeia Respiratória se processam, é de se esperar um aumento do número destas organelas quando algum agente solicita uma maior intensidade respiratória.

Quando a infecção virótica estava em estágio não muito avançado, as modificações nos cloroplastos não foram muito profundas. O desenvolvimento lamelar e redução de grana foram observados e parece ser este um estágio inicial de degradação cloroplástica. Observações semelhantes foram feitas por LEE (1964) quando estudou o mosaico do trigo.

5.8.2 - Do Tratamento - N

Os resultados ao microscópio ótico são concordantes com os exames ao microscópio eletrônico, referentes às modificações nos cloroplastos. Há um grande acúmulo de amido e à medida em que a deficiência se acentua, praticamente, os cloroplastos se transformam em amiloplastos. Fato este também observado por THOMSON e WEIER (1962) quando estudaram células ou folhas superiores e inferiores de feijoeiro com deficiência de nitrogênio.

O menor espessamento das paredes notado nos exames ao microscópio eletrônico é um ângulo que precisa ser melhor explorado, podendo ser devido à amostragem.

5.8.3 - Do Tratamento - P

Examinando a Figura 4, observa-se que ocorreram modificações profundas nos cloroplastos: acúmulo de amido, grana reduzidas, lamelas desenvolvidas e membranas rompidas.

Estas observações, até certo ponto, concordam com as de THOMSON et al. (1964), quando estudaram célula de folhas de feijoeiro cultivado em solução sem fósforo. O aspecto geral dos cloroplastos, como descreve o autor, depende do grau de deficiência. Não se conseguiu observar, no presente experimento, os grânulos osmiofílicos, como descreve THOMSON.

5.8.4 - Do Tratamento - K

Os cloroplastos tornaram-se, completamente, modificados e apresentaram alguns corpúsculos que parecem ser de natureza lipídica, conforme descrições de LEE (1964) .

5.8.5 - Do Tratamento - Ca

As modificações na infra-estrutura celular, devida à carência de cálcio foram estudadas por alguns autores, e MARINOS (1962) o fez em ponta de raiz de cevada. Constatou esse autor que em estágio inicial de deficiência, há destruição parcial das membranas, desorganização e destruição de organelas celulares. À medida que a deficiência avança as paredes celulares começam a se decompor, chegando mesmo a destruição parcial das mesmas.

Os dados obtidos e ilustrados na Figura 6 , embora em folhas , são concordantes quanto aos aspectos discutidos acima. Ao nível de cloroplastos , as alterações são bem profundas, caracterizando-se por uma reunião das lamelas nas superfícies dos mesmos.

5.8.6 - Do Tratamento - Mg

A presença de grânulos lipídicos e corpúsculos osmiofílicos nos cloroplastos foi sempre observada quando as plantas foram cultivadas em solução deficiente de Mg .

O estroma parece um pouco mais denso em relação às demais deficiências e os grãos de amido são de tamanho bem avantajado, fato este já constatado por THOMSON e WEIER (1962) em células de folhas de feijoeiro.

5.8.7 - Do Tratamento - S

As alterações devidas à omissão de enxofre foram bastante severas e até certo ponto se assemelharam às devidas à deficiência de cálcio.

Os cloroplastos foram modificados, com formas geralmente, globosas e com tendência de se reunirem. A sua estrutura bastante alterada.

As paredes celulares menos espessas se assemelharam à deficiência de nitrogênio, observação essa que necessita de maiores estudos.

6 - RESUMO E CONCLUSÕES

6.1 - Resumo

O presente experimento foi realizado com o objetivo de estudar algumas possíveis modificações no tomateiro (Lycopersium esculentum, MILL.), de vidos à infecção virótica de uma estirpe do "vira-cabeça" e a influência do estado nutricional da referida planta na multiplicação do vírus. Para isso, foram conduzidos os seguintes trabalhos:

