

Colonização de raízes de tomateiro por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em solução nutritiva com três fontes de nitrogênio

Aldir de O. de Carvalho, Jorge Jacob Neto & Margarida Goréte F. do Carmo

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Fitotecnia, IA, CEP 23851-970, Seropédica, RJ,
e-mail: gorete@ufrj.br

(Aceito para publicação em 13/12/2004)

Autor para Correspondência: Aldir de Oliveira de Carvalho

CARVALHO, A.O., JACOB NETO, J. & CARMO, M.G.F. Colonização de raízes de tomateiro por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em solução nutritiva com três fontes de nitrogênio. Fitopatologia Brasileira 30:26-32. 2005.

RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram os de avaliar o efeito do pH sobre a germinação de conídios e o crescimento miceliano de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e o efeito da fonte de nitrogênio sobre o início do processo de infecção de raízes de mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). Inicialmente quantificou-se a porcentagem de germinação dos conídios e o crescimento miceliano em meio Caldo Nutritivo com pH variando de 2,0 a 11,0. O pH do meio foi também medido ao final de 14 dias de crescimento do fungo. Avaliou-se, ainda, por meio de isolamentos e observações ao microscópio óptico, o efeito das fontes de nitrogênio sobre o processo de infecção e colonização das raízes. Utilizou-se a cultivar Kada Gigante e solução nutritiva contendo como fontes de nitrogênio $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$ e $N-NH_4NO_3$, seguido da adição ou não de conídios do patógeno. As avaliações de pH da solução, das alterações morfológicas da raiz e da colonização pelo patógeno foram feitas até 240 h após a infestação. O $N-NO_3^-$ proporcionou maiores valores de pH e favoreceu o desenvolvimento radicular, com aumento do tamanho e número de pêlos radiculares, e redução da taxa de adesão de conídios e da colonização por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* comparado a $N-NH_4NO_3$ e, principalmente, $N-NH_4^+$. Estes resultados, porém, devem-se, mais provavelmente, ao desbalanço iônico nas plantas supridas com $N-NH_4^+$, do que ao efeito simples da variação de pH da rizosfera. O patógeno mostrou-se hábil em se desenvolver em faixa ampla de pH, 3 a 9, em meio de cultura.

Palavras-chave adicionais: murcha de fusarium, rizosfera, NO_3^- , NH_4^+ .

ABSTRACT

Tomato root colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in nutrient solution containing three nitrogen sources

This work was conducted to elucidate the pH effect on the conidia germination and on the mycelium growth of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the effect of N sources on the infection process of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Initially, the quantification of conidia germination and the mycelium growth were performed in liquid culture medium with pH ranging from 2,0 to 11,0. The medium pH at 14 day after fungi growth was also measured. Cultivar 'Kada Gigante' was grown in a nutrient solution containing three N sources, NH_4^+ , NO_3^- and NH_4NO_3 , with or without addition of *Fusarium* conidia in the solution. The solution pH, root morphological alterations and pathogen colonization were measured up to 240 h after infestation. $N-NO_3^-$ application resulted in higher pH values and favored root development, with significant increase of root hair number. It also reduced the conidia attachment rate and *Fusarium* colonization rate compared to $N-NH_4NO_3$ and $N-NH_4^+$. These results are mostly due to the ionic imbalance of $N-NH_4^+$ fed plants than to the single rhizospheric pH change pH. The pathogen was able to develop on a wide range of pH – 3,0 to 9,0 in medium culture.

Additional keywords: fusarium wilt, rhizosphere, NO_3^- , NH_4^+ .

INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) apresenta um aspecto nômade devido ao acúmulo de inóculo de patógenos de solo como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sacc. Snyder & Hansen, agente da murcha de Fusarium. Esta tem causado grandes perdas que chegam a inviabilizar áreas inteiras para a exploração e obrigando os produtores a buscarem novas áreas para plantio, uma vez que o patógeno sobrevive no solo por longos períodos, mesmo na ausência do hospedeiro (Agrios, 1997). O controle da doença envolve várias medidas e práticas culturais, incluindo todas

aquelas de caráter preventivo, como calagem, irrigação, adição de matéria orgânica e, principalmente, uso de cultivares tolerantes ou resistentes.

Existem relatos sobre diferenças na intensidade dos sintomas de murcha de fusarium em diferentes culturas, quando adubadas com nitrogênio sob a forma de $N-NH_4^+$ ou de $N-NO_3^-$, em geral, com redução na severidade dos sintomas com a utilização de nitrogênio sob a forma de $N-NO_3^-$ em relação a $N-NH_4^+$, sendo este efeito atribuído à elevação do pH pelo uso do $N-NO_3^-$ (Jones *et al.*, 1989). Pouco se conhece, porém, sobre os mecanismos associados ao balanço iônico, principalmente em nível de rizosfera, regulado pelas formas de nitrogênio, e

suas implicações na interação patógeno-hospedeiro e na colonização da rizosfera, primeiro passo para início do processo de infecção.

