

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Fungos micorrízicos arbusculares e biocarvão na produção de mudas e
no cultivo do morangueiro em substrato**

José Luís Trevizan Chiomento

Passo Fundo

2020

José Luís Trevizan Chiomento

Fungos micorrízicos arbusculares e biocarvão na produção de mudas e no cultivo do morangueiro em substrato

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Agronomia.

Orientador:

Dr. Alexandre Augusto Nienow

Coorientadora:

Dra. Eunice Oliveira Calvete

Passo Fundo

2020

CIP – Catalogação na Publicação

- C539f Chiomento, José Luís Trevizan
Fungos micorrízicos arbusculares e biocarvão na
produção de mudas e no cultivo do morangueiro em
substrato / José Luís Trevizan Chiomento. – 2020.
92 f. : il. color. ; 30 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto Nienow.
Coorientador: Profa. Dra. Eunice Oliveira Calvete.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade
de Passo Fundo, 2020.
1. Morango - Cultivo. 2. Mudas. 3. Fungos
micorrízicos. 4. Morango - Produtividade. I. Nienow,
Alexandre Augusto, orientador. II. Calvete, Eunice
Oliveira, coorientador. III. Título.
- CDU: 634.75

ATA DE DEFESA DE TESE



PPGAgro
Programa de Pós-Graduação
em Agronomia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

"Fungos micorrizicos arbusculares e biocarvão na produção de mudas e no cultivo do morangueiro em substrato"

Elaborada por

José Luis Trevizan Chiomento

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
"Doutor em Agronomia – Área de Produção e Proteção de Plantas"

Aprovada em: 20/03/2020.

Pela Comissão Examinadora

Dr. Alexandre Nienow

Presidente da Comissão Examinadora
Orientador

Dra. Eunice Oliveira Calvete

Pesquisadora independente
Coorientadora

Dra. Rosiani Castoldi da Costa

Pesquisadora independente

Dra. Charise Dallazem Bertol

UPF

Dra. Andréia Caverzan

UPF

Dr. Edson Campagnola Bortoluzzi

Coordenador do PPGAgro

Dr. Eraldo Lourenso Zanella

Diretor da Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária, Universidade de Passo Fundo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nadir Chiomento e Nerete Trevizan Chiomento, meus maiores incentivadores e melhores exemplos, dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por tudo. O apoio, o incentivo e a compreensão deles foi fundamental em minha trajetória acadêmica. À minha irmã, Tábata, e ao meu cunhado, Maicon, pela colaboração durante esses dois anos intensos e por me proporcionarem o melhor presente já recebido: meu sobrinho Bento.

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Augusto Nienow, e à minha coorientadora, Dra. Eunice Oliveira Calvete, por todo o suporte que me foi dado durante o planejamento, a execução e a redação da pesquisa e pela amizade. À equipe do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal e aos amigos, pelo auxílio em todas as etapas da pesquisa. Sem vocês esta simbiose não teria se estabelecido e nem seria eficiente.

Ao Dr. Paulo Vítor Dutra de Souza (UFRGS) e à Dra. Charise Dallazem Bertol (UPF) pela disponibilidade em participarem do comitê de orientação deste trabalho e também por todas as suas contribuições durante o desenvolvimento dos estudos. Essa pesquisa foi fortificada graças à imensa colaboração de vocês.

Ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições Comunitárias de Ensino Particulares (PROSUC) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e ao PPGAgro da UPF, pela formação de recursos humanos e pela possibilidade de atuar na pesquisa.

À empresa SP Pesquisa e Tecnologia Ltda., pelo fornecimento do biocarvão usado nesta pesquisa e à empresa Bioagro Comercial Agropecuária Ltda., pela oferta das mudas de morangueiro usadas neste trabalho. Declara-se que os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) usados neste estudo estão regulamentados pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) do Ministério do Meio Ambiente, Brasil, conforme o cadastro de número A198F50.

“Maravilhar-se é o primeiro passo para um descobrimento.” (Louis Pasteur).

RESUMO

CHIOMENTO, José Luís Trevizan. Fungos micorrízicos arbusculares e biocarvão na produção de mudas e no cultivo do morangueiro em substrato. 92 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2020.

Produtores que queiram melhorar a produção e a qualidade de mudas e de morangos, em consonância à sustentabilidade no cultivo dessa hortícola, esbarram com a carência de ferramentas biotecnológicas, a exemplo de inoculantes à base de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e de biocarvão. Por isso, o trabalho objetivou avaliar se a interface FMA-biocarvão apresenta influência na produção de mudas *ex vitro* e durante o ciclo produtivo do morangueiro cultivado em substrato. Assim, foram realizados dois estudos, com os seguintes objetivos: 1) investigar se FMA associados ao biocarvão interferem no crescimento e na composição fitoquímica de tecidos vegetais de mudas de morangueiro durante a aclimatização *ex vitro*; 2) testar se a interface FMA-biocarvão modifica o desempenho morfo-hortícola do morangueiro cultivado em substrato durante seu ciclo produtivo. Os resultados mostraram que mudas produzidas com FMA apresentaram maiores teores de polifenóis totais e ácidos fenólicos, mas não foram beneficiadas em termos de crescimento e desenvolvimento. A combinação de 9% de biocarvão com FMA melhorou o conteúdo de flavonoides totais nas folhas das mudas e beneficiou a atividade da enzima fosfatase no substrato de cultivo. Substrato com até 6% de biocarvão e com micorrizas apresentou maior ação da enzima β -glucosidase. O principal efeito durante o ciclo produtivo do morangueiro foi proporcionado pela micorrização. O uso de FMA melhorou o crescimento fitométrico das plantas e os teores totais de antocianinas, flavonoides e polifenóis dos frutos. Constatou-se, também, que o uso de biocarvão no cultivo do morangueiro melhorou a colonização micorrízica, a biomassa radicial e a qualidade das plantas. Plantas cultivadas com 9% de biocarvão e inoculadas com *Claroideoglossum etunicatum* apresentaram sistema radicial mais robusto, com maior quantidade de raízes finas. Contudo, a comunidade micorrízica se expressa melhor em substrato sem biocarvão. Em conclusão, este é o primeiro estudo a fornecer informações sobre a interface FMA-biocarvão na fase de aclimatização *ex vitro* de mudas e durante o ciclo produtivo do morangueiro cultivado em substrato. Considerando a preferência das pessoas pelo consumo de alimentos funcionais, os resultados deste estudo confirmaram o potencial de aplicar a biotecnologia micorrízica no morangueiro como uma ferramenta valiosa para melhorar o teor de metabólitos secundários em diferentes órgãos da planta. Enfatiza-se que a interface FMA-biocarvão pode ser uma alternativa para potencializar a sustentabilidade do sistema de produção de mudas e cultivo do morangueiro. Por fim, essas investigações preenchem a lacuna existente entre a engenharia do biocarvão relacionada aos FMA no cultivo do morangueiro.

Palavras-chave: 1. *Fragaria X ananassa* Duch. 2. Endomicorriza. 3. Bioativador. 4. Produção. 5. Qualidade.

ABSTRACT

CHIOMENTO, José Luís Trevizan. Arbuscular mycorrhizal fungi and biochar in daughter plants production and cultivation of the strawberry on substrate. 92 f. Thesis (Doctor in Agronomy) – University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2020.

Producers who want to improve the production and quality of strawberry daughter plants and fruits, in line with sustainability in the cultivation of this horticultural crop, face the lack of biotechnological tools, such as inoculants based on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and biochar. Therefore, the work aimed to evaluate if the AMF-biochar interface has an influence on the production of daughter plants *ex vitro* and during the production cycle of strawberry cultivated in substrate. Thus, two studies were carried out, with the following objectives: 1) to investigate if AMF associated with biochar interfere in phytometric growth and in the phytochemical composition of plant tissues of strawberry daughter plants during *ex vitro* acclimatization; 2) test if the AMF-biochar interface modifies the morpho-horticultural performance of strawberry cultivated on substrate during its production cycle. The results showed that daughter plants produced with AMF had higher levels of total polyphenols and phenolic acids, but were not benefited in terms of growth and development. The combination of 9% of biochar with FMA improved the content of total flavonoids in the leaves of the daughter plants and benefited the activity of the enzyme phosphatase in the growing substrate. Substrate with up to 6% biochar and with mycorrhizae showed greater action of the enzyme β -glucosidase. The main effect during the strawberry production cycle was provided by mycorrhization. The use of AMF improved the phytometric growth of the plants and the total levels of anthocyanins, flavonoids and polyphenols in the fruits. It was also found that the use of biochar in strawberry cultivation improved mycorrhizal colonization, root biomass and plant quality. Plants grown with 9% biochar and inoculated with *Claroideoglossum etunicatum* showed a more robust root system, with a greater amount of thin roots. However, the mycorrhizal community is best expressed in substrate without biochar. In conclusion, this is the first study to provide information on the AMF-biochar interface during the *ex vitro* acclimatization phase of daughter plants and during the production cycle of strawberry grown on substrate. Considering people's preference for the consumption of functional foods, the results of this study confirmed the potential of applying mycorrhizal biotechnology to strawberry plants as a valuable tool to improve the content of secondary metabolites in different plant organs. It is emphasized that the AMF-biochar interface can be an alternative to enhance the sustainability of the daughter plants production and strawberry cultivation system. Finally, these investigations fill the gap between biofuel engineering related to AMF in strawberry cultivation.

Key words: 1. *Fragaria X ananassa* Duch. 2. Endomycorrhiza. 3. Bioactivator. 4. Production. 5. Quality.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Cultivo do morangueiro em substrato aliado a novas biotecnologias	15
2.2	FMA: bioecologia, benefícios e prospecções de uso em morangueiro	16
2.3	Engenharia do biocarvão e sua interação com FMA	20
3	CAPÍTULO I	24
3.1	Resumo	24
3.2	Introdução	24
3.3	Material e Métodos	26
3.3.1	Material vegetal e condições de crescimento de matrizes de morangueiro	26
3.3.2	Desenho experimental	28
3.3.3	Procedimentos	28
3.3.3.1	Crescimento e colonização micorrízica das mudas de morangueiro	31
3.3.3.2	Teores de polifenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante	31
3.3.3.3	Teores de ácidos fenólicos e taninos	32
3.3.3.4	Ação de enzimas em substrato enriquecido com FMA e biocarvão	33
3.3.4	Análise de dados	34
3.4	Resultados	34
3.4.1	Crescimento e colonização micorrízica das mudas de morangueiro	34
3.4.2	Teores de polifenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante	35
3.4.3	Teores de ácidos fenólicos e taninos	37
3.4.4	Ação de enzimas em substrato enriquecido com FMA e biocarvão	39
3.5	Discussão	40
3.6	Conclusões	44
4	CAPÍTULO II	46
4.1	Resumo	46
4.2	Introdução	46
4.3	Material e Métodos	49
4.3.1	Material vegetal e condições de crescimento do morangueiro	49
4.3.2	Desenho experimental	51
4.3.3	Procedimentos	52

4.3.3.1	Crescimento e colonização micorrízica das plantas de morangueiro	55
4.3.3.2	Qualidade fitoquímica de morangos	56
4.3.3.3	Produção de frutos	57
4.3.4	Análise de dados	58
4.4	Resultados	58
4.4.1	Crescimento e colonização micorrízica das plantas de morangueiro	58
4.4.2	Qualidade fitoquímica de morangos	63
4.4.3	Produção de frutos	64
4.5	Discussão	65
4.6	Conclusões	70
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
6	CONCLUSÃO GERAL	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

Não há dúvida de que a busca pela sustentabilidade dos sistemas de produção tem atraído os holofotes do mundo inteiro. Essa conduta é uma resposta à manutenção dos serviços ecossistêmicos, que têm reflexos diretos e indiretos aos seres humanos. Na última década foram propostas várias inovações tecnológicas para potencializar a agricultura sustentável, em especial para reduzir os insumos químicos demandados pelas plantas cultivadas. Cada vez mais os alimentos sustentáveis e cultivados localmente são desejados pelos consumidores, dispostos a comprar mesmo quando opções mais baratas estão disponíveis. Dentre esses alimentos está o morango (*Fragaria X ananassa* Duch.), que se destaca por ser uma fonte alimentar bastante nutritiva.

No estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil, a maioria dos produtores de morangueiro estão migrando do cultivo convencional (plantio no solo) para o cultivo em substrato, sobretudo por questões ergonômicas. No entanto, o perfil de cultivo em substrato se caracteriza por demandar mais fertilizantes, pois esses materiais por si só não contêm quantidades necessárias de nutrientes às plantas. Em adição, a maior parte do cultivo em substrato é feita em sistemas abertos, ou seja, após as fertirrigações a solução nutritiva drenada é escoada para o meio ambiente.

Esse cenário, que vai contra a produção sustentável de alimentos, evidencia entraves no cultivo de morangueiro em substrato no sistema aberto, pelo risco de contaminação de agroecossistemas. Dentre as alternativas para minimizar este inconveniente, de modo a promover a sustentabilidade no cultivo do morangueiro, estão a utilização dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e do biocarvão.

Os FMA são microrganismos benéficos, naturalmente presentes no solo, que estabelecem associações mutualísticas com as raízes dos vegetais. Esses fungos são considerados os principais componentes de um sistema solo-substrato/planta sustentável

e favorecem o crescimento e desenvolvimento da flora terrestre devido a sua aquisição e posterior entrega de água e nutrientes ao simbionte vegetal. Já o biocarvão é um material sólido, rico em carbono, oriundo da pirólise ou gaseificação de matéria orgânica/biomassa, sintetizado em um ambiente deficiente em oxigênio. O benefício mais notável decorrente do uso do biocarvão é o estímulo ao crescimento das plantas por aumentar o armazenamento de água, a disponibilidade de nutrientes e a vida microbiana benéfica no meio de crescimento vegetal. Porém, essas biotecnologias são carentes e desconhecidas (na maior parte das vezes) aos produtores.

Para que produtores possam inserir essas ferramentas no cultivo do morangueiro surge a seguinte questão: como a associação entre FMA e biocarvão interfere no crescimento, na produção e na composição fitoquímica durante a formação de mudas *ex vitro* e no ciclo produtivo de morangueiro cultivado em substrato? A hipótese para essa questão é que o uso de biocarvão como ativador de FMA altera o crescimento, desenvolvimento e perfil fitoquímico de mudas e plantas de morangueiro cultivadas em substrato.

Para responder à questão da pesquisa e testar essa hipótese foi desenvolvida este trabalho com os seguintes objetivos:

Objetivo geral: avaliar se a interface FMA-biocarvão apresenta influência na produção de mudas *ex vitro* e durante o ciclo produtivo do morangueiro cultivado em substrato.

Objetivos específicos: 1) avaliar se FMA associados ao biocarvão interferem no crescimento e na composição fitoquímica de tecidos vegetais de mudas de morangueiro durante a aclimatização *ex vitro*; 2) testar se a interface FMA-biocarvão modifica o desempenho morfo-hortícola do morangueiro cultivado em substrato durante seu ciclo produtivo.

Esta pesquisa justifica-se pela possibilidade de inserir os FMA e o biocarvão no cultivo do morangueiro em substrato como ferramentas biotecnológicas para

incrementar a produção e a qualidade das mudas e plantas cultivadas, visando a sustentabilidade do sistema de cultivo dessa hortícola. Isso é possível pois a interação entre FMA e biocarvão pode ser uma estratégia de biofertilização, o que ajudaria na redução das fertilizações químicas. Além disso, essa interface pode proporcionar proteção às plantas contra estresses abióticos e bióticos, o que contribuiria para melhorar o estabelecimento, crescimento e desenvolvimento dessa cultura. Por fim, o uso do biocarvão como ativador de FMA pode melhorar a qualidade fitoquímica de morangos, por meio do aumento da biossíntese de metabólitos secundários.

Ao final da pesquisa espera-se acrescentar ao conhecimento científico informações sobre a dinâmica de interação entre os FMA e o biocarvão no cultivo do morangueiro em substrato. Além disso, busca-se fornecer novas biotecnologias aos produtores, para que possam tornar o sistema de cultivo sustentável.

Este trabalho está organizado de modo que nesta introdução apresentou-se a contextualização do tema, o problema, a hipótese, os objetivos e a justificativa da pesquisa. O próximo componente deste trabalho - revisão da literatura - apresenta aspectos relacionados ao sujeito (morangueiro) e ao objeto da pesquisa (potencial hortícola de mudas e plantas de morangueiro submetidas à biotecnologia micorrízica e ao biocarvão), com as principais descobertas sobre o assunto publicadas nas principais revistas científicas da área. Nos capítulos I e II são apresentados e discutidos os resultados obtidos de dois anos de pesquisa, que abrangem a produção de mudas e o cultivo de morangueiro com FMA e biocarvão. Por fim, são apresentadas as considerações finais e a conclusão geral do trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão da literatura apresenta informações relacionadas ao cultivo do morangueiro em substrato e a ferramentas biotecnológicas com potencial para inserção no cultivo dessa espécie hortícola, a exemplo de FMA e de biocarvão. Para o levantamento das informações foram consultados artigos científicos publicados, sobretudo, nos últimos sete anos, considerando as principais descobertas sobre o tema da pesquisa publicadas em revistas científicas da área.

2.1 Cultivo do morangueiro em substrato aliado a novas biotecnologias

O morangueiro cultivado, originado a partir da hibridação entre *F. chiloensis* e *F. virginiana* (SINGH; BEER; PAL, 2015), difundiu-se em grande parte do mundo. Essa pluralidade de cultivo torna o morangueiro uma hortícola economicamente importante (RAMOS et al., 2018) que, em 2016, teve uma área de cultivo de 401.862 hectares (ha), com uma produção de 9,11 milhões de toneladas (t), o que representa uma produtividade média mundial de 22,7 t/ha (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2016). No Brasil, dentre as pequenas frutas, o morangueiro é a principal espécie cultivada, com produção aproximada de 150 mil toneladas, em uma área plantada correspondente a 4,2 mil ha (FAGHERAZZI et al., 2017).

O sistema de produção convencional do morangueiro (plantio no solo) ainda é a principal forma de cultivo (CLAIRE et al., 2018). No entanto, devido a problemas com doenças de solo e à proibição do uso de compostos fumigantes para sua desinfestação, o cultivo em substrato vem ganhando destaque (MARTÍNEZ et al., 2017). Atrelado à produção em substrato destaca-se o cultivo em ambiente protegido (COSTA et al., 2016). Assim, devido ao uso de cultivares classificadas como de dias neutros quanto ao

florescimento e a novas técnicas de produção, a exemplo do cultivo em substrato, os morangos brasileiros são produzidos e comercializados durante todo o ano (FAGHERAZZI et al., 2014).

Os substratos agrícolas têm sido utilizados há muito tempo para o cultivo de plantas hortícolas em diferentes formas e tamanhos de recipientes (CARLILE; CATTIVELLO; ZACCHEO, 2015). Como os substratos têm ampla variação nas suas propriedades físico-químicas (FERMINO; KÄMPF, 2012), escolher um material adequado é essencial ao desenvolvimento das plantas (MONDRAGÓN-VALERO et al., 2017). Os substratos usados devem ser de baixo custo e de fácil manejo (NOYA et al., 2017). Além disso, considerando que a maioria dos substratos usados para cultivo têm baixa disponibilidade de nutrientes, é preciso fornecê-los via fertirrigação às plantas.

O perfil de cultivo do morangueiro em substrato se caracteriza por demandar muitos fertilizantes químicos. Aliado a isso, ressalta-se que a maior parte dos cultivos em substrato são feitos em sistemas abertos, o que pode ocasionar contaminação ambiental. Para resolver esses problemas, a agricultura sustentável é urgentemente necessária (ZUO et al., 2018). A inoculação com FMA combinada ao uso de biocarvão no substrato de cultivo são ferramentas biotecnológicas com potencial para melhorar os manejos nutricional e fitossanitário do morangueiro, o que pode minimizar esses inconvenientes ambientais. Destaca-se que para introduzir essas biotecnologias no cultivo do morangueiro, de forma eficiente, algumas modificações no sistema devem ser feitas, a exemplo de reduções nas adubações fosfatadas e nas aplicações de biocidas.

2.2 FMA: bioecologia, benefícios e prospecções de uso em morangueiro

Dentre as associações ecológicas ocorrentes no solo estão as micorrizas, principais componentes de um sistema solo-planta sustentável (MOLLAVALI et al., 2015). O surgimento da interação entre micorrizas e plantas terrestres ocorreu a mais de 450 milhões de anos atrás, com os primeiros fósseis conhecidos datados de 407 milhões de anos atrás (STRULLU-DERRIEN et al., 2014), o que indica que as associações com

esses fungos facilitaram às plantas a habitação na terra e o desenvolvimento de raízes verdadeiras (SELOSSE et al., 2015).

Os FMA (filo Glomeromycota) estão entre os tipos de micorrizas existentes. Esses microrganismos, habitantes do solo (SENÉS-GUERRERO; SCHÜBLER, 2016), estabelecem associações simbióticas com 80% da flora terrestre (BERRUTI et al., 2016). O processo simbiótico, coordenado por sinalizações moleculares entre FMA e plantas hospedeiras (KAMEL et al., 2017), segue uma sequência bem definida de eventos: germinação de esporos assexuados no solo, ramificação de hifas em direção a uma raiz, fixação de hifas em superfícies radiciais e diferenciação de hifopódio, penetração e disseminação do fungo nas raízes por um aparelho de pré-penetração e desenvolvimento intracelular de arbúsculos (GENRE et al., 2005; GUTJAHR; PARNISKE, 2013).

Estabelecida a simbiose, ocorre fluxo bidirecional entre simbiontes: o fungo fornece nutrientes para a planta, a qual destina carboidratos e lipídios ao fungo (GARCIA et al., 2016; KEYMER et al., 2017). Essa troca de nutrientes ocorre nos arbúsculos e depende de variáveis ambientais e biológicas (MORCILLO et al., 2016). Ressalta-se que a micorriza arbuscular é de grande relevância à agricultura sustentável (SOSA-HERNÁNDEZ et al., 2018), pois proporciona melhor agregação do solo (LEIFHEIT et al., 2014), proteção às plantas contra patógenos (JUNG et al., 2012), maior aquisição de água e nutrientes (GÓMEZ-BELLOT et al., 2015), mitigação ao estresse salino (ABD-ALLAH et al., 2015), regulação do fluxo de carbono no sistema solo-planta (CORRADI; BONFANTE, 2012) e redução da emissão de gases do efeito estufa (BENDER et al., 2014).

Os FMA permitem que a planta hospedeira se desenvolva, de forma mais eficiente, sob condições de estresses biótico e abiótico a partir de comunicações complexas entre o hospedeiro e o fungo (ZARDAK et al., 2018). Além das modificações morfológicas, alterações nos níveis hormonais das plantas (BAGHERI et al., 2011), aumento de trocas gasosas foliares e da taxa fotossintética (BIRHANE et al., 2012) e aprimoramento de atividades enzimáticas antioxidantes (BASLAM;

GOICOECHEA, 2012) são alguns dos mecanismos que explicam essa proteção promovida pelos FMA.

A micorriza arbuscular é capaz de alterar os metabolismos primário e secundário da planta hospedeira (SBRANA; AVIO; GIOVANETTI, 2014). Os FMA não apenas melhoram a nutrição dos vegetais, mas também influenciam seu desenvolvimento e aliviam os efeitos de estresses ambientais (ROUPHAEL et al., 2015). Isso ocasiona, além de aumentos na biomassa e rendimento, mudanças em vários atributos de qualidade do simbionte vegetal. Essas mudanças na atividade do metabolismo secundário das plantas (maior produção de fitoquímicos) pode ser atribuída à ativação transitória de reações de defesa do hospedeiro, mediante à colonização micorrízica (ROUPHAEL et al., 2015). A atividade de enzimas-chave que beneficiam a formação de flavonoides, por exemplo, pode ser aumentada com a inoculação micorrízica (ZHANG et al., 2013).

O morangueiro é uma espécie colonizada por FMA e grande número de estudos focam suas interações. O primeiro relato da associação de FMA e do morangueiro foi de White (1929) ao afirmar que as micorrizas são, possivelmente, determinantes na distribuição dessa cultura. Posteriormente, verificaram-se os efeitos benéficos dos FMA no morangueiro. A micorriza arbuscular pode ser uma estratégia de biofertilização que ajudaria na redução das fertilizações químicas (SHARMA; ADHOLEYA, 2004). A colonização das raízes por FMA antes do transplante de plantas micropropagadas ajuda na tolerância ao estresse hídrico durante a aclimatização, melhorando o crescimento das plantas (BORKOWSKA, 2002). Além disso, a simbiose beneficia a morfologia radicular das plantas (SINCLAIR et al., 2014), aumenta a produção de frutos (ROBINSON-BOYER et al., 2016) e melhora a qualidade fitoquímica dos mesmos (CECATTO et al., 2016; LINGUA et al., 2013).