- a - Isolamento de uma estirpe do VVC ;
- b - Estudo de algumas de suas propriedades (teste de envelhecimento, resistência ao dessecamento, ponto final de diluição, teste de inativação térmica e sintomas em tomateiro, N. glutinosa, fumo e feijoeiro manteiga);
- c - Determinação do peso seco das diversas partes de plantas doentes e sadias ;
- d - Ensaios em solução nutritiva de HOAGLAND and ARNON completa ou com deficiência de macronutriente para estudo da multiplicação do VVC em plantas de tomates desenvolvidas nessas soluções. A estimativa de concentração do vírus foi feita através dos testes de lesões locais;
- e - Ensaios em solução nutritiva completa ou com deficiência de macronutrientes para estudo das deficiências associada ao VVC, determinando-se no final o teor dos nutrientes em pinas, pecíolos, caules e raízes de vários tratamentos;
- f - Estudo do aparecimento de sintomas do VVC no tomateiro associados à deficiência de macronutrientes;
- g - Estudo ao microscópio ótico de algumas alterações celulares devidas à deficiência de macronutrientes e deficiência associada à presença do vírus;
- h - Exames ao microscópio eletrônico de algumas alterações na infra-estrutura celular de folhas de tomateiro com deficiência de macronutrientes e de plantas cultivadas em solução completa, afetadas pelo VVC .

6.2 - Conclusões

Os resultados obtidos revelaram que:

- a - O vírus de lesões cloróticas de feijoeiro manteiga apresentavam as características de uma estirpe do VVC ;

- b - A multiplicação do VVC em plantas de tomateiro cultivadas em deficiência de macronutrientes é bastante reduzida em relação ao controle;
- c - De um modo geral, as plantas cultivadas em deficiência de nitrogênio associada ao VVC, possuem um menor teor de umidade nos pecíolos e caules;
- d - As pinas de tomateiro afetados pelo VVC, possuem um menor teor de umidade do que as sadias;
- e - Os sintomas do VVC em plantas com deficiência de N são, geralmente, localizados;
- f - As pinas de plantas do tratamento - Ca possuem baixo teor de nitrogênio; as do tratamento - N, baixo teor de cálcio e elevado teor de enxofre;
- g - Os pecíolos do tomateiro são, de um modo geral, a parte da planta mais rica em potássio e o maior teor de Mg encontrado nos mesmos foi no tratamento - K;
- h - O teor de potássio nos caules do tratamento - N é baixo;
- i - O teor de nitrogênio do tratamento - P, nas raízes, é baixo, o de fósforo em - N é alto e o de magnésio em - K é alto;
- j - Em plantas afetadas pelo VVC, o teor de fósforo e enxofre nas pinas sofrem alterações e o de cálcio nos pecíolos;
- k - Os teores de nitrogênio e potássio nos pecíolos de plantas afetadas pelo VVC e os de nitrogênio em caules e raízes são, de um modo geral, mais elevados do que nas plantas sadias;
- l - Pelas observações feitas ao microscópio ótico as alterações mais conspícuas denotando a ação do VVC em plantas cultivadas em solução nutritiva completa, incidiram nos cloroplastos, tornando-os amarelados, e no citoplasma revelando a presença de gotas lipídicas nos tratamentos (- N + VVC), (- K + VVC) e (- S + VVC). Tais observações foram feitas em comparação com os respectivos controles;
- m - Os cloroplastos de plantas afetadas pelo VVC são modificados (redução de grana e desenvolvimento das lamelas), além de um aumento sensível do número de mitocôndria. Nos tratamentos com deficiência de macronutrientes ocorrem modificações profundas nos cloroplastos, com excessão de - Mg em que os mesmos se mantiveram mais íntegros embora fosse notado acúmulo de grandes grãos de amido, grânulos de óleo e corpúsculos osmiofílicos. Acúmulo de amido também se observam nos tratamentos - N e - P.

7 - SUMMARY

The aim of the experiment described in this thesis was to study the effect of infection of a strain of Vira-cabeça virus (VCV), brasilian spotted wilt virus, in the tomato plants (Lycopersicum sculentum, MILL) on the chemical composition, infra-cellular structure and dry weight of the plant. Studied also was the influence of the nutritional level of the plant on the multiplication rate of the virus.

The VCV strain used was from tomato plants naturally affected with the virus. It was obtained by inoculating the leaves of bean plants (Phaseolus vulgaris L. , Manteiga var.) with juice extracted from infected tomato leaves. The local lesion produced in the Phaseolus vulgaris L. , Manteiga var. was then transferred to tobacco plants for multiplication of the virus. After six repetitions of the transfer, the strain was considered pure.

The tomato plants were grown in various nutrient solutions, one of which the composition was complete for growth, each of the others lacked one essential macronutrient.

The macronutrient content of the folioles, petioles, stems, and roots of the plants were determined and computed to the dry weight basis. Cellular alterations due to nutrient deficiencies, virus infection, or the combined effects of the two were followed in the optic and electronic microscopes.

