

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

Fungos micorrízicos arbusculares no desempenho hortícola de *Physalis peruviana* L., composição química e bioatividade de extratos dos frutos no controle de mofo-cinzeno de morango

Débora Filippi

Passo Fundo

2021

Débora Filippi

Fungos micorrízicos arbusculares no desempenho hortícola de *Physalis peruviana* L.,
composição química e bioatividade de extratos dos frutos no controle de mofo-cinzento
de morango

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 Doutora
em Agronomia.

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Augusto Nienow

Coorientadora:

Profa. Dra. Eunice Oliveira Calvete

Passo Fundo

2021

CIP – Catalogação na Publicação

- F486f Filippi, Débora
Fungos micorrízicos arbusculares no desempenho hortícola de *Physalis peruviana* L., composição química e bioatividade de extratos dos frutos no controle de mofo-cinzento de morango [recurso eletrônico] / Débora Filippi. – 2021.
2.16 MB ; PDF.
- Orientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto Nienow.
Coorientadora: Profa. Dra. Eunice Oliveira Calvete.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2021.
1. Morangos – Doenças e pragas. 2. Fenóis. 3. Fungos micorrízicos. 4. Mofos – Controle. I. Nienow, Alexandre Augusto, orientador. II. Calvete, Eunice Oliveira, coorientadora. III. Título.

CDU: 632.4

ATA DE DEFESA DE TESE



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

“Fungos micorrízicos arbusculares no desempenho hortícola de *Physalis peruviana* L., composição química e bioatividade de extratos dos frutos no controle de mofo-cinza de morango”

Elaborada por

Débora Filippi

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
“Doutora em Agronomia – Área de Produção e Proteção de Plantas”

Aprovada em: 29/04/2021
Pela Comissão Examinadora



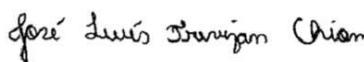
Dr. Alexandre Nienow
Presidente da Comissão Examinadora
Orientador
Coordenador do PPGAgro



Dra. Fabiana Tonial
Examinadora externa
Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UPF



Dra. Eunice Oliveira Calvete
Examinadora externa – Pesquisadora Independente
Coorientadora



José Luis Trevizan Chiomento
Examinador externo
Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária - UPF



Dra. Jaqueline Huzar Novakowski
Examinadora interna - UPF



Dr. Eraldo Lourenso Zanella
Diretor da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária,
Universidade de Passo Fundo



Dra. Maria Tereza Friedrich
Examinadora externa – Pesquisadora Independente

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Danilo Filippi e Dilce Maria Filippi, ao meu irmão Dionata Filippi e ao meu namorado e companheiro Artur Bordin, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus. E a todos que, de alguma forma, foram importantes em minha trajetória no PPGAgro – UPF.

“As montanhas da vida não existem apenas para que você chegue no topo, mas para que você aprenda o valor da escalada” (Autor desconhecido).

RESUMO

FILIPPI, Débora. Fungos micorrízicos arbusculares no desempenho hortícola de *Physalis peruviana* L., composição química e bioatividade de extratos dos frutos no controle de mofo-cinzento de morango. 93 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2021.

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) utilizados no cultivo de plantas de fisális (*Physalis peruviana* L.), fontes de fitoquímicos, podem melhorar a ação antifúngica exercida pelos extratos de frutos e se tornarem uma alternativa no controle do mofo-cinzento. Este trabalho objetivou verificar se FMA, adicionados ao substrato de cultivo de fisális, diferem quanto ao desempenho hortícola das plantas e quanto a ação dos extratos obtidos dos frutos no controle do mofo-cinzento, e desenvolver um conjunto de diagrama de área padrão (DAP) para auxiliar a avaliação do mofo-cinzento em morangos. Foram realizados dois experimentos nos Laboratórios de Ecofisiologia Vegetal e Fitopatologia, e no Setor de Horticultura da UPF. No experimento I foi investigado se plantas cultivadas na ausência e presença de FMA diferem quanto ao crescimento do sistema radicial, produção, qualidade química e tempo de maturação dos frutos, identificar a presença de ácidos fenólicos e flavonoides nos extratos de frutos de fisális e testá-los quanto ao controle *in vitro* do mofo-cinzento em relação ao uso de um fungicida químico. Foram testados três tratamentos (*Rhizophagus clarus*, *Glomus intraradices* e comunidade micorrízica) em comparação a plantas sem inoculação micorrízica, em blocos casualizados, com cinco repetições. Para o perfil fitoquímico foram utilizados vinte extratos de frutos de fisális, oriundos dos quatro tratamentos descritos anteriormente. Para o controle do mofo-cinzento foram testados oito tratamentos, dispostos em delineamento inteiramente casualizado, em replicata, com dez placas por tratamento. O isolado *G. intraradices* apresentou maior capacidade de infectar as raízes das plantas. *R. clarus* proporcionou maior volume radicial às plantas, porém não diferiu das plantas micorrizadas com *G. intraradices*. Plantas inoculadas com a comunidade micorrízica apresentaram maior quantidade de raízes finas, embora não tenham diferido daquelas produzidas com os isolados fúngicos. Plantas não micorrizadas produziram frutos com maior massa fresca média em relação às plantas inoculadas com a comunidade micorrízica, porém não diferiram das plantas micorrizadas com *G. intraradices* e *R. clarus*. Os frutos mais doces e saborosos foram produzidos por plantas inoculadas com a comunidade micorrízica e com o isolado *R. clarus*. Em todos os extratos foram identificados os ácidos fenólicos p-cumárico e cafeico e o flavonoide rutina, contudo, nenhum dos extratos apresentou melhor controle *in vitro* do mofo-cinzento em relação ao fungicida químico, demonstrando, portanto, que na concentração de 300 mg/mL, os fitoquímicos não apresentam ação *in vitro* sobre o mofo-cinzento de morangueiro. O experimento II objetivou desenvolver e validar um conjunto de DAP para avaliação da severidade do mofo-cinzento em morangos. Dez avaliadores foram selecionados para validar os diagramas, alocados em dois grupos: i) avaliadores sem experiência e ii) com experiência na avaliação de doenças de plantas usando escalas de classificação ou diagramas. As avaliações e validação ocorreram em três etapas: na primeira os avaliadores analisaram 50 fotos de morangos com diferentes níveis de severidade do mofo-cinzento, apresentados aleatoriamente em Power Point®; na segunda etapa utilizaram a escala de Nunes et al. (2012); e na terceira os diagramas desenvolvidos nesse estudo.

O diagrama desenvolvido permitiu uma estimativa mais acurada da doença. A precisão foi demonstrada pela proximidade entre os valores obtidos pela repetibilidade nas avaliações.

Palavras-chave: 1. FMA. 2. Qualidade. 3. Escala diagramática. 4. *Botrytis cinerea Pers.*.
5. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

FILIPPI, Débora. Arbuscular mycorrhizal fungi on the horticultural performance of *Physalis peruviana* L., chemical composition and bioactivity of fruit extracts on strawberry gray mold control. 93 f. Thesis (Doctor in Agronomy) – University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2021.

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) used in the cultivation of goldenberry plants (*Physalis peruviana* L.), sources of phytochemicals, can improve the antifungal action exerted by fruit extracts and become an alternative in the control of gray mold. This work aimed to verify if AMF, added to the goldenberry cultivation substrate, differ in the horticultural performance of the plants and in the action of the extracts obtained from the fruits in the control of gray mold, and to develop a set of standard area diagram (SAP) to aid the evaluation of gray mold in strawberries. Two experiments were carried out at the Plant Ecophysiology and Phytopathology Laboratories, and at the UPF Horticulture Sector. In experiment I, it was investigated whether plants grown in the absence and presence of AMF differ in terms of root system growth, production, chemical quality and fruit maturation time, identify the presence of phenolic acids and flavonoids in goldenberry fruit extracts and test them. about the in vitro control of gray mold in relation to the use of a chemical fungicide. Three treatments (*Rhizophagus clarus*, *Glomus intraradices* and mycorrhizal community) were tested in comparison to plants without mycorrhizal inoculation, in randomized blocks, with five replications. For the phytochemical profile, twenty extracts of goldenberry fruits were used, from the four treatments described above. For the control of gray mold, eight treatments were tested, arranged in a completely randomized design, in replicates, with ten plates per treatment. The isolate *G. intraradices* showed greater capacity to infect plant roots. *R. clarus* provided greater root volume to the plants, but did not differ from plants mycorrhizal with *G. intraradices*. Plants inoculated with the mycorrhizal community showed a greater amount of fine roots, although they did not differ from those produced with the fungal isolates. Non-mycorrhizal plants produced fruits with higher average fresh mass compared to plants inoculated with the mycorrhizal community, but they did not differ from plants mycorrhizal with *G. intraradices* and *R. clarus*. The sweetest and most flavorful fruits were produced by plants inoculated with the mycorrhizal community and with the isolate *R. clarus*. In all extracts the phenolic acids p-coumaric and caffeic and the flavonoid rutin were identified, however, none of the extracts showed better in vitro control of gray mold compared to the chemical fungicide, thus demonstrating that at a concentration of 300 mg/mL, the phytochemicals have no in vitro action on strawberry gray mold. Experiment II aimed to develop and validate a set of SAP to assess the severity of gray mold in strawberries. Ten raters were selected to validate the diagrams, divided into two groups: i) inexperienced raters and ii) with experience in the assessment of plant diseases using rating scales or diagrams. The evaluations and validation took place in three stages: in the first, the evaluators analyzed 50 photos of strawberries with different levels of gray mold severity, presented randomly in Power Point®; in the second stage, they used the scale by Nunes et al. (2012); and in the third, the diagrams developed in this study. The diagram developed allowed a more accurate estimate of the disease. Precision was demonstrated by the proximity between the values obtained by repeatability in the evaluations.

Key words: 1. AMF. 2. Quality 3. Diagrammatic scale. 4. *Botrytis cinerea* Pers.. 5. Phenolic compounds.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	<i>Fisális</i>	16
2.2	<i>Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)</i>	18
2.3	<i>Extratos de fisális e ação antifúngica</i>	19
2.4	<i>Mofo-cinzeno</i>	20
3	CAPÍTULO I	23
3.1	<i>Resumo</i>	23
3.2	<i>Introdução</i>	23
3.3	<i>Material e Métodos</i>	27
3.3.1	Estudo I: Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) no crescimento radicial e desempenho produtivo de fisális (<i>Physalis peruviana</i> L.) em ambiente protegido	27
3.3.1.1	<i>Sujeito, local e período de realização da pesquisa</i>	27
3.3.1.2	<i>Tratamentos e delineamento experimental</i>	27
3.3.1.3	<i>Procedimentos</i>	28
3.3.1.4	<i>Avaliações</i>	31
3.3.1.4.1	<i>Morfologia do sistema radicial</i>	31
3.3.1.4.2	<i>Capacidade infectiva dos FMA</i>	32
3.3.1.4.3	<i>Produção de frutos</i>	32
3.3.1.4.4	<i>Composição química</i>	33
3.3.1.5	<i>Análise estatística</i>	33
3.3.2	Estudo II: Caracterização fitoquímica de extratos de frutos de fisális e ação no controle do mofo-cinzeno (<i>Botrytis cinerea</i> Pers.) de morangueiro	33
3.3.2.1	<i>Sujeito, local e período de realização da pesquisa</i>	33
3.3.2.2	<i>Tratamentos e delineamento experimental</i>	33
3.3.2.3	<i>Procedimentos</i>	35
3.3.2.3.1	<i>Liofilização dos frutos</i>	35
3.3.2.3.2	<i>Perfil fitoquímico</i>	35
3.3.2.3.3	<i>Controle do mofo-cinzeno</i>	37
3.3.2.3.4	<i>Análise de dados</i>	38
3.4	<i>Resultados</i>	38
3.11	<i>Discussão</i>	44
3.12	<i>Conclusão</i>	49

4	CAPÍTULO II	50
4.1	<i>Resumo</i>	50
4.2	<i>Introdução</i>	50
4.3	<i>Material e Métodos</i>	53
4.3.1	<i>Desenvolvimento do DAP</i>	53
4.3.2	<i>Validação do DAP</i>	54
4.3.3	<i>Análise de dados</i>	54
4.4	<i>Resultados</i>	55
4.5	<i>Discussão</i>	61
4.6	<i>Conclusões</i>	63
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
6	CONCLUSÃO GERAL	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICES	84
	<i>Apêndice I - Resumo da análise de variância para a morfologia do sistema radicial de plantas de <i>fisalis</i> na ausência e presença de inoculação com FMA</i>	84
	<i>Apêndice II - Resumo da análise de variância para a produção de frutos de plantas de <i>fisalis</i> na ausência e presença de inoculação com FMA</i>	85
	<i>Apêndice III - Resumo da análise de variância para a qualidade de frutos de plantas de <i>fisalis</i> na ausência e presença de inoculação com FMA</i>	86
	<i>Apêndice IV - Resultados do teste <i>in vitro</i> de inibição do desenvolvimento micelial do mofo-cinzento</i>	87
	<i>Apêndice V - Resumo da análise de variância para caracterização fitoquímica dos extratos de <i>fisalis</i></i>	90

1 INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria X ananassa* Duch.) produz frutos perecíveis, de curta vida útil, suscetíveis ao desenvolvimento de doenças. Um exemplo é o mofo-cinzento, causado pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers., principal doença do morangueiro, a qual acomete morangos em diferentes estádios de maturação e, normalmente, se manifesta durante o período pós-colheita, incluindo os frutos já embalados, resultando em consideráveis perdas econômicas.

O controle da doença é realizado principalmente com o uso de fungicidas químicos. Contudo, vários fatores contribuem para um crescente interesse no desenvolvimento de novos métodos de controle da doença, como: a presença de resíduos químicos de fungicidas; preocupações ambientais; a baixa efetividade de alguns fungicidas em inibir a germinação e a produção de conídios de *B. cinerea*; a ausência de um diagrama de área padrão (DAP) para avaliar a efetividade de fungicidas e a severidade da doença; e a resistência desenvolvida a alguns fungicidas.

Dentre os novos métodos testados para controle do mofo-cinzento em morangos estão os biofungicidas, dentre esses os extratos de plantas. A ação antifúngica é atribuída aos metabólitos secundários naturalmente presentes nas diferentes partes das plantas, inclusive nos frutos, como a classe dos compostos fenólicos, responsáveis pela deformação de hifas, por suprimirem e inibirem a germinação de conídios, e por reduzirem o crescimento micelial de *B. cinerea*. Dentre os extratos de plantas possíveis de serem testados como biofungicida estão os extratos de fisális.

Uma espécie vem sendo cultivada em diferentes estados brasileiros e apresenta rápido retorno econômico para os produtores é o fisális (*Physalis peruviana* L.), planta pertencente ao gênero *Physalis* e à família Solanaceae. Os frutos possuem alto valor

nutricional, o que estimula a incorporação dessa frutífera também nos plantios de pequenas frutas e em ambiente protegido.

Sabe-se que existem ferramentas biotecnológicas, à exemplo, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que podem potencializar a ação biológica de compostos do metabolismo secundário.

Os FMA são microrganismos simbiotes de culturas agrícolas que, em condições favoráveis como a combinação planta/FMA e características do solo ou substrato, à exemplo, textura, fertilidade, pH e matéria orgânica, podem proporcionar diferentes benefícios, como a produção de compostos do metabolismo secundário nas plantas, campo científico que tende a crescer e que permite o emprego de extratos vegetais para o controle de doenças em diferentes espécies de plantas, como no morangueiro.

Contudo, surge a seguinte pergunta: como a biotecnologia micorrízica interfere no desempenho hortícola de fisális em vaso em ambiente protegido e na ação antifúngica de extratos de frutos no controle do mofo-cinzento de morangueiro? Para responder essa questão foram propostas as hipóteses de que o uso de FMA melhora o desempenho hortícola de fisális em vaso em ambiente protegido e que ocorrem alterações fitoquímicas nos extratos dos frutos capazes de aumentar o controle do mofo-cinzento em morangos.

Buscou-se, assim, com estes diferentes estudos, verificar se o enriquecimento do substrato de cultivo com FMA influencia no desempenho hortícola de plantas de fisális em vaso em ambiente protegido e se os extratos produzidos a partir dos frutos diferem no controle do mofo-cinzento *in vitro*.

Para responder essa questão da pesquisa e testar ambas hipóteses, foram propostos os seguintes objetivos:

Objetivo geral: avaliar se a biotecnologia micorrízica potencializa o desempenho hortícola de fisális em vaso em ambiente protegido e a ação antifúngica de extratos de frutos no controle do mofo-cinzento de morangueiro.

Objetivos específicos: 1) investigar se plantas de fisális cultivadas em vaso em ambiente protegido na ausência e presença de FMA diferem quanto ao crescimento do sistema radicial, produção e qualidade química dos frutos. E, avaliar se extratos de frutos de fisális cultivados sem e com FMA diferem no controle do mofo-cinzento *in vitro*. 2) desenvolver e validar um diagrama de área padrão (DAP) para avaliar a severidade do mofo-cinzento em morangos pós-coheita.

Os resultados obtidos acrescentam ao conhecimento científico a opção de utilização de FMA no cultivo de fisális em substrato e em ambiente protegido; o potencial uso de extratos oriundos de frutos no controle de doenças, no caso o mofo-cinzento em morangos; bem como a proposição de um diagrama de área padrão (DAP) que auxiliará na avaliação da severidade da doença em trabalhos de diferentes âmbitos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão da literatura apresenta informações sobre o uso de FMA no cultivo de fisális (*Physalis peruviana* L.), a ação antifúngica de extratos obtidos de frutos de fisális e a ocorrência do mofo-cinzeno em morangos.

2.1 Fisális

O cultivo de fisális é considerado de rápido retorno econômico e uma atividade agrícola em expansão no Brasil. Produtores rurais têm apostado na produção em diferentes estados brasileiros como possibilidade de aumentar a fonte de renda. A cultura também tem despertado o interesse de empresas voltadas à comercialização, devido ao alto valor agregado dos frutos (MUNIZ et al., 2012). A produção tem os frutos como produto principal, comercializados com ou sem o cálice, com preço de mercado que pode chegar a R\$ 70,00 o quilograma (OLIVEIRA et al., 2020). As raízes e as folhas são destinados ao mercado farmacológico, enquanto que os cálices são utilizados para fins decorativos em diferentes produtos alimentícios (MUNIZ et al., 2012).

O fisális pertence ao gênero *Physalis*, o qual compreende entre 75 e 90 espécies, e à família Solanaceae. É uma planta perene, herbácea, ramificada e de crescimento indeterminado. Cada planta atinge até 2,0 metros de altura e pode apresentar 1.000 folhas ou mais. As flores são pedunculares e hermafroditas, de coloração amarela com pontos marrons. A polinização é realizada por insetos, pelo vento e por autopolinização. O cálice, órgão característico do gênero *Physalis*, se alonga depois da fecundação do fruto, cobre o fruto e permanece por todo o período de desenvolvimento do mesmo. Inicialmente de coloração verde, o cálice perde sua clorofila durante o período de desenvolvimento dos frutos, passando para a coloração amarelo-amarronzado. Os frutos quando maduros apresentam coloração alaranjada. Os frutos se desenvolvem e permanecem dentro do

cálice, o qual protege e melhora a qualidade pós-colheita dos frutos (BALAGUERA - LÓPEZ; MARTÍNEZ C; HERRERA-ARÉVALO, 2014).

Figura 1 - Frutos de fisális com cálice em grau de maturação 5 de acordo com a NTC 4580 (ICONTEC, 1998). Passo Fundo – 2018



Fonte: Débora Filippi.