A micorrização em plantas de morangueiro pode produzir diferentes respostas em termos de crescimento e produção/qualidade de frutos. Inoculantes comerciais a base de FMA geralmente são formados por apenas uma ou algumas espécies, que podem ou não estar bem adaptadas às condições onde são aplicadas (GARLAND;

SCHROEDER-MORENO, 2011). Os dois únicos estudos sobre levantamentos de FMA em solos cultivados com morangueiro (CHIOMENTO et al., 2019b; PEDERSEN et al., 2017) se mostraram importantes para eleger espécies fúngicas que tenham afinidade com essa hortícola (Tabela 1). O uso de FMA compatíveis com o hospedeiro comumente fornece resultados mais satisfatórios (KORON; SONJAK; REGVAR, 2014). Outra ferramenta que pode potencializar os FMA corresponde ao uso de biocarvão no substrato de cultivo.

Tabela 1 - Espécies de FMA identificadas em solos cultivados com morangueiro no Rio Grande do Sul, Brasil. Passo Fundo - 2019

Espécies fúngicas ¹
<i>Acaulospora colossica</i> P.A. Schultz, Bever & J.B. Morton
<i>Acaulospora foveata</i> Trappe & Janos
<i>Acaulospora koskei</i> Blaszk.
<i>Acaulospora mellea</i> Spain & N.C. Schenck
<i>Acaulospora morrowiae</i> Spain & N.C. Schenck
<i>Acaulospora rehmi</i> Sieverding & Toro
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe
<i>Acaulospora</i> sp.
<i>Claroideogloium</i> aff. <i>luteum</i>
<i>Claroideogloium claroideum</i> (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler
<i>Claroideogloium etunicatum</i> (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler
<i>Cetraspora pellucida</i> (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) Oehl, F.A. Souza & Sieverd.
<i>Dentiscutata erythropha</i> (Koske & C. Walker)
<i>Dentiscutata heterogama</i> (T. H Nicolson & Gerd.) Sieverd., F.A. Souza & Oehl
<i>Dentiscutata rubra</i> (Stürmer & J.B. Morton)
<i>Gigaspora</i> sp.
<i>Glomus</i> aff. <i>caledonium</i>
<i>Glomus</i> aff. <i>manihotis</i>
<i>Glomus</i> aff. <i>versiforme</i>
<i>Glomus</i> sp. (<i>caesaris</i> like)
<i>Glomus</i> sp1
<i>Glomus</i> sp2
<i>Glomus</i> sp3
<i>Glomus</i> sp4
<i>Funneliformis</i> aff. <i>geosporum</i>
<i>Funneliformis</i> aff. <i>mosseae</i>
<i>Funneliformis mosseae</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler
<i>Paraglomus brasilianum</i> (Spain & J. Miranda) J.B. Morton & D. Redecker
<i>Rhizophagus intraradices</i> (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & Schuessler
<i>Septogloium viscosum</i> (T.H. Nicolson) C. Walker, D. Redecker, D. Stille & A. Schüßler

Fonte: Chiomento et al. (2019b) e Pedersen et al. (2017)

¹Classificação de Glomeromycota por Redecker et al. (2013).

Por fim, sabe-se que nem todos os FMA têm comportamento igual num determinado ambiente (GÓMEZ-BELLOT et al., 2015). As respostas dos hospedeiros em relação à inoculação micorrízica variam de acordo com o estágio fenológico (JIMÉNEZ-LEYVA et al., 2017), condições edafoclimáticas (HALDER et al., 2018), manejos/práticas agrícolas (VELÁZQUEZ et al., 2018), substrato de cultivo (COELHO et al., 2014) e especificidade entre o fungo e a planta (BERRUTI et al., 2016). Assim, estudos sobre o uso de inoculantes micorrízicos em diferentes fases de cultivo, a exemplo da aclimatização e da pós-aclimatização, e suas interações com bioativadores e distintas cultivares de um mesmo hospedeiro são importantes para elucidar as alterações metabólicas no crescimento e desenvolvimento do morangueiro.

2.3 Engenharia do biocarvão e sua interação com FMA

A descoberta de solos férteis contendo altas concentrações de materiais orgânicos carbonizados na Amazônia (WOODS; DENEVAN, 2009, p. 1) e em outras partes do mundo (WIEDNER et al., 2015) causou um entusiasmo quanto ao uso do biocarvão para melhorar a produtividade agrícola e a sustentabilidade ambiental (KOIDE, 2017, p. 461). O biocarvão é um material sólido rico em carbono, oriundo da pirólise ou gaseificação da matéria orgânica/biomassa (BLOK et al., 2017; HUSSAIN et al., 2017) em um ambiente deficiente em oxigênio (WU et al., 2016). Destaca-se que o uso do biocarvão em substratos hortícolas é de interesse público e agrícola (BLOK et al., 2017) devido aos benefícios ambientais e agronômicos (LIU et al. 2013).

A adição de biocarvão em distintos sistemas de cultivo pode reduzir a emissão global de gases do efeito estufa, a exemplo do óxido nitroso (N₂O) (CAYUELA et al., 2013). O benefício agrícola mais notável decorrente do uso de biocarvão é o estímulo ao crescimento vegetal pelo aumento do armazenamento de água (KOIDE et al., 2015) e da disponibilidade de nutrientes (OLMO et al., 2016), supressão de doenças (AKHTER et al., 2015) e aumento da vida microbiana benéfica (NIELSEN et al., 2014). Esses benefícios agrícolas são considerados estratégias para melhorar a produtividade das culturas e a qualidade do solo/substrato (LIU et al., 2017; WU et al., 2017). Devido ao

seu potencial em reduzir a contaminação do solo e da água por meio da adsorção de defensivos agrícolas, o biocarvão se destaca como uma ferramenta sustentável para mitigar ambientes poluídos (INYANG; DICKENSON, 2015).

Poucas pesquisas foram desenvolvidas considerando a inserção do biocarvão no cultivo do morangueiro. Em bioensaio com essa hortícola, reportou-se que a resistência sistêmica contra fungos foliares foi induzida em plantas cultivadas em meio contendo biocarvão (HAREL et al., 2012). Além disso, o uso do biocarvão em morangueiro resultou em maiores massas fresca e seca das plantas, menor suscetibilidade de frutos a *Botrytis cinerea* e mudanças na microbiota rizosférica (DE TENDER et al., 2016). No entanto, apesar dos efeitos benéficos, a aplicação de biocarvão em morangueiro ainda não é uma prática habitual. Outros estudos precisam ser intensificados para compreender os mecanismos de funcionamento do biocarvão em morangueiro e os fatores que influenciam os efeitos dessa tecnologia para aproximá-la de produtores e pesquisadores.

O biocarvão pode ser sintetizado a partir de várias matérias-primas, como resíduos de exploração agrícola e de sólidos urbanos (AHMAD et al., 2014), e produzido por diferentes processos, a exemplo de pirólises lenta e rápida e à gaseificação (INYANG; DICKENSON, 2015). Esses fatores afetam as propriedades do biocarvão, como tamanho de partículas, área superficial específica (ASE) e retenção hídrica (RAJAPAKSHA et al., 2014), com reflexos nos efeitos aos vegetais. Quanto menor o tamanho das partículas, por exemplo, maiores são a densidade, a ASE e a retenção de água (GIUFFRIDA; CONSOLI, 2016). Os aumentos induzidos pelo biocarvão nesses atributos são os principais responsáveis por melhorar a produtividade das culturas (HUSSAIN et al., 2017). Assim, é importante compreender como o biocarvão interage com os componentes do solo/substrato, pois alterações físicas e químicas influenciam os habitantes da rizosfera, incluindo os FMA (KOIDE, 2017, p. 462).

Há evidências do papel do biocarvão na promoção da atividade microbiana na rizosfera do meio de crescimento vegetal (DE TENDER et al., 2016; JOSEPH et al.,

2015), como é o caso dos FMA. Essa influência na microbiota é atribuída, em geral, à modulação na dinâmica de água e nutrientes no solo/substrato e a compostos de carbono reduzido (BAILEY et al., 2011; LEHMANN et al., 2011).

Alguns estudos mostraram que o uso do biocarvão potencializa a ação dos FMA (GÜEREÑA et al., 2015; LUO et al., 2017; MICKAN et al., 2016), provavelmente modificando as propriedades físicas e químicas do meio de crescimento, o que facilitaria a germinação dos esporos e o crescimento e ramificação das hifas (HAMMER et al., 2015). Além disso, o biocarvão reduz o estresse da planta por um mecanismo diferente daquele usado pelos FMA, podendo aumentar a eficiência desses microrganismos por efeitos sinérgicos (KOIDE, 2017, p. 469). No entanto, acima de determinado limite, a aplicação de biocarvão pode diminuir a atividade desses microrganismos (AKHTER et al., 2015; HALL; BELL, 2015; LECROY et al., 2013).

O efeito do biocarvão na simbiose micorrízica é influenciado pelas proporções amplamente variáveis usadas na agricultura (KOIDE, 2017, p. 463). Em experimentos de campo, os pesquisadores utilizaram de 0,3 t/ha (BLACKWELL et al., 2015) até 15 t/ha (SAITO, 1990). Já em ambientes protegidos as proporções variaram de 1% (DE TENDER et al., 2016) a 70% de biocarvão por volume (CONVERSA et al., 2015). Essa variação extrema na proporção de biocarvão em relação ao meio de crescimento contribui para a oscilação nos resultados de seu uso, que podem ser positivos (WARNOCK et al., 2010; GÜEREÑA et al., 2015), neutros ou negativos (AKHTER et al., 2015; HALL; BELL, 2015). Em geral, a adição das maiores proporções do biocarvão fornece resultados insatisfatórios quanto ao crescimento e desenvolvimento das plantas e à atividade microbiana. Também considerando o preço elevado do biocarvão, a aplicação de menores proporções dessa biotecnologia no substrato de cultivo (até 10% do volume do recipiente, por exemplo) é uma possibilidade que merece ser estudada.

Definir as razões para efeitos opostos é difícil (KOIDE, 2017, p. 464), pois fatores como a quantidade de biocarvão usada, a matéria-prima, as condições de pirólise a natureza do solo e o clima determinam como essa ferramenta influencia a simbiose

(KOIDE, 2017, p. 471). Portanto, a avaliação da aplicação do biocarvão, associada aos FMA, é necessária para esclarecer suas funções, benefícios e interações, pois a interface FMA-biocarvão pode ser uma alternativa para potencializar a sustentabilidade dos sistemas de cultivos dos vegetais, a exemplo do morangueiro. Essas investigações preencherão a lacuna existente entre a engenharia do biocarvão relacionada aos FMA e à aplicação no cultivo do morangueiro.

3 CAPÍTULO I

Uso de fungos micorrízicos arbusculares e biocarvão na aclimatização de mudas de morangueiro

3.1 Resumo

A interação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e biocarvão na produção de mudas de hortaliças, a exemplo do morangueiro, pode trazer benefícios na qualidade das mudas produzidas. O objetivo da pesquisa foi estudar se FMA associados ao biocarvão interferem no crescimento e na composição fitoquímica dos tecidos vegetais de mudas de morangueiro durante a aclimatização *ex vitro* e na atividade enzimática do substrato. Foram avaliadas quatro proporções de biocarvão (0%, 3%, 6% e 9% do volume do recipiente) na ausência e presença de inoculação com uma comunidade de FMA. O delineamento foi em blocos casualizados, no esquema bifatorial (4 x 2), com quatro repetições. Mudas produzidas em substrato enriquecido com FMA apresentaram maiores teores de polifenóis, flavonoides, ácidos fenólicos e taninos nos tecidos vegetais. A adição de FMA e 9% de biocarvão no substrato de cultivo aumentou o conteúdo de flavonoides totais em folhas e beneficiou a atividade da enzima fosfatase. Substrato com até 6% de biocarvão e com micorrizas apresentou maior ação da enzima β -glucosidase. Conclui-se que o uso de FMA potencializa a composição fitoquímica das mudas, sem melhorar seu crescimento. A combinação de 9% de biocarvão com FMA melhora o conteúdo de flavonoides totais em folhas e beneficia a atividade da enzima fosfatase no substrato de cultivo. Em adição, substrato com até 6% de biocarvão combinado com FMA tem maior ação da enzima β -glucosidase.

Palavras-chave: 1. *Fragaria X ananassa* Duch. 2. Micorrização. 3. Morfologia. 4. Fitoquímicos. 5. Atividade enzimática.

3.2 Introdução

No Brasil, as lavouras de produção de morangos (*Fragaria X ananassa* Duch.) comumente são estabelecidas a partir de mudas de raízes nuas importadas do Chile e/ou da Argentina. O transporte das mudas até as regiões produtoras no Brasil, em sua maioria, ocorre sem controle de temperatura, as quais permanecem armazenadas em *containers* por um tempo relativamente prolongado, que tem ocasionado atrasos no plantio e na produção mais precoce de frutos. Uma alternativa para reduzir os problemas relacionados ao uso de mudas de raízes nuas é a substituição por mudas com torrão,

produzidas a partir da técnica de micropropagação. Essa técnica possibilita a multiplicação em tempo e espaço físico reduzido e a geração de mudas livres de fitopatógenos (CAPOCASA et al., 2019).

Após a micropropagação, as mudas devem ser aclimatizadas em recipientes antes de serem entregues aos produtores. A produção de mudas em viveiros visa produzir plantas bem formadas, com bons sistemas radiciais (CAMPANELLI et al., 2011). Para a obtenção de mudas de qualidade a aclimatização *ex vitro* pode ser otimizada pelo uso de ferramentas biotecnológicas que promovam a sustentabilidade ambiental, a exemplo dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e do biocarvão. Os FMA são microrganismos que estabelecem associações simbióticas com 80% da flora terrestre (BERRUTI et al., 2016) e o biocarvão é um material rico em carbono, oriundo da pirólise de biomassa na ausência completa ou parcial de oxigênio (HUSSAIN et al., 2017). No entanto, pesquisas não foram realizadas para determinar a influência da interface FMA-biocarvão durante a aclimatização *ex vitro* de mudas de morangueiro.

O morangueiro é uma espécie colonizada por FMA e vários estudos focam suas interações. Por exemplo, Borkowska (2002) demonstrou que a micorrização antes do transplante de mudas micropropagadas de morangueiro ajudou na tolerância ao estresse hídrico durante a aclimatização e melhorou o crescimento das plantas. Além disso, o uso de biocarvão no meio de crescimento vegetal pode afetar os microrganismos presentes no solo/substrato, como os FMA (DE TENDER et al., 2016; LUO et al., 2017), o que melhora ainda mais o crescimento das plantas (HAMMER et al., 2015; OHSOWSKI et al., 2018). Porém, pouco se sabe sobre o efeito interativo de FMA e do biocarvão na produção de mudas de hortaliças, a exemplo do morangueiro. A hipótese do trabalho é a de que o uso de FMA e de biocarvão no substrato de cultivo melhora o desempenho de mudas de morangueiro na fase de aclimatização.

O objetivo do trabalho foi investigar se FMA associados ao biocarvão interferem no crescimento e na composição fitoquímica de tecidos vegetais de mudas de morangueiro durante a aclimatização *ex vitro*. Além disso, estudou-se a atividade enzimática do substrato enriquecido com FMA e biocarvão.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Material vegetal e condições de crescimento de matrizes de morangueiro

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade de Passo Fundo (28° 15' 46" S, 52° 24' 24" W), Rio Grande do Sul (RS), em estufas agrícolas, durante o período de julho (inverno) de 2017 a setembro (primavera) de 2018.

Matrizes de morangueiro da cultivar Albion, classificada como de dias neutros (DN) quanto ao florescimento, oriundas do viveiro Llahuén/Patagônia chilena (33° 50' 15,41" S, 70° 40' 03,06" W), foram transplantadas em julho de 2017 em recipientes (18 L) preenchidos com substrato comercial Horta 2[®], mantidos sobre bancadas de 1,20 m de altura, com a finalidade de produção de estolões. O substrato Horta 2[®] é composto por casca de pinus, vermiculita, corretivos de acidez e fertilizantes (nitrogênio, fósforo e potássio) em quantidades não fornecidas pelo fabricante.

O cultivo das matrizes de morangueiro foi desenvolvido em estufa agrícola (430 m²) de aço galvanizado, coberta com filme de polietileno de baixa densidade, com aditivo antiultravioleta e espessura de 150 micra, instalada no sentido noroeste-sudeste. A irrigação por gotejamento, com fluxo de 2,4 L/h por gotejador, foi fornecida às matrizes quatro vezes ao dia com molhamento total de dez minutos diários. As soluções nutritivas foram fornecidas quinzenalmente às matrizes conforme descrito por Furlani e Fernandes Júnior (2004) (Tabela 1).

Após seis meses, em janeiro (verão) de 2018, estolões foram retirados das matrizes, encaminhados ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF e submetidos à técnica de micropropagação (cultivo *in vitro*) para obter as mudas de morangueiro que constituíram o material vegetal da pesquisa. As etapas de obtenção das mudas estão apresentadas na Figura 1.

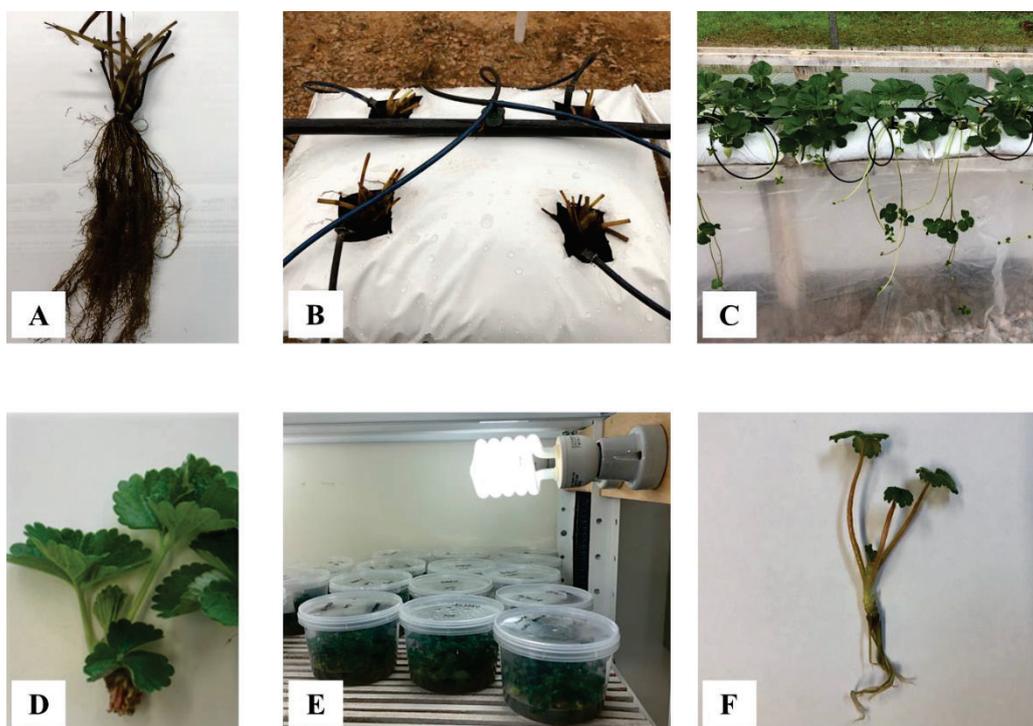
Tabela 1 - Composições de soluções nutritivas recomendadas para o cultivo sem solo de morangueiro. Passo Fundo - 2018

Sais ou fertilizantes	Soluções nutritivas (g/L H ₂ O) ¹		
	A	B	C
Nitrato de cálcio	160	0	0
Nitrato de potássio	0	100	100
Fosfato monoamônio	0	30	0
Fosfato monopotássico	0	36	72
Sulfato de magnésio	0	120	120
Ácido bórico	0,6	0	0
Sulfato de cobre	0,06	0	0
Sulfato de manganês	0,4	0	0
Sulfato de zinco	0,2	0	0
Molibdato de sódio	0,06	0	0
Quelato de ferro (6% de Fe)	12	0	0

Fonte: Furlani e Fernandes Júnior (2004).

¹Soluções A e B: ministradas no estágio vegetativo; soluções A e C: ministradas no estágio reprodutivo.

Figura 1 - Mudanças de morangueiro, cultivar Albion. A) matrizes; B) cultivo de matrizes; C) produção de estolões; D) estolões; E) cultivo *in vitro*; F) obtenção das mudas micropropagadas. Passo Fundo - 2017/2018



Fonte: Imagens do autor.

3.3.2 Desenho experimental

Os tratamentos foram quatro proporções de biocarvão (0%, 3%, 6% e 9% do volume do recipiente) na ausência e presença de inoculação com uma comunidade de FMA (Tabela 2). O experimento foi delineado em blocos casualizados, no esquema bifatorial 4 x 2, com quatro repetições e oito mudas por parcela.

O biocarvão, fornecido pela empresa SP Pesquisa e Tecnologia Ltda., foi obtido por reator de operação contínua a 400 °C e teve como matéria-prima a casca de arroz. Já a comunidade de FMA usada foi proveniente do cultivo-armadilha de solo agrícola coletado em local-referência no cultivo de morangueiro no município de Flores da Cunha (29° 01' 50" S, 51° 11' 30" W), RS (CHIOMENTO et al., 2019b), composta pelas espécies fúngicas apresentadas na Tabela 2. Optou-se pelo uso dessa comunidade micorrízica por apresentar a maior quantidade de espécies fúngicas generalistas em solos cultivados com morangueiro, conforme Chiomento et al. (2019b).

Tabela 2 - Comunidade de FMA identificada de solo agrícola coletado em Flores da Cunha, RS. Passo Fundo - 2018

Município	Comunidade micorrízica ¹
Flores da Cunha	<i>Claroideoglomus claroideum</i> (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler, <i>Claroideoglomus etunicatum</i> (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler, <i>Funneliformis</i> aff. <i>geosporum</i> , <i>Glomus</i> aff. <i>versiforme</i> , <i>Glomus</i> sp. (<i>caesaris</i> like) e <i>Glomus</i> sp2

Fonte: Chiomento et al. (2019b).

¹Classificação de Glomeromycota por Redecker et al. (2013).

3.3.3 Procedimentos

Em julho de 2018, decorridos seis meses do cultivo *in vitro*, as mudas de morangueiro obtidas (Figura 1 F) foram transferidas para bandejas de poliestireno de 72 células (100 cm³/célula), preenchidas com as proporções de substrato comercial S10B[®]

esterilizado (120 °C por 20 minutos) e de biocarvão, sem e com micorrização. Para os tratamentos inoculados com a comunidade de FMA foram adicionadas 5 g de inoculante na cova de plantio das mudas, na ocasião do transplante em bandejas. Uma amostra de 500 g do substrato S10B[®] contendo os tratamentos referentes ao biocarvão foi analisada para obtenção de seus atributos físicos, conforme Brasil (2007) (Tabela 3), e químicos, conforme Brasil (2014) (Tabela 4).

Tabela 3 - Caracterização física do substrato S10B[®] na ausência e presença das proporções de biocarvão. Passo Fundo - 2018

Substratos ¹	D ²	PT	EA	AFD	AT	AR
	(kg/m ³)					
S10B+0%B	241	0,861	0,459	0,155	0,024	0,223
S10B+3%B	243	0,856	0,384	0,219	0,016	0,237
S10B+6%B	242	0,860	0,334	0,278	0,019	0,229
S10B+9%B	237	0,859	0,380	0,234	0,021	0,224
100%B	147	0,915	0,329	0,434	0,013	0,139

Fonte: Dados do autor.

¹S10B+0%B: substrato S10B + 0% de biocarvão; S10B+3%B: substrato S10B + 3% de biocarvão; S10B+6%B: substrato S10B + 6% de biocarvão; S10B+9%B: substrato S10B + 9% de biocarvão; 100%B: biocarvão puro.

²D: densidade em base seca; PT = porosidade total; EA: espaço de aeração; AFD: água facilmente disponível; AT: água tamponante; AR: água remanescente.