From the results obtained the following conclusions can be drawn:

- 1 - Virus multiplication in the the plants was reduced by a deficiency of each of the macronutrients.
- 2 - The moisture content of the tomato leaves was reduced by virus infection.
- 3 - Of the plants grown in nutrient-deficient solutions, those of the N-deficient (- N) medium only manifested local lesions of the VCV strain ; the P , K , and Mg-deficient (- P , - K , - Mg) plants showed few systemic symptoms ; plants subjected to the combined treatments of phosphorus deficiency and VVC (- P + VCV) shed the lower leaves ; and the plants exposed to the combined treatment of (- K + VCV) infection developed increased necrosis in the leaf midrib.

- 4 - The folioles of plants grown in a - Ca medium were lower in nitrogen content than those of control plants grown in a complete nutrient medium ; in a - N medium the folioles were lower in calcium content and higher in sulfur than those of control plants.
- 5 - In general the potassium content of the petioles was higher than other parts of the plant. When potassium was omitted from the nutrient solution, the magnesium content of the petioles increased and the potassium content decreased.
- 6 - The stems of the plants were lower in K content with the - N treatment than with any other; the roots of the plants were low in N content in the - P treatment, high in P content in the - N treatment, and high in magnesium content in the - K treatment.
- 7 - The N and K content of the petioles and the N content of the stems and roots of plants infected with VCV were higher than in healthy plants. In VCV infected plants, alterations occurred in the P and S content of the folioles and calcium content of the petioles.
- 8 - At the cellular level, VCV caused a yellowing of the chloroplasts of the plants grown in complete nutrient solution and an increase in the lipid droplet formation in plants subjected to the following treatments: - N + VCV , - K + VCV and - S + VCV .
- 9 - Plants infected with VCV manifested modifications in the chloroplast structure, a reduction in the amount of grana and an increase in the lamellar system, and an increase in the number of mitochondria.
- 10 - All macronutrient-deficient nutrient solutions except - Mg produced changes in the chloroplasts. In the - Mg plants an accumulation of grains of starch and osmiophilic bodies occurred ; in the - N and - P plants starch grains accumulated in the chloroplast ; and in the - Ca plants the CW developed some gaps early in growth and were completely destroyed later.

§ BIBLIOGRAFIA

- BRESON, K. C. , C. B. Lyon , and Melle W. Barrentine - 1944 - Ionic Absorption by Tomato Plants as Correlated with Variations in the Composition of the Nutrient Medium. Plant Physiol. 19: 258-277 .
- BERGMAN, E. L. , and J. S. Boyle - 1962 - Effect of Tobacco Mosaic Virus on the Mineral Content of Tomato Leaves. Phytopath 52: 956-957 .
- BEST, R. J. , and H. P. C. Gallus - 1955 - Further Evidence for the Transfer of Character - Determinants (Recombination) Between Strains of Tomato Spotted Wilt Virus. Enzymologia 14: 207-221 .
- BEST, R. J. , and Gerard P. Katakis - 1964 - Lipid in a Purified Preparation of Tomato Spotted Wilt Virus. Nature 203 (4945): 671-672 .
- BEST, R. J. , and V. Hariharasubramanian - 1957 - Serological Studies on Tomato Spotted Wilt Virus (Strains E and R₁) . Enzymologia in the press).
- BLACK, L. M. , M. K. Brakke , and L. E. Vatter - 1952 - Partial Purification and Electron Microscopy of Tomato Spotted - Wilt Virus. Phytopath 42 , 3 (Abst.) .
- CALDAS, R. A. , D. M. Silva e R. Spindola - 1967.a - Estudo das Cloroses do Tomateiro (Lycopersicon esculentum , Mill) Causadas por Deficiência de Mg e pelo Vírus do Amarelo Baixeiro. Ciências e Cultura 19 (2): 350 .
- CALDAS, R. A. , O. J. Crocomo , A. Barioni Gusmán e L. C. Basso - 1967.b - Absorção de ³²P por Plantas de Tomate (Lycopersicon esculentum , Mill) afetadas pelo VVC. (Em Publicação) .
- CONRY, Ellis, and J. G. D. Lambe - 1962 - A Phosphorus - Magnesium Interaction in Tomato Nutrition. Nature 194 (4827): 500 .
- COSTA, A. S. - 1948 - Doenças de Vírus do Fumo, Batata e Tomateiro. S. I. A. (687) , Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro , Brasil.
- COSTA, A. S. , Ana Maria B. Carvalho , J. L. V. Rocha e Romeu de Tella - 1960 - Amarelecimento Terminal do Foliolo do Amendoim, Causado por Cigarrinha. Bragantia 19: CLXXIII - CLXXVIII .
- COSTA, A. S. e Ana Maria B. Carvalho - 1965 - Deficiências Minerais nas Fôlhas Induzidas por Moléstias e Pragas. Bragantia 24: [41] - 50 .