O fisális se adapta facilmente a diferentes condições agroecológicas, classificado como uma planta de dias curtos, com fotoperíodo de 8 horas por dia. Se desenvolve bem em temperatura média anual entre 13 e 16 °C. No entanto, temperaturas noturnas abaixo de 10 °C prejudicam o desenvolvimento das plantas, bem como a ocorrência de geadas, como ocorre durante o inverno no Rio Grande do Sul (ALMANZA-MERCHÁN; FISCHER, 2012).

Os métodos de propagação são o sexuado, utilizando sementes, mais utilizado comercialmente devido ao alto percentual de germinação (85 a 90%), e o assexuado, por estaquia (MUNIZ et al., 2012). Solos ricos em matéria orgânica (>3%), com pH entre 5,5 e 6,5, são preferencialmente indicados para o cultivo. Podem ser cultivados em substratos convencionais, formados pela mistura de solo, matéria orgânica e areia em diferentes proporções, ou substratos comerciais contendo cascas carbonizadas e enriquecidos com FMA (LASPRILLA, 2012).

2.2 Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)

Os FMA são microrganismos simbiotes de culturas agrícolas que, em condições favoráveis, realizam simbiose com as plantas, proporcionando diferentes benefícios, como a produção de compostos do metabolismo secundário (BRUISSON et al., 2016; CECATTO et al., 2016; PEDONE-BONFIM et al., 2018). São exemplos de FMA que se associam com o fisális, os fungos *Rhizophagus clarus* (T.H. Nicolson e N.C. Schenck) C. Walker e A. Schüßler e *Claroideoglossum claroideum* (NC Schenck e GS Smith) C. Walker e A. Schüßler (HRISTOZKOVA et al., 2017). Os FMA podem ser utilizados como ferramenta biotecnológica e beneficiar o sistema radicial das plantas e a qualidade dos frutos (CHIOMENTO et al., 2019b).

Plantas de fisális contaminadas com os metais pesados cádmio (Cd) e chumbo (Pb) após inoculadas com as espécies de FMA *Rhizophagus clarus* (T.H. Nicolson e N.C. Schenck) C. Walker e A. Schüßler e *Claroideoglossum claroideum* (NC Schenck e GS Smith) C. Walker e A. Schüßler apresentaram redução considerável dos metais pesados nos frutos em comparação com plantas não inoculadas. Além disso, foram observados benefícios no número e massa seca dos frutos, maior atividade da fosfatase ácida, acúmulo de proteínas nas raízes e produção de glomalina. O tipo de defesa antioxidante de frutos de fisális foi dependente da inoculação com FMA, sendo influenciado pela espécie inoculada. O estabelecimento micorrízico modificou a composição e a concentração dos ácidos graxos nos frutos e o acúmulo de compostos bioativos (HRISTOZKOVA et al., 2017).

A produção de compostos do metabolismo secundário em plantas, à exemplo dos compostos fenólicos, pode variar em função da espécie de FMA isolada ou em comunidade, da interação FMA/planta e da presença/ausência de elementos como fósforo e nitrogênio (PEDONE-BONFIM et al., 2018; SANCHEZ-BEL et al., 2016). As associações simbióticas entre as plantas e os FMA conferem resistência, permitindo sobreviverem ao ataque de fitopatógenos (BRUISSON et al., 2016; CHAGNON; BRADLEY, 2015). Plantas de tomateiro, pertencente à família Solanaceae, como o fisális, colonizadas com os isolados *Rhizophagus irregularis* C. Walker & A. Schüßler

(SANCHEZ-BEL et al., 2016; BLASZKOWSKI, 2012) e *Glomus mosseae* Gerd. et Trappe BEG12 (Biorize) (FIORILLI et al., 2011), e a cultura da videira inoculada com o isolado *R. irregularis* C. Walker & A. Schüßler (BRUISSON et al., 2016; BLASZKOWSKI, 2012), apresentaram maior resistência ao fitopatógeno *Botrytis cinerea* Pers..

Estudos nesse campo científico tendem a crescer, visto que o aumento do conteúdo e da concentração de compostos fenólicos em plantas produzidos pela simbiose FMA/planta não se restringem ao aumento individual dos compostos, mas podem ser empregados na forma de extratos vegetais como uma estratégia de controle de fitopatógenos, à exemplo do mofo-cinzento (BASU; RABARA; NEGI, 2018; PEDONE-BONFIM et al., 2018).

2.3 Extratos de fisális e ação antifúngica

O fisális é comumente utilizado na medicina popular para o tratamento de diferentes doenças, tem atraído o interesse científico (HASSANIEN, 2011; PUENTE et al., 2011). O conhecimento dos compostos do metabolismo secundário responsáveis pelas diferentes ações biológicas exercidas pela planta, à exemplo a ação antifúngica, é possível por meio da obtenção de extratos da planta, identificação e quantificação dos compostos presentes nos extratos e a realização de testes de ação antifúngica (CORRALES-BERNAL et al., 2015; ERTÜRK et al., 2017; FILIPPI, 2018; OLIVARES-TENORIO et al., 2017).

A denominação de extratos vegetais faz referência a um grupo de substâncias extraídas de diferentes partes da planta, incluindo raízes, cascas, sementes, folhas e frutos, as quais contêm uma variedade de compostos do metabolismo secundário (MARTÍNEZ, 2012).

Extratos de fisális são obtidos dos frutos (CORRALES-BERNAL et al., 2015; ERTÜRK et al., 2017; FILIPPI, 2018; GÖSTOK; ZENGİN, 2013; LICODIEDOFF;

KOSLOWSKI; RIBANI, 2013), do cálice das flores (FRANCO-OSPINA et al., 2013), das folhas, do tronco e das sementes (ERTÜRK et al., 2017).

Dentre os compostos do metabolismo secundário identificados em extratos de fisális com ação antifúngica, a classe dos compostos fenólicos é a predominante, representada principalmente por ácidos fenólicos e flavonoides (CORRALES-BERNAL et al., 2015; ERTÜRK et al., 2017; FILIPPI, 2018; OLIVARES-TENORIO et al., 2017).

A investigação *in vitro* da ação antifúngica exercida por extratos de fisális é descrita na literatura. Tiveram o desenvolvimento inibido por extratos obtidos de diferentes partes da planta os fungos *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc, *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, *Phytophthora cinnamomi* Rands, *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout, *C. albicans* ATCC 10231, *C. globrata*, *C. tropicalis* (Castell.) Berkhout e *Aspergillus niger* Tiegh., ATCC 9642 e *Botrytis cinerea* Pers. (ERTÜRK et al., 2017; FILIPPI, 2018; GÖZTOK; ZENGİN, 2013).

O interesse em testar a ação de extratos de fisális no controle do mofo-cinzento deveu-se, principalmente, à resistência desenvolvida para maioria dos fungicidas químicos registrados para o controle da doença, bem como pelo uso errôneo e/ou excessivo dos fungicidas químicos, confirmado pela presença de resíduos de produtos não permitidos ou acima do limite em morangos (BRASIL, 2016). Também se justifica pela persistência de ingredientes ativos dos fungicidas no solo e na água, representando potenciais fontes de contaminação ambiental (VIO-MICHAELIS et al., 2012).

2.4 Mofo-cinzento

O fungo *Botrytis cinerea* Pers., causador do mofo-cinzento, pode ser encontrado em diferentes regiões geográficas e infectar mais de duzentas espécies de plantas no mundo (DEAN et al., 2012; GRABKE, 2014). A importância científica e econômica do fungo é demonstrada pela posição de segundo lugar no *ranking* dos dez fungos

fitopatogênicos de maior importância mundial, ficando atrás somente do fungo *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch (DEAN et al., 2012).

O fungo pode sobreviver na matéria orgânica presente no solo ou na forma de escleródios. Após a germinação dos escleródios ocorre a formação de conídios unicelulares, incolores ou acinzentados, que são dispersos por correntes de ar para novos hospedeiros. O micélio fúngico é formado por hifas e conidióforos ramificados, de coloração variando do cinza ao marrom (TÖFOLI et al., 2011).

Condições climáticas de umidade favorecem a liberação de conídios. Longos períodos chuvosos, ou excesso de irrigação por aspersão, aumentam a incidência da doença. Temperaturas entre 22 e 25 °C e umidade relativa entre 90 e 100% favorecem a germinação de conídios, que penetram no tecido dos hospedeiros, esporulam e iniciam um novo ciclo infeccioso (TÖFOLI et al., 2011). O fungo também é capaz de se desenvolver em temperaturas inferiores a 10 °C (GINDRO; PEZET, 2001; LAHLALI et al., 2007; TÖFOLI et al., 2011) e manter a viabilidade dos conídios após o armazenamento em temperaturas de -80 a -20 °C por até três anos (GINDRO; PEZET, 2001).

O controle do fungo requer a adoção de diferentes práticas de manejo, como a utilização de cultivares resistentes, substratos esterilizados, solos bem drenados e aerados, remoção de plantas doentes, local adequado para o armazenamento dos frutos, controle biológico e químico (ROMANAZZI et al., 2016), e o uso de fungicidas naturais à base de extratos vegetais (BRASIL, 2016).

No mundo, a ocorrência do mofo-cinzento em morangueiro (*Fragaria X ananassa* Duch.) se constitui na principal podridão fúngica em morangos (ANTUNES; REISSER-JUNIOR; SCHWENGBER, 2016, p. 438; CANTILLANO; SILVA, 2010). A incidência do mofo-cinzento em morangueiro representa, em média, 15% no período pré-colheita e 50% na pós-colheita. Estes percentuais reforçam a necessidade de se realizar o manejo do fitopatógeno, principalmente no local de cultivo, seja em campo ou em ambiente

protegido, pois a alta incidência da doença pós-colheita é resultante, na maioria das vezes, de infecções que ocorreram no período pré-colheita (JEON et al., 2017).

A predominância do mofo-cinzento em morangueiro se deve a fatores como a resistência adquirida pelo fitopatógeno ao método tradicional de controle realizado com fungicidas químicos (LOPES et al., 2017); à composição química dos morangos e a escassez de informações a respeito da resistência, tolerância e suscetibilidade de cultivares de morangueiro ao fitopatógeno, considerando que apenas as cultivares Oso Grande e Camarosa são descritas como tolerante e suscetível, respectivamente (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011). A ausência de um diagrama de área padrão, com imagens de morangos lesionados por mofo-cinzento para avaliar a severidade da doença em pós-colheita também contribui para dificultar a tomada decisão de controle.

3 CAPÍTULO I

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) no crescimento radicial e desempenho produtivo de fisális (*Physalis peruviana* L.) em ambiente protegido, e ação de extratos de frutos no controle do mofo-cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.) de morangueiro

3.1 Resumo

A associação simbiótica de plantas com os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) favorece o desempenho vegetativo e produtivo, e pode beneficiar a produção de compostos do metabolismo secundário. Nesse sentido, extratos vegetais, à exemplo, extratos de frutos de fisális podem apresentar resultados promissores no controle de doenças de plantas, à exemplo, o mofo-cinzento de morangueiro. Os objetivos da pesquisa foram avaliar se a presença de FMA no substrato afeta a morfologia do sistema radicial, a produção e a composição química dos frutos de fisális cultivados em vaso, em ambiente protegido; identificar a presença de ácidos fenólicos e flavonoides nos extratos de fisális; e testar se extratos obtidos de frutos provenientes de plantas sem e com inoculação com FMA apresentam melhor controle *in vitro* do mofo-cinzento, em relação ao uso de um fungicida químico. Os tratamentos foram a ausência e a presença de três inoculantes de FMA (uma comunidade micorrízica e dois isolados fúngicos), dispostos no delineamento em blocos casualizados, com cinco repetições e três plantas por parcela. Para o perfil fitoquímico foram utilizados vinte extratos de frutos de fisális oriundos dos tratamentos com FMA. Para o controle do mofo-cinzento foram testados oito tratamentos, dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado, realizado em replicata de dez placas por tratamento. Os resultados desse estudo são inéditos por demonstrarem que a inoculação com FMA no substrato afeta a morfologia do sistema radicial, a massa fresca e a composição química dos frutos de fisális cultivados em ambiente protegido. O fungo *Glomus intraradices* é mais eficaz em colonizar as raízes de fisális, mas *Rhizophagus clarus* e *G. intraradices* proporcionam maior incremento do volume radicial e massa fresca dos frutos. A qualidade dos frutos é beneficiada pela inoculação com a comunidade micorrízica e *R. clarus*, sendo este uma possibilidade para utilizar-se na cultura do fisális. Os inóculos de FMA testados não potencializam a ação dos ácidos cafeico e p-cumárico e do flavonoide rutina presentes nos extratos de fisális, na concentração testada, sem revelar efeito no controle *in vitro* do mofo-cinzento de morangueiro.

Palavras-chave: 1. *Glomus intraradices*. 2. *Rhizophagus clarus*. 3. Comunidade micorrízica. 4. Fitoquímicos. 5. Desenvolvimento micelial.

3.2 Introdução

O fisális pertence à família Solanaceae, difundido no mercado internacional sobretudo pelo seu valor nutricional (ETZBACH et al., 2018). Em escala global, a cultura apresenta produção de 80.014 toneladas e área colhida de 14.943 hectares (FAO, 2019).

No Brasil, o cultivo iniciou em 1999 no estado de São Paulo (TREVISANI et al., 2016) e se difundiu para os diferentes estados, incluindo o Rio Grande do Sul (LIMA et al., 2009). No entanto, a produção nacional não é suficiente para abastecer o mercado consumidor interno (RODRIGUES et al., 2009), exigindo a importação de frutos da Colômbia, justificando seu alto valor comercial (BRAVO et al., 2014).

O crescente mercado justifica a necessidade de estudos para desenvolver novas tecnologias de cultivo da espécie, pois são limitadas as informações técnicas sobre o desempenho hortícola no Brasil. O cultivo em ambiente protegido em vaso permite que essa solanácea seja produzida em diferentes regiões, em especial aquelas que apresentam condições ambientais limitantes, como as baixas temperaturas no período de inverno ou restrições fitossanitárias presentes no solo. No entanto, as informações disponíveis na literatura se concentram em cultivo de fisális no campo.

O cultivo tradicional de outras solanáceas requer grande utilização de agroquímicos e fertilizantes, a exemplo do tomateiro e do pimentão, frequentemente ocasionando a contaminação do agroecossistema de cultivo. Uma das alternativas para minimizar esses entraves em cultivo em ambiente protegido é a inoculação do substrato com fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

Os FMA (filo Glomeromycota) estão entre os tipos de fungos micorrízicos existentes. Esses microrganismos, habitantes do solo (SENÉS-GUERRERO; SCHÜBLER, 2016), estabelecem associações simbióticas com 80% da flora terrestre (BERRUTI et al., 2016). Os FMA desempenham papel biológico no funcionamento e na estabilidade de ecossistemas naturais e agrícolas, proporcionando melhor estabelecimento inicial de plantas (GOETTEN; MORETTO; STRÜMER, 2016), proteção às plantas contra patógenos (JUNG et al., 2012), maior absorção de água e nutrientes (GÓMEZ-BELLOT et al., 2015) e redução do estresse salino (HASHIM et al., 2015) e promoverem o aumento do conteúdo de metabólitos secundários (PEDONE-BONFIM et al., 2018).

No *Physalis* foi demonstrado que os FMAs arbusculares aumentaram as taxas de crescimento dos frutos sob condições salinas (MIRANDA; FISCHER; ULRICHS, 2011) e a concentração de ácidos graxos insaturados dos frutos em resposta ao estresse por metais pesados (HRISTOZKOVA et al., 2017). Também a micorrização, sob estresse hídrico, promoveu efeitos benéficos no acúmulo de matéria seca de raiz e melhorou atributos relacionados às trocas gasosas das plantas (REYES et al., 2019).

Quando em simbiose com FMAs, as plantas sofrem algumas alterações morfológicas e fisiológicas (FOLLI-PEREIRA et al., 2012; HOFFMANN; LUCENA, 2006). Durante o desenvolvimento intracelular do FMA há formação da membrana periarbuscular, formando entre a planta e a parede do FMA uma região de troca de nutrientes (HOFFMANN; LUCENA, 2006), proporcionado pelas hifas fúngicas que funcionam como uma extensão do sistema radicial. A planta se beneficia do aumento da absorção de água e nutrientes, principalmente de fósforo (P), enquanto o FMA é beneficiado pelos fotoassimilados das plantas, que permitem o seu completo ciclo de vida, que ocorre em associação com a planta hospedeira (FOLLI-PEREIRA et al., 2012). Quando o arbúsculo chega em fase de senescência, essa membrana o envolve e as células que sofreram alterações voltam ao aspecto anterior ao da colonização (HOFFMANN; LUCENA, 2006).

A possibilidade de aumento do conteúdo de metabólitos secundários em frutos de *Physalis* inoculados com FMA permite que extratos obtidos dos frutos possam ser testados como métodos alternativos de controle de doenças, à exemplo o mofo-cinza do morangueiro. O controle da doença é realizado, principalmente, com o uso de fungicidas químicos e práticas de manejo da cultura (ROMANAZZI et al., 2016). Contudo, o controle químico tem apresentado problemas, como a resistência desenvolvida pelo fitopatógeno, a contaminação ambiental e a preocupação com a saúde humana, aumentando a pressão pelo uso de métodos alternativos de controle da doença, como o uso de extratos vegetais, podendo o extrato de *Physalis* apresentar potencial (KIM et al., 2016; LOPES et al., 2017).

A ação de extratos vegetais sobre o fitopatógeno é demonstrada através de resultados de testes *in vitro*, com resultados atribuídos principalmente aos compostos do metabolismo secundário (DANIEL; LENNOX; VRIES, 2015; MENDONZA et al., 2013). A intensidade da ação dos extratos de plantas pode variar em função da concentração de cada composto extraído e da parte da planta utilizada (frutos, folhas, sementes, caule e raiz) (ÇAKIR et al., 2014; GÖZTOK; ZENGİN, 2013).

Porém, estudos são necessários para preencher as lacunas existentes em relação ao desempenho hortícola de fisális submetido à biotecnologia micorrízica, cultivado em ambiente protegido e em vaso.

A simbiose entre fisális e espécies de FMA é descrita na literatura por proporcionar benefícios à espécie *Physalis peruviana* L. (HRISTOZKOVA et al., 2017), porém, a ação de extratos de fisális obtidos de frutos produzidos por plantas inoculadas com FMA sobre o mofo-cinzento do morangueiro ainda não foi reportada.

Esse trabalho foi proposto com base nas hipóteses: a) que plantas de fisális inoculadas com FMA apresentam desempenho hortícola superior; b) que extratos obtidos de frutos de fisális possuem ácidos fenólicos e flavonoides em sua composição fitoquímica; e c) que extratos provenientes de plantas com inoculação com FMA apresentam melhor controle *in vitro* do mofo-cinzento, em relação ao uso de um fungicida químico.

Assim, os objetivos foram avaliar se a presença de FMA no substrato afeta a morfologia do sistema radicial, a produção e a composição química dos frutos de fisális cultivados em vaso, em ambiente protegido; identificar a presença de ácidos fenólicos e flavonoides nos extratos de fisális; e testar se extratos obtidos de frutos provenientes de plantas sem e com inoculação com FMA apresentam melhor controle *in vitro* do mofo-cinzento, em relação ao uso de um fungicida químico.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Estudo I: Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) no crescimento radicial e desempenho produtivo de fisális (*Physalis peruviana* L.) em ambiente protegido

3.3.1.1 Sujeito, local e período de realização da pesquisa

A pesquisa foi conduzida com a cultura de fisális na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF) (28° 15' 46" S, 52° 24' 24" W) em Passo Fundo, Rio Grande do Sul (RS), Brasil, em estufas agrícolas, de agosto de 2018 a julho de 2019.