Tabela 4 - Caracterização química do substrato S10B[®] na ausência e presença das proporções de biocarvão. Passo Fundo - 2018

Substrato ¹	N ²	P ₂ O ₅	K ₂ O	CO	pH	CE	CTC
	% (m/m)					mS/cm	mmol/kg
S10B+0%B	1,01	0,83	0,17	21,28	4,6	1,12	473,34
S10B+3%B	0,90	0,82	0,17	18,31	4,7	0,92	451,73
S10B+6%B	1,04	0,70	0,17	21,74	4,7	1,03	488,67
S10B+9%B	0,86	0,66	0,17	18,05	4,8	0,97	471,81
100%B	0,34	0,79	0,21	27,41	6,2	0,26	327,84

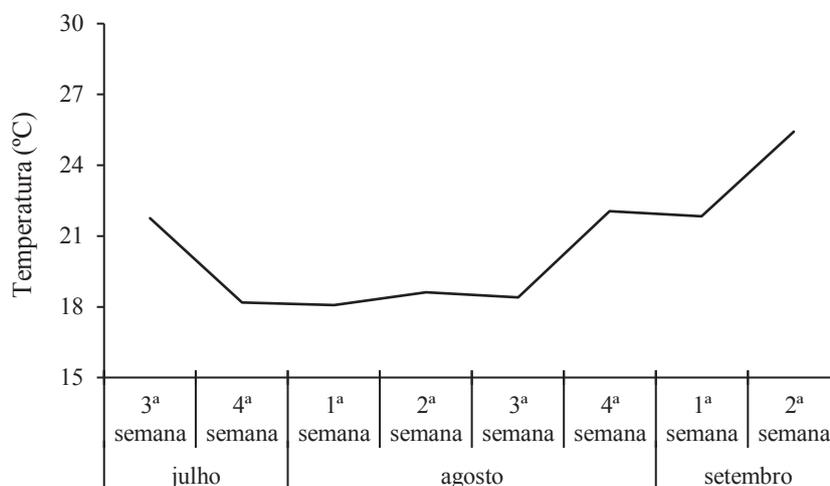
¹S10B+0%B: substrato S10B + 0% de biocarvão; S10B+3%B: substrato S10B + 3% de biocarvão; S10B+6%B: substrato S10B + 6% de biocarvão; S10B+9%B: substrato S10B + 9% de biocarvão; 100%B: biocarvão puro.

²N: nitrogênio; P₂O₅: pentóxido de fósforo; K₂O: óxido de potássio; CO: carbono orgânico; pH: potencial hidrogeniônico; CE: condutividade elétrica; CTC: capacidade de troca de cátions.

As bandejas foram mantidas em bancadas metálicas, a 1,2 m em relação à superfície do solo, em uma estufa agrícola de 90 m² com estrutura de aço galvanizado, teto semicircular, instalada no sentido noroeste-sudeste, coberta com filme de polietileno de baixa densidade, com aditivo antiultravioleta e espessura de 150 micra, e as laterais com tela antiafídeos.

A irrigação usada foi por aspersão, com vazão de 1,8 L/min por aspersor, automatizado com acionamento sete vezes ao dia, com tempo de molhamento total de 14 minutos e lâmina de água fornecida de 7,8 mm/dia. As soluções nutritivas foram fornecidas mensalmente às mudas conforme descrito por Furlani e Fernandes Júnior (2004) (Tabela 1). Uma miniestação meteorológica foi utilizada para monitorar a temperatura média do ar no interior da estufa (Figura 2). As avaliações foram iniciadas dois meses após o transplante das mudas, em setembro de 2018.

Figura 2 - Temperatura média semanal no interior da estufa agrícola durante a condução do experimento. Passo Fundo - 2018



Fonte: Dados do autor.

Nota: A temperatura média geral registrada durante o experimento (de julho a setembro) foi de 20,5 °C.

3.3.3.1 Crescimento e colonização micorrízica das mudas de morangueiro

Quanto à parte aérea, ao final do experimento avaliou-se o diâmetro da coroa e a altura da parte aérea de cinco mudas por parcela, com paquímetro digital.

Para avaliar o sistema radicial, as raízes foram coletadas e lavadas em água para eliminar fragmentos de substrato. As raízes foram digitalizadas em scanner e as imagens analisadas pelo software WinRHIZO[®]. Os atributos avaliados foram o comprimento total de raízes (CT, cm), área superficial (AS, cm²) e volume radicial (VR, cm³). As raízes foram agrupadas pelo software em distintas classes de diâmetro em relação à sua extensão total (BÖHM, 1979): raízes muito finas (RMF, Ø < 0,5 mm), raízes finas (RF, Ø de 0,5 a 2 mm) e raízes grossas (RG, Ø > 2 mm).

Para verificar a capacidade infectiva da comunidade de FMA, porções de raízes micorrizadas foram preparadas de acordo com Phillips e Hayman (1970) e a porcentagem de colonização micorrízica (CM) foi determinada conforme Trouvelot, Kouch e Gianinazzi-Pearson (1986) pela equação:

$$CM (\%) = \frac{\text{número total de fragmentos com raízes micorrizadas}}{\text{número total de fragmentos}} \times 100 \quad (1)$$

3.3.3.2 Teores de polifenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante

Em relação à composição fitoquímica de folhas e raízes, duas mudas de cada parcela (2 mudas/parcela x 4 repetições = 8 mudas/tratamento) foram analisadas.

Para determinar a composição fitoquímica de folhas e raízes foram analisadas duas mudas de cada parcela. O preparo de extratos de folhas e raízes foi realizado conforme Chaves, Calvete e Reginatto (2017) e Cvetković et al. (2017). Os extratos foram obtidos a partir de 20 g de material vegetal seco e moídos. O material vegetal (5 g) foi submetido ao processo de extração com 100 mL de água ultrapurificada (material vegetal:água, 1:20 m/v) na presença de ultrassom. A extração foi realizada por 75

minutos em lavadora ultrassônica (SoniClean 2, Sanders[®]). Os extratos obtidos foram filtrados (20 µm), congelados (-70 °C) e liofilizados (liofilizador LS3000, Terroni[®]). Antes das análises dos compostos fitoquímicos, 10 mg de extrato liofilizado de folhas e raízes foram ressuspensos com 5 mL de água ultrapurificada (material vegetal: água, 2:1 m/v), mantidos 10 minutos na lavadora ultrassônica e após centrifugados por 5 minutos a 3000 rotações por minuto (rpm).

O teor de polifenóis totais dos extratos de folhas (PTF) e de raízes (PTR) foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, conforme Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999), por espectrofotometria (espectrofotômetro PerkinElmer Lambda 20, Perkin Elmer[®]). O teor de polifenóis totais foi expresso em gramas de equivalente de ácido gálico por 100 g de extrato seco (g EAG/100 g ES).

O teor de flavonoides totais dos extratos de folhas (FTF) e de raízes (FTR) foi obtido conforme Miliauskas, Venskutonis e Van Beek (2004), por espectrofotometria. O teor de flavonoides totais foi expresso em gramas de rutina por 100 g de extrato seco (g rutina/100 g ES).

A atividade antioxidante dos extratos de folhas (AAF) e de raízes (AAR) foi determinada pelo poder de atividade redutora férrica, conforme Zhu et al. (2002), por espectrofotometria. A capacidade antioxidante foi expressa em gramas de equivalente de ácido gálico por 100 g de extrato seco (g EAG/100 g ES).

3.3.3.3 Teores de ácidos fenólicos e taninos

Os extratos vegetais foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para identificação e quantificação de ácidos fenólicos e de taninos.

Para análise de ácidos fenólicos as substâncias químicas de referência (SQR) usadas foram: ácido cafeico (>98%, Sigma Aldrich, lote SLBB5479V), ácido clorogênico (≥95%, Sigma Aldrich, lote SLBS0103V), ácido cumárico (>98%, Sigma

Aldrich, lote 091M1197V), ácido ferúlico (99%, Sigma Aldrich, lote STBC5005V) e ácido vanílico (>97%, Sigma Aldrich, lote BCBF7869V). Para a análise de taninos as SQR utilizadas foram: catequina (99%, Sigma Aldrich, lote BCBC2740) e epicatequina (99%, Sigma Aldrich, lote BCBC8078V).

Antes de realizar as análises, 20 mg de extrato liofilizado de folhas e raízes foram ressuspensos com 10 mL de água ultrapurificada (material vegetal:água, 2:1 m/v), mantidos 10 minutos na lavadora ultrassônica e filtrados em membrana de nylon de 0,45 µm.

As análises por CLAE foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Flexar LC Perkin Elmer (Burnsville, MN, USA), equipado com bomba binária Flexar LC, detector Flexar PDA em 280 nm, auto-amostrador. Os dados cromatográficos foram analisados pelo software Chromera Workstation[®]. Utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 ACE (250 x 4,6 mm). Para preparar a fase móvel foi utilizada água ultrapurificada obtida pelo Sistema Directi-Q – Millipore[®]/Millipore Corporation (EUA), acetonitrila e metanol grau HPLC e ácido fosfórico grau PA. O volume de injeção foi de 20 µL de cada extrato. O comprimento de onda de detecção das SQR foi de 280 nm. Os métodos foram validados previamente de acordo com a International Conference on Harmonization (ICH, 2005) e Brasil (2017).

Foram usadas as seguintes siglas como referência aos ácidos fenólicos e taninos analisados: ácido cafeico em folhas (ACAF) e em raízes (ACAR); ácido clorogênico em folhas (ACLF) e em raízes (ACLR); ácido cumárico em folhas (ACUF) e em raízes (ACUR); ácido ferúlico em folhas (AFEF) e em raízes (AFER); ácido vanílico em folhas (AVAF) e em raízes (AVAR); catequina em folhas (CATF) e em raízes (CATR); epicatequina em folhas (EPIF) e em raízes (EPIR).

3.3.3.4 Ação de enzimas em substrato enriquecido com FMA e biocarvão

Foi determinada a ação das enzimas fosfatase, conforme proposto por Tabatabai e Bremmer (1969), e β-glucosidase, seguindo a metodologia de Tabatabai (1982).

3.3.4 Análise de dados

Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância e de regressão. Quando houve significância apenas para o fator qualitativo (micorrização), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com auxílio do programa Costat[®].

3.4 Resultados

3.4.1 Crescimento e colonização micorrízica das mudas de morangueiro

Não foi observado efeito do biocarvão e da micorrização, de forma isolada ou combinada, no crescimento da parte aérea das mudas de morangueiro. Os valores médios obtidos corresponderam a 0,67 cm para o diâmetro da coroa e 6,79 cm para a altura da parte aérea.

Em relação ao sistema radicial não houve efeito significativo dos tratamentos na área superficial ($AS = 70,9 \text{ cm}^2$), no volume radicial ($VR = 17,9 \text{ cm}^3$) e no comprimento de raízes muito finas ($RMF = 118,5 \text{ cm}$) e de raízes grossas ($RG = 20,7 \text{ cm}$). Entretanto, sem micorrização, o comprimento total de raízes (CTR) e a quantidade de raízes finas (RF) foram superiores em 13% e 19%, respectivamente, em relação às mudas micorrizadas. A colonização micorrízica (CM) das raízes foi de 18,7% (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito da micorrização no sistema radicial de mudas de morangueiro, cultivar Albion. Passo Fundo - 2018

Micorrização	CTR (cm) ¹	RF (cm)	CM (%)
- FMA	205,5 ± 50,2 a	58,1 ± 14,1 a	0,0 ± 0,0 b
+ FMA	178,2 ± 39,4 b	47,0 ± 10,6 b	18,7 ± 8,9 a
C.V. (%) ²	16,09	17,83	28,77

Nota: Dados apresentados como média ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$, $n = 4$).

¹CTR: comprimento total de raízes; RF: raízes finas; CM: colonização micorrízica.

²Coefficiente de variação.

3.4.2 Teores de polifenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante

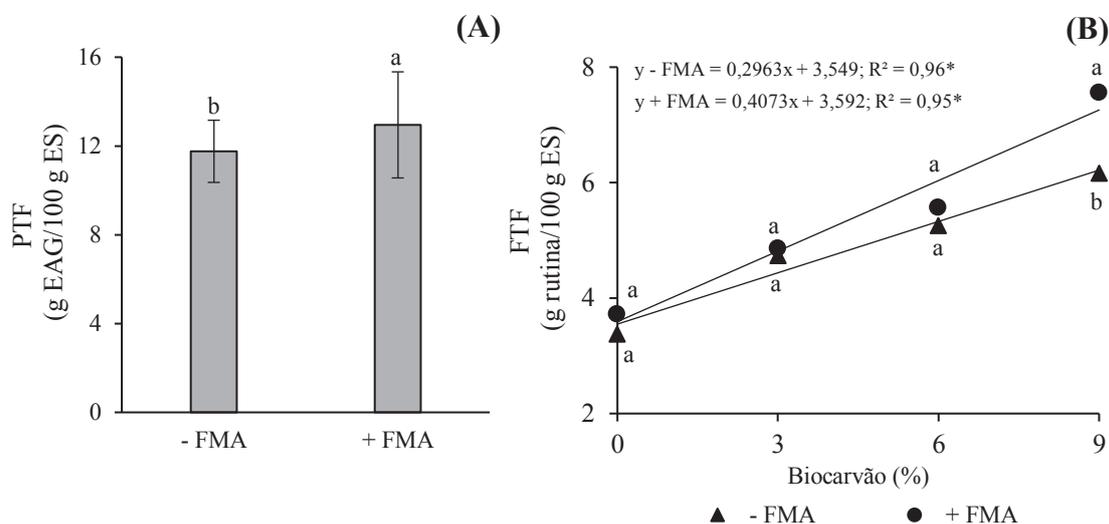
Os teores médios de polifenóis e flavonoides totais e da atividade antioxidante encontrados em folhas e raízes de mudas de morangueiro, independente das proporções de biocarvão e do uso de FMA, são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Teores médios de polifenóis e flavonoides totais nas folhas e raízes de mudas de morangueiro, cultivar Albion, durante a aclimatização. Passo Fundo - 2018

Análises	Teor médio	
	Folhas	Raízes
Polifenóis totais (g EAG/100 g ES)	12,36	23,40
Flavonoides totais (g rutina/100 g ES)	5,16	2,52
Atividade antioxidante (g EAG/100 g ES)	7,28	7,51

Analisando a composição fitoquímica da parte aérea das mudas, houve diferença estatística do fator micorrização para polifenóis totais (PTF) e da interação entre FMA e biocarvão para flavonoides totais (FTF). O uso de FMA e de biocarvão na aclimatização não alteraram significativamente a atividade antioxidante da parte aérea das mudas. Mudas crescidas na presença de FMA apresentaram incremento de 10% nos teores de PTF em relação às mudas não micorrizadas (Figura 3 A) e as mudas produzidas com 9% de biocarvão e FMA apresentaram maior teor de FTF (Figura 3 B). O acréscimo de maiores proporções de biocarvão elevaram linearmente os teores de FTF, sem ou com micorrização (Figura 3 B).

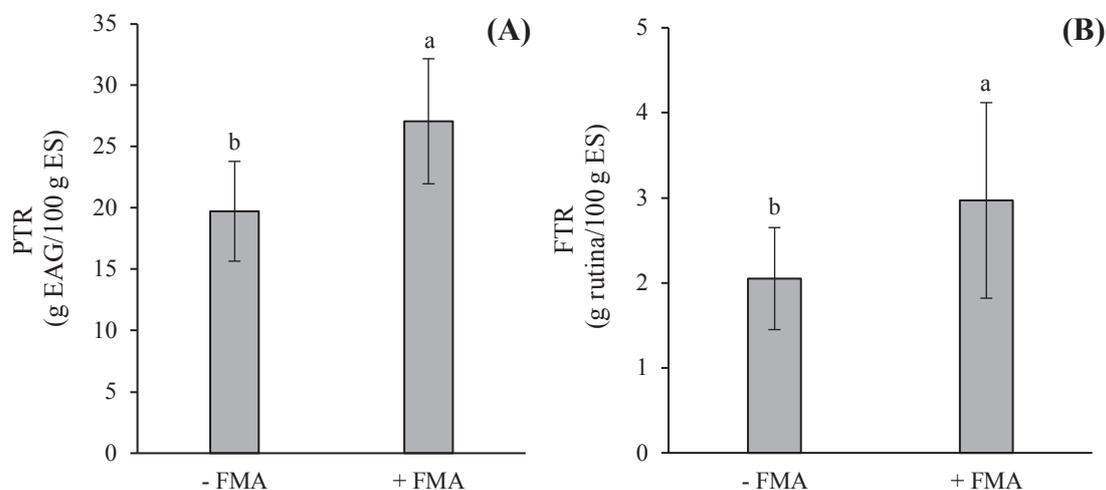
Figura 3 - Composição fitoquímica da parte aérea de mudas de morangueiro da cultivar Albion, durante a aclimatização, produzidas com biocarvão e FMA. A) polifenóis totais em folhas (PTF); B) flavonoides totais em folhas (FTF). Passo Fundo - 2018



Nota: A) Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas acima das colunas indicam diferença pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$, $n = 4$). B) Médias seguidas pela mesma letra minúscula para micorrização não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$, $n = 4$). * significativo a 5% de probabilidade de erro ($0,01 \leq p < 0,05$).

Quanto à composição fitoquímica do sistema radicial das mudas, o uso de FMA e de biocarvão na aclimatização não alteraram significativamente a atividade antioxidante das raízes das mudas. Além disso, não observou-se efeito do biocarvão e da interface FMA-biocarvão nos teores totais de polifenóis e de flavonoides das mudas. Houve diferença estatística apenas para o fator micorrização quanto aos atributos polifenóis totais (PTR) e flavonoides totais (FTR). Mudas produzidas com FMA apresentaram teores de PTR (Figura 4 A) e FTR (Figura 4 B) superiores em 27% e 31%, respectivamente, em relação àquelas não micorrizadas.

Figura 4 - Efeito da micorrização na composição fitoquímica do sistema radicial de mudas de morangueiro, cultivar Albion, durante a aclimatização. A) polifenóis totais em raízes (PTR); B) flavonoides totais em raízes (FTR). Passo Fundo - 2018



Nota: Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas acima das colunas indicam diferença pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$, $n = 4$).

3.4.3 Teores de ácidos fenólicos e taninos

Os teores médios de ácidos fenólicos e taninos encontrados em folhas e raízes de mudas de morangueiro, independente das proporções de biocarvão e do uso de FMA, são apresentados na Tabela 7. Não detectou-se a presença de ácido cumárico. O ácido cafeico foi detectado apenas em folhas e o ácido vanílico apenas em raízes.

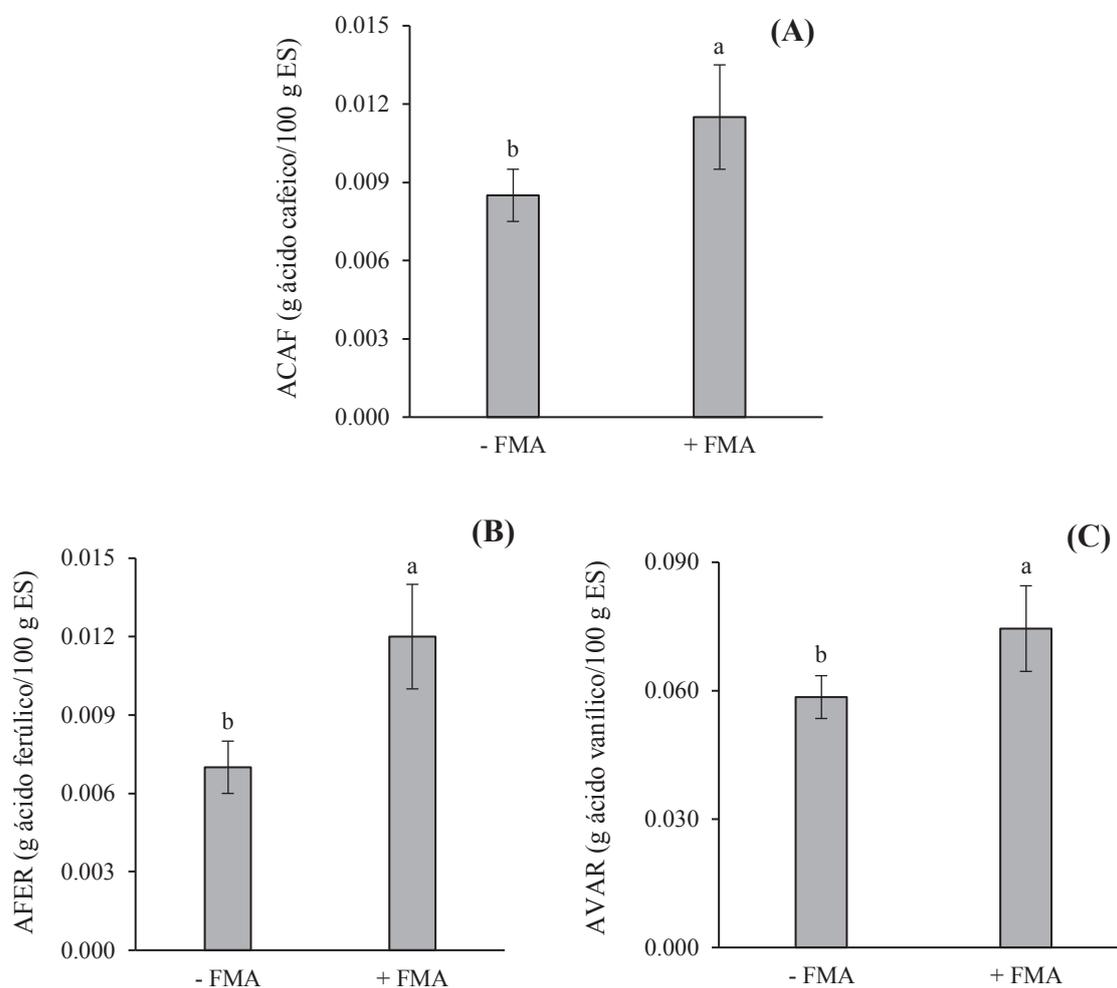
Tabela 7 - Teores médios de ácidos fenólicos e taninos nas folhas e raízes de mudas de morangueiro, cultivar Albion, durante a aclimatização. Passo Fundo - 2018

Fitoquímicos	Teor médio (g substância/100 g ES)	
	Folhas	Raízes
Ácido cafeico	0,010	0,000
Ácido clorogênico	4,000	5,384
Ácido cumárico	0,000	0,000
Ácido ferúlico	0,066	0,010
Ácido vanílico	0,000	0,067
Catequina	0,058	1,998
Epicatequina	0,009	0,123

O uso de biocarvão e da interface FMA-biocarvão não alteraram a composição de ácidos fenólicos e de taninos das mudas. Observou-se apenas o efeito do fator micorrização nos teores de ácidos fenólicos (Figura 5) e taninos (Figura 6).

Em relação à composição de ácidos fenólicos, mudas produzidas com FMA apresentaram teores de ACAF (Figura 5 A), AFER (Figura 5 B) e AVAR (Figura 5 C) superiores em 25%, 42% e 21%, respectivamente, em relação àquelas não micorrizadas.

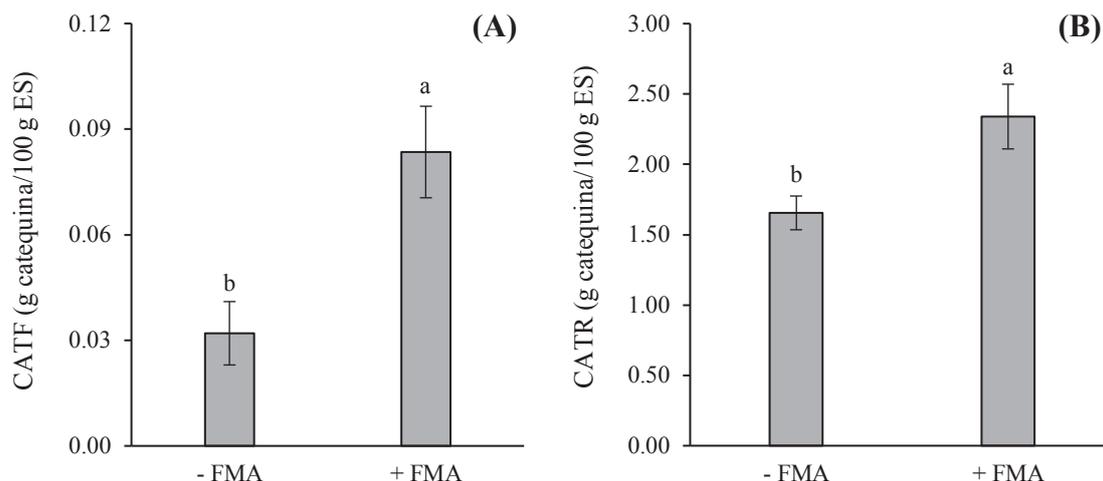
Figura 5 - Efeito da micorrização na composição de ácidos fenólicos de mudas de morangueiro, cultivar Albion, durante a aclimatização. A) ácido cafeico em folhas (ACAF); B) ácido férulico em raízes (AFER); C) ácido vanílico em raízes (AVAR). Passo Fundo - 2018



Nota: Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas acima das colunas indicam diferença pelo teste de Tukey ($p < 0,05$, $n = 4$).

Quanto à composição de taninos, mudas produzidas com FMA apresentaram teores de CATF (Figura 6 A) e CATR (Figura 6 B) superiores em 62% e 30%, respectivamente, em relação àquelas não micorrizadas.