- COSTA, C. L. , Aldo Alves , H. Nagai e A. S. Costa - 1964 - Contrôlo do Vira-Cabeça do Tomateiro pela Destruição do Vector. II - Comparação Entre Granutox - 5 e Pulverizações com Modernos Inseticidas. Bragantia 23: [281] - 289 .
- DIENER, T. O. and M. L. Weaver - 1957 - On Significance of Proline and Pipecolic Acid Accumulation in Western - X Diseased Peach Leaves. Phytoph 47 , 8 (Abst.) .
- DIENER, T. O. - 1963 - Physiology of Virus-Infected Plants. In Ann. Rev. of Phytopath 1:197-218 .
- DUFRENOY, J. - 1937 - Le "Spotted-Wilt" . Ann. Ephyties et Phytogeticque (3) 2: 187-223 .
- FRAGA, C. G. Jr. e A. S. Costa - 1950 - Análise de um Experimento para Combate de Vira-Cabeça do Tomateiro. Bragantia 10: [305] - 316 .
- GALLO, D. , J. Mitidieri e F. Pimentel Gomes - 1960 - Contrôlo do "Vira-Cabeça" do Tomateiro pelo Emprêgo de Inseticidas Sistêmicos nas Sementes. Boletim n.º 17 da E. S. A. "Luiz de Queiroz" , U. S. P. , Piracicaba .
- GALLO, D. , J. Mitidieri , F. Pimentel Gomes e R. Vencovsky - 1961 - Contrôlo do "Vira-Cabeça" do Tomateiro pelo Emprêgo de Inseticidas Sistêmicos nas Sementes e nos Sulcos. Boletim n.º 19 da E. S. A. "Luiz de Queiroz" , U. S. P. , Piracicaba .
- GEOFFREY, Samuel and J. G. Bald - 1933 - On the Use of the Primary Lesions in Quantitative Work with Two Plants Viruses. Ann. Appl. Biol. 20 (1): 70-99.
- GLÓRIA, N. A. , R. A. Catani e T. Matuo - 1965 - Determinação de Cálcio e Magnésio em Plantas pelo Método do EDTA . Anais da E. S. A. "Luiz de Queiroz" 22: 154-171 .
- GRIEVE, B. J. - 1943 - Studies in the Physiology of Host-Parasite Relation. 4 . Some Effects of Tomato Spotted Wilt on Growth. Australian Jour. Exp. Biol. and Med. Sci. , 21 (2): 89-101 .

- HAAG, H. P. , D. M. Silva and J. C. de Oliveira - 1967 - Influence of the Tristeza Virus on the Phosphorus (^{32}P) Distribution in Galego Lime (Citrus aurantifolia Christm) . Rev. de Agricultura 42 (2): 89-92 .
- HAYNES, J. L. , and W. R. Robbins - 1948 - Calcium and Boron as Essential Factors in the Root Environment. Jour. Amer. Soc. Agron. 40 (9): 795-803 .
- HESTER, Jackson B. - 1939 - The Absorption of Nutrients by the Tomato Plants at Different Stages of Growth. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 36: 720-722 .
- KITAJIMA, E. W. - 1965 - Electron Microscopy of "Vira-Cabeça" Virus. Virology 26 (1): 89-99 .
- LEE, Peter E. - 1964 - Electron Microscopy of Inclusions in Plants Infected by Wheat Striate Mosaic Virus. Virology 23: 145-151 .
- MALAVOLTA, E. - 1958 - Práticas de Química Orgânica e Biológica. CALQ , Departamento Editorial. Piracicaba , SP.
- MALAVOLTA, E. - 1964 - Análise Química dos Teores Totais. Curso Internacional de Diagnose Foliar. IICA - ESALQ . Piracicaba , SP .
- MALAVOLTA, E. - 1965 - Deficiências Minerais (II) . Curso de Fitopatologia para Graduados. INTA . Castelar , Buenos Aires , Argentina.
- MARINOS, Nicolos G. - 1962 - Studies on Submicroscopic Aspects of Mineral Deficiencies. I. Calcium Deficiency in the Shoot Apex of Barley. Amer. Jour. of Bot. 49 (8): 834-841 .
- MARINOS, Nicolos G. - 1963 - Studies on Submicroscopic Aspects of Mineral Deficiencies. II. Nitrogen , Potassium , Sulfur , Phosphorus , and Magnesium Deficiencies in the Shoot Apex of Barley. Amer. Jour. of Bot. 50 (10): 998-1005 .
- MARTIN, M. M. - 1964 - Purification and Electron Microscope Studies of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) from Tomato Roots. Virology 22 (4): 645-649 .
- MORRIS, D. O. - 1946 - The Strain Complex and Symptom Variability of Tomato Spotted Wilt Virus. Australia Conc. Sci. and Indust. Res. Bull. 202: 1-51 .
- OSMOND, C. B. - 1966 - Divalent Cation Absorption and Interaction in Atriplex. Australian J. Biol. Sci. 19 (1): 37-38 .