Os primeiros trabalhos relatando o efeito do pH e da nutrição sobre murcha de fusarium datam do início do século XX onde foi observado redução da doença com o aumento do pH pela calagem (Jones *et al.*, 1989), porém, segundo Jones & Woltz (1969) o fator determinante é o fornecimento de Ca^{++} . Os primeiros trabalhos que associaram o aumento das concentrações de N-NH_4^+ em relação a N-NO_3^- ao aumento da severidade da murcha de fusarium ocorreram em 1935, elaborados por Fisher, que atribuiu o fenômeno ao aumento da concentração de nitrogênio no solo (Jones *et al.*, 1989). Estudos sobre a combinação de pH e nitrogênio demonstram que, com a elevação de pH, a incidência de murcha é menor. Woltz & Jones (1973) observaram que a elevação do pH com a calagem para 6,5 a 7,5 reduziu significativamente a incidência da murcha de fusarium em tomateiro. Arya & Kuwatsuka (1993) e Höpfer *et al.* (1995) constataram que a utilização de N-NO_3^- em relação a N-NH_4^+ reduz a severidade da murcha causada por *F. oxysporum* Schlecht. f. sp. *lini* (Bollet) Snyder & Hansen em linho (*Linum usitatissimum* L.), por *F. oxysporum* Schlecht. f. sp. *raphani* Kendrick % Snyder em rabanete (*Raphanus sativus* L.) e por *F. solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *radicicola* (Wr.) Snyder & Hansen em batata (*Solanum tuberosum* L.). A adição de N-NO_3^- em cultivos de melão (*Cucumis melo* L.) (Jones *et al.*, 1989) reduziu a incidência de murcha de fusarium quando comparado com a adição de N-NH_4^+ . Schuerger & Mitchell (1992) verificaram variação significativa no peso da massa fresca de feijoeiro e em relação à infecção das plantas por *F. solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *phaseoli* (Burk) Snyder & Hansen, reguladas por variações de temperatura e pH, com maior taxa de infecção a pH 4 e 25 °C de temperatura.

Na rizosfera há a liberação de exsudatos pela planta que, provavelmente, variam de acordo com a nutrição da mesma, o pH, as condições climáticas e as cultivares (Jones *et al.*, 1989; Schuerger & Mitchell, 1992; Marschner, 1995). Este balanço, provavelmente, poderá interferir na maior ou menor ocupação da região da rizosfera pelo patógeno, favorecendo ou não a germinação dos esporos e a infecção. A fase de germinação dos conídios é crucial para o estabelecimento do patógeno e é, em geral, uma das mais sensíveis aos fatores do ambiente, como umidade, temperatura e presença de substâncias, como carboidratos, açúcares e aminoácidos (Agrios, 1997), além da presença de outros organismos.

As alterações na concentração de H^+ e seus prováveis efeitos sobre a severidade de doenças causadas por patógenos que penetram via raiz vêm recebendo pouca atenção (Schuerger & Mitchell, 1992). O pH da rizosfera pode variar em relação ao pH do solo em mais que duas unidades (Marschner & Römheld, 1983; Römheld, 1986), dependendo da forma de nitrogênio aplicada (NH_4^+ , NO_3^- , ou N_2 fixado biologicamente), espécie, estado nutricional da planta e capacidade tampão do solo (Marschner, 1995). Em muitos casos, essas alterações se devem a diferenças na liberação de H^+ devido ao desbalanço na taxa de absorção de cátions e de ânions, promovido pela

forma de nitrogênio absorvido.

Desta forma, este trabalho tem como objetivos estudar os efeitos do pH sobre a germinação de conídios e o crescimento miceliano de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e da fonte de nitrogênio sobre o início do processo de infecção de raízes de tomateiro.

MATERIALE MÉTODOS

Efeito do pH sobre o desenvolvimento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em meio líquido

Utilizou-se o isolado ENA-4514 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* com sete dias de crescimento em BDA a 25 °C e dez valores de pH ajustados em meio de Caldo Nutritivo (0,3% de extrato de carne e 0,5% de peptona em água destilada). Ao Caldo Nutritivo foi feita a adição de solução de HCl ou NaOH (1,0 M) até se atingir o valor desejado de pH, 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 e 11,0, seguido de esterilização por meio de filtração (Millipore a 0,20 μm). Para cada tratamento foram utilizadas três repetições, constituídas por um tubo de ensaio contendo 4,5 ml do meio com os respectivos valores de pH aos quais foi adicionado 0,5 ml de suspensão, contendo 10^5 conídios. ml^{-1} de conídios em água destilada e esterilizada. Após a adição, os tubos foram mantidos a 25 °C no escuro e sob agitação até o momento da avaliação, às 6, 9 e 12 h de incubação, por meio de leitura em hemacitômetro de 100 conídios por amostra. Considerou-se como esporo germinado, aquele que apresentava tubo germinativo com comprimento igual ou superior à maior dimensão do esporo. Durante as avaliações, os tubos foram mantidos em Becker contendo água a 0 °C visando paralisar o processo de germinação. Os valores foram expressos em porcentagem de esporos germinados.