3.3.1.2 Tratamentos e delineamento experimental

Os quatro tratamentos consistiram na inoculação do substrato de cultivo de fisális com uma comunidade micorrízica (Tabela 1), isolados dos fungos *Glomus intraradices* N.C. Schenck & G.S. Sm. e *Rhizophagus clarus* (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) C. Walker & A. Schüßler] e a testemunha - sem inoculação. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com cinco repetições e três plantas por parcela.

Tabela 1 - Comunidade de FMA identificada em solo cultivado com morangueiro no município de São José do Hortêncio, RS. Passo Fundo - 2019

Comunidade micorrízica
<i>Acaulospora foveata</i> Trappe & Janos
<i>Claroideoglossum</i> aff. <i>luteum</i>
<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>Funneliformis</i> aff. <i>mosseae</i>
<i>Funneliformis mosseae</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler
<i>Glomus</i> aff. <i>versiforme</i>
<i>Glomus</i> sp. (<i>caesaris</i> like)
<i>Glomus</i> sp. 2

Fonte: Chiomento et al. (2019b).

Conforme reportado por Chiomento et al. (2019a), a identificação das espécies micorrízicas da comunidade foi realizada pela extração dos esporos em 50 g de solo utilizando o método de peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) e centrifugação em sacarose (JENKINS, 1964). Após a extração, as espécies micorrízicas foram agrupadas em morfotipos (MORTON, 1988). A identificação das espécies foi realizada por meio da morfologia de morfotipos de esporos, em microscópio ótico (BLASZKOWSKI, 2012; SCHENCK; PÉREZ, 1990) e pelas descrições obtidas no banco de dados da International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM, 2017). A classificação taxonômica usada foi a proposta por Redecker et al. (2013).

A comunidade de FMA foi proveniente do cultivo-armadilha de solo agrícola coletado em local-referência no cultivo de morangueiro no município de São José do Hortêncio (29° 29' 33" S, 51° 12' 24" W), RS (CHIOMENTO et al., 2019a), composta pelas dez espécies fúngicas apresentadas na Tabela 1. O isolado *G. intraradices* N.C. Schenck & G.S. Sm. (110704) foi proveniente do produto comercial MYKE® PRO e o isolado *R. clarus* (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) C. Walker & A. Schüßler], (542906) foi obtido da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG).

Os inoculantes utilizados no experimento foram obtidos pela técnica de cultura em armadilha (STUTZ; MORTON, 1996) com sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] como planta hospedeira e areia esterilizada (120 °C por 20 minutos) como substrato. Após cinco meses de multiplicação do sorgo, os inoculantes foram obtidos e continham esporos micorrízicos, pedaços de raízes (da técnica de cultura em armadilha) e areia estéril (do substrato da técnica de cultura em armadilha). Não foi utilizado nenhum material portador (como, por exemplo, zeólito) durante o processo de multiplicação ou após a obtenção dos inoculantes, que foram aplicados manualmente na cova de plantio.

3.3.1.3 Procedimentos

A produção das mudas foi realizada a partir de sementes coletadas de frutos importados da Colômbia, adquiridos em estabelecimento comercial, que se encontravam

no estágio de maturação 5 (maduros) (ICONTEC, 1998). Sementes de três frutos foram dispostas em papel-toalha para secagem em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para induzir a germinação, as sementes foram dispostas em caixas gerbox contendo papel mata-borrão e solução de nitrato de potássio (KNO_3) a 0,1 molar (M) e armazenadas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Em setembro, após a germinação das sementes, as plântulas foram plantadas em bandejas de poliestireno de 72 células ($100\text{ cm}^3/\text{célula}$), preenchidas com o substrato comercial Horta 2[®] esterilizado ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos) e inoculado com 5 g de FMA das espécies conforme os tratamentos. O substrato Horta 2[®] é composto por casca de pinus, vermiculita, corretivos de acidez e nutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio), em quantidades não fornecidas pelo fabricante. Uma amostra de 500 g do substrato foi analisada para obtenção dos atributos físicos (BRASIL, 2007) (Tabela 2), e químicos (BRASIL, 2014) (Tabela 3).

Tabela 2 - Propriedades físicas do substrato utilizado no estudo. Passo Fundo - 2019

Substrato	D ¹ (kg/m^3)	PT	EA	AFD	AT
					(m^3/m^3)
Horta 2 [®]	241	0,837	0,303	0,149	0,020

Fonte: Dados da autora.

¹D: densidade. PT: porosidade total. EA: espaço de aeração. AFD: água facilmente disponível. AT: água tamponante.

Tabela 3 - Propriedades químicas do substrato utilizado no estudo. Passo Fundo - 2019

Substrato	N ¹	P ₂ O ₅	K ₂ O	CO	pH	CE	CTC
	%					(mS/cm)	(mmol/kg)
Horta 2 [®]	0,36	0,39	0,00	12,60	6,1	0,45	278,60

Fonte: Dados da autora.

¹N: 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 da superfície do solo, em uma estufa agrícola de 90 m^2 , com teto semicircular, instalada no sentido nordeste-sudoeste. 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, com vazão por aspersor de $1,8\text{ L}/\text{min}$,

de acionamento automatizado sete vezes ao dia, com molhamento total de 14 minutos e formação de lâmina de água de 7,8 mm/dia.

Em dezembro, após três meses do plantio, as mudas foram transplantadas em vaso de polietileno (3,6 L) preenchidos com o substrato comercial Horta 2[®] esterilizado (120 °C ± 1 °C por 20 minutos) e inoculado com mais 5 g de FMA conforme os tratamentos.

Os recipientes foram mantidos em canteiros cobertos com *mulching*, em estufa agrícola de 490 m², com teto semicircular, instalada no sentido nordeste-sudoeste. A estrutura de aço galvanizado era coberta com filme de polietileno de baixa densidade, com aditivo antiultravioleta e espessura de 150 micra.

A irrigação nessa etapa foi localizada constituída por hastes gotejadoras, no sistema automatizado, com vazão de 2,4 L/h por gotejador. O regime de irrigação consistiu no acionamento seis vezes ao dia, com tempo total de molhamento de seis minutos. A fertirrigação fornecida às plantas, mensalmente, foi a descrita por (FURLANI; FERNANDES JÚNIOR, 2004) (Tabela 4). As plantas foram conduzidas com três hastes tutoradas com o auxílio de arames.

Tabela 4 - Composição das soluções nutritivas recomendadas para o cultivo sem solo. Passo Fundo - 2019

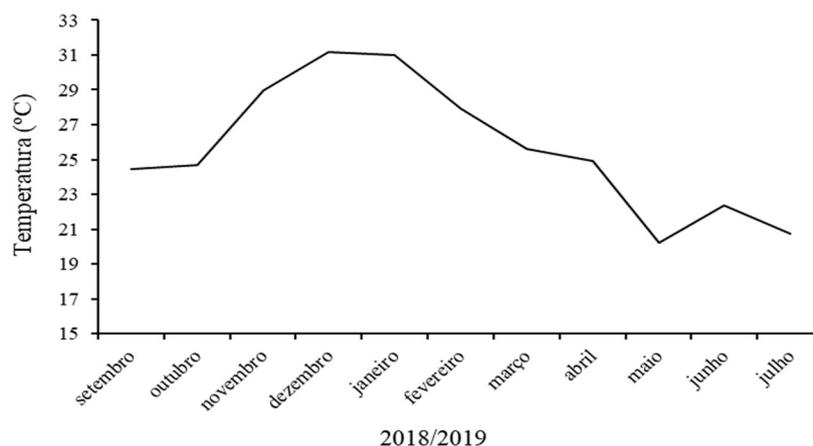
Sais ou fertilizantes	Soluções nutritivas (g/L H ₂ O) ¹		
	A	B	C
Nitrato de cálcio	160	0	0
Nitrato de potássio	0	100	100
Fosfato monoamônio	0	30	0
Fosfato monopotássico	0	36	72
Sulfato de magnésio	0	120	120
Ácido bórico	0,6	0	0
Sulfato de cobre	0,06	0	0
Sulfato de manganês	0,4	0	0
Sulfato de zinco	0,2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

Fonte: Furlani e Fernandez Júnior (2004).

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

Durante o experimento, utilizando uma miniestação meteorológica, foi monitorada a temperatura média do ar no interior das estufas (Figura 1). O período de setembro a novembro de 2018 correspondeu à aclimatização das mudas e de dezembro de 2018 a julho de 2019 o ciclo produtivo do fisális. A temperatura média foi de 25,7 °C.

Figura 1 - Temperatura média mensal durante a condução do experimento, de setembro de 2018 a julho de 2019. Passo Fundo - 2018/2019



Fonte: Dados da autora.

3.3.1.4 Avaliações

3.3.1.4.1 Morfologia do sistema radicial

A morfologia do sistema radicial foi avaliada no final do experimento, em julho de 2019. As raízes foram lavadas em água para eliminar os fragmentos do substrato e digitalizadas por um scanner. As imagens foram analisadas pelo software WinRHIZO[®]. Os atributos avaliados foram o comprimento total, a área superficial e o volume de raízes. As raízes foram agrupadas pelo software em distintas classes de diâmetro em relação à sua extensão total: muito finas ($\varnothing < 0,5$ mm), finas (\varnothing de 0,5 a 2 mm) e grossas ($\varnothing > 2$ mm) (BÖHM, 1979). Também foram avaliadas a massa fresca e seca do sistema radicial. Para obter a massa seca as raízes foram mantidas em estufa com circulação forçada de ar (65 °C) até massa constante, procedendo a pesagem em balança analítica eletrônica.

Também foi determinado o conteúdo de matéria seca do sistema radicial (CMSR) de acordo com a equação proposta por Atif et al. (2016):

$$\text{CMSR} = \left(\frac{\text{massa seca}}{\text{massa fresca}} \right) \times 100 \quad (1)$$

3.3.1.4.2 Capacidade infectiva dos FMA

Para verificar a capacidade infectiva dos FMA, porções de raízes das plantas micorrizadas foram preparadas de acordo com Phillips e Hayman (1970), e a porcentagem de colonização micorrízica (CO) (TROUVELOT et al., 1986) determinada pela equação:

$$\text{CO (\%)} = \frac{\text{número total de fragmentos com raízes micorrizadas}}{\text{número total de fragmentos}} \times 100 \quad (2)$$

3.3.1.4.3 Produção de frutos

Foi determinado o número de frutos produzidos por planta, a massa fresca e o diâmetro transversal dos frutos, e a produção por planta. O diâmetro transversal médio foi obtido a partir da avaliação de amostras de 20 frutos por parcela, medido com paquímetro digital. Os frutos foram colhidos quando estavam nos estádios de maturação 5 e 6, pesados em balança digital eletrônica (ICONTEC, 1998).

O tempo necessário para a maturação dos frutos foi avaliado e expresso em números de dias a partir do estágio de maturação verde - grau 1 (Icontec, NTC 4580) até atingir o estágio de maturação completamente maduro - grau 6 (ICONTEC, 1998). A amostra foi de 3 frutos por parcela, sendo um fruto por planta, marcados com fitilho. O período de avaliação se estendeu de final de março até o início de maio de 2019.

3.3.1.4 Composição química

A análise da composição química dos frutos foi feita no final do experimento, em julho de 2019. Foram avaliadas as seguintes características: teor de sólidos solúveis totais (SST), expresso em °Brix; acidez total titulável (ATT), expressa em % de ácido cítrico, a partir de amostras de 20 frutos por parcela; e relação SST/ATT, para avaliar o sabor dos frutos. O teor de SST foi determinado em refratômetro analógico. A determinação da ATT seguiu as normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

3.3.1.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (Anova) e as diferenças entre médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa Costat[®].

3.3.2 *Estudo II: Caracterização fitoquímica de extratos de frutos de fisális e ação no controle do mofo-cinzento (Botrytis cinerea Pers.) de morangueiro*

3.3.2.1 Sujeito, local e período de realização da pesquisa

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF) (28° 15' 46" S, 52° 24' 24" W), estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O desenvolvimento do experimento teve início em maio de 2019, com a colheita, armazenamento e liofilização dos frutos de fisális até dezembro de 2020, quando foram realizados os testes de ação antifúngica dos extratos no controle do mofo-cinzento em morangos, sujeito da pesquisa.

3.3.2.2 Tratamentos e delineamento experimental

Foram utilizados vinte (20) extratos de frutos de fisális oriundos dos tratamentos descritos no Capítulo 1 (Quadro 1).

Quadro 1 – Descrição dos quatro tratamentos que deram origem aos vinte extratos avaliados quanto ao perfil fitoquímico. Passo Fundo - 2020

T1: Extrato obtido de frutos de <i>fisális</i> oriundos de plantas inoculadas com a Comunidade micorrízica (Tabela 1 apresentada no Capítulo I).
T2: Extrato obtido de frutos de <i>fisális</i> oriundos de plantas não inoculadas com FMA.
T3: Extrato obtido de frutos de <i>fisális</i> oriundos de plantas inoculadas com <i>Rhizophagus clarus</i> (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) C. Walker & A. Schüßler].
T4: Extrato obtido de frutos de <i>fisális</i> oriundos de plantas inoculadas com <i>Glomus intraradices</i> N.C. Schenck & G.S. Sm.

Fonte: Autora (2020).

Para o controle do mofo-cinzento foram testados oito (8) tratamentos, conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 – Descrição dos oito tratamentos testados na inibição do desenvolvimento micelial do mofo-cinzento. Passo Fundo - 2020

T1: Extrato obtido de frutos de <i>fisális</i> oriundos de plantas inoculadas com a Comunidade micorrízica (Tabela 1 apresentada no Capítulo I).
T2: Extrato obtido de frutos de <i>fisális</i> oriundos de plantas não inoculadas com FMA.
T3: Extrato obtido de frutos de <i>fisális</i> oriundos de plantas inoculadas com <i>Rhizophagus clarus</i> (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) C. Walker & A. Schüßler].
T4: Extrato obtido de frutos de <i>fisális</i> oriundos de plantas inoculadas com <i>Glomus intraradices</i> N.C. Schenck & G.S. Sm.
T5: Fungicida comercial Mythos®.
T6: Controle (Meio de cultura BDA sólido, sem inóculo).
T7: Solvente (água/álcool etílico) utilizado no preparo dos extratos de frutos de <i>fisális</i> na proporção de 30/70, v/v.
T8: Controle (Meio de cultura BDA sólido, com inóculo)

Fonte: Autora (2020).

Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado, tendo como unidade experimental uma placa de Petri de 90 x 15 mm. O experimento foi realizado em replicata de dez placas por tratamento.

3.3.2.3 Procedimentos

3.3.2.3.1 Liofilização dos frutos

Foram coletados manualmente 20 frutos de cada tratamento de cada bloco, com mesmo grau de maturação (5 e 6), utilizando como critério a coloração do cálice, conforme estabelecido na Normativa Técnica Colombiana n° 4580 (1998). Após a remoção do cálice os frutos foram encaminhados para serem liofilizados no Laboratório Multiprocessos do Centro Tecnológico da UPF. As bandejas com os frutos foram armazenadas em ultrafreezer na temperatura de -72 °C até o momento da liofilização, pois o processo foi realizado em etapas, considerando a capacidade do equipamento de cinco bandejas/ciclo. Na câmara do liofilizador as bandejas foram acomodadas sem as tampas em prateleiras, processadas na pressão de -719 mm Hg por 51 h. Após liofilizadas, as bandejas foram fechadas e armazenadas em freezer (-6 °C) até o preparo dos extratos.

3.3.2.3.2 Perfil fitoquímico

a) Obtenção dos extratos

Os extratos foram preparados no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal da UPF, na concentração de 300 mg/mL, na ausência de luz para evitar possível degradação de compostos fenólicos. De cada tratamento foram utilizadas 3 g de frutos liofilizados, transferidos para erlenmeyers, macerados com auxílio de bastão de vidro e adicionados de 10 mL de solução extratora, a qual foi composta por água e álcool etílico na proporção de 30:70 (v/v). Os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e levados para banho de ultrassom nas condições de 100% de potência, sem aquecimento, por 2 horas. Posteriormente, os extratos foram filtrados em gase para separar o material vegetal liofilizado do que passou pelo filtro, e após armazenados em béqueres e protegidos da luz com papel alumínio.

b) Avaliação do perfil

A avaliação do perfil fitoquímico dos extratos obtidos dos frutos de *fisalis* foi realizada em dezembro de 2019, no Núcleo de Experimentação e Estudos Analíticos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - Campus Sertão. Foi realizada a determinação dos teores dos ácidos fenólicos: cafeico, ferúlico, gálico, fumárico e p-cumárico; e dos flavonoides: catequina, rutina, kaempferol, mangiferina e quercetina, expressos em $\mu\text{g/mL}$, dos 20 extratos. Os compostos dos extratos foram caracterizados e quantificados utilizando um sistema HPLC conectado a um espectrômetro de massa com single quadrupolo (LCMS 2020; Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com uma fonte de ionização por electro pulverização (ESI), com modificações (ARRUDA et al., 2018; SHIMADZU, 2014).

A separação cromatográfica dos ácidos fenólicos e flavonoides foi realizada em uma coluna Shim-pack VP-ODS III (150 x 2,0 mm id, tamanho de partícula 4,6 μm , Shimadzu, Kyoto, Japão), com forno termostato à 40 °C. A temperatura do amostrador foi mantida em 15 °C. O volume de injeção foi de 10 μL . As fases móveis consistiam em 0,1% de ácido fórmico em água (eluente A) e acetonitrila (eluente B), a uma taxa de fluxo de 0,40 mL/minuto. As condições de eluição foram as seguintes: 0-1 minuto, 5% de eluente B; 1-4 minutos, 5 a 60% de eluente B; 4-7 minutos, 60 a 70% de eluente B; 7-10 minutos, 70 a 100% de eluente B; 10-10,50 minutos, 100% de eluente B; 10,50-11 minutos, 100 a 5% de eluente B; 11-15 minutos, 5% de eluente B.

A fonte ESI foi operada no modo de íon negativo com os seguintes parâmetros principais: tensão capilar de 3,5 k V; temperatura do bloco de calor de 200 °C; temperatura da linha de dessolvatação de 250 °C; fluxo de gás de secagem (N_2) de 15 L/minuto; fluxo de gás de nebulização (N_2) de 1,5L/minuto. Para cada padrão: ácidos cafeico (Sigma CO352, CAS: 331-39-5), ferúlico (Sigma 1791), gálico (Sigma 3784, CAS: 149-91-7), fumárico (Sigma 47910, CAS: 110-17-8) e p-cumárico (Sigma C9008, CAS: 501-98-4), catequina (Sigma C1251, CAS: 205-825-1), rutina (Sigma R5143, CAS: 207-671-509), kaempferol (Sigma 60010, CAS: 520-18-3), mangiferina (Sigma M3547, CAS: 4773-96-0) e quercetina (Sigma Q4951, CAS: 117-39-5), a molécula desprotonada

[M-H] foi usada como íon de identificação do composto e determinação do tempo de retenção.

Os compostos foram caracterizados por comparação aos seus padrões de dissociação HPLC-ESI (-) MS e tempo de retenção com os padrões autênticos. A quantificação dos compostos foi realizada por comparação com curva padrão de calibração de cada padrão. As soluções de estoque de cada composto padrão (1 mg/mL) foram preparadas em metanol e armazenadas. Uma solução intermediária contendo todos os padrões (10 µg/mL) foi preparada em ácido fórmico a 0,1% em água e as diluições da solução realizadas em cinco níveis diferentes para as curvas de calibração (1-10 µg/mL). Os dados foram obtidos e processados pelo *SoftwareLabsolution* (versão 5,53 SP2 (SHIMADZU, 2014).