Figura 6 - Efeito da micorrização na composição de taninos de mudas de morangueiro, cultivar Albion, durante a aclimatização. A) catequina em folhas (CATF); B) catequina em raízes (CATR). Passo Fundo - 2018

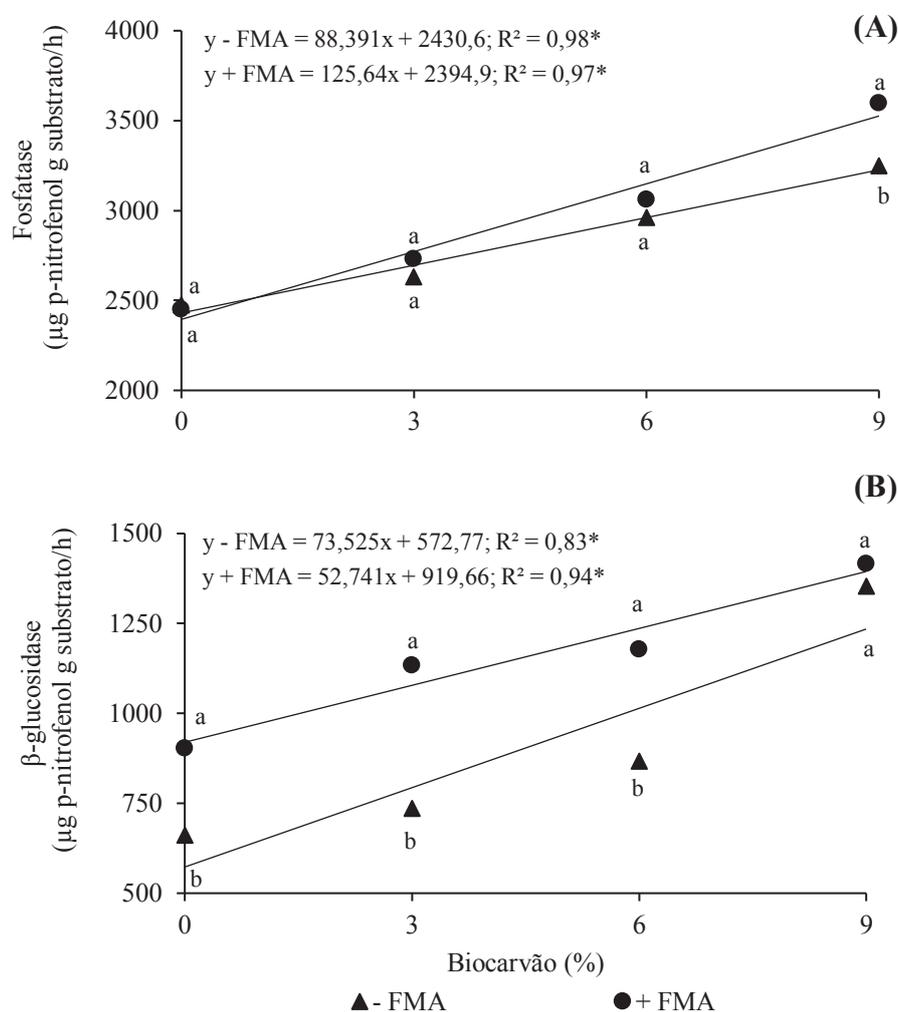


Nota: Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas acima das colunas indicam diferença pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$, $n = 4$).

3.4.4 Ação de enzimas em substrato enriquecido com FMA e biocarvão

Não houve efeito de forma isolada de FMA e biocarvão na atividade enzimática do substrato de cultivo. No entanto, a interação entre biocarvão e FMA foi significativa. O substrato enriquecido com 9% de biocarvão combinado com a presença de FMA apresentou maior atividade da enzima fosfatase (Figura 7 A). Por outro lado, substrato contendo até 6% de biocarvão e com micorrizas teve maior ação da enzima β -glucosidase (Figura 7 B). Sem ou com micorrização houve aumento linear da atividade das enzimas com o acréscimo de maiores proporções de biocarvão.

Figura 7 - Atividade de fosfatase (A) e β -glucosidase (B) em substrato enriquecido com biocarvão e FMA na aclimatização de mudas de morangueiro, cultivar Albion. Passo Fundo - 2018



Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula para micorrização não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$, $n = 4$). * significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 \leq p < 0,05$).

3.5 Discussão

O efeito positivo dos FMA na qualidade fitoquímica de frutos de morangueiro já foi reportado em outros trabalhos (CASTELLANOS-MORALES et al., 2010; CECATTO et al., 2016; CHIOMENTO et al., 2019a; LINGUA et al., 2013; PARADA et al., 2019), mas esse é o primeiro estudo a verificar o benefício da micorrização no

aumento dos teores de fitoquímicos em folhas e raízes de mudas de morangueiro (Figuras 3 A, 4, 5 e 6). Outras pesquisas analisaram o perfil fitoquímico em folhas (BESBES; HABEGGER; SCHWAB, 2019; CVETKOVIĆ et al., 2017) e em raízes (BESBES; HABEGGER; SCHWAB, 2019; NEMEC, 1973), mas sem usar as biotecnologias FMA-biocarvão durante a aclimatização das mudas. O uso de FMA potencializou o teor de compostos fitoquímicos das mudas e a adição de 9% de biocarvão no substrato com FMA melhorou o conteúdo de flavonoides totais nas folhas das mudas de morangueiro e beneficiou a atividade da enzima fosfatase. Ainda, substrato com até 6% de biocarvão e com FMA teve maior ação de β -glucosidase.

Diferente do esperado, o sistema radicial das mudas cresceu mais quando elas não foram micorrizadas (Tabela 5). Isso sugere que os FMA, inicialmente, demandam carbono do hospedeiro para sua manutenção e depois retribuem esse benefício ao simbionte vegetal. Os resultados contrariaram pesquisas já realizadas. Porém, destaca-se que as mesmas reportaram os benefícios de FMA a mudas de hortaliças durante a aclimatização sob condições limitantes, geralmente submetendo-as a estresses abióticos (BORKOWSKA, 2002) ou bióticos (CAMPOS et al., 2017), o que não aconteceu neste trabalho. Além disso, um aspecto a ser considerado é que foram usadas bandejas com capacidade volumétrica de 100 cm³/célula, normalmente utilizadas pelos viveiristas, o que pode ter limitado o crescimento do sistema radicial. Esse fato pode explicar a baixa colonização micorrízica observada nas raízes analisadas (Tabela 5). A literatura indica que colonização micorrízica inferior a 50% classifica-se como baixa (SABOYA et al., 2012). Embora a colonização micorrízica seja importante, o percentual de infectividade das raízes nem sempre se correlaciona com a eficiência da simbiose (KONVALINKOVÁ; JANSÁ, 2016).

É conhecido o efeito da micorriza arbuscular no metabolismo secundário das plantas, resultando na biossíntese reforçada de fitoquímicos com propriedades benéficas à saúde (BASU; RABARA; NEGI, 2018), a exemplo de flavonoides e taninos. O mecanismo da biossíntese de metabólitos secundários em plantas micorrizadas compreende a atividade de enzimas que levam à produção de flavonoides, terpenoides e precursores de polifenóis (LÓPEZ-RÁEZ et al., 2010; POZO; AZCON-AGUILAR,

2007). Tais moléculas podem ser moduladas por hormônios vegetais possivelmente envolvidos em respostas de defesa à micorrização (ADOLFSSON et al., 2017). Portanto, a maior concentração de metabólitos secundários em folhas e raízes pode ser atribuída à ativação de uma resposta de defesa do hospedeiro à colonização micorrízica (LINGUA et al., 2013; ROUPHAEL et al., 2015), detectado nas raízes das mudas de morangueiro (Tabela 5).

Os resultados dessa pesquisa diferem de outros estudos que avaliaram apenas frutos e usaram inoculantes monoespecíficos ou apenas os gêneros *Claroideoglossum* ou *Glomus*. Portanto esses resultados são inéditos não apenas por analisar folhas e raízes, mas pelo fato das mudas terem sido inoculadas com comunidade nativa de FMA de solo cultivado com morangueiro (Tabela 2), o que pode fornecer resultados mais satisfatórios devido à compatibilidade fungo-hospedeiro e por aumentar os efeitos mutualísticos com dois ou mais simbiontes (KORON; SONJAK; REGVAR, 2014).

Os metabólitos secundários são importantes para a defesa das plantas e contribuem para melhorar a sanidade vegetal (BJÖRKMAN et al., 2011). Além disso, a produção de hortaliças com alto teor de fitoquímicos (alimentos funcionais) atende demandas de consumidores devido aos seus efeitos benéficos à saúde (ROUPHAEL et al., 2010). Os compostos fenólicos de folhas de bagas, por exemplo, são conhecidos como agentes antioxidantes e anti-inflamatórios e possuem propriedades antimicrobianas (FERLEMI; LAMARI, 2016). Embora as folhas e raízes de morangueiro possam fornecer compostos secundários de importância à indústria farmacêutica, como é o caso de compostos fenólicos, flavonoides e taninos, o trabalho demonstrou os benefícios dos FMA para a produção desses compostos. Os resultados desse estudo apontam para a possibilidade de usar, por exemplo, folhas e raízes para fins medicinais, como chás e outros produtos. O uso de ferramentas biotecnológicas que resultem em maior acúmulo de fitoquímicos em órgãos vegetais, como é o caso dos FMA, tem papel importante na contribuição para os benefícios à saúde humana e à proteção das plantas.

Não foi verificado o efeito isolado do biocarvão no crescimento e qualidade das mudas, mas a adição de 9% de biocarvão no substrato combinada com o uso de FMA melhorou o conteúdo de flavonoides totais em folhas (Figura 3 B) e beneficiou a atividade da enzima fosfatase (Figura 7 A). Além disso, substrato com até 6% de biocarvão e com micorrizas apresentou maior ação da enzima β -glucosidase (Figura 7 B). Poucos estudos reportaram o benefício do biocarvão no aumento de metabólitos secundários em plantas (UMARU; SAMLING; UMARU, 2018). As pesquisas, geralmente, focam no crescimento vegetal e na produtividade das culturas (LIU et al., 2017; OLMO et al., 2016).

A atividade enzimática do meio de crescimento vegetal fornece informações sobre mudanças antropogênicas, agronômicas, químicas e climáticas no solo/substrato (GUERRA; SANJUÁN; LÓPEZ, 2018) e pode ser considerada um bom indicador da qualidade do agroecossistema (VERZEAUX et al., 2017). Há evidências do papel do biocarvão na promoção da atividade microbiana na rizosfera do meio de crescimento vegetal (DE TENDER et al., 2016), como é o caso dos FMA, o que pode promover maior liberação de nutrientes, como N e P por exemplo, e resultar em maior ação enzimática do meio de crescimento (GÓMEZ et al., 2014). A atividade enzimática responde à aplicação de biocarvão de várias maneiras e depende do tipo e da quantidade de biocarvão e das propriedades do solo/substrato (ZHU et al., 2017). Alguns componentes do biocarvão, como compostos orgânicos voláteis, podem ser os responsáveis por alterar a ação das enzimas do meio de crescimento vegetal (PAZ-FERREIRO et al., 2014).

Quando a interface FMA-biocarvão demonstra melhorar o crescimento e o rendimento das plantas, possíveis mecanismos têm sido sugeridos para explicar esses benefícios (JAAFAR; CLODE; ABBOTT, 2014), porém pouco compreendidos (SOLAIMAN; ABBOTT; MURPHY, 2019). Warnock et al. (2007) sintetizaram em quatro mecanismos como o biocarvão pode afetar a ação de FMA: (1) mudanças nas propriedades físicas e químicas do solo/substrato; (2) alteração da atividade de outros microrganismos que afetam as micorrizas; (3) mudanças na dinâmica de sinalização entre plantas e micorrizas; (4) refúgio para fungos e bactérias colonizadores. Nesse

estudo o efeito conjunto de FMA e biocarvão no conteúdo de flavonoides totais em folhas das mudas de morangueiro e na atividade das enzimas fosfatase e β -glucosidase presentes no substrato pode ter sido causado por um desses mecanismos ou pela combinação dos mesmos.

Esses resultados são inéditos ao determinar a influência da interface FMA-biocarvão durante a aclimatização *ex vitro* de mudas de morangueiro, principalmente quando analisaram-se a atividade enzimática do substrato de cultivo e o teor de fitoquímicos em folhas e raízes. Considerando a preferência das pessoas pelo consumo de alimentos funcionais, esses resultados apontam para a possibilidade de usar folhas e raízes de morangueiro para fins medicinais (uso das folhas na forma de chás, por exemplo), o que pode promover benefícios à saúde dos consumidores. Além disso, os resultados dessa pesquisa indicam o potencial de aplicar a biotecnologia micorrízica e o biocarvão no morangueiro como ferramentas para melhorar o teor de metabólitos secundários em diferentes órgãos da planta. Enfatiza-se que a interface FMA-biocarvão pode ser uma alternativa para potencializar a sustentabilidade do sistema de produção de mudas e cultivo do morangueiro. Por fim, essas investigações preenchem a lacuna existente entre a engenharia do biocarvão relacionada aos FMA no cultivo do morangueiro.

3.6 Conclusões

Conclui-se que o principal efeito durante a aclimatização *ex vitro* de mudas de morangueiro é proporcionado pela micorrização. O uso de FMA potencializa a composição fitoquímica de mudas, porém não melhora seu crescimento. Considerando a interação entre as duas biotecnologias aplicadas neste estudo, a adição de 9% de biocarvão no substrato de cultivo aliada ao uso de FMA melhoram o conteúdo de flavonoides totais em folhas de mudas de morangueiro e beneficiam a atividade da enzima fosfatase. Em adição, substrato com até 6% de biocarvão e com micorrizas apresenta maior ação da enzima β -glucosidase. Devido ao acúmulo de metabólitos secundários causado por FMA (principalmente) e biocarvão, os viveiristas podem

produzir mudas de morangueiro mais saudáveis. Além disso, estas descobertas podem resultar em aplicações práticas na indústria fitoterápica, por exemplo. Por fim, acredita-se que o uso destas ferramentas biotecnológicas na fase de aclimatização do morangueiro em viveiros pode ser uma alternativa para promover uma agricultura hortícola mais sustentável e isso incentivará uma revolução na indústria de plantas.

4 CAPÍTULO II

Desempenho morfo-hortícola de morangueiro cultivado em substrato com fungos micorrízicos arbusculares e biocarvão

4.1 Resumo

O efeito interativo de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e biocarvão no cultivo do morangueiro é pouco conhecido. Assim, o objetivo do trabalho foi investigar se a associação entre FMA e biocarvão modifica o desempenho morfo-hortícola do morangueiro cultivado em substrato durante seu ciclo produtivo. Foram avaliados quatro tratamentos de FMA (sem inoculação, inóculos *Cetraspora pellucida* e *Claroideoglobus etunicatum* e comunidade micorrízica) em substrato sem e com biocarvão (9% do volume do recipiente). O experimento foi delineado em blocos casualizados, no esquema bifatorial 4 x 2, com quatro repetições. Os resultados mostraram que o uso de FMA melhorou o crescimento fitométrico das plantas e potencializou a qualidade fitoquímica dos frutos. O uso de biocarvão melhorou a colonização micorrízica, a biomassa radicial e a qualidade das plantas. A interação de 9% de biocarvão e inoculação com a espécie *C. etunicatum* proporcionou melhor crescimento do sistema radicial. Conclui-se que a interface FMA-biocarvão torna o sistema radicial mais profuso em plantas cultivadas com 9% de biocarvão e inoculadas com a espécie fúngica *C. etunicatum*. Contudo, a comunidade micorrízica se expressa melhor em substrato sem biocarvão. Práticas bem-sucedidas para usar o biocarvão dependem da resposta da planta como também do seu custo ao ser incorporado no meio de cultivo.

Palavras-chave: 1. *Fragaria X ananassa* Duch. 2. Morfologia. 3. Produção. 4. Qualidade fitoquímica.

4.2 Introdução

O morangueiro cultivado (*Fragaria X ananassa* Duch.) difundiu-se em grande parte do mundo pela demanda por frutos (KORON; SONJAK; REGVAR, 2014) e pelo seu valor nutritivo (ROBINSON-BOYER et al., 2016). A necessidade de consumo diário de morangos é de 115 g *per capita* (RAHMAN et al., 2014). Assim, o cultivo do morangueiro tornou-se lucrativo para os produtores em várias partes do mundo.

A produção de morangos no Brasil (150 mil toneladas) ainda é concentrada no sistema de cultivo convencional (no solo, a céu aberto), com baixa produtividade (35,7 t/ha) quando comparada aos países considerados os maiores produtores, como Estados Unidos da América (67,9 t/ha) e Espanha (52,8 t/ha). Esses dados evidenciam o desafio brasileiro em introduzir novas tecnologias para diminuir a distância de produtividade entre os países mais desenvolvidos e melhorar o desempenho da cultura. Uma das iniciativas observadas no sul do Brasil é a migração da maioria dos produtores do cultivo tradicional no solo para o cultivo em substrato (recipiente).

O perfil de cultivo em substrato (hidroponia) se caracteriza por demandar muitos fertilizantes químicos (ANDRADE et al., 2017). Em outra mão, esses produtores cultivam em substrato sob sistemas abertos, onde a solução de nutrientes drenada e excedente é liberada para o ambiente, o que a longo prazo pode causar contaminação do agroecossistema. Uma alternativa para minimizar esses inconvenientes é usar ferramentas que promovam a sustentabilidade no cultivo do morangueiro, a exemplo de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e do biocarvão.

Na agricultura, o consumo de fertilizantes químicos é alto e tem como objetivo aumentar o crescimento e o rendimento das plantas. O uso extensivo desses insumos químicos é um problema emergente em todo o mundo. Portanto, a reciclagem de nutrientes de fontes orgânicas no meio de cultivo é uma abordagem sustentável para melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas tanto do solo (ABBAS et al., 2018) como do substrato. Fontes orgânicas estão recebendo a atenção devido ao seu potencial em melhorar a fertilidade do solo (ATKINSON; FITZGERALD; HIPPS, 2010). Assim, o biocarvão, um material sólido e rico em carbono, oriundo da pirólise de biomassa na ausência completa ou parcial de oxigênio (HUSSAIN et al., 2017), foi amplamente reconhecido por seu potencial em estimular o crescimento vegetal por aumentar o armazenamento de água (KOIDE et al., 2015), a disponibilidade de nutrientes (OLMO et al., 2016), a vida microbiana benéfica (NIELSEN et al., 2014), o sequestro de carbono, a mitigação às mudanças climáticas (SOHI et al., 2010) e aprimorar a fitorremediação de solos contaminados (BRENNAN et al., 2014).

Os benefícios indiretos do biocarvão também podem ocorrer devido ao aumento da colonização de raízes por FMA (WARNOCK et al. 2007), que influenciam a disponibilidade de nutrientes às plantas (SOHI et al., 2010) e a retenção de água no solo pelo aprimoramento de sua estrutura (ATKINSON; FITZGERALD; HIPPS, 2010). Além disso, os fertilizantes orgânicos podem ser adequados para os objetivos de uma agricultura sustentável e os FMA, principais componentes de muitos ecossistemas, têm efeitos positivos sobre as características quantitativas e qualitativas em suas plantas hospedeiras (HARRIER; WATSON, 2004).

Há evidências do papel do biocarvão na promoção da atividade microbiana na rizosfera do meio de crescimento vegetal (JOSEPH et al., 2015), como é o caso dos FMA. Estudos mostraram que o uso do biocarvão potencializa a ação dos FMA (GÜEREÑA et al., 2015; LUO et al., 2017; MICKAN et al., 2016), provavelmente modificando as propriedades físicas e químicas do meio de crescimento, o que facilitaria a germinação dos esporos e o crescimento e ramificação das hifas (HAMMER et al., 2015).

Para os produtores de morango introduzirem novas tecnologias durante o cultivo e ao mesmo tempo potencializar a agricultura sustentável, surge a seguinte questão: como a associação entre FMA e biocarvão afeta o desempenho do morangueiro cultivado em substrato durante seu ciclo produtivo? Destaca-se que essas biotecnologias são carentes e desconhecidas para a maioria dos produtores. Em adição, nenhuma pesquisa foi feita para determinar a influência da interface FMA-biocarvão durante o ciclo produtivo do morangueiro.

Na cultura do morangueiro os FMA, microrganismos que estabelecem associações simbióticas com 80% da flora terrestre (BERRUTI et al., 2016), beneficiam a morfologia do sistema radicial das plantas (CHIOMENTO et al., 2019a; SINCLAIR et al., 2014) e melhoram a qualidade fitoquímica de frutos (CASTELLANOS-MORALES et al., 2010; CECATTO et al., 2016; CHIOMENTO et al., 2019a; LINGUA et al., 2013; PARADA et al., 2019). Embora os benefícios combinados dos FMA e do biocarvão sejam possivelmente mais fortes que o efeito único de cada um, a maioria dos estudos se

concentrou em investigar cada uma dessas ferramentas biotecnológicas de forma isolada. Assim, pouco se sabe sobre o efeito interativo de FMA e biocarvão durante o ciclo produtivo do morangueiro.

Portanto, com base na hipótese de que a interface FMA-biocarvão melhora a morfologia da produção do morangueiro e a qualidade de frutos, o objetivo desse estudo foi investigar se a associação entre FMA e biocarvão modifica o desempenho morfo-hortícola de morangueiro cultivado em substrato durante seu ciclo produtivo.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Material vegetal e condições de crescimento do morangueiro

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade de Passo Fundo (28° 15' 46" S, 52° 24' 24" W), Rio Grande do Sul (RS), em estufas agrícolas, durante o período de junho (inverno) de 2018 a dezembro (verão) de 2019.

Matrizes de morangueiro da cultivar Albion, classificada como de dias neutros (DN) quanto ao florescimento, oriundas do viveiro Llahuén/Patagônia chilena (33° 50' 15,41" S, 70° 40' 03,06" W), foram transplantadas em junho de 2018 em recipientes (18 L) preenchidos com o substrato Horta 2[®] e mantidas em estufa agrícola sobre bancadas de 1,20 m de altura, com a finalidade de produção de estolões. O substrato Horta 2[®] é composto por casca de pinus, vermiculita, corretivos de acidez e fertilizantes (nitrogênio, fósforo e potássio) em quantidades não fornecidas pelo fabricante.

O cultivo das matrizes de morangueiro foi desenvolvido em estufa agrícola de aço galvanizado, coberta com filme de polietileno de baixa densidade, com aditivo antiultravioleta e espessura de 150 micra, instalada no sentido noroeste-sudeste. A irrigação por gotejamento, com fluxo de 2,4 L/h por gotejador, foi fornecida às matrizes quatro vezes ao dia, com molhamento total de dez minutos diários. As soluções nutritivas foram fornecidas quinzenalmente às matrizes conforme descrito por Furlani e Fernandes Júnior (2004) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição das soluções nutritivas recomendadas para o cultivo do morangueiro sem solo. Passo Fundo - 2018

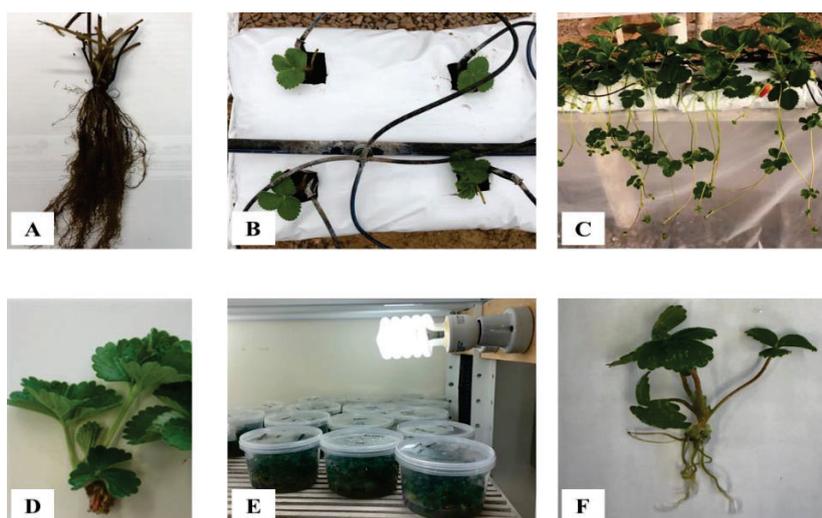
Sais ou fertilizantes	Soluções nutritivas (g/L H ₂ O) ¹		
	A	B	C
Nitrato de cálcio	160	0	0
Nitrato de potássio	0	100	100
Fosfato monoamônio	0	30	0
Fosfato monopotássico	0	36	72
Sulfato de magnésio	0	120	120
Ácido bórico	0,6	0	0
Sulfato de cobre	0,06	0	0
Sulfato de manganês	0,4	0	0
Sulfato de zinco	0,2	0	0
Molibdato de sódio	0,06	0	0
Quelato de ferro (6% de Fe)	12	0	0

Fonte: Furlani e Fernandes Júnior (2004).