Para determinar o efeito do pH sobre o crescimento miceliano, utilizaram-se os mesmos tratamentos anteriores, contidos em frascos Erlenmeyers de 125 ml. Para cada tratamento foram utilizados três frascos Erlenmeyers contendo 50 ml de meio ao qual foram adicionados cinco discos de micélio (3 mm de diâmetro) de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Os frascos foram mantidos a 25 °C no escuro e sob agitação durante 14 dias. Para a avaliação, efetuou-se a filtração em papel de filtro seguido de secagem em estufa a 65 °C por 72 h, quando se determinou o peso da matéria seca do micélio. Após a remoção do micélio por filtração, realizou-se, ainda, a medição do pH do meio de cultura.

Os dados de porcentagem de germinação de esporos, peso do micélio e pH final da solução nutritiva foram submetidos à análise de variância e à análise de regressão em função do pH original do meio, onde se testou o ajuste aos modelos quadráticos, cúbico e monomolecular. A escolha do modelo foi feita com base nos valores de R^2 e desvios em relação aos valores observados.

Crescimento de tomateiro e de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em solução nutritiva contendo três fontes de nitrogênio

Para avaliar o efeito da fonte de nitrogênio sobre o pH da solução nutritiva e sobre os eventos iniciais dos processos

de germinação dos esporos, de crescimento miceliano e de infecção e colonização de raízes de tomateiro, foi efetuado este segundo ensaio *in vitro*, utilizando-se a cultivar suscetível Kada Gigante e o isolado ENA-4514 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Compararam-se três fontes de nitrogênio (N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, e N-NH₄NO₃) com a infestação ou não com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, em cinco datas, 0, 24, 48, 120 e 240 h, desde a infestação.

Para montagem do ensaio, utilizaram-se sementes de tomateiro previamente tratadas em HCl a 5% por 10 min (Carmo *et al.*, 2004) e germinadas em caixas plásticas tipo Gerbox. Após 14 dias de incubação, a 25 °C e fotoperíodo de 12 h, selecionaram-se as plântulas de padrão mais homogêneo e efetuou-se a transferência das mesmas, sob condições assépticas, para tubos de ensaio, com capacidade para 60 ml, revestidos com folha de alumínio, contendo 50 ml das respectivas soluções nutritivas, também previamente esterilizadas por meio de filtragem em filtro Millipore (0,20 µm).

A solução nutritiva foi preparada conforme Jacob Neto *et al.* (1988), variando apenas a fonte de nitrogênio. Os frascos contendo as plântulas crescendo nas soluções foram aerados quatro vezes ao dia durante 20 min. Para a aeração, utilizou-se um dispositivo contendo uma mangueira para cada tubo de ensaio, previamente numerados, acoplado a uma bomba de compressão. A cada dois a três dias acrescentou-se 5 ml das respectivas soluções para completar o volume e garantir o suprimento dos nutrientes às mudas.

Aos vinte dias de crescimento das mudas, realizou-se a substituição completa das mesmas, utilizando-se de 45 ml de cada solução por tubo e observando-se sempre a fonte de nitrogênio dos respectivos tratamentos. Após 24 h, procedeu-se à infestação por meio da adição de 5 ml de suspensão de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* aos respectivos tubos visando obter a concentração de 10⁴ conídios por ml de solução nutritiva nos tratamentos, ou 5 ml de água apenas nos tratamentos testemunha.

Durante a condução do ensaio, as plantas foram mantidas em condições de laboratório, sob luz branca, 14 h de fotoperíodo e temperatura média noturna de 20 °C e diurna de 26 °C. A partir da infestação, iniciaram-se as avaliações destrutivas que foram feitas com 24, 48, 120 e 240 h. Em cada uma das quatro datas de avaliação, coletaram-se amostras para as diferentes avaliações: pH da solução nutritiva, presença de sintomas de fitotoxidez ou de murcha das mudas, características do sistema radicular, presença de conídios na superfície da raiz e de colonização na raiz e nas hastes pelo fungo.

Os valores de pH da solução nutritiva foram determinados na solução original, adicionada 24 h antes da infestação (-24 h), no momento da infestação (0 h) e nas respectivas avaliações efetuadas às 24, 48, 120 e 240 h após a infestação. Os sintomas de fitotoxidez foram determinados pela análise visual e comparativa das mudas dos diferentes tratamentos e de murcha pela observação de sintomas característicos. A colonização foi avaliada por meio de observações ao microscópio óptico de fragmentos de raiz e de hastes de plantas de tomateiro. Para a avaliação as 24 e 48 h após a

infestação, coletaram-se segmentos de 5 a 10 mm da região apical, mediana e basal das raízes, enquanto que nas avaliações de 120 e 240 h, coletaram-se também amostras a partir do colo e das hastes das plantas. Para visualização em microscopia óptica, efetuaram-se montagens simples em lâminas de microscopia contendo o corante lactofenol – azul de algodão (Dhingra & Sinclair, 1995). Para tanto, tomaram-se fragmentos radiculares de 3 a 5 mm que foram dispostos diretamente no corante, cobertos por lamínula e, em seguida, foi feita a exposição rápida das lâminas à chama até a ebulição do corante. Paralelamente, efetuaram-se isolamentos a partir das hastes e das raízes em meio específico (Komada, 1975). Após cinco dias de incubação a 25 °C no escuro, efetuou-se o exame individual das colônias desenvolvidas a partir dos fragmentos de tecido e identificação dos fungos presentes com base em Booth (1977).