3.3.2.3.3 Controle do mofo-cinzento

a) Obtenção do inóculo do mofo-cinzento

O inóculo do mofo-cinzento foi obtido de morangos pós-colheita, da cultivar Camarosa, oriundos de comércio local do município de Getúlio Vargas, RS, com 15 dias de antecedência à realização do teste. No Laboratório de Fitopatologia da UPF foi coletado, com o auxílio de uma agulha estéril, o inóculo fúngico do mofo-cinzento cultivado em placa de Petri e transferido para as placas contendo 25 mL de BDA. As placas foram fechadas e seladas com plástico tipo parafilme e armazenadas por 15 dias em câmara de incubação à 25 °C, sob 12 horas de luz.

b) Aplicação dos extratos nos inóculos

A metodologia utilizada para a aplicação dos tratamentos foi a denominada de “*Poisoned Food*” (BALOUIRI; SADIKI; IBSOUDA, 2016). Consistiu na incorporação dos tratamentos (Quadro 1) de concentração conhecida (300 mg/mL), no volume de 250 µL, sobre o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) sólido, previamente preparado e vertido em volume de 25 mL em placas de Petri de 90x15 mm, seguido de agitação

manual. Após a geleificação do meio de cultura foi realizada a inoculação do mofo-cinzento, colocando no centro de cada placa discos de micélio de 7 mm de diâmetro. As placas foram fechadas e seladas com plástico tipo parafilme e incubadas à 25 °C, com fotoperíodo de 12 h de luz por 15 dias.

Após o período de incubação foram medidos, com auxílio de paquímetro digital, o diâmetro do crescimento micelial do fungo em cada uma das placas e a ação dos tratamentos testados sobre o fungo, estimada pela seguinte equação:

$$\text{Atividade antifúngica (\%)} = \left(\frac{D_c - D_t}{D_c} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde D_c é o diâmetro do crescimento na placa controle e D_t o diâmetro na placa contendo o tratamento testado.

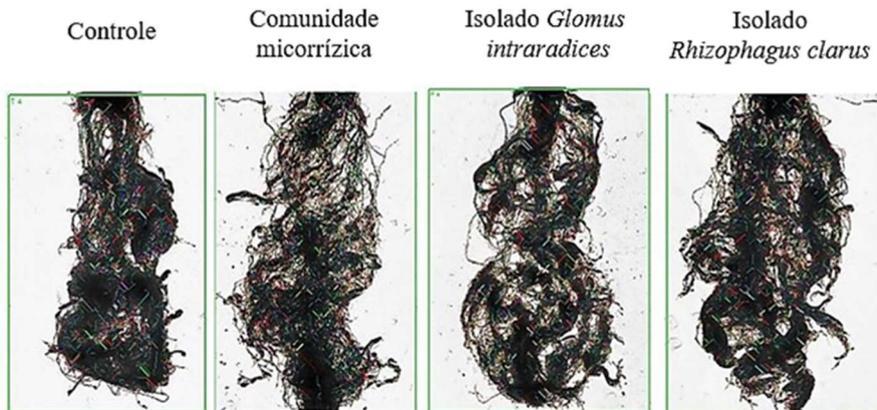
3.3.2.4 Análise estatística

Os dados obtidos quanto à concentração de flavonoides e ácidos fenólicos nos frutos foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade de erro. Os dados do crescimento micelial do mofo-cinzento não foram submetidos à análise de variância porque não houve controle pelos extratos. Apenas o fungicida comercial controlou o crescimento micelial do mofo-cinzento.

3.4 RESULTADOS

Quanto à capacidade infectiva dos FMA e a morfologia do sistema radicial (Figura 2), a análise de variância (Apêndice I) revelou a ocorrência de diferenças significativas entre os tratamentos para colonização micorrízica, volume de raízes e de raízes finas.

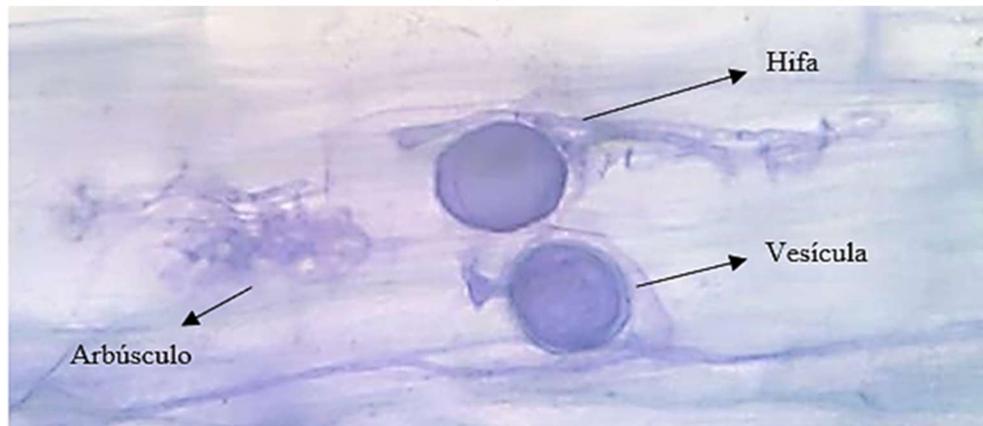
Figura 2 - Morfologia do sistema radicular de plantas de fisális na presença e ausência de inoculação com FMA. Passo Fundo - 2019



Fonte: Dados da autora.

A presença de hifas, vesículas e arbúsculos, estruturas fúngicas de FMA, foram constatadas no sistema radicial (Figura 3).

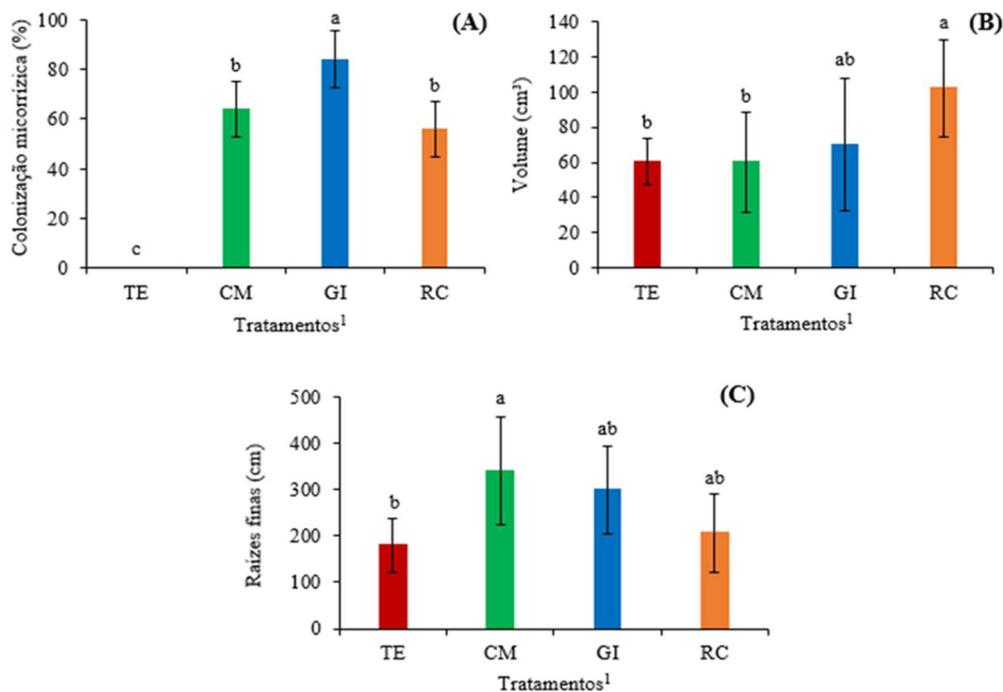
Figura 3 - Estruturas fúngicas (hifa, vesícula e arbúsculo) de FMA em raízes de fisális. Passo Fundo - 2019



Fonte: Dados da autora.

Os resultados mostraram que a espécie *G. intraradices* apresentou maior capacidade de infecção (84%), em relação à comunidade micorrízica (64%) e *R. clarus* (56%), que não diferiram entre si (Figura 4 A).

Figura 4 - Porcentagem de colonização micorrízica (A), volume de raízes (B) e comprimento de raízes finas (C) em plantas de fisális, na presença e ausência de FMA¹. Passo Fundo, RS - 2019



Fonte: Dados da autora.

Nota: Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Médias com letras distintas sobre as colunas diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

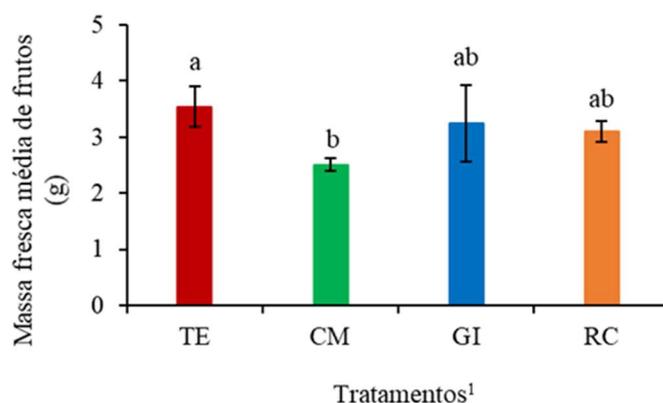
¹TE: testemunha (plantas não micorrizadas). CM: comunidade micorrízica (Tabela 1). GI: isolado *Glomus intraradices*. RC: isolado *Rhizophagus clarus*.

O comprimento total médio do sistema radicial foi de 688,41 cm, com área superficial média de 761,7 cm², não diferindo entre os tratamentos. No entanto, plantas inoculadas com *R. clarus* apresentaram maior volume radicial (102,0 cm³), seguido do tratamento com *G. intraradices* (70,4 cm³), que não diferiu das plantas não micorrizadas (60,7 cm³) e inoculadas com a comunidade de FMA (60,1 cm³) (Figura 4 B). A comunidade micorrízica proporcionou maior comprimento de raízes finas (340,9 cm), seguida dos isolados *G. intraradices* (300,6 cm) e *R. clarus* (207,2 cm), em relação à testemunha (180,1 cm) (Figura 4C). A média do comprimento de raízes muito finas foi de 244,0 cm e de raízes grossas de 187,1 cm, que não diferiram entre os tratamentos.

A colheita de frutos iniciou no final de março de 2019, finalizando no início de julho de 2019 por ocasião de uma intensa redução da temperatura com ocorrência de geadas que causaram danos na parte aérea das plantas.

A análise de variância demonstrou que houve diferenças significativas entre os tratamentos apenas para a massa fresca média de frutos (Apêndice II). A média do número total de frutos produzidos por planta foi de 36 frutos, com produção média de 112,4 g. Plantas não micorrizadas produziram frutos com maior massa fresca média (3,5 g) em relação às plantas inoculadas com a comunidade micorrízica (2,5 g), mas não diferiram das plantas micorrizadas com *G. intraradices* (3,2 g) e com *R. clarus* (3,1 g) (Figura 5). Entretanto, as diferenças nas médias da massa dos frutos não foram suficientes para propiciar diferenças estatística na produção por planta.

Figura 5 - Massa fresca média de frutos de fisális na presença e ausência de inoculação com FMA¹. Passo Fundo - 2019



Fonte: Dados da autora.

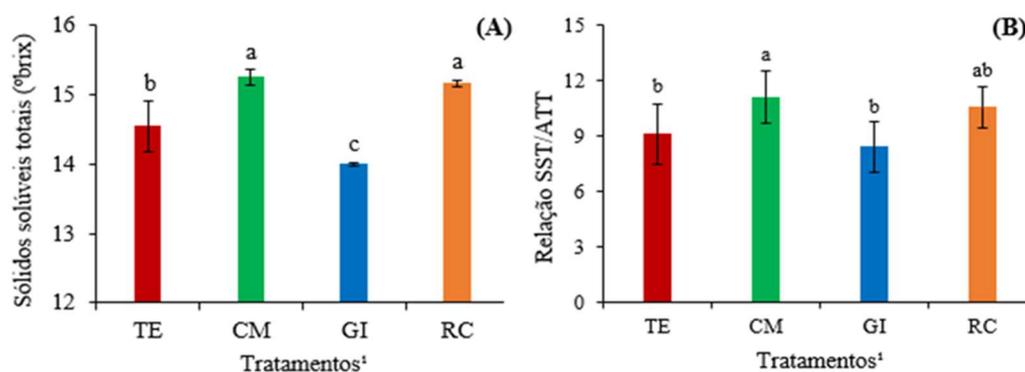
Nota: Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Médias com letras distintas sobre as colunas diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

¹TE: testemunha (plantas não micorrizadas). CM: comunidade micorrízica (Tabela 1). GI: isolado *Glomus intraradices*. RC: isolado *Rhizophagus clarus*.

O tempo que os frutos necessitaram para, partindo do estágio de maturação verde - grau 1 (ICONTEC, NTC 4580) atingirem o estágio de maturação completamente maduro - grau 6, foi influenciado pela presença dos FMA (ICONTEC, 1998). Enquanto nas plantas testemunha o período foi, em média, de 23 dias, nos tratamentos com FMA a média foi 10 dias superior, de 33 dias.

Quanto à composição química, relacionada com a qualidade dos frutos, de acordo com a análise de variância (Apêndice III) houve diferenças entre os tratamentos para sólidos solúveis totais (SST) e a relação sólidos solúveis totais/acidez total titulável (SST/ATT). Os frutos com maior teor de SST foram produzidos pelas plantas inoculadas com a comunidade micorrízica e com o isolado *R. clarus*, e mais baixos na presença de *G. intraradices* (Figura 6 A). Como a ATT não diferiu (média de 1,56% de ácido cítrico), os mesmos tratamentos apresentaram maior relação SST/ATT (Figura 6 B).

Figura 6 - Teor de sólidos solúveis totais (SST) (A) e relação sólidos solúveis totais /acidez total titulável (SST/ATT) (B) em frutos de fisális na presença e ausência de inoculação com FMA¹. Passo Fundo - 2019



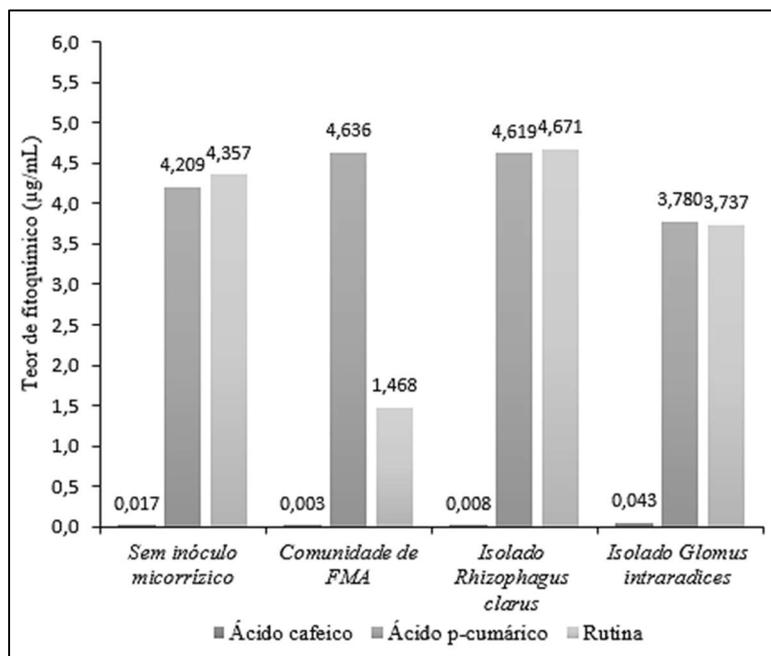
Fonte: Dados da autora.

Nota: Dados apresentados como média \pm desvio padrão. Médias com letras distintas sobre as colunas diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

¹TE: testemunha (plantas não micorrizadas); CM: comunidade micorrízica (Tabela 1); CM: comunidade micorrízica (Tabela 1). GI: isolado *Glomus intraradices*. RC: isolado *Rhizophagus clarus*.

Na caracterização fitoquímica dos extratos de frutos de fisális foram determinadas a presença de dois ácidos fenólicos e de um flavonoide. O teor do flavonoide rutina no extrato proveniente do inóculo com a comunidade micorrízica (1,468 $\mu\text{g/mL}$), embora não tenha diferido estatisticamente (Apêndice V), foi em valores absolutos em torno de três vezes menor em relação aos teores observados para os extratos provenientes de inóculo micorrízico com *R. clarus* (4,671 $\mu\text{g/mL}$), extrato sem inóculo micorrízico (4,357 $\mu\text{g/mL}$) e extrato proveniente de inóculo com *G. intraradices* (3,737 $\mu\text{g/mL}$). O ácido cafeico foi determinado em teores muito reduzidos, em níveis de traço em todos os extratos (Figura 7).

Figura 7- Concentração média de ácido cafeico, ácido p-cumárico e do flavonoide rutina em extratos de frutos de fisális para os tratamentos sem inóculo micorrízico (testemunha); comunidade micorrízica; isolado *Glomus intraradices* e isolado *Rhizophagus clarus*. Passo Fundo - 2020



Fonte: Dados da autora.

O ácido p-cumárico foi determinado na concentração de 4,636 µg/mL, no extrato proveniente do inóculo com a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares, 4,619 µg/mL no extrato proveniente do inóculo com o isolado *R. clarus*, 4,209 µg/mL no extrato sem inóculo micorrízico, e 3,780 µg/mL no extrato proveniente do inóculo com o isolado *G. intraradices*.

Os resultados do teste *in vitro* para inibição do desenvolvimento micelial do mofo-cinzento mostraram que os extratos obtidos de frutos de fisális, sem e com inoculação com FMA, não apresentaram controle *in vitro* do mofo-cinzento, não diferindo entre os tratamentos (Apêndice IV), apresentando-se o fungicida químico Mythos® eficiente.

3.5 DISCUSSÃO

Ao inocular plantas de fisális com FMA buscou-se avaliar se a presença desses microrganismos no substrato afeta a morfologia do sistema radicial, a produção e a composição química dos frutos de fisális cultivados em ambiente protegido, em vaso, além de identificar a presença de ácidos fenólicos e flavonoides nos extratos de fisális, e testar se extratos obtidos de frutos de plantas sem e com inoculação com FMA apresentam melhor controle *in vitro* do mofo-cinzento, em relação ao uso de um fungicida químico.

Os resultados mostraram que a espécie *G. intraradices* apresentou maior intensidade de colonização das raízes de fisális que a comunidade micorrízica e *R. clarus* (Figura 4A). A intensidade de colonização e o número de arbúsculos formados dentro das áreas colonizadas por FMA podem variar em função das diferentes combinações FMA-hospedeiro vegetal (FIORILLI et al., 2011). Por exemplo, o isolado *Glomus mosseae* Gerd. et Trappe BEG 12, inoculado em sementes de *Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker, apresentou 25% de intensidade de colonização e 77% de aumento no número de arbúsculos formados dentro das áreas colonizadas (FIORILLI et al., 2011). Por sua vez, plântulas de *Mimosa tenuiflora* cultivadas fora do solo, quando inoculadas por uma combinação de FMA, apresentaram as maiores taxas de colonização (PEDONE-BONFIM et al., 2018). Em morangueiros cv. Splendor, Sabrina e Fortuna, a incidência inicial de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* foi de até 10%, sendo observada a presença de esporos como estrutura fúngica. Posteriormente, em avaliação que coincidiu com o período de maior estresse no crescimento, a colonização foi de 50% das raízes. A cv. Fortuna se destacou em relação as demais cultivares, por apresentar dependência micorrízica $\geq 10\%$ (CECATTO et al., 2016).

