

PAULA RENATA ALVES DA SILVA

**INTERAÇÃO *Clonostachys rosea*, SILÍCIO E *Botrytis cinerea* EM
PEPINEIRO**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586i
2012
2012.

Silva, Paula Renata Alves da, 1986-

Interação *Clonostachys rosea*, silício e *Botrytis cinerea* em
pepineiro / Paula Renata Alves da Silva. – Viçosa, MG,

viii, 52f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Luiz Antonio Maffia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 31-43

1. *Botrytis cinerea* - Controle biológico. 2. Silício.
3. *Clonostachys rosea*. 4. Pepino - Doenças e pragas. I.
Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 632.96

PAULA RENATA ALVES DA SILVA

**INTERAÇÃO *Clonostachys rosea*, Silício e *Botrytis cinerea* EM
PEPINEIRO**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.**

APROVADA: 23 de fevereiro de 2012

Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues

Prof^ª. Margarida Goréte F. do Carmo

**Prof. Luiz Antonio Maffia
(Orientador)**

Ofereço

A Deus por ter me sustentado e guiado até aqui.

Dedico

Com amor, a minha mãe;

Com respeito aos meus avós Adelino da Silva (*in memorian*) e

Maria José da Silva (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar toda a minha vida.

Aos meus pais, Marcos da Silva e Regina Alves da Silva, principalmente a minha mãezona pelo amor incondicional e unilateral.

À minha querida vó Zé, pelo amor e dedicação à família em vida. Tenho certeza que estaria muito feliz com mais esta conquista da sua neta.

À minha sogra Aparecida e ao meu sogro Pedrinho por serem meus pais e me darem todo apoio o tempo que morei em Viçosa.

Ao meu noivo José Carlos Polidoro, pelo amor, momentos de descontração, e por ser os 3 “As” da minha vida (Amor, Amante e Amigo) enfim, por me apoiar em todos os sentidos e dar razão a minha vida.

Aos meus avós Norma e Manoel, às tias Leila e Angélica, aos tios Carlos e Levi, aos primos Cristiano e Carlos, às priminhas mais lindas Aline e Lorena e ao irmão Marcos pelo apoio e incentivo mesmo a distância.

Às amigas Mariella e Raquel, as irmãs que escolhi que mesmo distante nunca me abandonaram e estiveram sempre em meu pensamento e coração.

Às amigas Elisa e Valéria pela amizade e palavras de incentivo e apoio.

À minha cadela Belinha pela companhia diária. E a todos os meus cães que estão no RJ esperando o meu retorno (Mel, Lion, Pet, Bombom e Marrom).

Aos vizinhos Amauri, Flávia e Leci pela amizade com a minha família.

Aos professores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial a Professora Margarida Goréte Ferreira do Carmo, Helena Guglielmi Montano, João Sebastião de Paula Araújo e João Pedro Pimentel, por terem contribuído com minha formação e me ajudarem a chegar aonde cheguei, pelos ensinamentos e amizade.

Ao professor Luiz Antônio Maffia, pela orientação, confiança, amizade e paciência nesses dois anos.

Ao professor Fabrício de Ávila Rodrigues, pela coorientação e disponibilidade do seu laboratório.

À Dra. Renata Resende pelo apoio nas análises enzimáticas.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia e à Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade, estrutura e pelo apoio financeiro.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia que contribuíram para minha formação durante esse período.

À toda equipe de Pós-Graduação e Graduação do Laboratório de Epidemiologia e Controle Biológico pela amizade, confiança, descontração, auxílio e esforço, em especial a Yuri, Helton e Lucas, que ajudaram na execução dos experimentos.

À todos que de uma forma ou de outra me apoiaram durante esse tempo.

E como diz a música: “Se chorei ou se sorri, o importante é que emoções eu vivi!”

BIOGRAFIA

Paula Renata Alves da Silva, filha de Marcos da Silva e Regina Alves da Silva, nasceu em 19 de julho de 1986, na cidade do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro.

Em 2001, ingressou no curso Técnico em Agropecuária Orgânica pelo Colégio Técnico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CTUR), onde concluiu junto com o Ensino Médio, em dezembro de 2003.