Adotou-se o delineamento inteiramente ao acaso com quatro repetições e arranjo fatorial 3x2x5, composto por três fontes de nitrogênio, duas inoculações e cinco períodos de incubação, totalizando 120 parcelas representadas por um tubo de ensaio

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do pH sobre o desenvolvimento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em meio líquido

Observou-se efeito significativo do pH inicial do meio sobre a germinação dos conídios, crescimento miceliano e pH final do meio de cultura (p<0,01). A melhor discriminação do efeito do pH sobre a germinação dos conídios pôde ser observada com 9 h de incubação. Este efeito, bem como aquele sobre o crescimento miceliano, pode ser descrito por equação de terceiro grau (Figuras 1A e 1B), respectivamente. Tanto, a germinação como o crescimento miceliano ocorreram em pH variando de 3,0 a 11,0 (Figuras 1A e 1B). Em pH 2,0 a germinação dos conídios foi de 2% e o crescimento miceliano reduzido. Estes resultados indicam a capacidade do fungo em adaptar-se a ampla faixa de pH como já citado por Barnett & Hunter (1998), para *F. oxysporum* e, por Schuerger & Mitchell (1992), para *F. solani* f. sp. *phaseoli*.

Esta capacidade de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* crescer em faixa ampla de pH pode dever-se à própria capacidade do fungo em modificar o pH do meio. Observou-se efeito do pH inicial do meio sobre o pH deste aos 14 dias de incubação, também com efeito bem descrito por equação de terceiro grau. Constatou-se, porém, a tendência para a homogeneização do pH dentro da faixa de 5,0 a 7,0, a partir de pH inicial de 3,0 a 10,0 (Figura 1C). Esta resposta pode ser devido ao comportamento do fungo semelhante ao que foi descrito por Manteau *et al.* (2003) para *Botrytis cinerea* Pers. Os autores relatam que ocorre secreção diferenciada de substâncias pelo fungo em função do pH do substrato. Em pH próximo a 3,1, o fungo sintetiza ácido aspártico, protease, poligalacturonase e lactase, enquanto que, em pH ao redor de 6,0, são produzidos polissacarídeos extracelulares, ácido oxálico e poligalacturonases.

A capacidade de fungos se desenvolverem em faixas

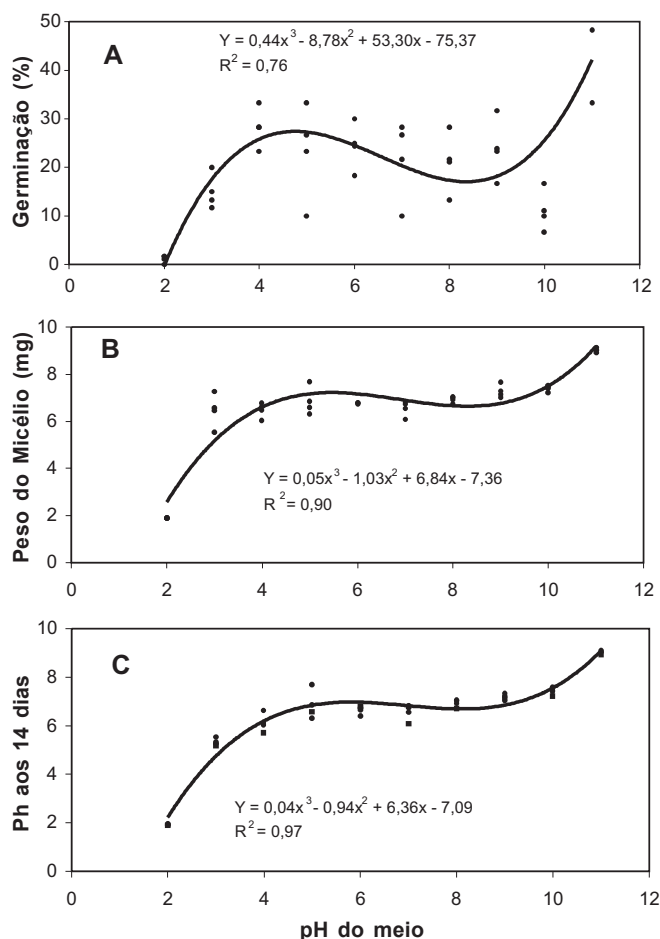


FIG. 1 - Desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, em meio caldo nutritivo com diferentes valores de pH, expresso pela porcentagem de germinação dos conídios às 9 h de incubação (A), peso da matéria seca do micélio (B) e pH final do meio, medido após 14 dias de incubação (C).

amplas de pH é associada a presença de sistemas reguladores de pH. Estes sistemas reguladores se expressam pela produção diferencial de enzimas e metabolitos extracelulares em função do pH do meio (Denison, 2000). Provavelmente este mecanismo de regulação do pH também ocorra em *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e esta habilidade possa estar associada à sua capacidade de sobrevivência por longos períodos no solo, na ausência do hospedeiro, mesmo em condições adversas.