Observando as formulações das soluções nutritivas (A, B e C) fornecidas mensalmente, percebe-se maior fornecimento de fosfato monoamônico e fosfato monopotássico durante o ciclo reprodutivo (72 g/L de água) do fisális, em relação ao ciclo vegetativo (66 g/L de água). A quantidade de fósforo (P), indispensável para o crescimento, está diretamente ligada à espécie de FMA, podendo interferir na intensidade de colonização e no número de arbúsculos formados (PEDONE-BONFIM et al., 2018).

A disponibilidade de P pode influenciar a viabilidade e a eficácia de FMAs (CECATTO et al., 2016). Na inoculação de plântulas de *Mimosa tenuiflora* com *Claroideoglossum etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & Schüßler (UNIVASF 06) e um mix (com 50 glomerosporos de cada FMA), não foi observado aumento no número de folhas pela adição de P, no entanto, quando inoculadas com *Gigaspora albida* N.C. Schenck & G.S. Sm. (UFPE 01) houve redução linear no número de folhas com o aumento das doses de P. A inoculação de plântulas com o isolado *G. albida* N.C. Schenck & G.S. Sm. (UFPE 01) e mix resultou em aumento do diâmetro de caule na ausência de P no solo (PEDONE-BONFIM et al., 2018).

O efeito da infecção com os FMAs em relação a testemunha, justifica o sistema radicial das plantas mostrar-se com maior volume de raízes (Figura 4 B), demonstrando o maior espaço ocupado pelas raízes das plantas inoculadas com FMAs. Esse benefício ao volume de raízes foi reportado na literatura, onde é demonstrado que a micorrização em fisális, sob estresse hídrico, aumentou o acúmulo de matéria seca de raiz (REYES et al., 2019). Também em morangueiro foram verificadas plantas de maior volume de raízes quando inoculadas com comunidades de FMA coletadas em solos de locais-referência no cultivo da espécie (CHIOMENTO et al., 2019b). Houve efeito da infecção com os FMAs no comprimento de raízes finas (Figura 4 C), mais eficientes na absorção de nutrientes.

Houve efeito da infecção com os FMAs no comprimento de raízes finas (Figura 4 C), mais eficientes na absorção de nutrientes. Sendo assim, sempre que o transporte de nutrientes for via micélio da micorriza, ao invés da solução do solo, ocorre benefício nutricional. Devido à plasticidade, as características das raízes 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, várias sinalizações moleculares são iniciadas, incluindo um fator difusível dos FMA chamado de “fator *Myc*” (quito-oligossacarídeos), que estimula a formação de raízes mais finas, alterando a morfologia do sistema radicial das plantas (OLÁH et al., 2005). Além disso, as modificações radiciais sob micorrização podem relacionar-se à alocação de açúcares às raízes (WU; LI; ZOU, 2011) e à regulação hormonal (ZOU et al., 2017), independente da

sinalização simbiótica (GUTJAH; CASIERI; PASZKOWSKI, 2009). Quanto mais raízes finas presentes nas plantas micorrizadas maior será a absorção de água e nutrientes (SINCLAIR et al., 2014), pois essas raízes são mais eficientes na utilização destes recursos disponíveis no meio de crescimento vegetal (MCCORMACK et al., 2015).

Embora plantas não micorrizadas produziram frutos com maior massa fresca média, houve benefícios da inoculação com FMAs na massa fresca média dos frutos. Entretanto, as diferenças nas médias da massa fresca dos frutos não diferiram estatisticamente a produção por planta. Nem sempre ocorre alta relação entre a infectividade fúngica e a eficiência em promover o crescimento das culturas devido ao tempo necessário para que se estabeleça o fluxo bidirecional entre simbiontes (ABBOTT; ROBSON, 1981), o que acaba limitando a resposta da planta à micorrização (LAMBAIS; CARDOSO, 1993). Em um ano de cultivo, não foi observado efeito da inoculação com FMA no aumento da quantidade e tamanho de frutos produzidos. Embora a colonização micorrízica seja importante, o percentual de infectividade das raízes nem sempre está correlacionado com a eficiência da simbiose (KONVALINKOVÁ; JANSÁ, 2016), que é influenciada por diferentes fatores, dentre esses: a combinação planta/FMA, a planta em si, características do substrato ou solo, como exemplo, pH e matéria orgânica (PEDONE-BONFIM et al., 2018.). Na literatura, é descrita a preferência de diferentes espécies de FMAs por solos com pH mais ácido (4,60 e 5,69), coletados em municípios do estado do RS, com aptidão agrícola para cultivo de morangueiro (CHIOMENTO et al., 2019a). Nesse sentido, o pH de 6,1 do substrato utilizado no cultivo do fisális, superior ao descrito na literatura, pode ter influenciado a eficiência da simbiose.

O tempo que os frutos necessitaram para, partindo do estágio de maturação verde - grau 1 (Icontec, NTC 4580), atingirem o estágio de maturação completamente maduro - grau 6 foi influenciado pela presença dos FMA. A diferença no tempo de maturação entre frutos de plantas micorrizadas e não micorrizadas pode estar relacionada ao fato de que os FMA demandam carboidratos da planta, ou seja, as plantas inoculadas com FMA realizam a partição dos fotoassimilados com os órgãos das plantas (drenos), mas também

com os FMA, enquanto plantas não micorrizadas não apresentam esse dreno a mais (LEITE et al., 2017).

Plantas de fisális inoculadas com FMA produziram frutos com melhor qualidade química. Frutos com maiores teores de açúcares foram proporcionados pela comunidade micorrízica (15,3 °Brix) e *R. clarus* (15,2 °Brix), seguido da testemunha (14,5 °Brix) e *G. intraradices* (14 °Brix) (Figura 6 A) e, conseqüentemente, maiores valores da relação SST/ATT, uma vez que a ATT não foi alterada, determinando melhor sabor (Figura 6 B). O benefício também foi observado em abobrinha (ROUPHAEL; CARDERELLI; COLLA, 2015), morangueiro (SINCLAIR et al., 2014) e tomateiro (SELLITTO et al., 2019). Estudando o efeito das FMA em diferentes disponibilidades de P, relatam incrementos de 2.946%, 3.219% e 3.481% no teor de carboidratos em plântulas de *M. tenuiflora* inoculadas com *C. etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & Schüßler (UNIVASF 06), *G. albidum* N.C. Schenck & G.S. Sm. (UFPE 01) e um mix, respectivamente, na ausência de P (PEDONE-BONFIM et al., 2018). No entanto, a porcentagem de incremento diminuiu com o aumento da dose de P, e na mais alta dose não houve incremento.

Em um ano de cultivo, não foi observado efeito da inoculação com FMA no aumento da quantidade e tamanho de frutos produzidos. Nem sempre ocorre alta relação entre a infectividade fúngica e a eficiência em promover o crescimento das culturas devido ao tempo necessário para que se estabeleça o fluxo bidirecional entre simbioses (ABBOTT; ROBSON, 1981), o que acaba limitando a resposta da planta à micorrização (LAMBAIS; CARDOSO, 1993). Embora a colonização micorrízica seja importante, o percentual de infectividade das raízes nem sempre está correlacionado com a eficiência da simbiose (KONVALINKOVÁ; JANSÁ, 2016).

Os resultados desse trabalho confirmaram o potencial de aplicar a biotecnologia micorrízica no cultivo de fisális em vaso, em ambiente protegido, visto que a presença de *G. intraradices* e *R. clarus* resulta em frutos com maior massa fresca e maior volume de raízes, bem como a presença da comunidade micorrízica e de *R. clarus* resulta em frutos de maior qualidade e plantas com maiores raízes finas. Porém, não excluem a necessidade

da continuidade da investigação com outras espécies de FMA, ou mix de espécies micorrízicas, para alcançar maior sucesso simbiótico fungo-hospedeiro e ganhos no desempenho hortícola de fisális.

Os objetivos definidos do cultivo também podem determinar a melhor opção, como pode ser verificada na produção diferenciada dos fitoquímicos, conforme o FMA empregado. As funções complexas dos FMA em agroecossistemas estão sendo descobertas e entendidas (GARLAND; SCHROEDER-MORENO, 2011). Dessa forma, uma maior compreensão da aplicação e dos benefícios dos FMA pode viabilizar seu uso na produção agrícola (ROBINSON-BOYER et al., 2016), no caso, no cultivo de fisális em ambiente protegido.

Ao avaliar a presença de ácidos fenólicos e flavonoide nos extratos de frutos de fisális, se observou a presença de compostos de ambas as classes de metabólitos secundários. Como resposta de defesa à colonização micorrízica, que não deixa de ser um causador de estresse, o hospedeiro vegetal pode aumentar a atividade de seu metabolismo secundário e a produção de compostos fitoquímicos (CHIOMENTO et al., 2019b; LINGUA et al., 2013). Embora os teores de ácidos fenólicos e flavonoide dentre os extratos não tenham diferido estatisticamente, foi observado que plantas inoculadas com *R. clarus* apresentaram maior média de teor total de compostos do metabolismo secundário.

Partindo do que é proposto na literatura, de que diante de um causador de estresse, como resposta de defesa à colonização micorrízica, o hospedeiro vegetal pode aumentar a atividade de seu metabolismo secundário e a produção de compostos fitoquímicos (CHIOMENTO et al., 2019b; LINGUA et al., 2013), a comunidade micorrízica pode não ter sido reconhecida pelas plantas como uma causadora de estresse, visto que plantas inoculadas com a comunidade micorrízica proporcionaram frutos de fisális de melhor qualidade (SST e SST/ATT), justificando o menor teor de ácido cafeico (0,003 µg/mL) e do flavonoide rutina (1,468 µg/mL), em relação aos demais inoculantes testados e a plantas sem inoculação micorrízica.

Ao testar os extratos obtidos de frutos provenientes de plantas sem e com inoculação com FMAs, para compreender se esses apresentam melhor controle *in vitro* do mofo-cinzeno, em relação ao uso de um fungicida químico, observamos que houve ausência de atividade biológica pelos extratos de fisális. Pressupõem-se que algumas características peculiares de cada composto do metabolismo secundário, à exemplo, baixa solubilidade aquosa, baixa estabilidade e permeabilidade de membrana limitada da rutina, podem ter contribuído para a ausência de atividade biológica dos extratos (GULLÓN et al., 2017). A concentração dos extratos (300 mg/mL) também pode ter influenciado na ausência de ação antifúngica, considerando que para um composto químico exercer atividade biológica deve atingir o alvo fisiológico numa concentração mínima, que determine tanto esse efeito biológico quanto o mecanismo de ação (OLIVEIRA; BASTOS, 2011). No entanto, os resultados desse experimento podem servir de subsídio para novas pesquisas, que podem se concentrar em investigar diferentes concentrações de extratos e até mesmo de extratos provenientes de frutos não submetidos ao armazenamento.

3.6 Conclusão

Os resultados obtidos nesse estudo são inéditos por demonstrar que, a inoculação com FMA no substrato afeta a morfologia do sistema radicial, a massa fresca e a composição química dos frutos de fisális cultivados em ambiente protegido. O fungo *G. intraradices* é mais eficaz em colonizar as raízes de fisális, mas *R. clarus* e *G. intraradices* proporcionam maior incremento do volume radicial e massa fresca dos frutos. A qualidade dos frutos é beneficiada pela inoculação com a comunidade micorrízica e *R. clarus*, que por sua vez, parece ser uma possibilidade de utilizar-se para a cultura do fisális, pois os resultados obtidos são promissores e servem como subsídio para incentivar o uso de inoculação com FMA pelos produtores e norteá-los quanto a escolha da(s) espécie(es). Os inóculos de FMA testados não potencializam a ação dos fitoquímicos presentes nos extratos de fisális (ácido cafeico, ácido p-cumárico e rutina), na concentração testada, sem revelar efeito no controle *in vitro* do mofo-cinzeno de morangueiro.

4 CAPÍTULO II

Desenvolvimento e validação de diagrama de área padrão (DAP) para avaliação da severidade do mofo-cinzento em morangos pós-colheita

4.1 Resumo

O mofo-cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.) é uma das principais doenças que afetam os morangos. As avaliações de severidade da doença são dificultadas pela inexistência de um diagrama de área padrão (DAP). Portanto, o objetivo desse estudo foi desenvolver e validar um conjunto de DAP para avaliar a severidade do mofo-cinzento em frutos de morangueiro. O conjunto de DAP possui sete níveis de severidade da doença (0, 8, 28, 46, 77, 82 e 100%) e foram validados por cinco avaliadores com experiência e cinco sem experiência em doenças de plantas. Foram utilizados cinquenta frutos para avaliar a severidade em três etapas: 1) sem escala; 2) com uma escala de classificação conhecida; e 3) com o DAP. O coeficiente de correlação de concordância de Lin (LCCC) da severidade estimada e real foi aprimorado com o uso de DAP (0,936) em comparação com a escala de classificação (0,735) e com a avaliação sem escala (-0,072). A comparação entre pares de todos os avaliadores mostrou que 87% do coeficiente de determinação foi superior a 0,81 com o DAP, enquanto apenas 37% e 9% foram superiores a 0,81 na escala de classificação e sem escala, respectivamente. O conjunto de DAP proposto nesse estudo pode melhorar a acurácia e precisão para estimar a severidade do mofo-cinzento em morangos.

Palavras-chave: 1. *Botrytis cinerea* Pers. 2. Avaliação da doença. 3. Severidade da doença. 4. *Camarosa*. 5. Fitopatometria.

4.2 Introdução

O morangueiro é uma das principais culturas hortícolas do mundo (ANTUNES; REISSER JUNIOR, 2007). Os frutos contêm fitoquímicos que desempenham diferentes funções e podem resultar em benefícios à saúde (CHAVES; CALVETE; REGINATTO, 2017; CHIOMENTO et al., 2019b; DUARTE et al., 2018). Os morangos são frutos altamente perecíveis e suscetíveis a várias doenças. O mofo-cinzento é considerado uma das principais doenças (PETRASCH et al., 2019), causada pelo fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* Pers. (JIN et al., 2017). A doença pode ocorrer no campo ou em estufa,

durante o armazenamento, transporte e comercialização, afetando atributos qualitativos e quantitativos (JEON et al., 2017; ROMANAZZI et al., 2016).

O fungo inicialmente coloniza tecidos mortos ou senescentes, que servem como fonte de energia para se estabelecer posteriormente e colonizar tecidos saudáveis (PETRASCH et al., 2019). Os sintomas são caracterizados pela descoloração do tecido, com aparência úmida e necrótica das lesões (Figura 1). Os sinais são caracterizados por um micélio acinzentado, constituído por conídios unicelulares e conidióforos ramificados sobre as áreas afetadas (TÖFOLI et al., 2011). As condições ambientais favoráveis para a ocorrência da doença são temperaturas amenas, alta umidade e falta de arejamento, que geralmente ocorrem no cultivo em estufa (PETRASCH et al., 2019).

Figura 1 - Morango pós-colheita da cultivar Camarosa com sintomas característicos de mofo-cinzento causado por *Botrytis cinerea* Pers. Passo Fundo - 2019



Fonte: Dados da autora.

A estimativa da intensidade do mofo-cinzento em morangos pré ou pós-colheita foi feita exclusivamente por avaliação da incidência (JEON et al., 2017). No entanto, as avaliações de severidade podem garantir que as estimativas sejam mais precisas e acuradas. As estimativas geralmente correspondem à porcentagem de área danificada (NUNES et al., 2012), podem ser usadas, por exemplo, para avaliar o nível de eficácia

das medidas de controle, como: a aplicação de fungicidas (KIM et al., 2016; LOPES et al., 2017) ou resistência genética (FORGES et al., 2018).

As avaliações de severidade podem ser realizadas com o auxílio de diagramas de área padrão (DAP), que são ilustrações de plantas ou partes de plantas com diferentes intensidades da doença (DEL PONTE et al., 2017). Os DAP são usados como referência para comparar as amostras, a fim de estimar com precisão e exatidão, e reduzir a subjetividade das estimativas em investigações epidemiológicas (CAPUCHO et al., 2011), estudos comparando métodos de controle de doenças ou caracterizando patótipos (MONZANI et al., 2018).

A avaliação visual é um dos principais métodos utilizados para estimar a severidade das doenças de plantas. Apesar da disponibilidade de *software* com alta precisão, os diagramas de área padrão (DAP) ainda são ferramentas importantes para estimar visualmente a severidade (ARAÚJO et al., 2018). O uso de um DAP pode melhorar consideravelmente a estimativa da severidade nas avaliações realizadas por pessoas com e sem experiência na avaliação de doenças, além de maior praticidade para avaliar um grande número de amostras e não exigir treinamento prévio dos avaliadores.

Na literatura há um conjunto de DAP para avaliar a doença em folhas de morangueiro (KIM et al., 2016) e uma escala de classificação para avaliar a ocorrência da doença em morangos durante o período de armazenamento (NUNES et al., 2012). No entanto, não existem DAP publicados que contenham imagens dos frutos, o que dificulta a avaliação da severidade da doença por pessoas experientes e inexperientes.

Existe uma escala de classificação publicada para quantificar mofo-cinzento em morangos, mas não um conjunto de DAP que permita uma quantificação mais precisa e exata da doença (NUNES et al., 2012). Assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver e validar um conjunto de DAP para avaliar a severidade do mofo-cinzento em morangos.

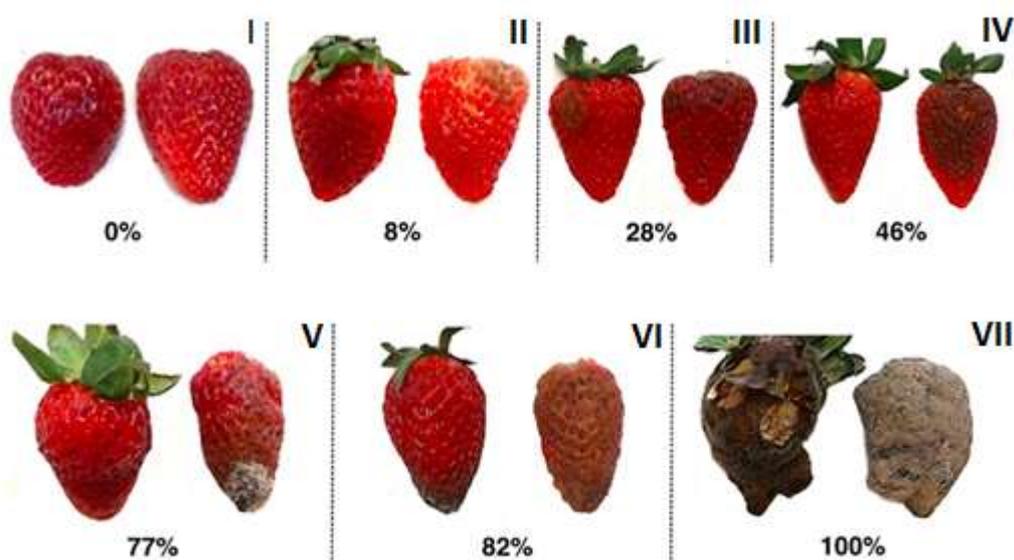
4.3 Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo (28° 15' 46" S, 52° 24' 24" W), no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de outubro a dezembro de 2019.