- PIMENTEL GOMES, F. - 1963 - Curso de Estatística Experimental. 2.^a ed. , 348 pp. 15 Tabelas. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" , Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- PORTER, K. R. , and R. D. Machado - 1960 - The Endoplasmic Reticulum and the Formation of Plant Cell Walls. Proc. Eur. Reg. Conf. on Electron Microscopy , Delf 2: 754-759 .
- SELMAN, I. W. , and Sheila A. Grant - 1957 - Some Effects of Nitrogen Supply on the Infection of Tomato Plants with Tomato Spotted Wilt Virus. The Ann. App. Biol. 45 (3): 448-455 .
- SELMAN, I. W. , M. R. Brierley , G. F. Pegg and T. A. Hill - 1961 - Changes in the Free Amino Acids and Amides in Tomato Plants Inoculated with Tomato Spotted Wilt Virus. The Ann. Appl. Biol. 49 (4): 601-615 .
- SILVA, D. M. e H. P. Haag - 1966 - Influence of the Tristeza Virus on the Mineral Composition of Galego Lime (Citrus aurantifolia , Christm) Cultivated in Nutrient Solution. Abstracts of the Fourth Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Italy .
- SMITH, Kenneth - 1957 - Textbook of Plant Virus Diseases. 652 pp. J. and A. Churchill Ltd., London.
- STEINBERG, R. A. , Bowhing J. D. , and J. E. McMurtrey Jr. - 1950 - Accumulation of Free Amino Acid as a Chemical Basis of Morfological Symptoms in Tobacco Manifesting Frenching and Mineral Deficiency Symptons. Plant Physiol. 25: 279-288 .
- THOMSON, W. W. , and T. E. Weier - 1962 - The Fine Structure of Chloroplasts from Mineral - Deficient Leaves of Phaseolus vulgaris. Amer. Jour. of Bot. 49 (10): 1047-1055 .
- THOMSON, W. W. , T. E. Weier and H. Drever - 1964 - Electron - Microscopic Studies on Chloroplast from Phosphorus - Deficient Plants. Amer. Jour. of Bot. 51 (9): 933-938 .

- WALL, Monroe E. - 1940.a - The Role of K in Plants. II. Effect of Varying Amounts of K on the Growth Status and Metabolism of Tomato Plants. Soil Sci. 49 (4): 315-331 .
- WALL, Monroe E. - 1940.b - The Role of K in Plants. III. Nitrogen and Carbohydrate Metabolism in K Deficient Plants Supplied with either Nitrate or Ammonium Nitrogen. Soil Sci. 49 (5): 393-409 .
- WELKIE, G. , W. Pound and S. Glenn - 1958 - Manganese Nutrition of *Nicotiana tabacum* L. in Relation to Multiplication of Tobacco Mosaic Virus. Virology 5: 92-109 .
- WOOLEY, J. T. and T. C. Broyer - 1957 - Foliar Symptoms of Deficiencies of Inorganic Elements in Tomato. Plant Physiol. 32 (2): 148-151 .

APÊNDICE I

Dados de Teores de N , P , K , Ca , Mg e S em Pinas , Pecíolos , Caules ,
e Raízes de Plantas Sadias do 1º Ensaio.