Crescimento de tomateiro e de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em solução nutritiva contendo três fontes de nitrogênio

A infestação reduziu significativamente o pH da solução nutritiva comparado a testemunha, 4,28 e 4,34, respectivamente. Observou-se, sempre, valor de pH significativamente maior no tratamento com $N-NO_3^-$, seguido do tratamento $N-H_4NO_3$, que, em geral, foi maior que os do $N-NH_4^+$ (Figura 2). Esta diferença confirma resultados observados por Carvalho (2003) em ensaio em condições de casa de vegetação e apresentam a mesma tendência relatada por Kirkby & Mengel (1967) em estudo pioneiro sobre a variação de pH em função da fonte de

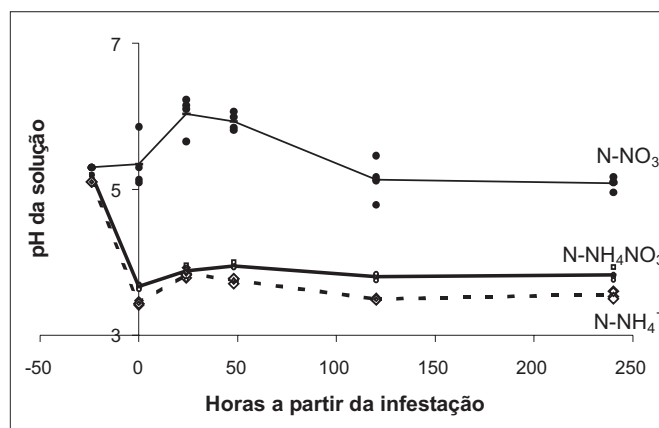


FIG. 2 - Valores de pH da solução nutritiva com três fontes de nitrogênio ($N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$ e $N-NH_4NO_3$) com crescimento de plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) 24 h antes da infestação (-24) e ao longo de 240 h após a infestação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

nitrogênio, também com o tomateiro. A redução do pH no tratamento com $N-NO_3^-$ a partir de 48 h, e a estabilização do mesmo na faixa de 5,0 a 5,5, a partir de 120 h, deve-se, provavelmente, à redução nas concentrações de K^+ e P da solução, decorrente do desenvolvimento das plantas, tanto da parte aérea como do sistema radicular, e conseqüentemente da maior absorção dos mesmos levando à rápida exaustão destes na solução. Apesar da reposição da solução a cada dois a três dias por meio de complementação do volume dos tubos, esta, provavelmente, não foi suficiente para atender a demanda das plantas. Marschner & Römheld (1983), Häussling *et al.* (1985) e Römheld (1986) relatam que a deficiência de K, P ou Fe podem levar à redução de pH da solução. A exaustão destes pode levar à liberação de H^+ pelas raízes, mesmo na presença de $N-NO_3^-$, com conseqüente redução de pH.

A recuperação de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, a partir das raízes, ocorreu em todos os tratamentos onde foi feita a infestação, independente da fonte de nitrogênio e da data da avaliação, tendo-se observado crescimento do patógeno ao longo de toda a extensão das raízes. Nas observações ao microscópio óptico, 24 h após a infestação, constatou-se, nos tratamentos com $N-NH_4NO_3$ e, principalmente, com $N-NH_4^+$, menor número e tamanho dos pêlos radiculares (Figura 3A) e grande concentração de conídios aderidos aos mesmos. Por outro lado, no tratamento com $N-NO_3^-$, constatou-se maior número e tamanho de pêlos radiculares (Figura 3B) e baixíssima frequência de conídios associados aos mesmos, confirmada apenas por meio da recuperação do patógeno no isolamento em meio de Komada. A detecção de baixa frequência de conídios aderidos à raiz neste tratamento deve-se, provavelmente, à presença de pêlos radiculares, grandes e em alta quantidade, dificultando a visualização dos conídios presentes. Ou seja, a população do patógeno na região da raiz no tratamento com $N-NO_3^-$ apresenta-se alta em função da maior superfície radicular neste tratamento proporcionado pela alta quantidade de pêlos radiculares.