4.3.1 Desenvolvimento do DAP

Para o desenvolvimento dos diagramas (Figura 2) foram utilizados 50 frutos com diferentes níveis de severidade da doença. A cultivar de morangueiro utilizada foi a Camarosa, pois dentre as nove cultivares (“Albion”, “Aromas”, “Benecia”, “Camarosa”, “Camino Real”, “Festival”, “Monterey”, “Oso Grande” e “San Andreas”), recomendadas para os produtores de morangueiro do estado do Rio Grande do Sul, apenas a cultivar Camarosa é descrita como suscetível ao mofo-cinza. Sendo assim, os morangos foram cortados em duas metades longitudinalmente, para permitir a total visualização das lesões, colocados sobre papel branco e fotografados com câmera digital de 16MP.

Figura 2 - Diagramas de área padrão (DAP) para avaliar a porcentagem de severidade do mofo-cinza causado por *Botrytis cinerea* Pers. em morangos. Passo Fundo - 2019



Fonte: Dados da autora.

As imagens foram processadas no Programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) para determinar, de cada fruto, a área total (soma das duas metades dos frutos), a área total de lesão e a porcentagem de severidade real do mofo-cinzento. O conjunto de DAP foi proposto com sete níveis de severidade, variando de 0 a 100%.

4.3.2 Validação do DAP

A validação do conjunto de DAP foi realizada por dez avaliadores, sendo cinco sem experiência e outros cinco com experiência na avaliação de doenças de plantas usando escalas de classificação ou DAP. Todos os avaliadores receberam informações prévias por explicações verbais sobre os sintomas da doença e os sinais do patógeno nos frutos de morango. A validação se deu em três fases: na primeira fase 50 fotos de morangos com diferentes níveis de severidade do mofo-cinzento foram apresentadas aleatoriamente em um arquivo Power Point[®], para atribuir a porcentagem de severidade sem a utilização de qualquer tipo de escala; posteriormente, as mesmas fotos foram apresentadas em ordem diferente, e os avaliadores instruídos a usar a escala de classificação publicada para a severidade do mofo-cinzento; na terceira fase as mesmas fotos foram analisadas utilizando os DAP desenvolvidos (NUNES et al., 2012).

4.3.3 Análise de dados

A exatidão e a precisão foram calculadas para as estimativas de severidade de cada avaliador com base no coeficiente de correlação de concordância de Lin (LCCC) (BOCK et al., 2010; NITA; ELLIS; MADDEN, 2003). Os erros absolutos foram obtidos pela diferença entre a severidade estimada e a severidade real de cada fruto avaliado (MONZANI et al., 2018).

A confiabilidade entre os avaliadores foi avaliada com base no coeficiente de determinação (R^2) da equação de regressão linear entre as estimativas de severidade para

todos os pares de avaliadores (DOMICIANO et al., 2014; MONZANI et al., 2018). O coeficiente de correlação (ρ) entre a severidade real e a estimada foi determinado com todos os avaliadores combinados (NITA; ELLIS; MADDEN 2003).

Um teste de equivalência foi utilizado para verificar a diferença entre as médias de todas as estatísticas do LCCC (v, u, Cb, r, ρ_c) nas comparações: i) sem e com a escala de classificação; ii) sem e com os DAP; e iii) com a escala de classificação e com os DAP. Foram calculados os intervalos de confiança de 95% (IC) por bootstrapping. Todas as análises foram realizadas com base em 1.000 amostras de bootstrap balanceadas e os ICs de 95% calculados com base na diferença entre as médias do grupo, onde se o IC incluir zero não há diferença significativa ($\alpha= 0,05$).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software RStudio (R CORE TEAM, 2018). A função `epi.ccc` do pacote `epiR` foi usada para obter as estatísticas do LCCC. A função de inicialização do pacote foi usada para o teste de equivalência e a função `icc` do pacote `irr` para calcular o coeficiente de concordância (ρ_c) (MONZANI et al., 2018).

4.4 Resultados

O uso dos DAP proporcionou aumento significativo no valor médio do LCCC ou ρ_c (Tabela 1) para os avaliadores inexperientes (0,94) e os experientes (0,93) em comparação com o uso da escala de classificação (0,79 e 0,68) e, ainda mais, sem qualquer auxílio (0,01 e -0,13).

Para o grupo de avaliadores experientes, houve uma redução significativa no viés de escala e localização e um aumento na exatidão e na precisão com o uso dos DAP em relação à avaliação sem escala. O mesmo ocorreu para a comparação do uso dos DAP com a escala de classificação, com exceção do viés de escala que não foi significativo (Tabela 1). Para o grupo de avaliadores inexperientes, não houve efeito significativo dos DAP e da escala de classificação no viés de localização, viés de escala e precisão. No

entanto, a precisão aumentou, o que proporcionou um aumento no valor da concordância (Tabela 1).

As estimativas de severidade, para os dois grupos de avaliadores, foram mais próximas dos valores reais usando os DAP (Figura 3), com redução significativa nos erros absolutos (Figura 4) em comparação com as avaliações de severidade sem escala e com a escala de classificação.

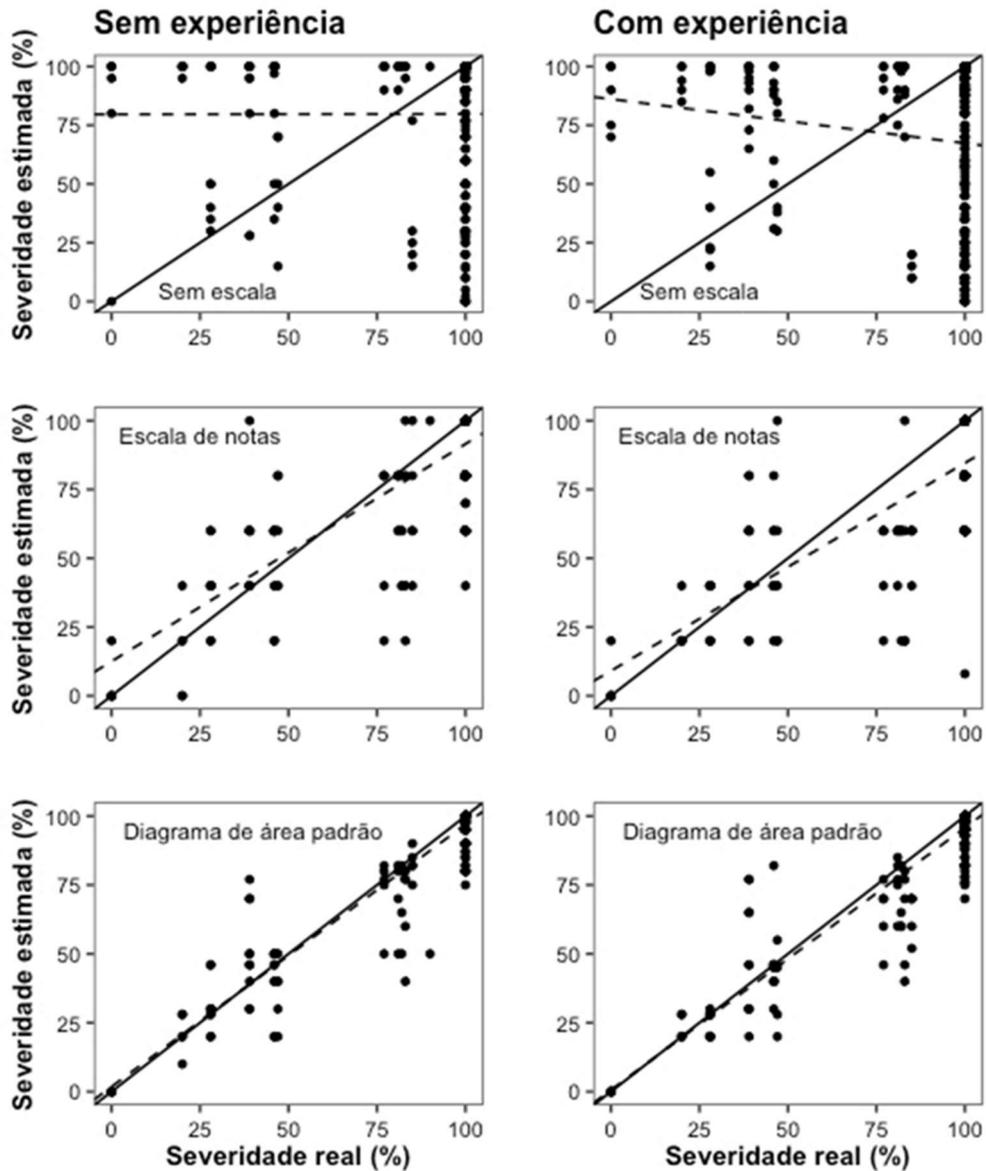
Tabela 1 - Viés de escala, viés de localização, exatidão, precisão e concordância da avaliação da severidade do mofo-cinzeno (*Botrytis cinerea Pers.*) em 50 imagens de morangos, realizada por cinco avaliadores experientes e cinco inexperientes nas condições sem escala, com escala de classificação e com diagrama de área padrão (DAP). Passo Fundo –2020

Avaliação	Avaliadores sem experiência					Avaliadores com experiência				
	v^2	u^3	C_b^4	r^5	ρ_c^6	v^2	u^3	C_b^4	r^5	ρ_c^6
<i>Média (desvio padrão)</i>										
Sem escala	1.11 (0.11)	-0.20 (0.17)	0.97 (0.03)	0.01 (0.34)	0.01 (0.34)	1.23 (0.12)	-0.52 (0.34)	0.85 (0.12)	0.15 (0.02)	0.13 (0.04)
Escala de classificação	0.98 (0.12)	-0.20 (0.40)	0.98 (0.11)	0.81 (0.05)	0.79 (0.12)	1.00 (0.10)	-0.44 (0.24)	0.91 (0.08)	0.75 (0.15)	0.68 (0.16)
DAP	1.00 (0.12)	-0.08 (0.11)	0.99 (0.01)	0.95 (0.03)	0.94 (0.04)	1.01 (0.11)	-0.13 (0.12)	0.99 (0.02)	0.94 (0.03)	0.93 (0.03)
<i>Diferença em relação à avaliação da severidade sem escala</i>										
Escala de classificação										
Média (erro padrão) ⁷	-0.13 (0.09)	0.00 (0.09)	0.01 (0.02)	0.80 (0.08)	0.78 (0.07)	-0.23 (0.07)	0.08 (0.09)	0.06 (0.04)	0.90 (0.07)	0.81 (0.07)
CI 95% ⁸	-0.32 - 0.03 ^{ns}	-0.16 - 0.18 ^{ns}	-0.02 - 0.07 ^{ns}	0.64 - 0.95*	0.63 - 0.94*	-0.38 - 0.10 ^{ns}	-0.09 - 0.26 ^{ns}	-0.03 - 0.13 ^{ns}	0.76 - 1.03*	0.66 - 0.94*
DAP										
Média (erro padrão) ⁷	-0.11 (0.09)	0.11 (0.09)	0.02 (0.02)	0.94 (0.07)	0.93 (0.06)	-0.22 (0.08)	0.39 (0.10)	0.14 (0.05)	1.09 (0.05)	1.06 (0.05)
CI 95% ⁸	-0.32 - 0.03 ^{ns}	-0.06 - 0.30 ^{ns}	-0.01 - 0.08 ^{ns}	0.80 - 1.06*	0.81 - 1.05*	-0.40 - -0.60*	0.18 - 0.58*	0.05 - 0.24*	0.97 - 1.19*	0.96 - 1.15*
<i>Diferença em relação à avaliação da severidade com a escala de classificação</i>										
DAP										
Média (erro padrão) ⁷	0.02 (0.04)	0.12 (0.04)	0.01 (0.01)	0.14 (0.03)	0.14 (0.03)	0.01 (0.03)	0.31 (0.04)	0.08 (0.02)	0.19 (0.03)	0.25 (0.04)
CI 95% ⁸	-0.06 - 0.10 ^{ns}	0.04 - 0.20*	0.01 - 0.04*	0.08 - 0.20*	0.09 - 0.22*	-0.06 - 0.07 ^{ns}	0.23 - 0.40*	0.05 - 0.12*	0.13 - 0.25*	0.18 - 0.31*

Fonte: Dados da autora.

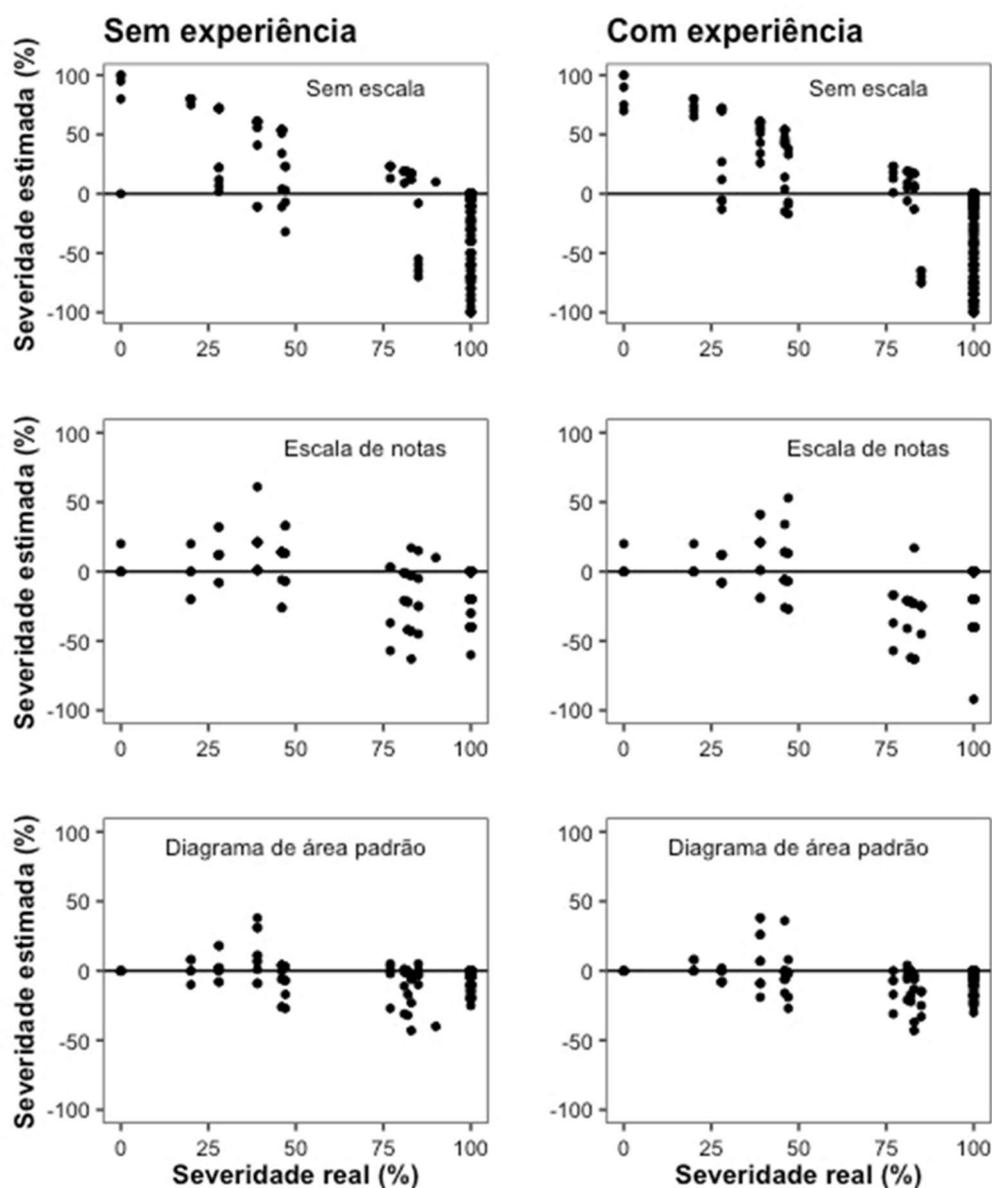
¹Escala de classificação descrita por Nunes et al. (2012). ²Viés de escala ou mudança de inclinação (v): 1 = não há viés em relação à linha do contrato. ³Viés de localização ou alteração de altura (u): 0 = não há viés em relação à linha do contrato. ⁴Coefficiente de viés (C_b) é uma medida de precisão, ou seja, o desvio da linha de melhor ajuste com a linha de concordância. ⁵Coefficiente de correlação (r) é uma medida de precisão. ⁶Coefficiente de correlação de concordância de Lin (ρ_c ou LCCC): combina precisão com exatidão para medir a concordância com o valor real. ⁷Diferença entre as médias para cada variável. Erros padrão são mostrados entre parênteses e são valores calculados por meio de *bootstrapping*. ⁸CI 95%: 95% de intervalo de confiança com base em 1000 amostras por *bootstrapping*. Se o IC 95% incluir zero a diferença entre as médias não é significativa ($\alpha = 0.05$). ^{ns} Não significativo; * Significativo ($\alpha = 0.05$).

Figura 3 - Relação entre a severidade real (%) e a estimada (%) na avaliação de 50 imagens de morangos com diferentes níveis de sintomas de mofo-cinza (*Botrytis cinerea* Pers.) por avaliadores sem e com experiência em doenças de plantas, sem o uso de escala, com o auxílio de escala de classificação e do diagrama de área padrão (DAP). A linha contínua representa a de melhor ajuste e a pontilhada a de concordância perfeita entre a severidade real e a estimada (inclinação da linha de 1 e interceptação de 0). Passo Fundo – 2020



Fonte: Dados da autora.

Figura 4 - Relação entre a severidade real (%) e os erros absolutos na avaliação de 50 imagens de morangos com diferentes níveis de sintomas de mofo-cinza (*Botrytis cinerea* Pers.) por avaliadores sem e com experiência em doenças de plantas, sem o uso de escala, com o auxílio de escala de classificação e do diagrama de área padrão (DAP). Erros absolutos baixos indicam que a severidade estimada foi semelhante a real. Passo Fundo - 2020



Fonte: Dados da autora.

O valor combinado do LCCC (Tabela 2) de todos os avaliadores aumentou significativamente de -0,072, na avaliação sem escala, para 0,735 com o uso da escala de classificação e para 0,936 com o DAP.

Tabela 2 - Confiabilidade na avaliação da severidade do mofo-cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.) de 50 imagens de morangos por avaliadores sem e com experiência em doenças de plantas sem o uso de escala, com o auxílio de escala de classificação e do diagrama de área padrão (DAP). Passo Fundo - 2020

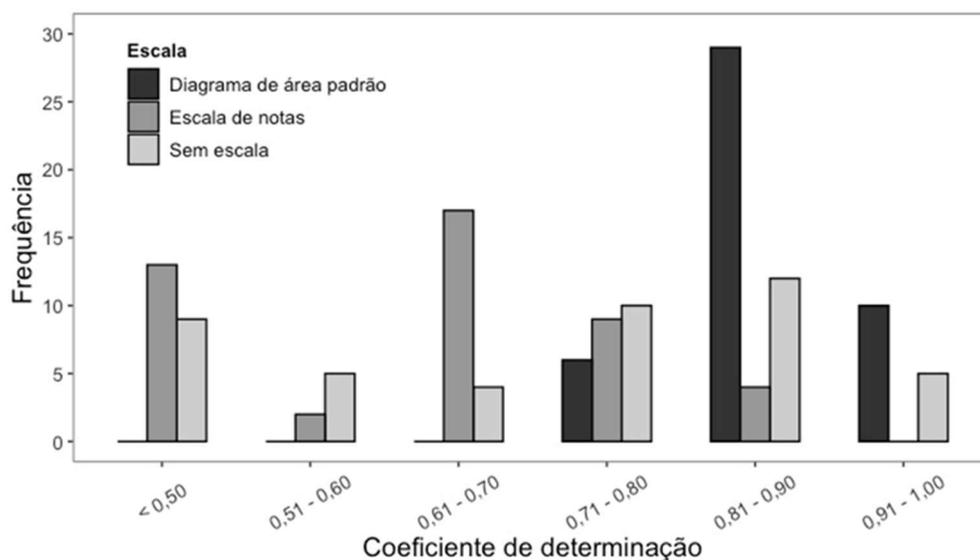
Estatística	Avaliação da severidade		
	Sem escala	Escala de classificação ¹	DAP
LCCC ²	-0.072	0.735	0.936
<i>P</i> ³	0.952	< 0.001	< 0.001
CI 95% ⁴	-0.156 – 0.013 ^{ns}	0.593 – 0.819*	0.913 – 0.951*

Fonte: Dados da autora.