Partes da		T R A T A M E N T O S							
Planta		C	1/2 C	- N	- P	- K	- Ca	- Mg	- S
% de N	Pinas	4,84	3,46	2,52	5,04	4,52	3,21	4,77	4,55
	Pecíolos	2,18	1,62	1,00	1,86	2,08	2,53	2,21	1,92
	Caules	2,12	1,55	0,86	2,04	2,03	2,43	1,87	2,14
	Raízes	4,88	3,97	2,27	4,10	3,90	4,12	4,43	4,69
% de P	Pinas	0,44	0,41	0,71	0,17	0,75	0,67	0,53	0,49
	Pecíolos	0,44	0,43	1,28	0,10	0,96	1,02	0,59	0,45
	Caules	0,47	0,40	0,74	0,10	0,67	1,12	0,68	0,51
	Raízes	0,56	0,40	1,54	0,25	0,85	0,72	0,49	0,70
% de K	Pinas	3,25	2,76	5,07	5,45	1,20	3,10	5,60	3,30
	Pecíolos	8,25	5,00	8,35	9,20	2,30	8,30	10,40	7,60
	Caules	6,60	3,97	5,05	7,00	1,90	7,35	8,95	6,15
	Raízes	1,90	1,66	3,30	2,27	0,75	1,95	2,80	2,70
% de Ca	Pinas	3,05	2,69	1,53	3,15	4,39	1,31	2,73	2,78
	Pecíolos	2,13	2,20	0,45	1,86	3,88	0,40	2,48	1,63
	Caules	1,43	1,57	0,37	1,74	2,24	0,40	2,00	0,95
	Raízes	0,49	0,75	0,18	0,59	0,56	0,23	0,66	0,51
% de Mg	Pinas	0,54	0,30	0,70	0,76	0,60	1,93	0,14	0,57
	Pecíolos	0,37	0,23	0,42	0,58	1,00	1,07	0,09	0,49
	Caules	0,27	0,14	0,15	1,03	0,59	0,48	0,12	0,32
	Raízes	0,21	0,12	0,24	0,28	0,77	0,09	0,12	0,31
% de S	Pinas	0,63	0,55	2,76	0,85	0,50	0,94	0,77	0,35
	Pecíolos	0,20	0,16	1,66	0,36	0,30	0,67	0,37	0,17
	Caules	0,23	0,15	0,55	0,38	0,33	0,42	0,31	0,23
	Raízes	0,32	0,29	0,43	0,33	0,45	0,38	0,45	0,34

APÊNDICE II

Dados de Teores de N , P , K , Ca , Mg e S em Pinas , Pecíolos , Caules ,
e Raízes de Plantas Sadias do 2º Ensaio.

Partes da Planta	T R A T A M E N T O S								
	C	1/2 C	- N	- P	- K	- Ca	- Mg	- S	
% de N	Pinas	4,08	4,87	2,95	4,19	4,32	3,85	4,20	4,15
	Pecíolos	1,76	1,70	1,13	1,50	1,79	2,07	1,75	1,80
	Caules	2,39	1,52	1,28	1,66	1,91	2,20	2,23	1,95
	Raízes	3,55	3,95	2,53	3,16	3,35	3,69	3,15	2,90
% de P	Pinas	0,89	0,85	1,17	0,23	1,25	0,61	0,89	0,96
	Pecíolos	1,04	0,65	1,12	0,15	1,21	0,62	1,10	1,04
	Caules	0,90	0,62	0,76	0,09	0,84	0,61	0,96	0,86
	Raízes	1,13	0,98	1,96	0,34	1,19	1,43	1,12	1,21
% de K	Pinas	4,95	4,90	5,20	5,35	1,20	4,70	5,75	4,50
	Pecíolos	8,30	7,75	7,65	7,20	2,10	9,35	8,75	6,40
	Caules	5,70	6,75	4,20	5,30	2,45	7,05	6,00	5,20
	Raízes	4,25	3,75	4,05	3,90	0,75	2,35	4,85	4,45
% de Ca	Pinas	3,76	2,82	1,40	3,00	4,35	1,54	2,37	4,06
	Pecíolos	2,42	2,10	0,70	1,48	2,00	1,06	2,06	2,56
	Caules	1,15	0,74	0,40	1,07	1,06	0,59	1,25	1,31
	Raízes	0,53	0,60	0,29	0,62	0,64	0,42	0,38	0,72
% de Mg	Pinas	0,82	0,48	1,23	0,65	0,78	0,99	0,31	0,51
	Pecíolos	1,14	0,51	0,65	0,78	1,45	1,03	0,36	0,88
	Caules	0,62	0,43	0,43	0,46	0,74	0,40	0,38	0,075
	Raízes	0,29	0,36	0,12	0,25	0,46	0,094	0,19	0,59
% de S	Pinas	1,53	1,13	3,26	1,46	1,27	0,82	1,02	0,37
	Pecíolos	0,67	0,24	1,02	0,42	0,58	0,38	0,47	0,16
	Caules	0,39	0,21	0,41	0,28	0,46	0,27	0,38	0,08
	Raízes	0,50	0,27	0,61	0,47	0,49	0,21	0,51	0,22