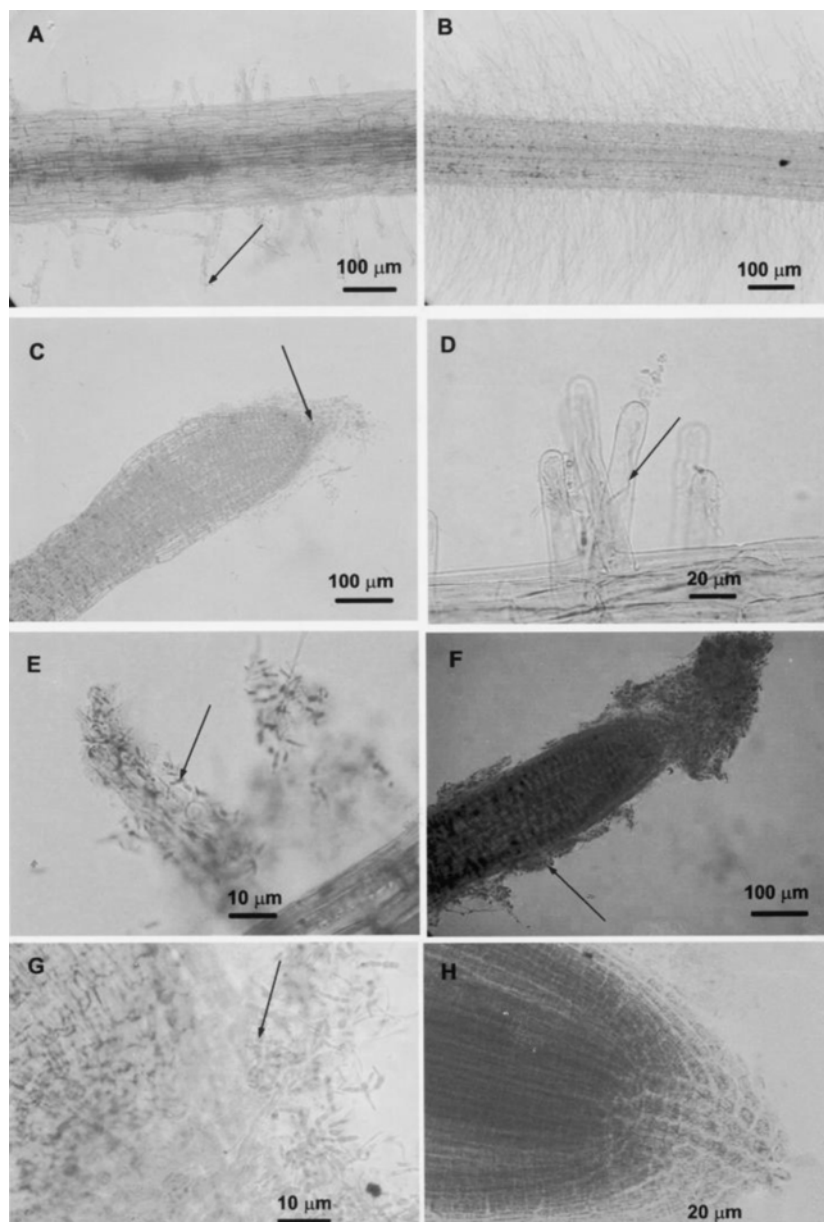


FIG. 3 - Raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* crescidas por 30 dias em solução nutritiva com diferentes fontes de nitrogênio, mostrando às 24 h após a infestação: a) pêlos radiculares curtos e em menor número em $N-NH_4NO_3$ e presença de conídios aderidos; b) pêlos radiculares abundantes e extensos em $N-NO_3^-$, aparentemente sem a presença de conídios aderidos; c) coifa com a presença de conídios aderidos à sua superfície em NH_4^+ ; às 48 h após a infestação: d) intensa colonização dos pêlos radiculares em $N-NH_4^+$; e) detalhe da presença de conídios aderidos aos pêlos radiculares em $N-NH_4NO_3$; f) coifa envolvida por manta miceliana e com visível escamação do tecido da epiderme em $N-NH_4^+$; e às 120 h após a infestação: g) detalhe da coifa envolvida por manta miceliana em $N-NH_4NO_3$, com presença de clamidosporos; h) coifa bem formada e sem a presença aparente de estruturas do patógeno em $N-NO_3^-$.

Nos tratamentos $N-NH_4NO_3$ e, principalmente, no $N-NH_4^+$ observou-se na região de emissão de pêlos radiculares e da coifa (Figura 3C), 24 h após a infestação, intensa aproximação e adesão de conídios de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. A 48 h da infestação, além da intensa adesão de conídios, observou-se também a presença de conídios germinados na região de

emissão de pêlos radiculares (Figura 3D e 3E) e na região da coifa e, pontos de infecção nas regiões cortical e de emissão de pêlos radiculares, ao contrário do tratamento com $N-NO_3^-$, onde não foi observada a presença de conídios ou de micélio do fungo, além de descamação do tecido da epiderme no tratamento com $N-NH_4^+$. Às 120 h após a infestação, observou-

se nos tratamentos com $N-NH_4^+$ (Figura 3F) e $N-NH_4NO_3$ (Figura 3G) a presença de intenso aglomerado de conídios e de micélio de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* na região da coifa, visivelmente deformada, bem como de clamidósporos se formando diretamente a partir de conídios. Às 120 h, observou-se, ainda, o desenvolvimento de manta miceliana a partir da região da coifa e da região meristemática da raiz, se estendendo até a zona de alongação da raiz (Figura 3F) e a concentração de conídios sobre alguns pêlos radiculares presentes nesta mesma zona, bem como a recuperação do patógeno a partir das hastes nos tratamentos com $N-NH_4^+$ e $N-NH_4NO_3$. No tratamento com $N-NO_3^-$, às 120 h, não foi observada a presença de conídios ou de micélio do patógeno nas regiões da coifa (Figura 3H) e de alongação da raiz, e sim na superfície de pêlos absorventes, porém com baixa frequência, e não houve recuperação do mesmo a partir das hastes. Às 240 h após a infestação, observou-se nos tratamentos $N-NH_4^+$ e $N-NH_4NO_3$, além da presença de conídios aderidos aos pêlos absorventes e às coifas, a colonização generalizada da superfície da raiz desde a coifa até a zona de alongação radicular.