¹ Escala de classificação descrita por Nunes et al., (2012). ² LCCC: Coeficiente de correlação de concordância de Lin (*pc* ou LCCC): combina precisão com exatidão para medir a concordância com o valor real. ³ *P* = valor de probabilidade. ⁴ IC 95%: intervalo de confiança de 95%. Se o IC95% incluir zero a diferença entre as médias não é significativa ($\alpha = 0,05$). ^{ns} Não significativo; * Significativo ($\alpha = 0,05$).

Com base na frequência dos coeficientes de determinação (R^2) das estimativas de severidade, na comparação entre pares de todos os avaliadores (Figura 5), pode-se observar que, com o uso dos DAP, 87% dos valores de R^2 foram maiores que 0,81, enquanto que sem escala ou com a escala de classificação apenas 37% e 9% dos valores de R^2 foram superiores a 0,81, respectivamente. Isso demonstra maior consistência entre diferentes avaliadores da severidade do mofo-cinzento com o uso dos DAP.

Figura 5 - Frequência de confiabilidade entre dez avaliadores, com base no coeficiente de determinação (R^2), para avaliações da severidade do mofo-cinzeno (*Botrytis cinerea* Pers.) em 50 imagens de frutos de morango sem o uso de escala, com o auxílio de escala de classificação e diagrama de área padrão (DAP). Passo Fundo – 2020



Fonte: Dados da autora.

4.5 Discussão

O conjunto de DAP desenvolvido e validado nesse estudo, para avaliar a severidade do mofo-cinzeno em morangos, pode ser usado por produtores e pesquisadores. Estas informações complementam os DAP desenvolvidos para avaliar a doença em folhas de morangueiro (KIM et al., 2016) e uma escala de classificação ordinal para avaliar a ocorrência da doença em morangos durante o período de armazenamento (NUNES et al., 2012). No entanto, até o momento, não foram publicados DAP ou escalas de classificação que contêm imagens dos frutos, o que torna difícil avaliar a gravidade da doença por avaliadores experientes e inexperientes. O conjunto de DAP desenvolvido com fotos tornará mais fácil e preciso avaliar a gravidade do mofo-cinzeno de morangueiro, do que sem o auxílio visual.

A avaliação visual é um dos principais métodos utilizados para estimar a severidade de doenças das plantas. Apesar da disponibilidade de softwares de alta precisão, os DAP ainda são ferramentas importantes para estimar visualmente a gravidade das doenças (ARAÚJO et al., 2018). O uso de DAP pode melhorar consideravelmente a estimativa da gravidade da doença em avaliações realizadas por pessoas com experiência na avaliação de doenças e sem experiência. Além de maior acesso, facilidade de uso, praticidade para avaliar um grande número de amostras e não exigir treinamento prévio dos avaliadores.

Os DAP desenvolvidos nesse estudo têm a vantagem de visualizar a lesão total da doença. Devido ao formato tridimensional do morango, os frutos foram cortados pela metade e usadas imagens de ambos os lados para avaliar o dano total do mofo-cinzento. Assim, os DAP refletiram o faixa de severidade da doença encontrada em locais de produção de morangueiro.

A avaliação da severidade do mofo-cinzento com o auxílio dos DAP permitiu uma estimativa mais precisa e acurada da doença, assim como as apresentadas por outros autores para a avaliação da severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) em maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) (COSTA et al., 2018), cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *Citri*) em laranja (*Citrus x sinensis*) (BRAIDO et al., 2014), mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) em folhas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (DUAN et al., 2015), antracnose (*Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*) em fruto de pimentão (*Capsicum annuum*) (PEDROSO et al., 2011), sarna (*Fusicladium eriobotryae*) em nêspersas (*Eriobotrya japonica*) (GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2014), sarna (*Fusicladium effusum*) na noz pecã (*Carya illinoensis*) (YADAV et al., 2012) e manchas na maçã (*Malus domestica*) (SPOLTI et al., 2011).

O número de ilustrações em um conjunto de DAP varia entre os estudos, no entanto, Del Ponte et al. (2017) enfatizaram que o número não deve ser menor que seis e maior que dez, e que as ilustrações devem permitir que os avaliadores discriminem

facilmente entre áreas doentes e saudáveis. Esses critérios foram seguidos no conjunto de DAP desenvolvidos neste estudo.

Atualmente, existem nove cultivares de morangueiro Albion, Aromas, Benecia, Camarosa, Camino Real, Festival, Monterey, Oso Grande e San Andreas recomendadas e cultivadas por produtores do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A utilização de uma cultivar de morangueiro nesse estudo pode ser considerada uma limitação, porém, para se obter fotografias com bons níveis de severidade do mofo-cinzento, foi escolhida a cultivar Camarosa, descrita como suscetível à doença. Assim, o conjunto de DAP desenvolvido neste estudo pode ser utilizado como ferramenta eficiente em estudos de desempenho de cultivares, na avaliação de suscetibilidade e severidade do mofo-cinzento, nas propriedades rurais e em programas de melhoramento.

4.6 Conclusão

Os resultados obtidos nesse estudo são inéditos, por desenvolver e validar um conjunto de DAP com imagens de morangos com sintomas do mofo-cinzento e sinais de *B. cinerea*. O DAP facilitará e otimizará o processo de quantificação da severidade da doença, bem como permitirá treinar avaliadores e contribuir para a construção de um banco de dados mais consistente de registros da doença.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe a possibilidade de utilizar os resultados promissores obtidos neste trabalho (Capítulo 1) como subsídio para incentivar o uso de inoculação com FMA pelos produtores de fisális e norteá-los quanto a escolha da(s) espécie(es). Esse é o primeiro trabalho que buscou avaliar a inoculação de FMA no cultivo de fisális em substrato, cultivado em vaso, em ambiente protegido. São escassos os trabalhos que buscaram avaliar o efeito da inoculação com FMA em fisális. Os estudos se concentram em avaliar a associação simbiótica com FMA em solos contaminados com metais pesados e, os efeitos da inoculação com FMA em outras culturas, à exemplo, o tomateiro também pertencente a família Solanaceae.

Os resultados obtidos neste trabalho também podem ser utilizados para nortear estudos que visem testar outros inóculos de FMA, isolados ou em comunidade, com o intuito de avaliar se a biotecnologia micorrízica potencializa a ação de extratos de fisális, e esses possam ser testados no controle de mofo-cinzento em morangos, visto que os inóculos testados não potencializaram a ação dos fitoquímicos presentes nos extratos.

Esse é o primeiro estudo que buscou avaliar os efeitos da inoculação com FMA em extratos de frutos de fisális, e testá-los quanto a sua ação para o controle *in vitro* do mofo-cinzento. Os resultados desse experimento podem servir de subsídio para novas pesquisas, que podem se concentrar em investigar diferentes concentrações de extratos e até mesmo de extratos provenientes de frutos não submetidos ao armazenamento.

Também, esse é o primeiro trabalho que buscou desenvolver e validar um conjunto de DAP (Capítulo 2) com imagens reais de morangos, com diferentes níveis de severidade de mofo-cinzento causado pelo fungo *B. cinerea*. Na literatura há um conjunto de DAP para avaliar a doença em folhas de morangueiro (KIM et al., 2016) e uma escala de classificação para avaliar a ocorrência da doença em morangos durante o período de

armazenamento (NUNES et al., 2012). No entanto, não existem DAP publicados que contenham imagens dos frutos, o que dificulta a avaliação da severidade da doença por pessoas experientes e inexperientes.

O DAP, embora tenha sido desenvolvido e validado com imagens de morangos da cultivar Camarosa, pode ser utilizado para caracterizar a reação de diferentes cultivares, bem como para avaliar a eficácia de novos fungicidas, produtos químicos e/ou biológicos, para o controle de mofo-cinzento em morangos. Este conjunto de DAP pode ser usado para treinar pessoas na avaliação da doença e contribuir para a construção de um banco de dados consistente de registros da doença no cultivo do morangueiro no Brasil.

6 CONCLUSÃO GERAL

Em conclusão, este é o primeiro estudo a fornecer informações sobre a inoculação de FMA em plantas de fisális cultivadas em substrato e ambiente protegido. Os resultados deste trabalho são inéditos pois confirmam que existe uma melhor opção de uso dos FMA para o maior desempenho hortícola de fisális, espécie *P. peruviana*. A inoculação de FMA beneficia a morfologia do sistema radicial, a massa fresca e a composição química dos frutos de fisális. *R. clarus* e *G. intraradices* proporcionam maior incremento do volume radicial e massa fresca dos frutos. A qualidade dos frutos é beneficiada pela comunidade micorrízica e *R. clarus*. Os inóculos testados não potencializam a ação dos fitoquímicos presentes nos extratos de fisális, na concentração de 300 mg/mL, no controle *in vitro* do mofo-cinzento de morangueiro, no entanto, os resultados deste trabalho podem servir de subsídio para novas pesquisas, pressupondo que *R. clarus* parece ser uma possibilidade de utilizar-se para a cultura do fisális. Este também é o primeiro estudo que buscou desenvolver e validar um conjunto de DAP com imagens reais de morangos com sintomas de mofo-cinzento e sinais de *B. cinerea*. O uso de DAP melhora consideravelmente a estimativa da severidade da doença em avaliações realizadas por pessoas com experiência na avaliação de doenças e sem experiência. As estimativas de severidade de mofo-cinzento, para ambos os grupos de avaliadores, são mais próximas dos valores reais usando o conjunto de DAP, que pode ser utilizado como ferramenta eficiente em estudos futuros, à exemplo, estudos de desempenho de cultivares de morangueiro em relação à severidade do mofo-cinzento e em programas de melhoramento para avaliação de genótipos e caracterização de suas reações à doença.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, L. K.; ROBSON, A. D. Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculation type. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 32, n. 4, p. 631-639, 1981.

ALMANZA-MERCHÁN, P. J.; FISCHER, G. Fisiologia del cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). In: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DA *Physalis*, 2., 2012, Lages. **Anais II Reunião Técnica da Cultura da *Physalis***. Lages: UDESC, 2012. p. 32 - 34.

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JUNIOR, C. Caracterização da produção de morangos no Brasil. **Rivista di Frutticoltura e Ortofloricoltura**, v. 69, p. 60-65, 2007.

ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G. L.; SANTOS, A. M. **A cultura do morango**. 2. ed. Brasília - DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. (Embrapa Informação Tecnológica. Comunicado Técnico). Disponível em:
<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/128281/1/PLANTAR-Morango-ed02-2011.pdf>. Acesso em: 09 mai. 2020.

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, C.; SCHWENGBER, J. E. (Ed.). **Morangueiro**. Brasília-DF: Embrapa, 2016.

ARAÚJO, E. R.; RESENDE, R. S.; KREZANOSKI, C. E.; DUARTE, H. S. S. A standard area diagram set for severity assessment of *Botrytis* leaf blight of onion. **European Journal of Plant Pathology**, v. 153, p. 273-277, 2018.

ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; MORAIS, D. R. de.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 245, p. 738-749, 2018.

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.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

BASU, S.; RABARA, R. C.; NEGI, S. A. M. F. The future prospect for sustainable agriculture. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 102, p. 36-45, 2018.

BALAGUERA-LÓPEZ, H. E; MARTÍNEZ C. C. A.; ARÉVALO, A. H. Papel del cáliz en el comportamiento poscosecha de frutos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) ecotipo Colombia. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 8, n. 2, p. 181-191, 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, 2016.

BOCK, C. H.; POOLE, G.; PARKER, P. E.; GOTTWALD, T. R. Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 29, n. 2, p. 59-107, 2010.

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

BLASZKOWSKI, J. **Glomeromycota**. Kraków: The Władysław Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, 2012.

BRAIDO, R.; GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O.; JANEIRO, V.; CARVALHO, S. A.; BELASQUE, J. J.; BOCK, C. H.; NUNES, W. M. C. Development and validation of standard area diagrams as assessment aids for estimating the severity of citrus canker

on unripe oranges. **Plant Disease**, v. 98, n. 11, p. 1543-1550, 2014.

BRASIL, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT). **Consulta de praga**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 09 mar. 2019.

BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos: Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. Brasília: Anvisa, 2016. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+20132015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8. Acesso em: 10 out. 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n. 17 de 21 de maio de 2007 **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 mai. 2007. Seção 1, p. 1-8.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos**. Brasília: MAPA/SDA/CGAL, 2014.

BRAVO, K.; SEPULVEDA-ORTEGA, S.; LARA-GUZMAN, O.; NAVAS-ARBOLEDA, A. A.; OSORIO, E. Influence of cultivar and ripening time on bioactive compounds and antioxidant properties in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Journal Science Food Agriculture**, v. 95, n. 7, p. 1562-1569, 2014.

BRUISSON, S.; MAILLOT, P.; SCHELLENBAUM, P.; WALTER, B.; GINDRO, K.; DEGLÈNE-BENBRAHIM, L. Arbuscular mycorrhizal symbiosis stimulates key genes of the phenylpropanoid biosynthesis and stilbenoid production in grapevine leaves in response to downy mildew and grey mould infection. **Phytochemistry**, v. 131, p. 92-99, 2016.

- ÇAKIR, Ö., PEKMEZ, M., ÇEPNİ, E., CANDAR, B., FİDAN, K. Evaluation of biological activities of *Physalis peruviana* ethanol extracts and expression of Bcl-2 genes in HeLa cells. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 422-430, 2014.
- CANTILLANO, R. F. F.; SILVA, M. M. da. **Manuseio Pós-Colheita de Morangos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. (Embrapa Clima Temperado. Documento Técnico, 318).
- CAPUCHO, A. S.; ZAMBOLIM, L.; DUARTE, H. S. S.; VAZ, G. R. O. Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. **Plant Pathology**, v. 60, n. 6, p. 1144-1150, 2011.
- CECATTO, A. P.; RUIZ, F. M.; CALVETE, E. O.; MARTÍNEZ, J.; PALENCIA, P. Mycorrhizal inoculation affects the phytochemical content in strawberry fruits. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 2, p. 227-237, 2016.
- COSTA, A. P.; PIRES DE CARVALHO, M.; PEIXOTO, J. R.; BLUM, L. E. B.; FALEIRO, F. G. Standard area diagram set for bacterial spot assessment in fruits of yellow passion fruit. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 6, p. 1-15, 2018.
- CHAGNON, P. L.; BRADLEY, R. L. The relative importance of host vigor and hormonal response to pathogens in controlling the development of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 83, p. 40-42, 2015.
- CHAVES, V. C.; CALVETE, E.; REGINATTO, F. H. Quality properties and antioxidant activity of seven strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch) cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 293-298, 2017.
- 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, 2019a.
-

CHIOMENTO, J. L. T.; COSTA, R. C.; 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, 2019b.

CORRALES-BERNAL, A.; VERGARA, A. I.; ROJANO, B.; YAHIA, E.; MALDONADO, M. E. Características nutricionales y antioxidantes de la uchuva colombiana (*Physalis peruviana*) en três estadios de su maduración. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición**, v. 65, n. 4, p. 254-262, 2015.

DANIEL, C. K.; LENNOX, C. L.; VRIES, F. A. *In vivo* application of garlic extracts in combination with clove oil to prevent postharvest decay caused by *Botrytis cinerea* Pers., *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba* on apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 99, p. 88-92, 2015.

DEAN, R.; KAN, J. A. L. V.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DEL PONTE, E.; PETHYBRIDGE, S. J.; BOCK, C. H.; MICHEREFF, S. J.; MACHADO, F. J.; SPOLTI, P. Standard area diagrams for aiding severity estimation: scientometrics, pathosystems, and methodological trends in the last 25 years. **Phytopathology**, v. 107, n. 10, p. 1161-1174, 2017.

DOMICIANO, G. P.; DUARTE, H. S. S.; MOREIRA, E. N.; RODRIGUES, F. A. Development and validation of a set of standard area diagrams to aid in estimation of spot blotch severity on wheat leaves. **Plant Pathology**, v. 63, p. 922-928, 2014.

DUAN, J.; ZHAO, B.; WANG, Y.; YANG, W. Development and validation of a standard area diagram set to aid estimation of bacterial spot severity on tomato leaves. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, p. 665-675, 2015.

DUARTE, L. J.; CHAVES, V. C.; NASCIMENTO, M. V. P. S.; CALVETE, E.; LI, M.; CIRAOLO, E. Molecular mechanism of action of Pelargonidin-3-O-glucoside, the main anthocyanin responsible for the anti-inflammatory effect of strawberry fruits. **Food Chemistry**, v. 247, p. 56-65, 2018.

ERTÜRK, Ö.; ÇOL AYVAZ, M.; CAN, Z.; KARAMAN, U.; KORKMAZ, K. Antioxidant, antimicrobial activities and phenolic and chemical contents of *Physalis peruviana* L. from Trabzon, Turkey. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 51, n. 3, p. 213-216, 2017.

ETZBACH, L.; PFEIFFER, A.; WEBER, F.; SCHIEBER, A. Characterization of carotenoid profiles in goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruits at various ripening stages and in different plant tissues by HPLC-DAD-APCI-MSⁿ. **Food Chemistry**, v. 245, p. 508-517, 2018.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **FAOSTAT: Data, Crops, Visualize Data**, 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 07 jun. 2021.

FILIPPI, D. **Ação antifúngica do extrato de *Physalis peruviana* Linnaeus frente ao fungo *Botrytis cinerea* Pers.**. 2018. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

FIORILLI, V.; CATONI, M.; FRANCIÀ, D.; CARDINALE, F.; LANFRANCO, L. The arbuscular mycorrhizal symbiosis reduces disease severity in tomato plants infected by *Botrytis cinerea* Pers.. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, n. 1, p. 237-242, 2011.

FOLLI-PEREIRA, S. M. da.; MEIRA-HADDAD, S. L.; BAZZOLLI, S. D. M.; KASUYA, M. C. M. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 6, p. 1663-1679, 2012.

FORGES, M.; VÁSQUEZ, H.; CHARLES, F.; SARI, D. C.; URBAN, L.; LIZZI, Y. Impact of UV-C radiation on the sensitivity of three strawberry plantcultivars (*Fragaria x ananassa*) against *Botrytis cinerea* Pers.. **Scientia Horticulturae**, v. 240, p. 603-613, 2018.

FORREST, W.; NUTTER, J. R. Disease assessment terms and concepts. **Plant Disease**, Special Topic, p. 1187-1189, 1991.

FRANCO-OSPINA, L. A.; MATIZ-MELO, G. E.; PÁJARO-BOLÍVAR, I. B.; GÓMEZ-ESTRADA, H. A. **Actividad Antibacteriana in vitro de Extractos y Fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz.** Cartagena: Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 2013. (Boletim Técnico, 12).

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 II Reunião Técnica da Cultura da *Physalis*.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p. 102-115.

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.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 235-244, 1963.