APÊNDICE III

Dados de Teores de N , P , K , Ca , Mg e S em Pinas , Pecíolos , Caules , e Raízes de Plantas Sadias do 3º Ensaio.

Partes da Planta		T R A T A M E N T O S							
		C	1/2 C	- N	- P	- K	- Ca	- Mg	- S
% de N	Pinas	4,31	4,33	2,79	4,03	4,80	3,52	4,43	4,42
	Pecíolos	1,11	1,86	0,78	1,59	1,80	1,18	1,37	1,91
	Caules	1,52	1,77	0,85	1,78	1,74	2,05	1,57	2,25
	Raízes	3,54	4,40	2,29	3,31	3,89	3,34	3,45	4,38
% de P	Pinas	0,71	0,78	0,87	0,13	0,78	0,65	0,88	0,90
	Pecíolos	0,50	0,60	0,76	0,06	0,61	0,71	0,68	0,72
	Caules	0,50	0,60	0,55	0,06	0,51	1,01	0,70	0,71
	Raízes	0,72	0,58	1,72	0,19	0,56	0,95	0,73	0,80
% de K	Pinas	4,80	5,10	4,40	4,85	1,05	3,30	5,50	4,65
	Pecíolos	7,70	8,10	6,35	6,85	1,70	7,90	8,25	8,00
	Caules	5,75	6,20	4,50	4,50	1,50	6,40	6,35	5,65
	Raízes	4,15	1,75	3,00	2,45	0,50	3,15	2,45	2,35
% de Ca	Pinas	3,47	2,90	1,31	2,59	4,16	1,25	2,35	2,83
	Pecíolos	1,97	1,60	0,16	1,17	2,53	0,80	2,24	1,58
	Caules	0,83	1,04	0,34	0,88	1,30	0,37	1,41	0,86
	Raízes	0,29	0,32	0,10	0,64	0,58	0,27	0,51	0,56
% de Mg	Pinas	0,63	0,62	1,19	0,69	0,94	1,18	0,54	0,91
	Pecíolos	0,84	0,74	0,53	0,90	1,48	0,98	0,27	0,78
	Caules	0,56	0,32	0,16	0,51	0,77	0,39	0,17	0,43
	Raízes	0,38	0,26	0,16	0,22	0,40	0,19	0,26	0,13
% de S	Pinas	1,60	1,16	3,24	1,52	1,22	0,64	1,23	0,29
	Pecíolos	0,34	0,28	0,33	1,05	0,39	0,42	0,35	0,06
	Caules	0,25	0,24	0,32	0,42	0,29	0,53	0,26	0,03
	Raízes	0,42	0,42	0,41	0,46	0,32	0,36	0,30	0,12

APÊNDICE IV

Dados de Teores de N , P , K , Ca , Mg e S em Pinas , Pecíolos , Caules , e Raízes de Plantas Doentes do 2º Ensaio.