Em 2004, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde graduou-se em fevereiro de 2010.

Em Março do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Procedimentos Gerais.....	10
3.2 Ensaio 1: Resistência à <i>B. cinerea</i> mediada pela aplicação de <i>C. rosea</i> e/ou Si .	11
3.3 Ensaio 2: Promoção de crescimento e redução da severidade de <i>B. cinerea</i> pela aplicação de <i>C. rosea</i> e/ou Si	15
3.4 Determinação da concentração foliar de Si.....	16
3.5 Análises estatísticas.....	16
4. RESULTADOS	17
4.1 Ensaio 1: Resistência a <i>B. cinerea</i> mediada pela aplicação de <i>C. rosea</i> e/ou Si..	17
4.2 Ensaio 2: Promoção de crescimento e redução da severidade de <i>B. cinerea</i> pela aplicação de <i>C. rosea</i> e/ou Si	19
4.3 Concentração foliar de Si	20
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÕES	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

RESUMO

SILVA, Paula Renata Alves da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Interação *Clonostachys rosea*, Silício e *Botrytis cinerea* em pepineiro.** Orientador: Luiz Antônio Maffia.

Plantas de pepino sob cultivo protegido são frequentemente infectadas por *Botrytis cinerea*, que causa o mofo cinzento. Controla-se a doença com sucessivas aplicações de fungicidas. No contexto do manejo integrado do mofo cinzento, estudou-se o efeito da interação *Clonostachys rosea*, Silício (Si) e *B. cinerea* na severidade da doença. Quando se aplicaram Si e *C. rosea* isolados ou em conjunto, aumentou-se o período de incubação da doença. Com a aplicação de *C. rosea*, o período de incubação aumentou-se em aproximadamente 63 h e se reduziram significativamente a severidade do mofo cinzento e o extravasamento de eletrólitos. Com a aplicação isolada de *C. rosea* ou de Si aumentou-se a atividade de polifenoloxidase, peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase e reduziram-se a severidade, a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) e a taxa de progresso do mofo cinzento. Quando se aplicou *C. rosea* isoladamente, ocorreu promoção do crescimento de plantas, considerando-se a massa seca do sistema radicular, o comprimento da parte aérea, e a massa seca da parte aérea. O antagonista colonizou plantas endofiticamente e a frequência de colonização foi maior nas plantas inoculadas com *B. cinerea* que nas não inoculadas. Conclui-se que *C. rosea* é um potencial agente de controle biológico do mofo cinzento do pepino, que pode ser endofítico em plantas de pepino e promover seu crescimento.

ABSTRACT

SILVA, Paula Renata Alves da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Interaction *Clonostachys rosea*, Silicon and *Botrytis cinerea***. Adviser: Luiz Antônio Maffia.

Cucumber plants grown in greenhouse conditions are often infected by *Botrytis cinerea*, which causes the gray mold. The disease is controlled by successive applications of fungicides. In the perspective of integrated management of gray mold, we studied the effects of the interaction *Clonostachys rosea*, Silicon (Si) and *Botrytis cinerea* on disease severity. When Si and *C. rosea* were applied alone or together, the incubation period of disease was increased. When *C. rosea* was applied, the incubation period increased about 63h and gray mold severity and electrolyte leakage were significantly reduced. The application of either *C. rosea* or Si alone increased the activity of polyphenoloxidase, peroxidase, chitinase and β -1,3-glucanase, and reduce disease severity, area under the curve of progress of disease (AUCPD), and rate of gray mold progress. The application of just *C. rosea* was promoted plant growth, considering the dry mass of root system, stem length and dry mass of stems. The antagonist colonized endophytically cucumber plants; the frequency of colonization was higher in the inoculated with *B. cinerea* than in the uninoculated plants. We conclude that *C. rosea* is a potential biological control agent of cucumber gray mold that can be endophytic and can promote the growth of cucumber plants.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do pepino (*Cucumis sativus* L.) é a segunda cucurbitácea mais plantada no mundo (Almeida, 2006) e uma das mais consumidas no Brasil (Cardoso e Silva, 2003). O pepino é bastante cultivado em sistema de cultivo protegido, em vista do ciclo vegetativo curto e do elevado valor econômico na entressafra, em determinadas regiões do Brasil (Caldas, 2008). Porém, o ambiente protegido favorece a ocorrência de doenças como o mofo cinzento (Elad *et al.*, 1995), causada por *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.. O mofo cinzento reduz a produtividade do pepino em muitas regiões do mundo, e pode ocorrer em folhas, frutos, flores e hastes (Dik e Elad, 1999). Em casa de vegetação, a haste pode ser infectada pelo crescimento do fungo através do pecíolo e/ou por infecção direta através de partes da planta com ferimentos ocasionados pelas podas de brotos laterais (Elad e Shtienberg, 1995).