Brammall & Higgins (1988), Agrios (1997) e Olivain & Alabouvette (1997) relatam que a germinação e o desenvolvimento miceliano de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ocorrem nas primeiras 24 h após a infestação. O crescimento miceliano do mesmo não significa, porém, que ocorreu a penetração e início do processo de infecção, o que pode levar mais 96 h (Olivain & Alabouvette, 1997). No presente trabalho, o crescimento miceliano, essencial para a penetração do patógeno nos tecidos do hospedeiro (Olivain & Alabouvette, 1997), foi observado somente após 48 h da infestação, sem constatação, no entanto, de pontos de infecção.

Às 120 e 240 h após a infestação, a grande concentração de conídios, a presença abundante de micélio, de clamidósporos e de esporodóquios junto à epiderme radicular indicam que os processos de infecção e colonização foram bem sucedidos nos tratamentos $N-NH_4^+$ e $N-NH_4NO_3$. Schuerger & Mitchel (1992) relatam que a reprodução assexuada de *F. solani* f. sp. *phaseoli* na superfície de raízes de plantas de feijão, com produção de conidióforos e conídios ocorre a partir de dois dias da infestação. O aumento da concentração de conídios de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* na superfície dos pêlos radiculares e na região da coifa, e o intenso crescimento miceliano, com presença de conidióforos e de conídios nestes mesmos pontos, indicam serem estas as regiões preferenciais de adesão e de penetração do patógeno, conforme relatos de Brammall & Higgins (1988), Agrios (1997) e Olivain & Alabouvette (1997). E, provavelmente, o aumento na concentração de conídios deve-se à multiplicação do patógeno no tecido colonizado e à produção de inóculo secundário. Nas plantas desenvolvidas em $N-NO_3^-$, apesar da presença de conídios aderidos à superfície da raiz, não foi constatado crescimento miceliano e reprodução do patógeno (Figura 3B e 3H), possivelmente, por este não ter sido bem sucedido no processo de colonização das raízes.

O menor desenvolvimento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* sobre as raízes de plantas de tomateiro crescidas

em solução nutritiva, contendo NO_3^- como fonte de nitrogênio, provavelmente não se deve ao efeito direto da fonte de nitrogênio sobre o pH da rizosfera decorrente da extrusão de H^+ ou de OH^- pela absorção de $N-NH_4^+$ ou de NO_3^- , respectivamente, uma vez que o patógeno desenvolve-se em ampla faixa de pH (Figura 1A e 1B). Esta diferença entre as duas fontes de nitrogênio deve-se mais, provavelmente, a efeitos indiretos como alteração no espectro de exsudatos da raiz e outros mecanismos que restringem o desenvolvimento do patógeno nas raízes. No primeiro caso, na presença de $N-NH_4^+$ ou $N-NH_4NO_3$, provavelmente ocorre a liberação de substâncias com efeito de quimiotactismo ou elétrico sobre os esporos do fungo favorecendo a sua aglomeração nos pêlos radiculares e na coifa nas primeiras 48 h (Figura 3A, 3C, 3D e 3E), o mesmo não ocorrendo com $N-NO_3^-$, resultando em menor adesão de conídios (Figura 3B e 3H).

Não houve restrição à adesão do patógeno sobre a raiz em plantas supridas com $N-NO_3^-$. Sugere-se, então, que estes mecanismos sejam governados internamente nas células da raiz. Estes podem estar associados à integridade da parede celular associada ao Ca^{++} (Römheld, 1986; Castellane, 1998), alterada pela fonte de nitrogênio (Marschner & Römheld, 1983; Römheld, 1986), como às alterações fisiológicas com efeito direto no espectro de substâncias exsudadas ou aos mecanismos de restrição do processo de colonização. Rabe (1994) relata como exemplo o acúmulo massivo de glutamina nas raízes de plantas de tomateiro supridas com $N-NH_4^+$ comparado a $N-NO_3^-$. Alguns autores descrevem diversos mecanismos de defesa de planta contra infecções de patógenos vasculares: o aumento da atividade citoplasmática das células adjacentes ao parênquima vascular em contato com o patógeno, o espessamento da parede celular, o aumento do número e redução do tamanho dos vacúolos, o depósito de corpúsculos granulares nas células citoplasmáticas adjacentes, o espessamento da parede secundária do meta e protoxilema e a produção de compostos fenólicos (Brammall & Higgins, 1988). Outro mecanismo citado são as alterações na estrutura da parede de células corticais e hipodérmicas, como deposição de papilas, de lignina e de suberina, que inibem o crescimento miceliano inter e intracelular (Brammall & Higgins, 1988). Olivain & Alabouvette (1997) descrevem um mecanismo de resistência de tomateiro a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* denominado de compartimentalização que consiste em alterações das células corticais na zona diferenciada da raiz com indução de espessamento da parede celular, obstrução intercelular, formação de depósitos intracelulares e desenvolvimento de células hipertrofiadas no sentido longitudinal e centrípeto.