¹Soluções A e B: ministradas no estágio vegetativo; soluções A e C: ministradas no estágio reprodutivo.

Após três meses, em setembro (primavera) de 2018, estolões foram retirados das matrizes, encaminhados ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF e submetidos à técnica de micropropagação (cultivo *in vitro*) para obter as mudas que constituíram o material vegetal da pesquisa (Figura 1).

Figura 1 - Mudanças de morangueiro, cultivar Albion. A) matrizes; B) cultivo de matrizes; C) produção de estolões; D) estolões; E) cultivo *in vitro*; F) obtenção das mudas micropropagadas. Passo Fundo - 2018/2019



Fonte: Imagens do autor.

4.3.2 Desenho experimental

Os tratamentos aplicados ao substrato foram sem inoculação e três inóculos de FMA [*Cetraspora pellucida* (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) Oehl, F.A. Souza & Sieverd., *Claroideoglossum etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler e uma comunidade micorrízica (Tabela 2)], sem e com a presença de biocarvão (9% do volume do recipiente). O experimento foi delineado em blocos casualizados, com os tratamentos arranjados no esquema bifatorial 4 x 2, com quatro repetições e três plantas por parcela.

Tabela 2 - Comunidade de FMA identificada de solo agrícola coletado em Flores da Cunha, RS. Passo Fundo - 2019

Município	Comunidade micorrízica ¹
Flores da Cunha	<i>Claroideoglossum claroideum</i> (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler, <i>Claroideoglossum etunicatum</i> (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler, <i>Funneliformis</i> aff. <i>geosporum</i> , <i>Glomus</i> aff. <i>versiforme</i> , <i>Glomus</i> sp. (<i>caesaris</i> like) e <i>Glomus</i> sp2

Fonte: Chiomento et al. (2019b).

¹Classificação de Glomeromycota por Redecker et al. (2013).

O biocarvão, fornecido pela empresa SP Pesquisa e Tecnologia Ltda., foi obtido em reator de operação contínua a 400 °C e teve como matéria-prima a casca de arroz. Os isolados *C. pellucida* SCT954B e *C. etunicatum* SCT101A foram provenientes da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG). Já a comunidade de FMA foi proveniente do cultivo-armadilha de solo agrícola coletado em local-referência no cultivo de morangueiro, no município de Flores da Cunha (29° 01' 50" S, 51° 11' 30" W), RS (CHIOMENTO et al., 2019b).

A opção por utilizar 9% de biocarvão foi decorrente do fato de que, nessa proporção, as folhas das mudas de morangueiro produziram maior teor de flavonoides e a atividade da enzima fosfatase no substrato de cultivo foi beneficiada, conforme

resultados apresentados no capítulo I. Por sua vez, o uso da comunidade micorrízica se justificou por ela apresentar a maior quantidade de espécies fúngicas generalistas em solos cultivados com morangueiro, conforme Chiomento et al. (2019b).

4.3.3 Procedimentos

Optou-se por aplicar os tratamentos (FMA e biocarvão) em duas etapas: 1) na aclimatização das mudas; 2) no transplante para o local de cultivo. Para o fator micorrização, da quantidade total de inoculante de FMA usada (10 g), 1/2 foi aplicada na aclimatização das mudas e 1/2 no momento do transplante em vasos. Para o biocarvão dividiu-se a proporção de 9% do volume do recipiente de cultivo (vasos de 5 L) em 50 partes iguais. Esses 9% do volume do recipiente (5 L) corresponderam a 450 mL de biocarvão, dos quais 1/50 (9 mL) usou-se na aclimatização e 49/50 (441 mL) aplicou-se no momento do transplante das mudas.

Em março (outono) de 2019, decorridos seis meses do cultivo *in vitro*, as mudas de morangueiro obtidas (Figura 1 F) foram aclimatizadas em bandejas de poliestireno de 72 células (100 cm³/célula), preenchidas com o substrato comercial S10B[®] esterilizado (120 °C por 20 minutos) e com os tratamentos referentes à proporção de biocarvão (1/50 da proporção total) e à micorrização (1/2 da quantidade total = 5 g de inoculante na cova de plantio), para produzir as mudas de torrão. Além disso, uma amostra de 500 g do substrato S10B[®] contendo os tratamentos referentes ao biocarvão foi analisada para obtenção de seus atributos físicos, conforme Brasil (2007) (Tabela 3), e químicos, conforme Brasil (2014) (Tabela 4).

Tabela 3 - Caracterização física do substrato S10B[®] na ausência e presença das proporções de biocarvão. Passo Fundo - 2019

Substratos ¹	D ²	PT	EA	AFD	AT	AR
	(kg/m ³)					
S10B+0%B	241	0,861	0,459	0,155	0,024	0,223
S10B+9%B	237	0,859	0,380	0,234	0,021	0,224
100%B	147	0,915	0,329	0,434	0,013	0,139

Fonte: Dados do autor.

¹S10B+0%B: substrato S10B + 0% de biocarvão; S10B+9%B: substrato S10B + 9% de biocarvão; 100%B: biocarvão puro.

²D: densidade em base seca; PT = porosidade total; EA: espaço de aeração; AFD: água facilmente disponível; AT: água tamponante; AR: água remanescente.

Tabela 4 - Caracterização química do substrato S10B[®] na ausência e presença das proporções de biocarvão. Passo Fundo - 2019

Substrato ¹	N ²	P ₂ O ₅	K ₂ O	CO	pH	CE	CTC
	% (m/m)					mS/cm	mmol/kg
S10B+0%B	1,01	0,83	0,17	21,28	4,6	1,12	473,34
S10B+9%B	0,86	0,66	0,17	18,05	4,8	0,97	471,81
100%B	0,34	0,79	0,21	27,41	6,2	0,26	327,84

¹S10B+0%B: substrato S10B + 0% de biocarvão; S10B+9%B: substrato S10B + 9% de biocarvão; 100%B: biocarvão puro.

²N: nitrogênio; P₂O₅: pentóxido de fósforo; K₂O: óxido de potássio; CO: carbono orgânico; pH: potencial hidrogeniônico; CE: condutividade elétrica; CTC: capacidade de troca de cátions.

As bandejas foram mantidas em bancadas metálicas, a 1,2 m em relação à superfície do solo, em uma estufa agrícola de 90 m², com teto semicircular, instalada no sentido noroeste-sudeste. A estrutura de aço galvanizado era coberta com filme de polietileno de baixa densidade, com aditivo antiultravioleta e espessura de 150 micra, e as laterais revestidas com tela antiafídeos. A irrigação foi por aspersão, no sistema automatizado (*timer*), com vazão de 1,8 L/min por aspersor. A frequência de irrigação foi de sete vezes ao dia, com molhamento total de 14 minutos. A lâmina de água fornecida às mudas foi de 7,8 mm/dia.

Em maio (outono) de 2019, após oito semanas de aclimatização, as mudas de torrão produzidas, contendo parte dos tratamentos testados, foram transplantadas em vasos de polietileno (5 L), preenchidos com o substrato comercial S10B[®] esterilizado

(120 °C por 20 minutos), complementando com a outra parte dos tratamentos referentes à proporção de biocarvão (49/50 da proporção total) e à micorrização (1/2 da quantidade total). O biocarvão foi misturado ao substrato de cultivo. Para os tratamentos inoculados com FMA foram adicionadas mais 5 g de inoculante na cova de plantio das mudas, na ocasião do transplante nos vasos.

Os vasos foram mantidos em bancadas a 1,2 m em relação à superfície do solo, em uma estufa agrícola de 430 m², com teto semicircular, instalada no sentido noroeste-sudeste. A estrutura de aço galvanizado era coberta com filme de polietileno de baixa densidade, com aditivo antiultravioleta e espessura de 150 micra. A irrigação empregada no experimento foi localizada, por meio de hastes gotejadoras, no sistema automatizado, com vazão de 2,28 L/h por gotejador. O regime de irrigação consistiu no acionamento das hastes gotejadoras seis vezes ao dia, com molhamento total de doze minutos. As soluções nutritivas fornecidas às plantas, quinzenalmente, foram feitas conforme descrita por Furlani e Fernandes Júnior (2004), porém com redução de 50% no fornecimento de fósforo (Tabela 5) de acordo com De Nardi (2018). Por meio de uma miniestação meteorológica monitorou-se a temperatura do ar (mínima, média e máxima) no interior da estufa (Figura 2).

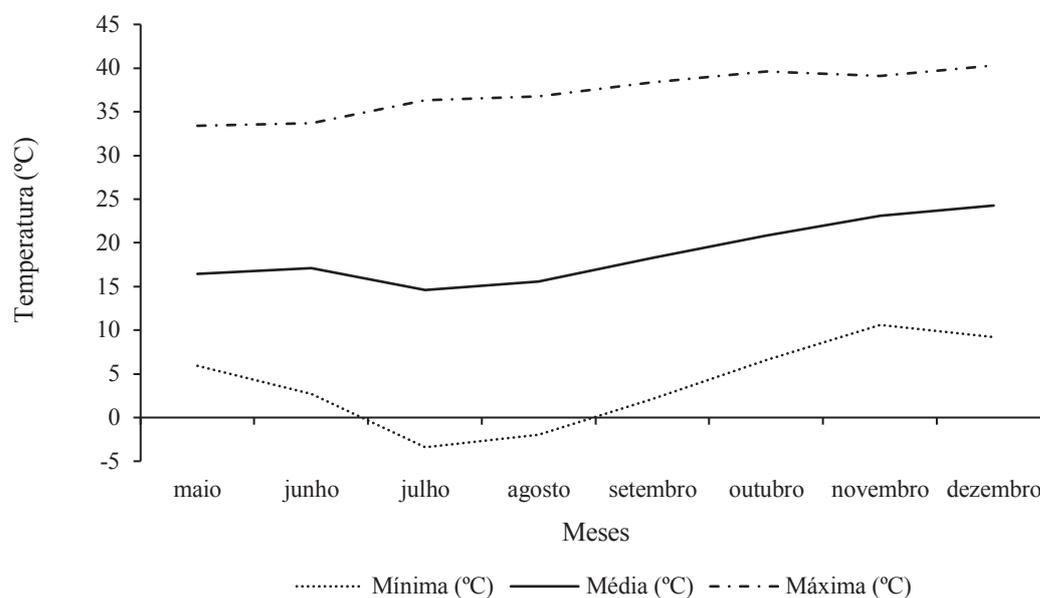
Tabela 5 - Composições de soluções nutritivas com redução de 50% no fornecimento de fósforo para o cultivo sem solo de morangueiro. Passo Fundo - 2019

Sais ou fertilizantes	Soluções nutritivas (g/L H ₂ O) ¹		
	A	B	C
Nitrato de cálcio	160	0	0
Nitrato de potássio	0	114	125
Fosfato monoamônio	0	15	0
Fosfato monopotássico	0	18	36
Sulfato de magnésio	0	120	120
Ácido bórico	0,6	0	0
Sulfato de cobre	0,06	0	0
Sulfato de manganês	0,4	0	0
Sulfato de zinco	0,2	0	0
Molibdato de sódio	0,06	0	0
Quelato de ferro (6% de Fe)	12	0	0

Fonte: Adaptada de Furlani e Fernandes Júnior (2004).

¹Soluções A e B: ministradas no estágio vegetativo; soluções A e C: ministradas no estágio reprodutivo.

Figura 2 - Temperaturas mínima, média e máxima mensais no interior da estufa agrícola durante a condução do experimento. Passo Fundo - 2019



4.3.3.1 Crescimento e colonização micorrízica das plantas de morangueiro

A parte aérea das plantas foi avaliada ao final do experimento (dezembro de 2019), sendo mensurados o diâmetro da coroa (DC, cm), com paquímetro digital, a altura da parte aérea (AP, cm), com régua, e as massas fresca (MFPA, g) e seca (MSPA, g) da parte aérea. Para obter a massa seca, as plantas foram mantidas em estufa com circulação forçada de ar, a 65 °C durante 48 horas, até massa constante, procedendo à pesagem em balança analítica.

Para avaliar o sistema radicial, após coletadas e lavadas em água para eliminar os fragmentos do substrato, as raízes foram digitalizadas por um scanner e as imagens analisadas pelo software WinRHIZO[®]. Os atributos avaliados foram o comprimento total de raízes (CT, cm), área superficial (AS, cm²) e volume radicial (VR, cm³). As raízes foram agrupadas pelo software em distintas classes de diâmetro em relação à sua extensão total (BÖHM, 1979): raízes muito finas (RMF, Ø < 0,5 mm), raízes finas (RF, Ø de 0,5 a 2 mm) e raízes grossas (RG, Ø > 2 mm). Também foram avaliadas a massa

fresca (MFR, g) e seca (MSR, g) do sistema radicial, seguindo a metodologia descrita anteriormente para a morfologia da parte aérea.

A qualidade das plantas foi obtida por modelos de desenvolvimento. Assim, foi determinado o índice de qualidade de Dickson (IQD), proposto por Dickson, Leaf e Hosner (1960), pela equação:

$$IQD = \frac{(MST)}{\left(\frac{H}{DC} + \frac{MSPA}{MSR}\right)} \quad (1)$$

onde: MST = massa seca total (g); H = altura da parte aérea (cm); DC = diâmetro da coroa (cm); MSPA = massa seca da parte aérea (g); MSR = massa seca da raiz (g).

Determinou-se também o conteúdo de massa seca da parte aérea (CMSPA, %) e do sistema radicial (CMSR, %), de acordo com Atif et al. (2016), pela equação:

$$CMS = \left(\frac{\text{massa seca}}{\text{massa fresca}}\right) \times 100 \quad (2)$$

Por fim, para verificar a capacidade infectiva dos FMA, porções de raízes foram preparadas de acordo com Phillips e Hayman (1970) e a porcentagem de colonização micorrízica (CM, %) foi determinada conforme Trouvelot, Kouch e Gianinazzi-Pearson (1986), pela equação:

$$CM (\%) = \frac{\text{número total de fragmentos com raízes micorrizadas}}{\text{número total de fragmentos}} \times 100 \quad (3)$$

4.3.3.2 Qualidade fitoquímica de morangos

A qualidade fitoquímica dos frutos foi avaliada no pico de maturação [novembro (primavera) de 2019], a partir da avaliação do teor de sólidos solúveis totais (SST), expresso em °brix, e da acidez total titulável (ATT), expressa em % de ácido cítrico, a partir de amostras de 100 g de frutos de cada repetição. O teor de SST foi determinado

em refratômetro analógico, enquanto que a ATT foi realizada de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Para avaliar o sabor dos frutos foi determinada a relação SST/ATT.

Os frutos colhidos no mês de novembro (cinco colheitas) foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados a -20 °C para o procedimento de extração de fitoquímicos, realizado conforme Revilla, Ryan e Martin-Ortega (1998), e quantificação dos teores de polifenóis totais (PFT), flavonoides totais (FT), antocianinas totais (AT) e atividade antioxidante (AA).

O teor de PFT foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999) e os resultados expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por 100 gramas de fruto fresco (mg EAG/100 g FF). O teor de FT, realizado conforme Miliuskas, Venskutonis e Van Beek (2004), foi expresso em miligramas de rutina por 100 gramas de fruto fresco (mg rutina/100 g FF). O teor de AT foi determinado pelo método de pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001; LEE; DURST; WROLSTAD, 2005) e os resultados expressos em miligramas de equivalente de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo por 100 gramas de fruto fresco (mg EP/100 g FF). A determinação da AA foi feita pelo poder de atividade redutora férrica (ZHU et al., 2002) e os resultados expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por 100 gramas de fruto fresco (mg EAG/100 g FF).

4.3.3.3 Produção de frutos

A partir da frutificação, em agosto (inverno) de 2019, foi avaliado o número total de frutos por planta (NTF, número/planta) e a produção total de frutos por planta (PT, g/planta), colhidos quando apresentavam de $\frac{3}{4}$ até totalmente maduros. Os frutos foram pesados em balança digital. A massa fresca média de frutos (MFMF, g) foi determinada pela divisão entre a PT e o NTF.

4.3.4 Análise de dados

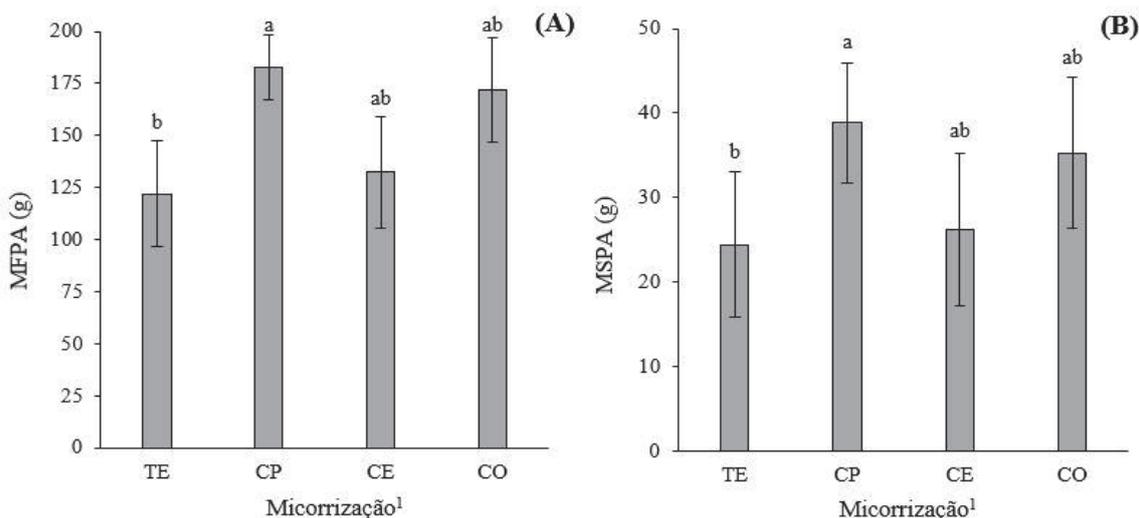
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando houve significância, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com auxílio do programa Costat[®].

4.4 Resultados

4.4.1 Crescimento e colonização micorrízica das plantas de moranguero

Com relação à parte aérea, os tratamentos não afetaram a altura das plantas (média de 27,9 cm) e o diâmetro da coroa (média de 5,5 cm). Diferenças foram constatadas apenas para o efeito da micorrização nos atributos massa fresca (MFPA) e massa seca (MSPA). Plantas micorrizadas apresentaram, em média, MFPA (Figura 3 A) e MSPA (Figura 3 B) superiores em 25% e 27%, respectivamente, em relação às não micorrizadas.

Figura 3 - Crescimento da parte aérea de plantas de moranguero, cultivar Albion, na presença e ausência de micorrização. A) massa fresca da parte aérea (MFPA); B) massa seca da parte aérea (MSPA). Passo Fundo - 2019



Nota: Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas acima das colunas indicam diferença pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$, $n = 4$).

¹TE: testemunha (sem micorrização); CP: *C. pellucida*; CE: *C. etunicatum*; CO: comunidade micorrízica (Tabela 2).

Quanto ao sistema radicial das plantas, o efeito da interação entre FMA e biocarvão foi constatado nas variáveis comprimento total (CT), raízes muito finas (RMF), raízes finas (RF) e raízes grossas (RG). Analisando os fatores de forma isolada, houve efeito significativo da micorrização na massa fresca (MFR), massa seca (MSR), área superficial (AS) e colonização micorrízica (CM). A presença do biocarvão também proporcionou diferenças significativas nos atributos MFR, MSR e CM.

No substrato sem biocarvão a comunidade micorrízica e a espécie fúngica *C. pellucida* melhoraram os atributos CT e RF (Tabela 6). Contudo, ao adicionar-se 9% de biocarvão no substrato a espécie fúngica *C. etunicatum* expressou-se com superioridade aos demais tratamentos fúngicos e à testemunha em relação a todos os atributos analisados. Portanto, o uso de 9% de biocarvão no substrato de cultivo potencializou a ação de *C. etunicatum*, mostrando que essa interação proporcionou os melhores resultados (Tabela 6). Por outro lado, na ausência de biocarvão a comunidade de FMA manifestou-se com superioridade em relação a todos os atributos avaliados (Tabela 6).

Tabela 6 - Associação de FMA e biocarvão quanto ao sistema radicial de plantas de morangueiro, cultivar Albion. Passo Fundo - 2019

Micorrização	CT (cm) ¹		RMF (cm)	
	Biocarvão (%)		Biocarvão (%)	
	0	9	0	9
Testemunha	264,00±99,09 Ba	393,62±63,61 Ab	96,47±53,17 Aa	155,87±26,88 Ab
<i>C. pellucida</i>	339,85±87,59 Aa	223,14±98,06 Ab	122,72±43,28 Aa	110,12±30,06 Ab
<i>C. etunicatum</i>	385,46±99,92 Ba	704,06±99,64 Aa	159,61±71,84 Ba	348,54±40,59 Aa
Comunidade	491,92±94,87 Aa	245,33±77,85 Bb	194,58±82,25 Aa	109,38±43,69 Ab
Média	380,92		162,16	
C.V. (%) ²	35,40		36,26	
Micorrização	RF (cm)		RG (cm)	
	Biocarvão (%)		Biocarvão (%)	
	0	9	0	9
Testemunha	80,27±28,46 Ba	136,25±37,92 Ab	87,14±21,99 Ab	101,39±19,47 Ab
<i>C. pellucida</i>	115,31±33,14 Aa	64,73±56,22 Ab	101,67±23,52 Ab	48,20±36,30 Ab
<i>C. etunicatum</i>	122,24±34,54 Ba	197,68±65,94 Aa	103,49±23,97 Ab	157,53±57,04 Aa
Comunidade	152,34±56,56 Aa	65,40±25,03 Bb	144,80±17,97 Aa	70,35±23,68 Bb
Média	116,78		101,82	
C.V. (%)	36,55		29,92	

Nota: Dados apresentados como média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$, $n = 4$).

¹CT: comprimento total radicial; RMF: raízes muito finas; RF: raízes finas; RG: raízes grossas.

²Coefficiente de variação.

Plantas micorrizadas apresentaram AS superior em 31% quando comparadas às plantas cultivadas sem FMA (Tabela 7). Plantas inoculadas com a espécie fúngica *C. pellucida* e com a comunidade micorrízica apresentaram sistema radicial mais robusto em relação às plantas desprovidas da micorriza arbuscular e também em relação às plantas cultivadas com *C. etunicatum* (Tabela 7). Essa superioridade foi, em média, de 45% para MFR e 54% para MSR em relação à testemunha e, em média, de 28% para MFR e 35% para MSR quanto ao isolado *C. etunicatum* (Tabela 7). Contribuição positiva também foi verificada quando as plantas foram cultivadas com 9% de biocarvão, ao apresentarem MFR, MSR e CM superior em 23%, 26% e 10%, respectivamente, em relação às plantas cultivadas sem essa biotecnologia (Tabela 7). As estruturas de FMA observadas nas raízes foram hifas, vesículas e arbúsculos (Figura 4).

Tabela 7 - Efeito da micorrização e do biocarvão no sistema radicial de plantas de morangueiro, cultivar Albion. Passo Fundo - 2019

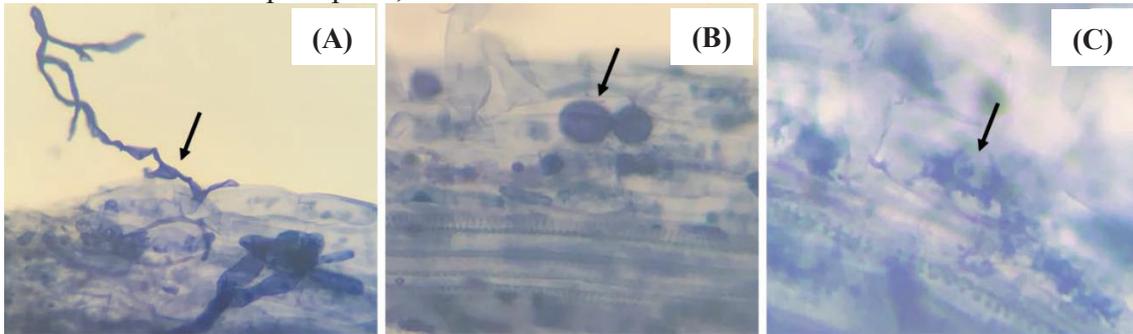
Micorrização	MFR (g) ¹	MSR (g)	AS (cm ²)	CM (%)
Testemunha	36,58±12,71 c	5,36±2,25 c	408,34±123,55 b	0,00±0,00 b
<i>C. pellucida</i>	75,15±24,09 a	13,52±5,81 a	587,73±84,63 a	82,50±11,65 a
<i>C. etunicatum</i>	48,36±11,29 b	7,50±2,15 b	590,60±126,32 a	83,75±9,16 a
Comunidade	58,80±14,50 ab	9,73±2,93 ab	603,96±149,10 a	80,00±7,56 a
Biocarvão (%)				
0	47,44±14,51 b	7,65±2,79 b	523,67±127,36 a	58,75±34,23 b
9	62,00±24,67 a	10,41±5,60 a	571,65±157,23 a	65,62±38,47 a
Média	54,72	9,03	574,66	62,18
C.V. (%) ²	24,97	35,33	20,09	11,58

Nota: Dados apresentados como média ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$, $n = 4$).