GINDRO, K.; PEZET, R. Effects of long-term storage at different temperatures on conidia of *Botrytis cinerea* Pers. Pers. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 1, p. 101-104, 2001.

GOETTEN, L. C.; MORETTO, G.; STÜRMER, S. L. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum produced on-farm and phosphorus on growth and nutrition of native woody plant species from Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 30, n. 1, p. 9-16, 2016.

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.

GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, E.; MARTINS, R. B.; PONTE, E. M.; MICHEREFF, S. J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Development and validation of a standard area diagram set to aid assessment of severity of loquat scab on fruit. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, n. 1, p. 419–428, 2014.

GÖZTOK, F.; ZENGİN, F. The antimicrobial activity of *Physalis peruviana* L. **Bitlis Eren University Journal of Science and Technology**, v. 3, p. 15- 17, 2013.

GRABKE, A. **Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* Pers. from Strawberry – Molecular Mechanisms and Management**. 2014. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Plantas e Ciências Ambientais) – Escola de Pós-Graduação de Clemson University, Universidade de Clemson, Carolina do Sul, 2014.

GULLÓN, B.; Lã-CHAU, T. A.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M.; EIBES, G. Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and

approaches to enhance its bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 220-235, 2017.

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, n. 4, p. 829-837, 2009.

HASHEM, A.; ABD-ALLAH, E. F.; ALQARAWI, A. A.; EGAMBERDIEVA, D. Induction of salt stress tolerance in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] by arbuscular mycorrhizal fungi. **Legume Research**, v. 38, n. 5, p. 579-588, 2015.

HASSANIEN, M. F. R. *Physalis peruviana*: A rich source of bioactive phytochemicals for functional foods and pharmaceuticals. **Food Reviews International**, v. 27, n. 3, p. 259-273. 2011.

HODGE, A.; BERTA, G.; DOUSSAN, C.; MERCHAN, F.; CRESPI, M. Plant root growth, architecture and function. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 153-187, 2009.

HOFFMANN, L. V.; LUCENA, V. S. **Para Entender Micorrizas Arbusculares**. Campina Grande – PB: Embrapa Algodão, 2006. (Embrapa Algodão. Documentos, 156, p. 22). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/276480/para-entender-micorrizas-asbusculares>. Acesso em: 01 jun. 2021.

HRISTOZKOVA, M.; GENEVA, M.; STANCHEVA, I.; ILIEV, I.; AZCÓN-AGUILAR, C. Symbiotic association between goldenberry (*Physalis peruviana*) and arbuscular mycorrhizal fungi in heavy metal-contaminated soil. **Journal of Plant Protection Research**, v. 57, n. 2, p. 173-184, 2017.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ICONTEC. Instituto Colombiano de Normas Técnicas e Certificação. **Norma Técnica Colombiana 4580. Frutas frescas. Uchuva. Especificaciones.** Colômbia: ICONTEC, 1998. (ICONTEC. Norma Técnica, 4580).

INVAM. **International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi.** Disponível em: <http://invam.wvu.edu/>. Acesso em: 14 out. 2017.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 9, p. 692-695, 1964.

JEON, C. W.; KIM, D.; PARK, J. J.; KANG, N. J.; SWAK, Y. Exported strawberry gray mold decay related spore density and disease incidence in cultivation field. **The Korean Journal of Pesticide Science**, v. 21, n. 2, p. 224-231, 2017.

JIN, P.; WANG, H.; ZHANG, Y.; HUANG, Y.; WANG, L.; ZHENG, Y. UV-C enhances resistance against gray mold decay caused by *Botrytis cinerea Pers.* in strawberry fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 106-1111, 2017.

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, n. 6, p. 651-664, 2012.

KIM, J.; SHIN, J-H.; GUMILANG, A.; CHUNG, K.; CHOI, K. Y.; KIM, K. S. Effectiveness of different classes of fungicides on *Botrytis cinerea Pers.* causing gray mold on fruit and vegetables. **The Plant Pathology Journal**, v. 32, n. 6, p. 570-574, 2016.

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

LAHLALI, R.; SERRHINI, M. N.; FRIEL, D.; JIJAKLI, M. H. Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the *in vitro* radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 1, p. 1-9, 2007.

LAMBAIS, M. R.; CARDOSO, E. J. B. N. Response of *Stylosanthes guianensis* to endomycorrhizal fungi inoculation as affected by lime and phosphorus applications. **Plant and Soil**, v. 150, p. 109-116, 1993.

LASPRILLA, D. M. Manejo integrado del cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en zonas productoras de Colombia. In: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DA *Physalis*. 2. 2012, Lages. **Anais II Reunião Técnica da Cultura da *Physalis***. Lages: UDESC, 2012. p. 7.

LEITE, T. S. de.; DOMBROSKI, J. L. D.; FREITAS, R. M. O. de.; LEITE, M. S. de.; RODRIGUES, M. R. O. de. Produção de mudas de *Enterolobium contortisiliquum* e partição de assimilados em resposta à adubação fosfatada e inoculação com fungos micorrízicos. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 4, 1157-1166, 2017.

LICODIEDOFF, S.; KOSLOWSKI, L. A. D.; RIBANI, R. H. Flavonols and antioxidant activity of *Physalis peruviana* fruit at two maturity stages. **Acta Scientiarum Technology**, v. 35, n. 2, p. 393-399, 2013.

LIMA, C. S. M.; MANICA-BERTO, R.; SILVA, S. J. P.; BETEMPS, D. L.; RUFATO, A. R. Custos de implantação e condução de pomar de *Physalis* na região sul do estado do Rio Grande do Sul. **Revista Ceres**, v. 56, n. 5, p. 555-561, 2009.

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, n. 8, p. 16207-16225, 2013.

LOPES, U. P.; ZAMBOLIM, L.; CAPOBRIANGO, N. P.; GRACIA, N. A. O.; FREITAS-LOPES, R. L. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to fungicides controlling gray mold on strawberry in Brazil. **Bragantia**, v. 76, n. 2, p. 266-272, 2017.

MARTÍNEZ, J. A. Natural Fungicides Obtained from Plants. In: DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A. **Fungicides for Plant and Animal Diseases**. Cartagena, Espanha: Intechopen, 2012. p. 1-28.

MCCORMACK, M. L.; DICKI, I. A.; EISSENSTAT, D. M.; FAHEY, T. J.; FERNANDEZ, C. W.; DALI, G.; HELMISAARI, H. S.; HOBBIE, E. A.; IVERSEN, C. N.; JACKSON, R. B.; LEPPÄLAMMI-KUJANSUU, J.; NORBY, R. J.; PHILLIPS, R. P.; KURT, S.; PREGITZE, K. S.; PRITCHARD, S. G.; REWALD, B.; ZADWORNÝ, M. Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. **New Phytologist**, v. 207, n. 3, p. 505-518, 2015.

MENDOZA, L.; YANEZ, K.; VIVANCO, M.; MELO, R.; COTORAS, M. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 360-364, 2013.

MIRANDA, D.; FISCHER, G.; ULRICHS, C. The influence of arbuscular mycorrhizal colonization on the growth parameters of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) plants grown in a saline soil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 11, n. 2, p. 18-30, 2011.

MONZANI, R. M.; SILVA, G. A.; NUTTER JUNIOR, F.; DUARTE, H. S. S.; DE MIO, L. L. M. Development and validation of a standard area set diagrams to evaluate bacterial blight on yellow passion fruit leaves. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 4, p. 332-337, 2018.

MORTON, J. B. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. **Mycotaxon**, v. 32, p. 267-324, 1988.

MUNIZ, J.; KRETZSCHMAR, A. A.; RUFATO, L.; GATIBONI, L. C. Principais pesquisas realizadas com o cultivo de *Physalis* no Sul do Brasil. In: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DA *Physalis*. 2., 2012, Lages. **Anais II Reunião Técnica da Cultura da *Physalis***. Lages: UDESC, 2012. p. 60-74.

NITA, M.; ELLIS, M. A.; MADDEN, L. V. Reliability and accuracy of visual estimation of phomopsis leaf blight of strawberry. **Phytopathology**, v. 93, n. 8, p. 995-1005, 2003.

NUNES, M. C. N.; MORAIS, A. M. M. B.; BRECHT, J. K.; SARGENT, S. A.; BARTZ, J. A.; ALLEN, R. A. Occurrence of gray mold in stored strawberries as affected by ripeness, temperature, and atmosphere. **Proceedings of The Florida State Horticultural Society**, n. 125, p. 287-294, 2012.

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, n. 2, p. 195-207, 2005.

OLIVARES-TENORIO, M. L.; VERKERK, R.; BOEKEL, M. A. J. S. DEKKER, M. Thermal stability of phytochemicals, HMF and antioxidant activity in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 46-57, 2017.

OLIVEIRA, J.; SILVA, J.; AMOURIM, M.; SANTOS, M.; BATISTA, A. Produção de pequenas frutas no Brasil: um mercado em potencial. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17, n. 33, p. 362-379, 2020.

OLIVEIRA, D. M. de; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

PEDONE-BONFIM, M. V. L.; ALVES DA SILVA, D. K.; SILVA-BATISTA, A. R. da.; OLIVEIRA, A. P. de.; SILVA ALMEIDA, J. R. G. da.; YANO-MELO, A. M.; MAIA, L. C. Mycorrhizal inoculation as an alternative for the sustainable production of *Mimosa tenuiflora* seedlings with improved growth and secondary compounds content. **Fungal Biology**, v. 122, n. 9, p. 918-927, 2018.

PEDROSO, C.; LAGE, D. A. C.; HENZ, G. P.; CAFÉ-FILHO, A. C. Development and validation of a diagrammatic scale for estimation of anthracnose on sweet pepper fruits for epidemiological studies. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, n. 1, p. 219-225, 2011.

PETRASCH, S.; KNAPP, S. J.; KAN, J. A. L. V.; BLANCO-ULATE, B. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 6, p. 877-892, 2019.

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, n. 1, p. 158-161, 1970.

PUENTE, L. A.; PINTO-MUÑOZ, C. A.; CASTRO, E. S.; CORTÉS, M. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1733-1740, 2011.

R CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2018. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

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.

REYES, S. M. R.; HOYOS, G. R.; FERREIRA JÚNIOR, D. C.; CECÍLIO FILHO, A. B.; FONSECA, L. P. M. Physiological response of *Physalis peruviana* L. seedlings inoculated with *Funneliformis mosseae* under drought stress. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 1, p. 175-183, 2019.

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.

RODRIGUES, E.; ROCKENBACH, I. I.; CATANEO, C.; GONZAGA, L. V.; CHAVES, E. S.; FETT, R. Minerals and essential fatty acids of the exotic fruit *Physalis peruviana* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 642-645, 2009.

ROMANAZZI, G.; SMILANICK, J. L.; FELIZIANI, E.; DROBY, S. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 113, p. 69-76, 2016.

ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; COLLA, G. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviating the adverse effects of acidity and aluminium toxicity in zucchini squash. **Scientia Horticulturae**, v. 188, p. 97-105, 2015.

SANCHEZ-BEL, P.; TRONCHO, P.; GAMIR, J.; POZO, M. J.; CAMAÑES, G.; CEREZO, M.; FLORS, V. The nitrogen availability interferes with mycorrhiza-induced resistance against *Botrytis cinerea* in Tomato. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

SELLITTO, V. M.; GOLUBKINA, N. A.; PIETRANTONIO, L.; COZZOLINO, E.; CUCINIELLO, A.; CENVINZO, V.; FLORIN, I.; CARUSO, G. Tomato yield, quality, mineral composition and antioxidants as affected by beneficial microorganisms under soil salinity induced by balanced nutrient solutions. **Agriculture**, v. 9, n. 5, 2019.

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

SCHENCK, N. C.; PÉREZ, Y. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. 3. ed. Gainesville: Synergistic Publications, 1990.

SHIMADZU. Análise qualitativa e quantitativa de compostos fenólicos empregando o LCMS-8040. **Application News – MS – 04**, 2014.

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, n. 2, p. 146-158, 2014.

SPOLTI, P.; SCHNEIDER, L.; SANHUEZA, R. M. V.; BATZER, J. C.; GLEASON, M. L.; DEL PONTE MEDEIROS, E. Improving sooty blotch and flyspeck severity estimation on apple fruit with the aid of standard area diagrams. **European Journal of Plant Pathology**, v. 129, p. 21-29, 2011.

STUTZ, J. C.; MORTON, J. B. Successive pot culture reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, n. 12, p. 1883-1889, 1996.

TÖFOLI, J. G.; FERRARI, J. T.; DOMINGUES, R. J.; NOGUEIRA, E. M. C. *Botrytis* sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. **Biológico**, v. 73, n. 1, p. 11-20, 2011.

TREVISANI, N.; SCHMIT, R.; BECK, M.; GUIDOLIN, A. F.; COIMBRA, J. L. M. Selection of fisális populations for hybridizations, based on fruit traits. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 2, 2016.

TROUVELOT, A.; KOUCH, J.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire: recherche of method d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. (Eds.) Paris. **Les Mycorhizes: Physiologie and Genetique**. Paris: INRA Press, 1986. p. 217-221.

VIO-MICHAELIS, S.; APABLAZA-HIDALGO, G.; GÓMEZ, M.; PEÑA-VERA, R.; MONTENEGRO, G. Antifungal activity of tree Chilean plant extracts on *Botrytis cinerea*. **Botanical Sciences**, v. 90, n. 2, p. 179-183, 2012.

YADAV, N. V. S.; DE VOS, S. M.; BOCK, C. H.; WOOD, B. W. Development and validation of standard area diagrams to aid assessment of pecan scab symptoms on fruit. **Plant Pathology**, v. 62, n. 2, p. 325–335, 2012.

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, n. 2, p. 232-236, 2011.

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, p. 41134, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE I - Resumo da análise de variância para a morfologia do sistema radicial de plantas de fisális na ausência e presença de inoculação com FMA. Passo Fundo - 2020

Causas de Variação	Quadrado Médio							
	GL ¹	CO (%)	CT (cm)	AS (cm ²)	V (cm ³)	RMF (cm)	RF (cm)	RG (cm)
Blocos	4	120 ^{ns}	6012,94 ^{ns}	8632,07*	2022,04**	8005,32 ^{ns}	1270,64 ^{ns}	5484,30 ^{ns}
FMA	3	647,33*	8016,27 ^{ns}	4622,02 ^{ns}	1946,84*	6168,96 ^{ns}	2888,36*	2529,74 ^{ns}
Resíduo	12	90	3495,04	1561,11	372,26	4302,25	6678,27	2387,44
TOTAL	19							
Média		51,00	688,41	716,74	73,30	244,02	257,169	187,12
CV (%) ²		18,60	27,15	16,40	26,32	26,87	31,77	26,11

¹ GL: graus de liberdade. CO: colonização micorrízica. CT: comprimento total radicial. AS: área superficial radicial. V: volume de raízes. RMF: raízes muito finas. RF: raízes finas. RG: raízes grossas.

² CV: coeficiente de variação.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$).

^{ns} não significativo ($p \geq 0,05$).

APÊNDICE II - Resumo da análise de variância para a produção de frutos de plantas de fisalis na ausência e presença de inoculação com FMA. Passo Fundo - 2020

Causas de Variação	Quadrado Médio			
	GL ¹	NTF (nº/planta)	PT (g/planta)	MFMF (g)
Blocos	4	49,82 ^{ns}	658,52 ^{ns}	0,13 ^{ns}
FMA	3	150,18 ^{ns}	2744,10 ^{ns}	0,93*
Resíduo	12	84,55	832,79	0,17
TOTAL	19			
Média		36,35	112,47	3,10
CV (%) ²		25,29	25,65	13,40

¹ GL: grau de liberdade. NTF: número total de frutos. PT: produção total. MFMF: massa fresca média de frutos.

² CV: coeficiente de variação.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$).

^{ns} não significativo ($p \geq 0,05$).

APÊNDICE III - Resumo da análise de variância para a qualidade de frutos de plantas de fisális na ausência e presença de inoculação com FMA. Passo Fundo - 2020

Causas de Variação	Quadrado Médio				
	GL ¹	SST (%brix)	ATT (%)	SST/ATT	DMF (mm)
Blocos	4	0,02 ^{ns}	0,12*	3,30 ^{ns}	0,81 ^{ns}
FMA	3	1,72**	0,12 ^{ns}	7,99*	1,01 ^{ns}
Resíduo	12	0,04	0,03	1,54	0,66
TOTAL	19				
Média		14,74	1,55	9,78	16,63
CV (%) ²		1,38	12,41	12,69	4,89

¹ GL: graus de liberdade. SST: sólidos solúveis totais. ATT: acidez total titulável. SST/ATT: sabor de frutos. DMF: diâmetro médio de frutos.

² CV: coeficiente de variação.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$).

^{ns} não significativo ($p \geq 0,05$).

APÊNDICE IV - Resultados do teste *in vitro* de inibição do desenvolvimento micelial do mofo-cinzento. Passo Fundo - 2020

Continua

Tratamentos	Volume (μ L) de cada tratamento adicionado em cada placa de Petri	Repetição	Medida do desenvolvimento micelial (mm)
1	250	1	90.00
1	250	2	90.00
1	250	3	90.00
1	250	4	90.00
1	250	5	82.10
1	250	6	90.00
1	250	7	90.00
1	250	8	90.00
1	250	9	90.00
1	250	10	90.00
2	250	11	90.00
2	250	12	90.00
2	250	13	60.71

Continuação

2	250	14	90.00
2	250	15	90.00
2	250	16	31.92
2	250	17	90.00
2	250	18	90.00
2	250	19	90.00
2	250	20	23.26
3	250	21	90.00
3	250	22	90.00
3	250	23	90.00
3	250	24	90.00
3	250	25	90.00
3	250	26	90.00
3	250	27	90.00
3	250	28	90.00
3	250	29	90.00
3	250	30	90.00
4	250	31	90.00
4	250	32	38.81
4	250	33	90.00
4	250	34	90.00
4	250	35	90.00
4	250	36	90.00
4	250	37	90.00
4	250	38	0.00
4	250	39	90.00
4	250	40	90.00
5	250	41	0.00
5	250	42	48.45
5	250	43	0.00
5	250	44	0.00
5	250	45	0.00
5	250	46	50.18
5	250	47	0.00
5	250	48	0.00
5	250	49	43.50

			Conclusão
5	250	50	50.79
6	250	51	0.00
6	250	52	0.00
6	250	53	0.00
6	250	54	0.00
6	250	55	0.00
6	250	56	0.00
6	250	57	0.00
6	250	58	0.00
6	250	59	0.00
6	250	60	0.00
7	250	61	90.00
7	250	62	90.00
7	250	63	90.00
7	250	64	90.00
7	250	65	90.00
7	250	66	90.00
7	250	67	34.78
7	250	68	0.00
7	250	69	90.00
7	250	70	24.55
8	250	71	90.00
8	250	72	90.00
8	250	73	90.00
8	250	74	90.00
8	250	75	90.00
8	250	76	90.00
8	250	77	90.00
8	250	78	90.00
8	250	79	90.00
8	250	80	90.00

APÊNDICE V - Resumo da análise de variância para caracterização fitoquímica dos extratos de fisális. Passo Fundo - 2020

Fontes de Variação	Quadrado Médio	
	GL ¹	Concentração do composto fenólico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Blocos	4	0,00019 ^{ns}
FMA	3	0,000063 ^{ns}
Resíduo	12	0,000073
TOTAL	19	
Média		0,00355
CV (%) ²		41,51

¹ GL: graus de liberdade. ² CV: coeficiente de variação. ^{ns} não significativo ($p \geq 0,05$).