Partes da Planta		T R A T A M E N T O S							
		C	1/2 C	- N	- P	- K	- Ca	- Mg	- S
% de N	Pinas	4,78	4,59	2,89	4,67	4,21	3,49	4,45	4,83
	Pecíolos	2,16	2,29	1,70	2,07	2,14	2,23	2,35	2,13
	Caules	2,45	2,26	2,06	1,94	2,67	2,59	2,56	2,16
	Raízes	3,63	3,41	3,08	3,28	3,75	3,52	3,70	3,40
% de P	Pinas	0,87	0,79	1,00	0,29	0,95	0,54	0,81	0,83
	Pecíolos	1,00	0,95	1,10	0,17	1,07	0,68	1,01	0,92
	Caules	0,83	0,80	0,82	0,14	0,75	0,65	0,91	0,84
	Raízes	0,96	1,27	1,77	0,25	1,20	1,56	1,00	1,30
% de K	Pinas	4,35	4,70	4,35	4,15	1,20	3,10	4,65	3,55
	Pecíolos	8,15	7,10	8,25	7,80	2,50	9,30	8,90	7,25
	Caules	6,25	6,60	5,50	5,90	2,00	7,10	6,80	6,10
	Raízes	3,45	3,90	3,35	4,25	0,80	2,60	4,10	4,25
% de Ca	Pinas	3,45	2,54	2,19	2,45	4,43	1,50	2,82	2,84
	Pecíolos	2,12	1,76	0,30	1,78	3,09	0,86	1,88	2,30
	Caules	1,00	0,94	0,46	1,14	1,34	0,21	1,10	1,22
	Raízes	0,59	0,39	0,24	0,72	0,43	0,49	0,56	0,38
% de Mg	Pinas	0,66	0,96	0,92	1,00	0,51	0,68	0,31	0,40
	Pecíolos	0,92	1,36	0,64	1,05	1,44	0,91	0,13	0,76
	Caules	0,48	0,48	0,29	0,88	0,56	0,25	0,32	0,53
	Raízes	0,11	0,21	0,12	0,40	0,88	0,33	0,21	0,52
% de S	Pinas	1,21	1,38	2,62	1,29	0,80	0,61	0,88	0,49
	Pecíolos	0,58	0,49	0,68	0,63	0,40	0,27	0,42	0,23
	Caules	0,32	0,30	0,35	0,41	0,24	0,26	0,29	0,14
	Raízes	0,38	0,51	0,53	0,46	0,43	0,29	0,40	0,26

APÊNDICE V

Dados de Teores de N , P , K , Ca , Mg e S em Pinas , Pecíolos , Caules ,
e Raízes de Plantas Doentes do 3º Ensaio.

Partes da Planta		T R A T A M E N T O S							
		C	1/2 C	- N	- P	- K	- Ca	- Mg	- S
% de N	Pinas	4,41	4,70	2,21	4,05	5,08	3,42	4,20	4,57
	Pecíolos	1,86	1,45	0,80	1,88	2,16	1,86	1,72	1,46
	Caules	2,19	1,61	0,67	1,86	2,04	2,00	2,09	1,73
	Raízes	4,30	3,71	2,43	3,68	4,45	3,57	3,88	3,57
% de P	Pinas	0,61	0,68	0,90	0,21	0,76	0,80	0,73	0,52
	Pecíolos	0,54	0,62	0,83	0,11	0,61	0,83	0,59	0,63
	Caules	0,53	0,60	0,64	0,11	0,52	0,88	0,62	0,63
	Raízes	0,55	0,68	1,56	0,25	0,58	1,06	0,77	0,60
% de K	Pinas	4,65	4,70	4,35	5,15	1,05	3,45	5,25	2,75
	Pecíolos	6,50	6,65	5,95	6,90	2,00	8,00	7,60	7,60
	Caules	5,15	5,80	3,10	5,70	1,60	5,65	5,50	5,25
	Raízes	3,75	2,50	2,45	2,00	0,50	3,80	2,40	1,35
% de Ca	Pinas	2,85	3,42	1,73	3,36	4,11	1,28	2,25	1,85
	Pecíolos	1,44	1,63	0,38	1,34	2,32	0,66	1,76	1,50
	Caules	0,70	1,28	0,30	1,12	1,31	0,32	1,10	0,83
	Raízes	0,38	0,46	0,13	0,70	0,14	0,16	0,50	0,42
% de Mg	Pinas	0,59	0,60	0,87	0,89	0,76	1,19	0,22	0,34
	Pecíolos	0,77	0,69	0,55	0,68	1,41	0,97	0,45	0,70
	Caules	0,52	0,42	0,14	0,46	0,64	0,50	0,45	0,33
	Raízes	0,15	0,10	0,08	0,20	0,52	0,34	0,29	0,24
% de S	Pinas	1,31	1,27	3,50	1,30	0,90	0,85	1,27	0,19
	Pecíolos	0,32	0,32	0,38	1,23	0,30	0,50	0,33	0,07
	Caules	0,24	0,29	0,36	0,45	0,18	0,30	0,27	0,06
	Raízes	0,30	0,29	0,44	0,43	0,31	0,46	0,42	0,19