¹MFR: massa fresca da raiz; MSR: massa seca da raiz; AS: área superficial radicial; CM: colonização micorrízica.

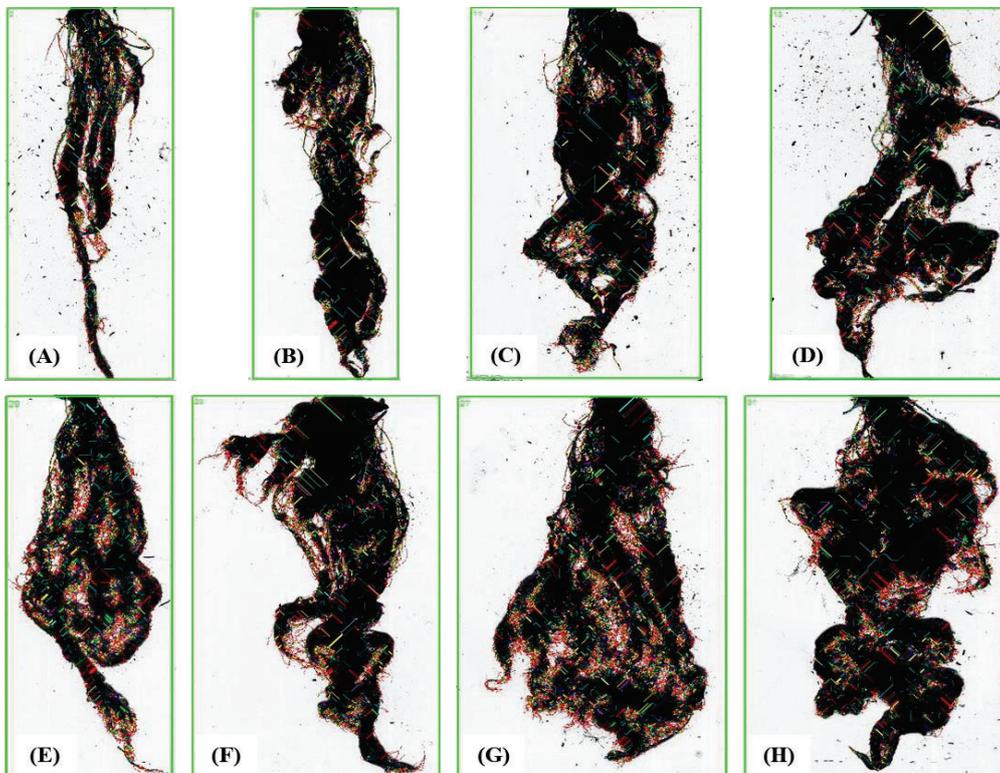
²Coefficiente de variação.

Figura 4 - Estruturas de FMA visualizadas em raízes de morangueiro, cultivar Albion, referentes a hifas (A), vesículas (B) e arbúsculos (C). Observação em microscópio óptico, com aumento de 400x. Passo Fundo - 2019



O sistema radicular das plantas produzidas com FMA e biocarvão, registrada pelo software WinRHIZO[®] acoplado a um scanner, é apresentada na Figura 5.

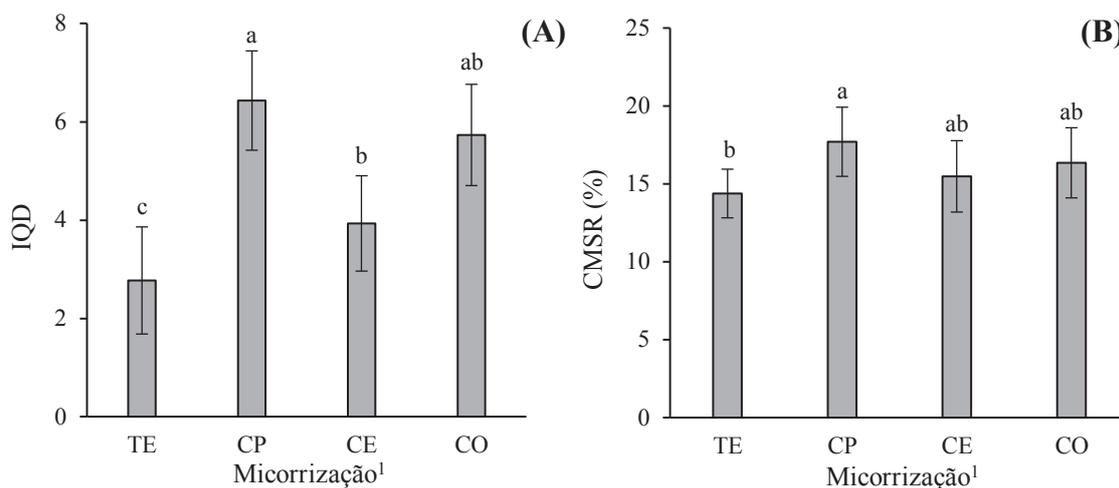
Figura 5 - Morfologia do sistema radicular de plantas de morangueiro, cultivar Albion. A) sem biocarvão e FMA; B) sem biocarvão e com *C. pellucida*; C) sem biocarvão e com *C. etunicatum*; D) sem biocarvão e com comunidade micorrízica; E) com biocarvão e sem FMA; F) com biocarvão e *C. pellucida*; G) com biocarvão e *C. etunicatum*; H) com biocarvão e comunidade micorrízica. Passo Fundo - 2019



Para os atributos definidos para avaliar a qualidade das plantas, não houve efeito da interação entre FMA e biocarvão, mas a micorrização, de forma independente, afetou o índice de qualidade de Dickson (IQD) e o conteúdo de massa seca do sistema radicular (CMSR) e o biocarvão o IQD.

Plantas micorrizadas apresentaram, em média, IQD (Figura 6 A) e CMSR (Figura 6 B) superiores em 48% e 40%, respectivamente, em relação àquelas não micorrizadas. Plantas produzidas com 9% de biocarvão apresentaram IQD superior em 27% (Figura 7).

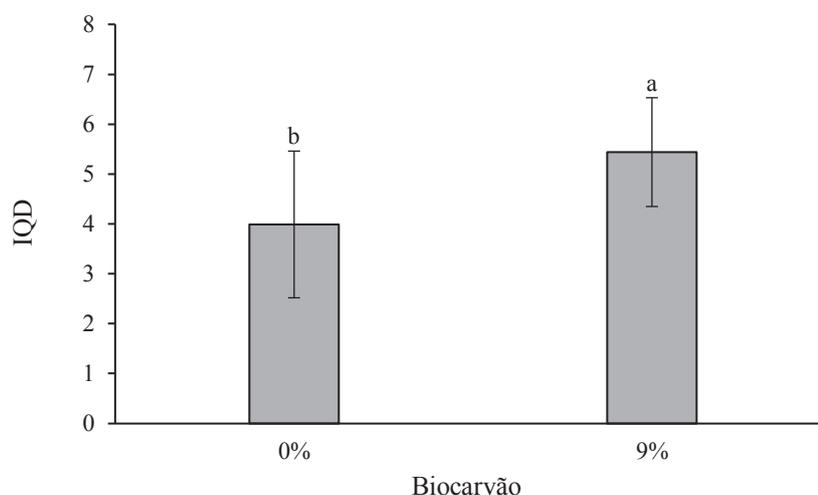
Figura 6 - Qualidade de plantas de morangueiro, cultivar Albion, na presença e ausência de micorrização. A) índice de qualidade de Dickson (IQD); B) conteúdo de massa seca do sistema radicular (CMSR). Passo Fundo - 2019



Nota: Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas acima das colunas indicam diferença pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$, $n = 4$).

¹TE: testemunha (sem micorrização); CP: *C. pellucida*; CE: *C. etunicatum*; CO: comunidade micorrízica (Tabela 2).

Figura 7 - Efeito do biocarvão no índice de qualidade de Dickson (IQD) de plantas de morangueiro, cultivar Albion. Passo Fundo - 2019



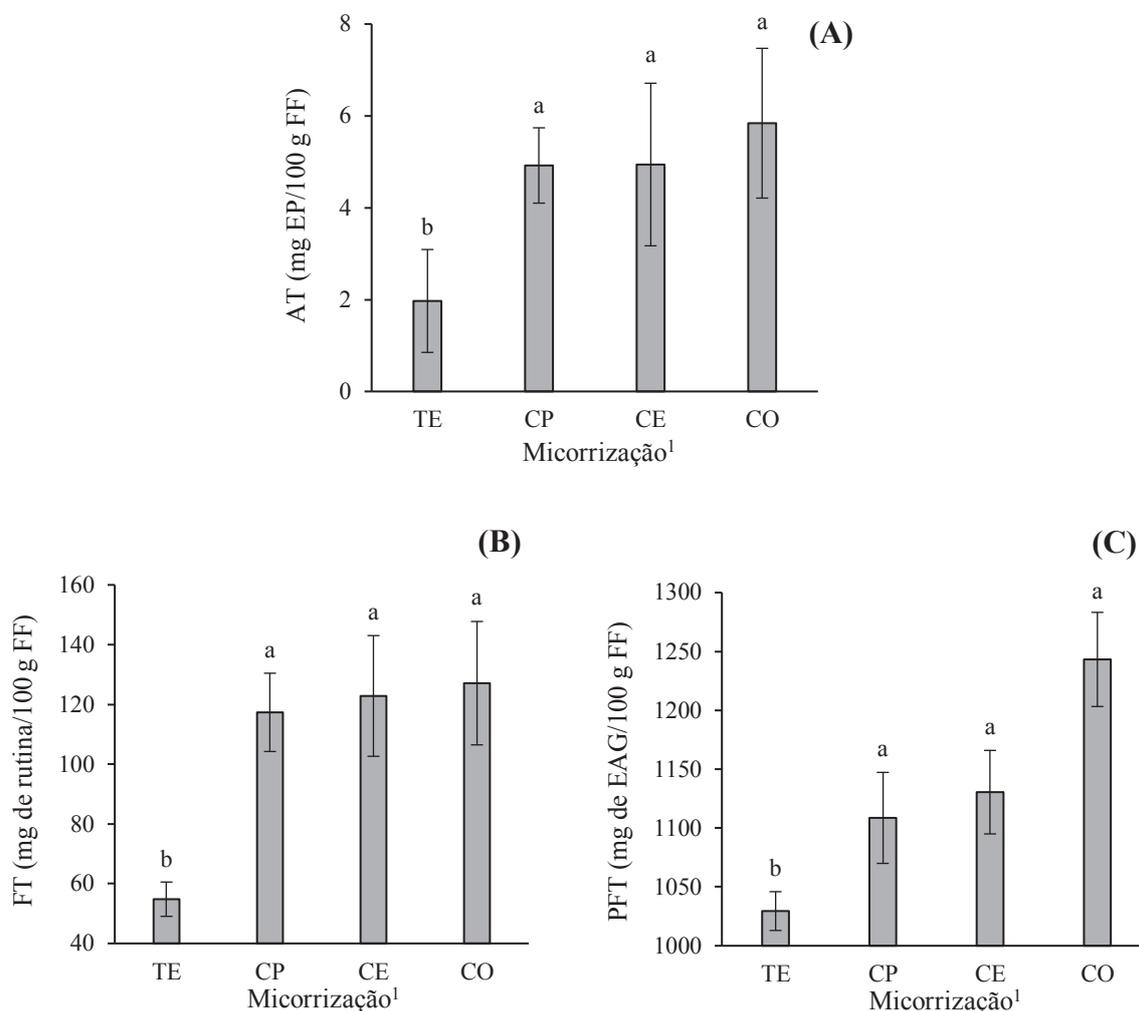
Nota: Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas acima das colunas indicam diferença pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$, $n = 4$).

4.4.2 Qualidade fitoquímica de morangos

A qualidade fitoquímica de frutos não apresentou variação significativa para o efeito do biocarvão e nem para a interação entre FMA e biocarvão. Por sua vez, a micorrização gerou efeitos sobre as antocianinas totais (AT), flavonoides totais (FT) e polifenóis totais (PFT). Para os demais atributos avaliados os valores médios obtidos foram de 7,30 °brix para sólidos solúveis totais (SST), 0,69% para acidez total titulável (ATT), 10,80 para a relação SST/ATT e 504,48 mg EAG/100 g FF para a atividade antioxidante (AA).

Plantas micorrizadas produziram frutos que apresentaram, em média, teores de AT (Figura 8 A), FT (Figura 8 B) e PFT (Figura 8 C) superiores em 62%, 55% e 11%, respectivamente, em relação aos frutos de plantas não micorrizadas.

Figura 8 - Teores totais de fitoquímicos em frutos de morangueiro, cultivar Albion, na presença e ausência de micorrização. A) antocianinas totais (AT); B) flavonoides totais (FT); C) polifenóis totais (PFT). Passo Fundo - 2019



Nota: Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas acima das colunas indicam diferença pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$, $n = 4$).

¹TE: testemunha (sem micorrização); CP: *C. pellicuda*; CE: *C. etunicatum*; CO: comunidade micorrizica (Tabela 2).

4.4.3 Produção de frutos

Os tratamentos, de forma isolada ou combinada, não apresentaram diferenças significativas sobre as variáveis relacionadas à produção de frutos (Tabela 8). Independente do uso de biocarvão ou de FMA no substrato de cultivo, com aproximadamente cinco meses de colheita, o número total de frutos (NTF) foi de $62,3 \pm$

11,4 frutos/planta, a produção total por planta (PT) foi de 816,8 g \pm 92,9 g e a massa fresca média dos frutos (MFMF) foi de 13,1 g \pm 1,5 (Tabela 8).

Tabela 8 - Rendimento de frutos de morangueiro, cultivar Albion, de plantas crescidas com FMA e biocarvão. Passo Fundo - 2019

Micorrização	NTF (número/planta) ¹	PT (g/planta)	MFMF (cm ²)
Testemunha	59,95 \pm 11,57 ^{ns}	793,54 \pm 92,50 ^{ns}	13,27 \pm 1,98 ^{ns}
<i>C. pellucida</i>	62,95 \pm 10,91	859,77 \pm 90,70	13,71 \pm 1,54
<i>C. etunicatum</i>	60,12 \pm 11,55	812,25 \pm 91,58	13,48 \pm 1,23
Comunidade	59,95 \pm 12,20	801,78 \pm 94,17	12,11 \pm 1,99
Biocarvão (%)			
0	62,79 \pm 11,67 ^{ns}	816,97 \pm 92,54 ^{ns}	13,09 \pm 1,63 ^{ns}
9	61,96 \pm 10,75	816,70 \pm 91,61	13,19 \pm 1,73
Média	62,38	816,83	13,14
C.V. (%) ²	12,57	13,47	8,30

Nota: Dados apresentados como média \pm desvio padrão; ^{ns} não significativo.

¹NTF: número total de frutos por planta; PT: produção total de frutos por planta; MFMF: massa fresca média de frutos.

²Coefficiente de variação.

4.5 Discussão

O uso extensivo de insumos químicos, principalmente fertilizantes, é um problema em todo o mundo. Essa dificuldade aumenta quando trabalha-se com o cultivo em substrato em sistemas abertos (hidroponia). Esses fertilizantes, além de contaminar o solo, se não forem bem administrados podem ter efeitos negativos na fisiologia e bioquímica, base do metabolismo das plantas. Assim, o biocarvão foi reconhecido por aumentar o armazenamento de água (KOIDE et al., 2015) e a disponibilidade de nutrientes (OLMO et al., 2016), além de potencializar a ação dos FMA (GÜEREÑA et al., 2015; LUO et al., 2017; MICKAN et al., 2016), beneficiando o cultivo das plantas.

Nesse estudo o biocarvão (9%) associado aos FMA (espécie *C. etunicatum*) incrementaram a morfologia do sistema radicial (Tabela 6) e a micorrização mostrou efeito positivo no ciclo produtivo do morangueiro cultivado em substrato (Figuras 3, 6 e

8; Tabela 7). Esses resultados são os primeiros que reportam a adição de biocarvão em substrato juntamente com a inoculação de micorrizas no cultivo hidropônico de morangueiro.

Sugere-se que o resultado positivo da espécie fúngica *C. etunicatum* na presença de 9% de biocarvão possa ser explicado pela diminuição de P_2O_5 (0,66%) e dos sais (0,97 mS/cm) nesse meio de crescimento em relação ao substrato que não continha o carvão vegetal (0,83% de P_2O_5 e 1,12 mS/cm, respectivamente) (Tabela 4). Adicionalmente, a presença de biocarvão aumentou a água facilmente disponível para $0,234 \text{ m}^3/\text{m}^3$ (Tabela 3) em relação ao meio de crescimento contendo apenas com o substrato ($0,155 \text{ m}^3/\text{m}^3$).

Outras pesquisas reportaram o benefício da micorrização ao sistema radicial do morangueiro (CHIOMENTO et al., 2019a; FAN et al., 2011; SINCLAIR et al., 2014). Devido à plasticidade das raízes, suas características podem ser moduladas por diversos fatores, incluindo os FMA (HODGE et al., 2009). Durante o processo simbiótico, para que ocorra a associação entre o hospedeiro e o fungo, uma cascata de sinalizações é iniciada, incluindo um fator difusível dos FMA chamado de “fator Myc” (quitoligossacarídeos), que estimula a formação de raízes mais finas (OLÁH et al., 2005), alterando a morfologia radicial das plantas.

As modificações radiciais sob micorrização podem estar relacionadas à alocação de açúcares às raízes (WU; LI; ZOU, 2011) e à regulação hormonal (ZOU et al., 2017), independente da sinalização simbiótica (GUTJAHR; CASIERI; PASZKOWSKI, 2009). A micorriza arbuscular causa mudanças morfológicas, nutricionais e fisiológicas nas plantas hospedeiras para combater o estresse e melhorar o crescimento e o vigor das plantas (ALQARAWI; ABD-ALLAH; HASHEM, 2014). Porém, mais importante é que os FMA modificam a arquitetura das raízes para melhorar o acesso à água e aos nutrientes (WU et al., 2010).

A adição de biocarvão no substrato de cultivo resultou em um aumento no desenvolvimento das raízes das plantas (Tabela 7). Esses resultados estão de acordo

com aqueles obtidos por De Tender et al. (2016), que apontaram algumas explicações sobre como o biocarvão pode beneficiar o sistema radicial das plantas: (1) apresentar um efeito de adição de nutrientes, ou seja, pode atuar como fertilizante no meio de cultivo; (2) atuar de forma indireta nas propriedades da planta alterando o microbioma da rizosfera, observado nesse estudo pelo aumento significativo da colonização micorrízica em raízes de plantas cultivadas com biocarvão (Tabela 7); (3) pode apresentar uma resposta direta ou indireta (pelo seu efeito no microbioma da rizosfera) na via da auxina da planta. A auxina relaciona-se com o desenvolvimento da raiz da planta (OVERVOORDE; FUKAKI; BEECKMAN, 2010) e já reportou-se que o uso de biocarvão no meio de crescimento vegetal pode induzir genes relacionados à auxina (VIGER et al., 2014).

Por fim, detectou-se que plantas cultivadas com 9% de biocarvão e inoculadas com a espécie fúngica *C. etunicatum* apresentaram sistema radicial mais profuso (Tabela 6). Quando a interface FMA-biocarvão demonstra melhorar o crescimento e o desenvolvimento das plantas, uma série de possíveis mecanismos tem sido sugerida para explicar esses benefícios (JAAFAR; CLODE; ABBOTT, 2014), porém tais mecanismos são pouco compreendidos (SOLAIMAN; ABBOTT; MURPHY, 2019). Warnock et al. (2007) sintetizaram em quatro mecanismos como o biocarvão pode afetar a ação de FMA: (1) mudanças nas propriedades físicas e químicas do solo/substrato; (2) alteração da atividade de outros microrganismos que afetam as micorrizas; (3) mudanças na dinâmica de sinalização entre plantas e micorrizas; (4) refúgio para fungos e bactérias colonizadores. Nesse estudo o efeito conjunto de FMA e biocarvão no sistema radicial das plantas (Tabela 6) pode ter sido causado por um desses mecanismos ou pela combinação dos mesmos.

A micorrização não beneficiou significativamente a produção de morangos. Porém, destaca-se que entre as plantas inoculadas, a maior produção foi observada naquelas desenvolvidas na presença da espécie fúngica *C. pellucida*, que produziram 8% a mais em relação às plantas não inoculadas com FMA (Tabela 8), mostrando incremento na produção em 66,23 g/planta. Considerando a inserção de 6.300 plantas em uma estufa de 500 m² (com 16 bancadas, duas linhas de cultivo por bancada e

espaçamento entre plantas de 25 cm) esses 66,23 g/planta representam um acréscimo na produção de 417,25 kg/estufa de 500 m². Isso corresponderia a um aumento de 0,83 kg/m², ou seja, 8,3 t/ha, o que se torna bastante rentável do ponto de vista dos moranguicultores. Por outro lado, comprovou-se o benefício da micorrização na qualidade fitoquímica dos morangos pelo aumento nos teores totais de antocianinas, flavonoides e polifenóis (Figura 8), conforme já relatado em outras pesquisas (CASTELLANOS-MORALES et al., 2010; CECATTO et al., 2016; CHIOMENTO et al., 2019a; LINGUA et al., 2013; PARADA et al., 2019).

A dinâmica desses microrganismos no metabolismo secundário das plantas resulta na biossíntese reforçada de fitoquímicos com propriedades benéficas à saúde (BASU; RABARA; NEGI, 2018). Essas maiores concentrações de fitoquímicos nos frutos (Figura 8) podem ser atribuídas à ativação de uma resposta de defesa do morangueiro à colonização micorrízica (LINGUA et al., 2013), observada nas raízes das plantas analisadas (Tabela 7).

Na indústria hortícola, o foco dos produtores tem sido tradicionalmente o rendimento (BAUM; EL-TOHAMY; GRUDA, 2015). No entanto, a demanda dos consumidores por alimentos de qualidade está aumentando e se tornará a força motriz no futuro (WILLETT et al., 2019). Nas últimas décadas houve um aumento do interesse pelo consumo de frutos do tipo bagas, as quais contêm as melhores fontes de compostos bioativos (SKROVANKOVA et al., 2015), como é o caso do morango. Os valores nutricionais e as propriedades benéficas de compostos bioativos do morango fazem dele um fruto bastante consumido (ARIZA et al., 2016). Essas substâncias bioativas reduzem o estresse oxidativo e neutralizam a superprodução de espécies reativas de oxigênio, que estão relacionadas à ocorrência de várias doenças (ATMANI et al., 2009). Assim, a ingestão de morangos ricos em fitoquímicos promove cardioproteção (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2014), proteção contra o câncer (CHEN; LI, 2006) e aumenta as propriedades antidiabéticas (PINTO et al., 2010).

Esses efeitos na saúde humana têm sido relacionados à atividade antioxidante de compostos fenólicos, principalmente de antocianinas (OLSSON et al., 2006), que foram

detectadas nesse estudo (Figura 8 A). Além dos aspectos bioativos, a análise quantitativa de antocianinas em morangos é importante por serem responsáveis pela cor vermelha dos frutos e esse atributo influenciar na preferência do consumidor (WOJDYŁO; OSZMIAŃSKI; BOBER, 2008), com impacto positivo no rendimento dos produtores (LINGUA et al., 2013).

Como diferencial de outras pesquisas realizadas com morangueiro, que usaram apenas os gêneros *Claroideoglomus* ou *Glomus* como inoculantes, os resultados desse estudo são inéditos porque as plantas também foram inoculadas com uma comunidade micorrízica proveniente de solos adaptados ao cultivo de morangueiro (Tabela 2) e com a espécie fúngica *C. pellucida*. Um dos fatores que influencia os efeitos positivos da micorriza arbuscular é a escolha da espécie fúngica (FORTUNA et al., 1992). Assim, gêneros, espécies e isolados de FMA precisam ser estudados quanto ao seu potencial biotecnológico para beneficiar o crescimento/desenvolvimento do simbionte vegetal antes de serem usados comercialmente (TAYLOR; HARRIER, 2001). Inoculantes comerciais à base de FMA geralmente são formados por apenas uma ou algumas espécies, que podem ou não estar bem adaptadas às condições onde são aplicadas (GARLAND; SCHROEDER-MORENO, 2011). No caso da cultura do morangueiro, a micorrização pode produzir diferentes respostas em termos de crescimento e produção/qualidade de frutos (CHIOMENTO et al., 2019a; VESTBERG, 1992). Portanto, os únicos estudos sobre levantamentos de FMA em solos cultivados com morangueiro (CHIOMENTO et al., 2019b; PEDERSEN et al., 2017) são importantes para eleger espécies fúngicas que tenham afinidade com essa hortícola. O uso de FMA compatíveis com o hospedeiro comumente fornece resultados mais satisfatórios (KORON; SONJAK; REGVAR, 2014).