A possível associação destes mecanismos ao nível celular e fisiológico, derivado da absorção de $N-NO_3^-$ pelas plantas de tomateiro, resultaram em melhor desenvolvimento das plantas e resistência à infecção por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Com base nos resultados pode-se concluir que *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* desenvolve-se bem em faixa ampla de pH, de 3 a 9, e que a colonização das raízes ocorre em plantas supridas com as três fontes de nitrogênio, independente do pH. Pode-se concluir, ainda, que em plantas

de tomateiro, crescidas em solução nutritiva na presença de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, ocorre a adesão deste à superfície das raízes, independente da fonte de nitrogênio, porém com maior taxa de adesão e de colonização dos pêlos absorventes e da região da coifa em plantas supridas com $N-NH_4^+$ e $N-NH_4NO_3$ em relação às plantas supridas com $N-NO_3^-$. E finalmente, plantas de tomateiro cultivadas em solução nutritiva quando supridas com $N-NO_3^-$ apresentam pêlos absorventes em maior número e tamanho que aquelas supridas com $N-NH_4^+$ e $N-NH_4NO_3$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. Plant Pathology. New York. Academic Press. 1997.
- ARYA, N. & KUWATSUKA, S. Changes in populations and activity of three *Fusarium* spp. in soils with different properties. Soil Science Plant Nutrition 39:389-397. 1993.
- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. St. Paul, Minnesota. APS Press. 1998.
- BOOTH, C. *Fusarium* - Laboratory guide to the identification of the major species. England. CMI. 1977.
- BRAMMALL, R.A. & HIGGINS, V.J. A histological comparison of fungal colonization in tomato seedlings susceptible or resistant to *fusarium* crown and root disease. Canadian Journal of Botany 66:915-925. 1988.
- CARMO, M.G.F., CORREA, F.M., CORDEIRO, E.S. & CARVALHO, A.O. Tratamentos de erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Vauterin *et al.* e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate. Horticultura Brasileira 22:413-418. 2004.
- CARVALHO, A.O. Influência da fonte de nitrogênio no pH da rizosfera e na colonização de plantas de tomate por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen. (Tese de Doutorado). Seropédica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2003.
- CASTELLANE, P.D. Podridão apical em frutos de tomateiro. Jaboticabal. FUNEP. 1988.
- DENISON, S.H. "pH Regulation of gene expression in fungi." Fungal Genetics and Biology 29:61-71. 2000.
- DHINGRA, O. & SINCLAIR, J.B. Basic plant pathology methods. Flórida. CRC Press. 1995.
- HÄUSSLING, M., LEISEN, E., MARSHNER, H. & RÖMHELD, V. An improved method for non-destructive measurements of the pH at the root-soil interface (rhizosphere). Journal of Plant Physiology 117:371-375. 1985.
- HÖPPER, H., STEINBERG, C. & ALABOUVETTE, C. Involvement of clay type and pH in the mechanisms of soil suppressiveness to fusarium wilt of flax. Soil Biological and Biochemistry 27:955-967. 1995.
- JACOB NETO, J., THOMAS, R.J. & FRANCO, A.A. Variação estacional da concentração de molibdênio nos nódulos e demais partes da planta de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Turrialba 38:51-58. 1988.
- JONES, J.P. & WOLTZ, S.S. Fusarium wilt (Race 2) of tomato: calcium, pH and micronutrient effects on disease development. Plant Disease 53:276-279. 1969.
- JONES, J.P.E., ENGELHARD, A.W. & WOLTZ, S.S. Management of fusarium wilt of vegetables and ornamentals by macro and microelement nutrition. In: Soilborne plant pathogens: Management of disease with macro and microelements Engelhard, A.W. (Ed.). St. Paul. APS Press. 1989. pp.18-83.
- KIRKBY, E.A. & MENGEL, K. Ionic balance in different tissues of the tomato plant in relation to nitrate, urea or ammonium nutrition. Plant Physiology 42:6-14. 1967.
- KOMADA, H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Review of Plant Protection Research 8:114-125. 1975.
- MANTEAU, S., ABOUNA, S., LAMBERT, B. & LEGENDRE, L. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiology Ecology 43:359-366. 2003.
- MARSCHNER, H. & RÖMHELD, V. *In vivo* measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface: effect of plant species and nitrogen source. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 111:241-251. 1983.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. London. Academic Press. 1995.
- OLIVAIN, C. & ALABOUVETTE, C. Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. New Phytology 137:481-494. 1997.
- RABE, E. Altered nitrogen metabolism under environmental stress conditions. In: Pessarakli, M. (Ed.) Plant and Crop Stress. New York. Marcel Dekker, Inc. 1994. pp.261-276.
- RÖMHELD, V. pH Changes in the rhizosphere of various crop plants in relation to the supply of plant nutrients. Potash Review 12:1-12. 1986.
- SCHUERGER, A.C. & MITCHELL, D.J. Effects of temperature and hydrogen ion concentration on attachment of macroconidia of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* to mung bean roots in hydroponic nutrient solution. Phytopathology 82:1311-1319. 1992.
- WOLTZ, S.S. & JONES, J.P. Interactions in source of nitrogen fertilizer and liming procedure in the control of fusarium wilt of tomato. Hort Science 8:137-139. 1973.