Considerando a preferência das pessoas pelo consumo de alimentos funcionais, os resultados desse estudo confirmaram o potencial de aplicar a biotecnologia micorrízica no morangueiro como uma ferramenta valiosa para melhorar os teores totais de antocianinas, flavonoides e polifenóis nos frutos. Ainda, os resultados apontaram para a possibilidade de usar os FMA e o biocarvão no morangueiro para beneficiar o sistema radicular das plantas. Portanto, essas investigações preenchem em parte a lacuna

existente entre a engenharia do biocarvão e sua aplicação combinada com os FMA no cultivo do morangueiro em substrato.

4.6 Conclusões

Conclui-se que a adição combinada de FMA e biocarvão no meio de crescimento pode ser uma opção para o cultivo do morangueiro em substrato porque esta interface beneficia o desempenho do sistema radicial. O uso destas biotecnologias torna o sistema radicial mais profuso em plantas cultivadas com 9% de biocarvão e inoculadas com a espécie fúngica *C. etunicatum*. Contudo, a comunidade micorrízica se expressa melhor em substrato sem biocarvão. Em adição, de forma isolada a micorrização promove o principal efeito durante o ciclo produtivo do morangueiro. O uso de FMA melhora o crescimento fitométrico das plantas e potencializa a qualidade fitoquímica dos frutos. Dentre os FMA usados neste estudo, a espécie fúngica *C. pellucida* apresenta maior grandeza em relação à testemunha, pois beneficia as biomassas aérea e radicial das plantas. O uso de biocarvão no cultivo do morangueiro melhora a colonização micorrízica, a biomassa radicial e a qualidade das plantas. Dessa forma, uma maior compreensão da aplicação e dos benefícios da interface FMA-biocarvão pode ser uma alternativa para potencializar a sustentabilidade do sistema de cultivo do morangueiro. Práticas bem-sucedidas para usar o biocarvão dependem da resposta da planta como também do seu custo ao ser incorporado no meio de cultivo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os benefícios combinados dos FMA e do biocarvão sejam mais fortes que o efeito único de cada um, a maioria dos estudos se concentrou em investigar cada uma dessas ferramentas biotecnológicas de forma isolada. Assim, como as informações sobre a dinâmica de associação entre FMA e biocarvão eram inexistentes para o cultivo do morangueiro, esta pesquisa representou a primeira tentativa de compreender o potencial hortícola de utilização dessas biotecnologias nas fases de produção de mudas (capítulo I) e de cultivo (capítulo II), utilizando a cultivar Albion. Estes resultados são importantes para fortalecer a produção sustentável de morangos em todo o mundo.

O trabalho confirma os efeitos positivos dos FMA e do biocarvão no crescimento, desenvolvimento e qualidade fitoquímica na fase de aclimatização *ex vitro* de mudas e durante o ciclo produtivo do morangueiro cultivado em substrato e em ambiente protegido, sinalizando que a interface FMA-biocarvão pode ser uma alternativa importante para melhorar o cultivo desta hortícola. A associação entre estas duas biotecnologias aplicadas na formação de mudas de morangueiro (capítulo I) indica que a adição de 9% de biocarvão no substrato de cultivo aliada ao uso de FMA potencializam o conteúdo de flavonoides totais nas folhas das mudas e aumentam a atividade da enzima fosfatase no substrato de cultivo. Já no ciclo produtivo do morangueiro (capítulo II), plantas cultivadas com 9% de biocarvão e inoculadas com a espécie fúngica *C. etunicatum* apresentam sistema radicial mais robusto, com maior quantidade de raízes finas.

Ao analisar apenas o efeito da micorrização no morangueiro, observa-se que o uso de FMA beneficia a composição fitoquímica das mudas (capítulo I) e dos frutos (capítulo II) e melhora o crescimento fitométrico das plantas (capítulo II). A essência da associação micorrízica é o benefício na produção e qualidade de culturas hortícolas de forma ambientalmente sustentável. Entretanto, neste trabalho e em outros estudos desenvolvidos pela equipe do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal da UPF (CECATTO

et al., 2016; CHIOMENTO et al., 2019a; DE NARDI, 2018, p. 38-57; PEDERSEN, 2016, p. 68-95) não foi possível encontrar o benefício da micorrização, de forma conjunta, no rendimento e na qualidade de morangos. No entanto, considerando que o custo para produzir uma planta de morangueiro no cultivo em substrato corresponde a R\$ 6,00/planta, que em estufa de 500 m² são cultivadas 6.300 plantas e que o produtor venda os frutos a R\$ 20,00/kg, o incremento de 417,25 kg nessa área representa uma redução em 22% no custo de produção.

Constata-se, também, que a adição de 9% de biocarvão no cultivo do morangueiro melhora a colonização micorrízica, a biomassa radicial e a qualidade das plantas (capítulo II). Destaca-se que o grupo de pesquisa do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal da UPF é o primeiro a investigar o desempenho de morangueiro produzido com biocarvão. Embora identificada que a proporção de 9% para ser usada em substrato na configuração experimental do capítulo I, que incrementou o teor de fitoquímicos das mudas de morangueiro (Figura 3 B, capítulo I) e a atividade da enzima fosfatase no substrato de cultivo (Figura 7 A, capítulo I), atualmente não existe uma dose padrão recomendada para uso de biocarvão em substrato.

Apesar da adição de 9% de biocarvão ter beneficiado o morangueiro, observa-se que há uma resposta linear crescente para o teor de flavonoides totais (Figura 3 B, capítulo I) e para a enzima fosfatase (Figura 7 A, capítulo I) em função das proporções de biocarvão usadas, o que indica que maiores doses poderiam originar melhores resultados em mudas e plantas. No entanto, a adição de maiores proporções do biocarvão no meio de crescimento vegetal (>20% do volume do recipiente) parece fornecer resultados insatisfatórios quanto ao crescimento e desenvolvimento das plantas e à atividade microbiana. As dosagens para o biocarvão relacionam-se com vários fatores, os quais precisam ser investigados em diferentes cenários, incluindo variação nas propriedades físicas e químicas do biocarvão, substrato e diferenças nas respostas de diferentes espécies vegetais.

O biocarvão ainda não é produzido em larga escala (comercialmente) no Brasil. O que é produzido nacionalmente visa atender às demandas de pesquisadores, que são

os responsáveis por investigarem como introduzir o biocarvão no cultivo de plantas de forma eficiente. A produção desta biotecnologia é feita por poucas empresas e também pelos próprios pesquisadores em laboratórios. Assim, o preço do biocarvão torna-se elevado (aproximadamente R\$ 7,50/L) em comparação a outros substratos comerciais (aproximadamente R\$ 1,00/L). No entanto, acredita-se que no momento em que o uso do biocarvão tornar-se mais frequente o preço será mais acessível aos produtores.

Finalmente, cientistas, horticultores e indústrias precisam colaborar para potencializar o uso de FMA e de biocarvão como ferramentas sustentáveis para melhorar o crescimento e o desenvolvimento do morangueiro cultivado em substrato e em ambiente protegido. Pesquisas futuras devem se concentrar em: (1) investigar maiores proporções de biocarvão (até 20% do volume do recipiente, por exemplo); (2) entender a interação entre cepas de FMA, cultivares de morangueiro e adição de biocarvão para selecionar as melhores combinações; (3) avaliar a eficiência da micorrização e do biocarvão em condições de múltiplos fatores estressantes (déficits hídrico e nutricional, por exemplo).

6 CONCLUSÃO GERAL

Em conclusão, este é o primeiro estudo a fornecer informações sobre a interface FMA-biocarvão na fase de aclimatização *ex vitro* de mudas e durante o ciclo produtivo do morangueiro cultivado em substrato. O principal efeito no potencial hortícola de mudas e de plantas de morangueiro, cultivar Albion, é proporcionado pela micorrização. O uso de FMA potencializa a composição fitoquímica das mudas e dos frutos e melhora o crescimento fitométrico das plantas. A adição de biocarvão no substrato melhora a colonização micorrízica, a biomassa radicial e a qualidade das plantas. Considerando a dinâmica entre as duas biotecnologias aplicadas na formação de mudas de morangueiro, a adição de 9% de biocarvão no substrato combinada ao uso de FMA melhoram o conteúdo de flavonoides totais em folhas das mudas e beneficiam a atividade da enzima fosfatase no substrato de cultivo. Em adição, substrato com até 6% de biocarvão e com micorrizas apresenta maior ação da enzima β -glucosidase. No ciclo produtivo do morangueiro, plantas cultivadas com 9% de biocarvão e inoculadas com a espécie fúngica *C. etunicatum* apresentam sistema radicial mais profuso. Contudo, a comunidade micorrízica se expressa melhor em substrato sem biocarvão. O uso destas biotecnologias na fase de aclimatização e durante o ciclo produtivo do morangueiro cultivado em substrato pode ser uma alternativa para promover uma agricultura hortícola mais sustentável e isso incentivará uma revolução na indústria de plantas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, T.; RIZWAN, M.; ALI, S.; ADREES, M.; MAHMOOD, A.; REHMAN, M. Z.; IBRAHIM, M.; ARSHAD, M.; QAYYUM, M. F. Biochar application increased the growth and yield and reduced cadmium in drought stressed wheat grown in an aged contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 825-833, 2018.
- ABD-ALLAH, E. F.; HASHEM, A.; ALQARAWI, A. A.; BAHKALI, A. H.; ALWHIBI, M. S. Enhancing growth performance and systemic acquired resistance of medicinal plant *Sesbania sesban* (L.) Merr using arbuscular mycorrhizal fungi under salt stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, p. 274-283, 2015.
- ADOLFSSON, L.; NZIENGUI, H.; ABREU, I. N.; ŠIMURA, J.; BEEBO, A.; HERDEAN, A.; ABOALIZADEH, J.; ŠIROKÁ, J.; MORITZ, T.; NOVÁK, O.; JUNG, K.; SCHOEFS, B.; SPETEA, C. Enhanced secondary- and hormone metabolism in leaves of arbuscular mycorrhizal *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, v. 175, p. 392-411, 2017.
- AHMAD, M.; LEE, S. S.; LIM, J. E.; LEE, S. E.; CHO, J. S.; MOON, D. H.; HASHIMOTO, Y.; OK, Y. S. Speciation and phytoavailability of lead and antimony in a small arms range soil amended with mussel shell, cow bone and biochar: EXAFS spectroscopy and chemical extractions. **Chemosphere**, v. 95, p. 433-441, 2014.
- AKHTER, A.; HAGE-AHMED, K.; SOJA, G.; STEINKELLNER, S. Compost and biochar alter mycorrhization, tomato root exudation, and development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 529, 2015.
- ALQARAWI, A. A.; ABD-ALLAH, E. F.; HASHEM, A. Alleviation of salt-induced adverse impact via mycorrhizal fungi in *Ephedra aphylla* Forssk. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 802-810, 2014.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GIAMPIERI, F.; TULIPANI, S.; CASOLI, T.; DI STEFANO, G.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; BUSCO, F.; QUILES, J. L.; CORDERO, M. D.; BOMPADRE, S.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, p. 289-294, 2014.

ANDRADE, C. A. W.; MIGUEL, A. C. A.; SPRICIGO, P. C.; DIAS, C. T. S.; JACOMI, A. P. Comparison of quality between organic and conventional strawberries from multiple farms. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 2, e-045, 2017.

ARIZA, M. T.; REBOREDO-RODRÍGUEZ, P.; MAZZONI, L.; FORBES-HERNÁNDEZ, T. Y.; GIAMPIERI, F.; AFRIN, S.; GASPARRINI, M.; SORIA, C.; MARTÍNEZ-FERRI, E.; BATTINO, M.; MEZZETTI, B. Strawberry achenes are an important source of bioactive compounds for human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, e-1103, 2016.

ATIF, M. J.; JELLANI, G.; MALIK, M. H. A.; SALEEM, N.; ULLAH, H.; KHAN, M. Z.; IKRAM, S. Different growth media effect the germination and growth of tomato seedlings. **Science, Technology and Development**, v. 35, n. 3, p. 123-127, 2016.

ATKINSON, C. J.; FITZGERALD, J. D.; HIPPS, N. A. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1-2, p. 1-18, 2010.

ATMANI, D.; CHAHER, N.; ATMANI, D.; BERBOUC, M.; DEBBACHE, N.; BOUDAUD, H. Flavonoids in human health: from structure to biological activity. **Current Nutrition & Food Science**, v. 5, p. 225-237, 2009.

BAGHERI, V.; SHAMSHIRI, M. H.; SHIRANI, H.; ROOSTA, H. R. Effect of mycorrhizal inoculation on ecophysiological responses of pistachio plants grown under different water regimes. **Photosynthetica**, v. 49, p. 531-538, 2011.

BAILEY, V. L.; FANSLER, S. J.; SMITH, J. L.; BOLTON, H. J. Reconciling apparent variability in effects of biochar amendment on soil enzyme activities by assay optimization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 296-301, 2011.

BASLAM, M.; GOICOECHEA, N. Water deficit improved the capacity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidant compounds in lettuce leaves. **Mycorrhiza**, v. 22, p. 347-359, 2012.

BASU, S.; RABARA, R. C.; NEGI, S. AMF: the future prospect for sustainable agriculture. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 102, p. 36-45, 2018.

BAUM, C.; EL-TOHAMY, W.; GRUDA, N. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: a review. **Scientia Horticulturae**, v. 187, p. 131-141, 2015.

BENDER, S. F.; PLANTENGA, F.; NEFTEL, A.; JOCHER, M.; OBERHOLZER, H. R.; KÖHL, L.; GILES, M.; DANIELL, T. J.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. Symbiotic relationships between soil fungi and plants reduce N₂O emissions from soil. **The ISME Journal**, v. 8, p. 1336-1345, 2014.

BERRUTI, A.; LUMINI, E.; BALESTRINI, R.; BIANCIOTTO, V. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1559, p. 1-13, 2016.

BESBES, F.; HABEGGER, R.; SCHWAB, W. Induction of PR-10 genes and metabolites in strawberry plants in response to *Verticillium dahliae* infection. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 128, 2019.

BIRHANE, E.; STERCK, F. J.; FETENE, M.; BONGERS, F.; KUYPER, T. W. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of rankincense seedlings under pulsed water availability conditions. **Oecologia**, v. 169, p. 895-904, 2012.

BJÖRKMAN, M.; KLINGEN, I.; BIRCH, A. N. E.; BONES, A. M.; BRUCE, T. J. A.; JOHANSEN, T. J.; MEADOW, R.; MØLMANN, J.; SELJÅSEN, R.; SMART, L. E.; STEWART, D. Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health – Influences of climate, environment and agronomic practice. **Phytochemistry**, v. 72, n. 7, p. 538-556, 2011.

BLACKWELL, P.; JOSEPH, S.; MUNROE, P.; ANAWAR, H. M.; STORER, P.; GILKES, R. J.; SOLAIMAN, Z. M. Influences of biochar and biochar-mineral complex on mycorrhizal colonisation and nutrition of wheat and sorghum. **Pedosphere**, v. 25, p. 686-695, 2015.

BLOK, C.; VAN DER SALM, C.; HOFLAND-ZIJLSTRA, J.; STREMINSKA, M.; EVELEENS, B.; REGELINK, I.; FRYDA, L.; VISSER, R. Biochar for horticultural rooting media improvement: evaluation of biochar from gasification and slow pyrolysis. **Agronomy**, v. 7, n. 1, e-6, 2017.

BÖHM, W. **Methods of studying root systems**. Berlin: Springer-Verlag, 1979. 188 p.

BORKOWSKA, B. Growth and photosynthetic activity of micropropagated strawberry plants inoculated with endomycorrhizal fungi (AMF) and growing under drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 24, n. 4, p. 365-370, 2002.

BRASIL. Instrução normativa n. 17, de 21 de maio de 2007: aprova os métodos analíticos oficiais para análise de substratos e condicionadores de solos e revoga a

Instrução Normativa n. 46, de 12 de setembro de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 99, Seção 1, p. 8, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial; Murilo Carlos Muniz Veras (Org.) – Brasília: MAPA/SDA/CGAL, 2014. 220 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de Julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>> Acesso em 09 nov. 2017. Acesso em: 21 set. 2018.

BRENNAN, A.; MORENO-JIMENEZ, E.; PUSCHENREITER, M.; ALBURQUERQUE, J. A.; SWITZER, C. Effects of biochar amendment on root traits and contaminant availability of maize plants in a copper and arsenic impacted soil. **Plant and Soil**, v. 379, p. 351-360, 2014.

CAMPANELLI, A.; RUTA, C.; TAGARELLI, A.; MORONE-FORTUNATO, I. Nursery inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus viscosum* and its effect on the growth and physiology of hybrid artichoke seedlings. **Italian Journal of Agronomy**, v. 6, p. 159-164, 2011.

CAMPOS, M. A. S.; DA SILVA, S. F. B.; YANO-MELO, A. M.; DE MELO, N. F.; MAIA, L. C. Application of arbuscular mycorrhizal fungi during the acclimatization of *Alpinia purpurata* to induce tolerance to *Meloidogyne arenaria*. **The Plant Pathology Journal**, v. 33, n. 3, p. 329-336, 2017.

CAPOCASA, F.; BALDUCCI, F.; MARCELLINI, M.; BERNARDINI, D.; NAVACCHI, O.; MEZZETTI, B. Comparing nursery behavior, field plant yield and fruit quality of in vitro and in vivo propagated strawberry mother plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 136, n. 1, p. 65-74, 2019.

CARLILE, W. R.; CATTIVELLO, C.; ZACCHEO, P. Organic growing media: constituents and properties. **Vadose Zone Journal**, v. 14, n. 6, p. 11539-11663, 2015.

CASTELLANOS-MORALES, V.; VILLEGAS, J.; WENDELIN, S.; VIERHEILIG, H.; EDER, R.; CARDENAS-NAVARRO, R. Root colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* alters the quality of strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* Duch.) at different nitrogen levels. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1774-1782, 2010.

CAYUELA, M. L.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A.; ROIG, A.; HANLEY, K.; ENDERS, A.; LEHMANN, J. Biochar and denitrification in soils: when, how much and why does biochar reduce N₂O emissions? **Scientific Reports**, v. 3, p. 17-32, 2013.

CECATTO, A. P.; RUIZ, F. M.; CALVETE, E. O.; MARTÍNEZ, J.; PALENCIA, P. Mycorrhizal inoculation affects the phytochemical content in strawberry fruits. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 2, p. 227-237, 2016.

CHAVES, V. C.; CALVETE, E. O.; REGINATTO, F. H. Quality properties and antioxidant activity of seven strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 293-298, 2017.

CHEN, P. S.; LI, J. H. Chemopreventive effect of punicalagin, a novel tannin component isolated from *Terminalia catappa*, on H-Ras-transformed NIH3T3 cells. **Toxicology Letters**, v. 63, p. 44-53, 2006.

CHIOMENTO, J. L. T.; COSTA, R. C.; DE NARDI, F. S.; TRENTIN, N. S.; NIENOW, A. A.; CALVETE, E. O. Arbuscular mycorrhizal fungi communities improve the phytochemical quality of strawberry. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 94, n. 5, p. 653-663, 2019a.

CHIOMENTO, J. L. T.; STÜRMER, S. L.; CARRENHO, R.; COSTA, R. C.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; ANTUNES, L. E. C.; NIENOW, A. A.; CALVETE, E. O. Composition of arbuscular mycorrhizal fungi communities signals generalist species in soils cultivated with strawberry. **Scientia Horticulturae**, v. 253, p. 286-294, 2019b.

CLAIRE, D.; WATTERS, N.; GENDRON, L.; BOILY, C.; PÉPIN, S.; CARON, J. High productivity of soilless strawberry cultivation under rain shelters. **Scientia Horticulturae**, v. 232, p. 127-138, 2018.

COELHO, I. R.; PEDONE-BONFIM, M. V. L.; SILVA, F. S. B.; MAIA, L. C. Optimization of the production of mycorrhizal inoculum on substrate with organic fertilizer. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1173-1178, 2014.

CONVERSA, G.; BONASIA, A.; LAZZIZERA, C.; ELIA, A. Influence of biochar, mycorrhizal inoculation, and fertilizer rate on growth and flowering of *Pelargonium* (*Pelargonium zonale* L.) plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 429, 2015.

CORRADI, N.; BONFANTE, P. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: origin and evolution of a beneficial plant infection. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 4, e-1002600, 2012.

COSTA, R. C.; CALVETE, E. O.; MENDONÇA, H. F. C.; CAMPAGNOLO, A.; CHIOMENTO, J. L. T. Performance of day-neutral strawberry cultivars in soilless culture. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 1, p. 94-100, 2016.

CVETKOVIĆ, D. J.; STANOJEVIĆ, L. P.; STANKOVIĆ, M. Z.; CAKIĆ, M. D.; SAVIĆ, S. R.; MILJKOVIĆ, M. D. Antioxidant activity of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) leaves. **Separation Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1039-1051, 2017.

DE NARDI, F. S. **Doses de fósforo e associação micorrízica na produção, qualidade e nutrição de morangueiro em substrato**. 2018. 99 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

DE TENDER, C. A.; DEBODE, J.; VANDECASTEELE, B.; D'HOSE, T.; CREMELIE, P.; HAEGEMAN, A.; RUTTINK, T.; DAWYNDT, P.; MAES, M. Biological, physicochemical and plant health responses in lettuce and strawberry in soil or peat amended with biochar. **Applied Soil Ecology**, v. 107, p. 1-12, 2016.

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **The Forestry Chronicle**, v. 36, n. 1, p. 10-13, 1960.

FAGHERAZZI, A. F.; COCCO, C.; ANTUNES, L. E. C.; SOUZA, J. A.; RUFATO, L. La fragolicoltura brasiliana guarda avanti. **Rivista di Frutticoltura e Ortofloricoltura**, v. 75, p. 20-24, 2014.

FAGHERAZZI, A. F.; GRIMALDI, F.; KRETZSCHMAR, A. A.; MOLINA, A. R.; GONÇALVES, M. A.; ANTUNES, L. E. C.; BARUZZI, G.; RUFATO, L. Strawberry production progress in Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 1156, p. 937-940, 2017.

FAN, L.; DALPÉ, Y.; FANG, C.; DUBÉ, C.; KHANIZADEH, S. Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass and root morphology of selected strawberry cultivars under salt stress. **Botany**, v. 89, p. 1-7, 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT: agricultural production/strawberry**, 2016. Disponível em: <http://www.faostat.fao.org>. Acesso em: jul. 2018.

FERLEMI, A. V.; LAMARI, F. N. Berry leaves: an alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. **Antioxidants**, v. 5, n. 2, e-17, 2016.

FERMINO, M. H.; KÄMPF, A. N. Densidade de substratos dependendo dos métodos de análise e níveis de umidade. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 75-79, 2012.

FORTUNA, P.; CITERNESI, A.; MORINI, S.; GIOVANNETTI, M.; LORETI, F. Infectivity and effectiveness of different species of arbuscular mycorrhizal fungi in micropropagated plants of Mr S2/5 plum root stock. **Agronomie**, v. 12, p. 825-829, 1992.

FURLANI, P. R.; FERNANDEZ JÚNIOR, F. Cultivo hidropônico de morango em ambiente protegido. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO & ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 2., 2004, Pelotas. **Anais...** Curitiba: Embrapa Clima Temperado, 2004. p. 102-115.

GARCIA, K.; DOIDY, J.; ZIMMERMANN, S. D.; WIPF, D.; COURTY, P. E. Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. **Trends in Plant Science**, v. 21, p. 937-950, 2016.

GARLAND, B. C.; SCHROEDER-MORENO, M. S. Influence of summer cover crops and mycorrhizal fungi on strawberry production in the Southeastern United States. **HortScience**, v. 46, n. 7, p. 985-992, 2011.

GENRE, A.; CHABAUD, M.; TIMMERS, T.; BONFANTE, P.; BARKER, D. G. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. **Plant Cell**, v. 17, p. 3489-3499, 2005.

GIUFFRIDA, F.; CONSOLI, S. Reusing perlite substrates in soilless cultivation: analysis of particle size, hydraulic properties, and solarization effects. **Journal of Irrigation and Drainage Engineering**, v. 142, 2016.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. 1-13.

GÓMEZ, J. D.; DENEK, K.; STEWART, C. E.; ZHENG, J.; COTRUFO, M. F. Biochar addition rate influences soil microbial abundance and activity in temperate soils. **European Journal of Soil Science**, v. 65, p. 28-39, 2014.

GÓMEZ-BELLOT, M. J.; NORTES, P. A.; ORTUÑO, M. F.; ROMERO, C.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; SÁNCHEZ-BLANCOA, M. J. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and treated wastewater on water relations and leaf structure alterations of *Viburnum tinus* L. plants during both saline and recovery periods. **Journal of Plant Physiology**, v. 188, p. 96-105, 2015.

GÜEREÑA, D. T.; LEHMANN, J.; THIES, J. E.; ENDERS, A.; KARANJA, N.; NEUFELDT, H. Partitioning the contributions of biochar properties to enhanced biological nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, p. 479-491, 2015.

GUERRA, P. A. M.; SANJÚAN, M. D. C. S.; LÓPEZ, M. J. Evaluation of physicochemical properties and enzymatic activity of organic substrates during four crop cycles in soilless containers. **Food Science & Nutrition**, v. 6, p. 2066-2078, 2018.

GUTJAHR, C.; CASIERI, L.; PASZKOWSKI, U. *Glomus intraradices* induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. **New Phytologist**, v. 182, p. 829-837, 2009.

GUTJAHR, C.; PARNISKE, M. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, p. 593-617, 2013.

HALDER, M.; DHAR, P. P.; JOARDAR, J. C.; AMIN, M. S.; KOBIR, M. H.; DEY, A. K.; RAHMAN, M. S. Effects of edaphoclimatic factors on arbuscular mycorrhiza fungi colonization in Chittagong BCSIR reserve forest, Bangladesh. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 47, n. 1, p. 97-104, 2018.

HALL, D. J. M.; BELL, R. W. Biochar and compost increase crop yields but the effect is short term on sandplain soils of Western Australia. **Pedosphere**, v. 25, p. 720-728, 2015.

HAMMER, E. C.; FORSTREUTER, M.; RILLIG, M. C.; KOHLER, J. Biochar increases arbuscular mycorrhizal plant growth enhancement and ameliorates salinity stress. **Applied Soil Ecology**, v. 96, p. 114-121, 2015.

HAREL, Y. M.; ELAD, Y.; RAV-DAVID, D.; BORENSTEIN, M.; SHULCHANI, R.; LEW, B.; GRABER, E. R. Biochar mediates systemic response of strawberry to foliar fungal pathogens. **Plant and Soil**, v. 357, n. 1-2, p. 245-257, 2012.

HARRIER, L. A.; WATSON, C. A. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. **Pest Management Science**, v. 60, n. 2, p. 149-157, 2004.

HODGE, A.; BERTA, G.; DOUSSAN, C.; MERCHAN, F.; CRESPI, M. Plant root growth, architecture and function. **Plant and Soil**, v. 321, p. 153-187, 2009.

HUSSAIN, M.; FAROOQ, M.; NAWAZ, A.; AL-SADI, A. M.; SOLAIMAN, Z. M.; ALGHAMDI, S. S.; AMMARA, U.; OK, Y. S.; SIDDIQUE, K. H. M. Biochar for crop

production: potential benefits and risks. **Journal of Soils and Sediments**, v. 17, n. 3, p. 685-716, 2017.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. ZENEBO, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Org.). 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. Primeira edição digital.

ICH. International Conference on Harmonization. **Guideline on the Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**, 2005.

INYANG, M.; DICKENSON, E. The potential role of biochar in the removal of organic and microbial contaminants from potable and reuse water: a review. **Chemosphere**, v. 134, p. 232-240, 2015.

JAAFAR, N. M.; CLODE, P. L.; ABBOTT, L. K. Microscopy observations of habitable space in biochar for colonisation by fungal hyphae from soil. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, n. 3, p. 483-490, 2014.

JIMÉNEZ-LEYVA, J. A.; GUTIÉRREZ, A.; OROZCO, J. A.; VARGAS, G.; ESQUEDA, M.; GARDEA, A.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, V.; SÁNCHEZ, E.; MUÑOZ, E. : Phenological and ecophysiological responses of *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* to native arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus availability. **Environmental and Experimental Botany**, v. 138, p. 193-202, 2017.

JOSEPH, S.; ANAWAR, H. M.; STORER, P.; BLACKWELL, P.; CHIA, C.; LIN, Y.; MUNROE, P.; DONNE, S.; HOVART, J.; WANG, J.; SOLAIMAN, Z. M. Effect of enriched biochars containing nanophase magnetic iron particles on mycorrhizal colonisation, plant growth, nutrient uptake and soil quality improvement. **Pedosphere**, v. 25, p. 749-760, 2015.

JUNG, S. C.; MARTINEZ-MEDINA, A.; LOPEZ-RAEZ, J. A.; POZO, M. J. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, p. 651-664, 2012.

KAMEL, L.; KELLER-PEARSON, M.; ROUX, C.; ANÉ, J. M. Biology and evolution of arbuscular mycorrhizal symbiosis in the light of genomics. **New Phytologist**, v. 213, p. 531-536, 2017.

KEYMER, A.; PIMPRIKAR, P.; WEWER, V.; HUBER, C.; BRANDS, M.; BUCERIUS, S. L.; DELAUX, P. M.; KLINGL, V.; PENACK-LAHAYE, E. V. R.; WANG, T. L.; EISENREICH, W.; DÖRMANN, P.; PARNISKE, M.; GUTJAHR, C. Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. **eLife**, v. 6, e-29107, 2017.

KOIDE, R. T. Biochar-arbuscular mycorrhiza interaction in temperate soils. In: JOHNSON, N. C.; GEHRING, C.; JANSA, J. (Ed). **Mycorrhizal mediation of soil: fertility, structure, and carbon storage**. Elsevier, 2017. p. 461-477.

KOIDE, R. T.; NGUYEN, B. T.; SKINNER, R. H.; DELL, C. J.; PEOPLES, M. S. M.; ADLER, P. P. R.; DROHAN, P. P. J. Biochar amendment of soil improves resilience to climate change. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 7, p. 1084-1091, 2015.

KONVALINKOVÁ, T.; JANSA, J. Lights off for arbuscular mycorrhiza: on its symbiotic functioning under light deprivation. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-11, 2016.

KORON, D.; SONJAK, S.; REGVAR, M. Effects of non-chemical soil fumigant treatments on root colonisation with arbuscular mycorrhizal fungi and strawberry fruit production. **Crop Protection**, v. 55, p. 35-41, 2014.

LECROY, C.; MASIELLO, C. A.; RUDGERS, J. A.; HOCKADAY, W. C.; SILBERG, J. J. Nitrogen, biochar, and mycorrhizae: alteration of the symbiosis and oxidation of the char surface. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 58, p. 248-254, 2013.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.

LEHMANN, J.; RILLIG, M. C.; THIES, J.; MASIELLO, C. A.; HOCKADAY, W. C.; CROWLEY, D. Biochar effects on soil biota: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 1812-1836, 2011.

LEIFHEIT, E. F.; VERESOGLOU, S. D.; LEHMANN, A.; MORRIS, E. K.; RILLIG, M. C. Multiple factors influence the role of arbuscular mycorrhizal fungi in soil aggregation: a meta-analysis. **Plant and Soil**, v. 374, p. 523-537, 2014.

LINGUA, G.; BONA, E.; MANASSERO, P.; MARSANO, F.; TODESCHINI, V.; CANTAMESSA, S.; COPETTA, A.; D'AGOSTINO, G.; GAMALERO, E.; BERTA, G. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads increases anthocyanin concentration in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* var. Selva) in conditions of reduced fertilization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 16207-16225, 2013.

LIU, L.; WANG, Y. F.; YAN, X. W.; LI, J. W.; JIAO, N. Y.; HU, S. J. Biochar amendments increase the yield advantage of legume-based inter cropping systems over monoculture. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 237, p. 16-23, 2017.

LIU, X. Y.; ZHANG, A. F.; JI, C. Y.; JOSEPH, S.; BIAN, R. J.; LI, L. Q.; PAN, G. X.; PAZ-FERREIRO, J. Biochar's effect on crop productivity and the dependence on experimental conditions - a meta-analysis of literature data. **Plant and Soil**, v. 373, p. 583-594, 2013.

LÓPEZ-RÁEZ, J. A.; FLORS, V.; GARCIA, J. M.; POZO, M. J. AM symbiosis alters phenolic acid content in tomato roots. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 9, p. 1138-1140, 2010.

LUO, S.; WANG, S.; TIAN, L.; LI, S.; LI, X.; SHEN, Y.; TIAN, C. Long-term biochar application influences soil microbial community and its potential roles in semiarid farmland. **Applied Soil Ecology**, v. 117-118, p. 10-15, 2017.

MARTÍNEZ, F.; OLIVEIRA, J. A.; CALVETE, E. O.; PALENCIA, P. Influence of growth medium on yield, quality indexes and SPAD values in strawberry plants. **Scientia Horticulturae**, v. 217, p. 17-27, 2017.

MICKAN, B. S.; ABBOTT, L. K.; STEFANOVA, K.; SOLAIMAN, Z. M. Interactions between biochar and mycorrhizal fungi in a water-stressed agricultural soil. **Mycorrhiza**, v. 26, p. 565-574, 2016.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 231-237, 2004.

MOLLAVALI, M.; BOLANDNAZAR, S.; NAZEMIEH, H.; ZARE, F.; ALIASGHARZAD, N. The effect of mycorrhizal fungi on antioxidant activity of various cultivars of onion (*Allium cepa* L). **International Journal of Biosciences**, v. 6, n. 1, p. 66-79, 2015.

MONDRAGÓN-VALERO, A.; LOPÉZ-CORTÉS, I.; SALAZAR, D. M.; CÓRDOVA, P. F. Physical mechanisms produced in the development of nursery almond trees (*Prunus dulcis* Miller) as a response to the plant adaptation to different substrates. **Rhizosphere**, v. 3, p. 44-49, 2017.

MORCILLO, R. J. L.; NAVARRETEA, M. I. T.; BOTEJA, J. A. O.; MONGUIOB, S. P.; GARCÍA-GARRIDO, J. M. Suppression of allene oxide synthase 3 in potato increases degree of arbuscular mycorrhizal fungal colonization. **Journal of Plant Physiology**, v. 190, p. 15-25, 2016.

NEMEC, S. Phenolics in the strawberry root. **Annals of Botany**, v. 37, p. 935-941, 1973.

NIELSEN, S.; MINCHIN, T.; KIMBER, S.; VAN ZWIETEN, L.; GILBERT, J.; MUNROE, P.; JOSEPH, S.; THOMAS, T. Comparative analysis of the microbial communities in agricultural soil amended with enhanced biochars or traditional fertilisers. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 191, p. 73-82, 2014.

NOYA, M. G.; CUQUEL, F. L.; SCHAFER, G.; ARMINDO, R. A. Substrates for cultivating herbaceous perennial plants in extensive green roofs. **Ecological Engineering**, v. 102, p. 662-669, 2017.

OHSOWSKI, B. M.; DUNFIELD, K.; KLIRONOMOS, J. N.; HART, M. M. Plant response to biochar, compost, and mycorrhizal fungal amendments in post-mine sandpits. **Restoration Ecology**, v. 26, n. 1, p. 63-72, 2018.

OLÁH, B.; BRIÈRE, C.; BÉCARD, G.; DÉNARIÉ, J.; GOUGH, C. Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. **The Plant Journal**, v. 44, p. 195-207, 2005.

OLMO, M.; VILLAR, R.; SALAZAR, P.; ALBURQUERQUE, J. Changes in soil nutrient availability explain biochar's impact on wheat root development. **Plant and Soil**, v. 399, p. 333-343, 2016.

OLSSON, M. E.; ANDERSSON, C. S.; OREDSSON, S.; BERGLUND, R. H.; GUSTAVSSON, K. E. Antioxidant levels and inhibition of cancer cell proliferation in vitro by extracts from organically and conventionally cultivated strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1248-1255, 2006.

OVERVOORDE, P.; FUKAKI, H.; BEECKMAN, T. Auxin control of root development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, e-001537, 2010.

PARADA, J.; VALENZUELA, T.; GÓMEZ, F.; TEREUCÁN, G.; GARCÍA, S.; CORNEJO, P.; WINTERHALTER, P.; RUIZ, A. Effect of fertilization and arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on antioxidant profiles and activities in *Fragaria ananassa* fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 3, p. 1397-1404, 2019.

PAZ-FERREIRO, J.; FU, S. L.; MENDEZ, A.; GASCO, G. Interactive effects of biochar and the earthworm *Pontoscolex corethrurus* on plant productivity and soil enzyme activities. **Journal of Soils and Sediments**, v. 14, n. 3, p. 483-494, 2014.

PEDERSEN, A. C. **Occurrence and applicability of arbuscular mycorrhizal fungi in strawberry**. 2016. 187 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

PEDERSEN, A. C.; DE NARDI, F. S.; COSTA, R. C.; ANTONIOLLI, R.; STÜRMER, S. L.; CALVETE, E. O. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in strawberry crop systems detected in trap cultures. **Acta Horticulturae**, v. 1170, p. 1085-1092, 2017.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 158-161, 1970.

PINTO, M. S.; CARVALHO, J. E.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; SHETTY, K. Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) using *in vitro* models. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 1027-1035, 2010.

POZO, M. J.; AZCON-AGUILAR, C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 4, p. 393-398, 2007.

RAHMAN, M. M.; RAHMAN, M. M.; HOSSAIN, M. M.; KHALIQ, Q. A.; MONIRUZZAMAN, M. Effect of planting time and genotypes growth, yield and quality of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Scientia Horticulturae**, v. 167, p. 56-62, 2014.

RAJAPAKSHA, A. U.; VITHANAGE, M.; ZHANG, M.; AHMAD, M.; MOHAN, D.; CHANG, S. X.; OK, Y. S. Pyrolysis condition affected sulfamethazine sorption by tea waste biochars. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 303-308, 2014.

RAMOS, P.; PARRA-PALMA, C.; FIGUEROA, C. R.; ZUÑIGA, P. E.; VALENZUELA-RIFFO, F.; GONZALEZ, J.; GAETE-EASTMAN, C.; MORALES-QUINTANA, L. Cell wall-related enzymatic activities and transcriptional profiles in four strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars during fruit development and ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 238, p. 325-332, 2018.

REDECKER, D.; SCHUBLER, A.; STOCKINGER, H.; STÜRMER, S. L.; MORTON, J. B.; WALKER, C. An evidence based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). **Mycorrhiza**, v. 23, p. 515-531, 2013.

REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4592-4597, 1998.

ROBINSON-BOYER, L.; FENG, W.; GULBIS, N.; HAJDU, K.; HARRISON, R. J.; JEFFRIES, P.; XU, X. The use of arbuscular mycorrhizal fungi to improve strawberry production in coir substrate. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, e-1237, 2016.

ROUPHAEL, Y.; FRANKEN, P.; SCHNEIDER, C.; SCHWARZ, D.; GIOVANNETTI, M.; AGNOLUCCI, M.; DE PASCALE, S.; BONINI, P.; COLLA, G. Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 91-108, 2015.

ROUPHAEL, Y.; SCHWARZ, D.; KRUMBEIN, A.; COLLA, G. Impact of grafting on product quality of fruit vegetables. **Scientia Horticulturae**, v. 127, p. 172-179, 2010.

SABOYA, R. C. C.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; MONTEIRO, F. P. R.; SANTOS, G. R.; ERASMO, E. A. L.; CHAGAS, L. F. B. Fungos micorrízicos arbusculares afetando a produção de mudas de pinhão-mansão na região Sul do Estado de Tocantins, Brasil. **Revista Ceres**, v. 59, n. 1, p. 142-146, 2012.

SAITO, M. Charcoal as a micro-habitat for VA mycorrhizal fungi, and its practical implication. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 29, p. 341-344, 1990.

SBRANA, C.; AVIO, L.; GIOVANETTI, M. Beneficial mycorrhizal symbionts affecting the production of health-promoting phytochemicals. **Electrophoresis**, v. 35, p. 1535-1546, 2014.

SELOSSE, M. A.; STRULLU-DERRIEN, C.; MARTIN, F. M.; KAMOUN, S.; KENRICK, P. Plants, fungi and oomycetes: a 400-million year affair that shapes the biosphere. **New Phytologist**, v. 206, p. 501-506, 2015.

SENÉS-GUERRERO, C.; SCHÜBLER, A. A conserved arbuscular mycorrhizal fungal core-species community colonizes potato roots in the Andes. **Fungal Diversity**, v. 77, p. 317-333, 2016.

SHARMA, M. P.; ADHOLEYA, A. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization on the post vitro growth and yield of micropropagated strawberry grown in a sandy loam soil. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, p. 322-328, 2004.

SINCLAIR, G.; CHAREST, C.; DALPÉ, Y.; KHANIZADEH, S. Influence of colonization by arbuscular mycorrhizal fungi on three strawberry cultivars under salty conditions. **Agricultural and Food Science**, v. 23, p. 146-158, 2014.

SINGH, A. K.; BEER, K.; PAL, A. K. Effect of vermicompost and biofertilizers on strawberry: growth, flowering and yield. **Annals of Plant and Soil Research**, v. 17, n. 2, p. 196-199, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SKROVANKOVA, S.; SUMCZYNSKI, D.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; SOCHOR, J. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 24673–24706, 2015.

SOHI, S. P.; KRULL, E.; LOPEZ-CAPEL, E.; BOL, R. A review of biochar and its use and function in soil. **Advances in Agronomy**, v. 105, p. 47-82, 2010.

SOLAIMAN, Z. M.; ABBOTT, L. K.; MURPHY, D. V. Biochar phosphorus concentration dictates mycorrhizal colonisation, plant growth and soil phosphorus cycling. **Scientific Reports**, v. 9, n. 5062, 2019.

SOSA-HERNÁNDEZ, M. A.; ROY, J.; HEMPEL, S.; KAUTZ, T.; KÖPKE, U.; UKSA, M.; SCHLOTTER, M.; CARUSO, T.; RILLIG, M. C. Subsoil arbuscular mycorrhizal fungal communities in arable soil differ from those in topsoil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 117, p. 83-86, 2018.

STRULLU-DERRIEN, C.; KENRICK, P.; PRESSEL, S.; DUCKETT, J. G.; RIOULT, J. P.; STRULLU, D. G. Fungal associations in *Horneophyton ligneri* from the Rhynie Chert (c. 407 million year old) closely resemble those in extant lower land plants: novel insights into ancestral plant-fungus symbioses. **New Phytologist**, v. 203, p. 964-979, 2014.

TABATABAI, M. A. Soil enzyme. In: PAGE, A. L. (Ed.). **Methods of soil analysis, part 2**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 903-948.

TABATABAI, M. A.; BREMMER, J. M. Use of p-nitrophenol phosphate in assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 1, p. 301-307, 1969.

TAYLOR, J.; HARRIER, L. A. A comparison of development and mineral nutrition of micropropagated *Fragaria x ananassa* cv. Elvira (strawberry) when colonised by nine species of arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, v. 18, n. 3, p. 205-215, 2001.

TROUVELOT, A.; KOUGH, J. L.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire: recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. (Eds.). **Physiological and genetic aspects of mycorrhizae**. Paris: INRA Press, 1986. p. 217-221.

UMARU, I. J.; SAMLING, B.; UMARU, H. A. Phytochemical screening of *Etilingera elatior* (torch ginger) cultivated on different dosage of biochar. **Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology**, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2018.

VELÁZQUEZ, M. S.; FABISIK, J. C.; ABARCA, C. L.; ALLEGRUCCI, N.; CABELLO, M. Colonization dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Ilex paraguariensis* crops: seasonality and influence of management practices. **Journal of King Saud University - Science**, 2018.

VERZEAUX, J.; NIVELLE, E.; ROGER, D.; HIREL, B.; DUBOIS, F.; TETU, T. Spore density of arbuscular mycorrhizal fungi is fostered by six years of a no-till system and is correlated with environmental parameters in a silty loam soil. **Agronomy**, v. 7, n. 38, 2017.

VESTBERG, M. The effect of vesicular arbuscular mycorrhizal inoculation on the growth and root colonisation of ten strawberry cultivars. **Agricultural and Food Science**, v. 1, p. 527-535, 1992.

VIGER, M.; HANCOCK, R. D.; MIGLIETTA, F.; TAYLOR, G. More plant growth but less plant defence? First global gene expression data for plants grown in soil amended with biochar. **GCB Bioenergy**, v. 7, p. 658-672, 2014.

WARNOCK, D. D.; LEHMANN, J.; KUYPER, T. W.; RILLIG, M. C. Mycorrhizal responses to biochar in soil - concepts and mechanisms. **Plant and Soil**, v. 300, p. 9-20, 2007.

WARNOCK, D. D.; MUMMEY, D. L.; MCBRIDE, B.; MAJOR, J.; LEHMANN, J.; RILLIG, M. C. Influences of non-herbaceous biochar on arbuscular mycorrhizal fungal abundances in roots and soils: results from growth-chamber and field experiments. **Applied Soil Ecology**, v. 46, p. 450-456, 2010.

WHITE, P. R. Mycorrhiza as a possible determining factor in the distribution of the strawberry. **Annals of Botany**, v. 43, n. 171, p. 535-544, 1929.

WIEDNER, K.; SCHNEEWEIß, J.; DIPPOLD, M. A.; GLASER, B. Anthropogenic dark earth in northern Germany – the Nordic analogue to terra preta de Índio in Amazonia. **Catena**, v. 132, p. 114-125, 2015.

WILLET, W.; ROCKSTRÖM, J.; LOKEN, B.; SPRINGMANN, M.; LANG, T.; VERMEULEN, S.; GARNETT, T.; TILMAN, D.; DECLERCK, F.; WOOD, A. Food in the Anthropocene: The EAT-Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. **The Lancet**, v. 6736, p. 3-49, 2019.

WOJDYŁO, A.; OSZMIANŃSKI, J.; BOBER, I. The effect of addition of chokeberry, flowering quince fruits and rhubarb juice to strawberry jams on their polyphenol content, antioxidant activity and colour. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 1043-1051, 2008.

WOODS, W. I.; DENEVAN, W. M. Amazonian dark earths: the first century of reports. In: WOODS, W. I.; TEIXEIRA, W. G.; LEHMANN, J.; STEINER, C.; WINKLERPRINS, A.; REBELLATO, L. (Ed.). **Amazonian dark earths: Wim Sombroek's vision**. Berlin: Springer, 2009. p. 1-14.

WU, H. P.; LAI, C.; ZENG, G. M.; LIANG, J.; CHEN, J.; XU, J. J.; DAI, J.; LI, X. D.; LIU, J. F.; CHEN, M.; LU, L. H.; HU, L.; WAN, J. The interactions of composting and biochar and their implications for soil amendment and pollution remediation: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, p. 754-764, 2017.

WU, H. P.; ZENG, G. M.; LIANG, J.; CHEN, J.; XU, J. J.; DAI, J.; LI, X. D.; CHEN, M.; XU, P. A.; ZHOU, Y. Y.; LI, F.; HU, L.; WAN, J. Responses of bacterial community and functional marker genes of nitrogen cycling to biochar, compost and combined amendments in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 8583-8591, 2016.

WU, Q. S.; LI, G. H.; ZOU, Y. N. Improvement of root system architecture in peach (*Prunus persica*) seedlings by arbuscular mycorrhizal fungi, related to allocation of glucose/sucrose to root. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 39, p. 232-236, 2011.

WU, Q. S.; ZOU, Y. N.; LIU, W.; YE, X. F.; ZAI, H. F.; ZHAO, L. J. Alleviation of salt stress in citrus seedlings inoculated with mycorrhiza: changes in leaf antioxidant defense systems. **Plant, Soil and Environment**, v. 56, p. 470-475, 2010.

ZARDAK, S. G.; DEHNAVI, M. M.; SALEHI, A.; GHOLAMHOSEINI, M. Effects of using arbuscular mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on the physiological traits and essential oil yield of fennel. **Rhizosphere**, v. 6, p. 31-38, 2018.

ZHANG, R. Q.; ZHU, H. H.; ZHAO, H. Q.; YAO, Q. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation increases phenolic synthesis in clover roots via hydrogen peroxide, salicylic acid and nitric oxide signaling pathways. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 1, p. 74-79, 2013.

ZHU, Q. Y.; HACKMAN, R. M.; ENSUNSA, J. L.; HOLT, R. R.; KEEN, C. L. Antioxidative activities of oolong tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6929-6934, 2002.

ZHU, X.; CHEN, B.; ZHU, L.; XING, B. Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: a review. **Environmental Pollution**, v. 227, p. 98-115, 2017.

ZOU, Y. N.; WANG, P.; LIU, C. Y.; NI, Q. D.; ZHANG, D. J.; WU, Q. S. Mycorrhizal trifoliolate orange has greater root adaptation of morphology and phytohormones in response to drought stress. **Scientific Reports**, v. 7, e-41134, 2017.

ZUO, Y.; ZHANG, J.; ZHAO, R.; DAI, H.; ZHANG, Z. Application of vermicompost improves strawberry growth and quality through increased photosynthesis rate, free radical scavenging and soil enzymatic activity. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p.132-140, 2018.