O manejo do mofo cinzento baseia-se principalmente no controle químico, porém a aplicação de fungicidas pode causar problemas, como resíduos tóxicos nos frutos e seleção de isolados do patógeno resistentes a fungicidas (Myresiotis *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009; Bardas *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Veloukas *et al.*, 2011). Portanto, demanda-se obter métodos alternativos para supressão de *B. cinerea* em plantios comerciais. Nesse contexto, o uso de agentes de controle biológico e a resistência mediada por agentes bióticos e/ou abióticos pode ser uma alternativa eficiente.

Dentre os agentes de biocontrole, destaca-se *Clonostachys rosea* (Link Fries) [forma perfeita = *Bionectria ochroleuca*], que ocorre naturalmente no solo, restos culturais, plantas daninhas e cultivadas, é saprófita amplamente distribuído no mundo e antagonista a vários fungos fitopatogênicos (Sutton *et al.*, 1997; Nobre *et al.*, 2005). A aplicação de *C. rosea* em plantas de fumo e trigo induziu resistência a *Erysiphe orontii* e *Fusarium culmorum*, respectivamente (Lahoz *et al.*, 2004; Roberti *et al.*, 2008). A aplicação do antagonista pode promover outros efeitos benéficos a plantas, como melhorar as condições fisiológicas e a eficiência fotossintética, reduzir estresses abióticos e aumentar a absorção de água e nutrientes, o que pode aumentar a produtividade (Shoresh *et al.*, 2010). *Clonostachys rosea* é antagonista a *B. cinerea* principalmente por meio de hiperparasitismo e competição por nutrientes e colonização de tecidos mortos/senescentes (Sutton, 1997; Morandi *et al.*, 2003; Cota

et al., 2008). O antagonista também pode promover o crescimento de plantas de pepino cultivadas em sistema hidropônico (Liu e Sutton, 2002). No Brasil, não há relatos sobre o efeito de *C. rosea* em induzir resistência em plantas a fitopatógenos, apesar da eficiência de alguns isolados como antagonistas (Nobre *et al.*, 2005).

O uso do controle biológico seria interessante no contexto do manejo integrado. Nessa perspectiva, seria válido associar a aplicação de *C. rosea* à de outra(s) alternativa(s). Dentre essas estratégias, tem-se o uso do silício (Si). O Si é o segundo maior elemento constituinte do solo, logo após o oxigênio (Korndörfer, 2007). Porém, apesar dos efeitos conhecidos, ainda não se estabeleceu a essencialidade do elemento (Reynolds *et al.*, 2009; Korndörfer e Oliveira, 2010). Vários autores relataram que a aplicação de Si pode proteger plantas de patógenos (Chérif *et al.*, 1994; Schuenger e Hammer, 2003; Rodrigues *et al.*, 2004; Rémus-Borel *et al.*, 2005; Moyer *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2009). Há, também, relatos de que o Si aumentou o peso da matéria seca de plantas de arroz, aveia, cevada e trigo entre 2-20% (Lewin e Reiman, 1969; Gali e Smith, 1992), bem como registros de promoção de crescimento em outras espécies (Marschner *et al.*, 1990; Hossain *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004b; Mali e Aery, 2009; Lee *et al.*, 2010). Não se obtiveram relatos sobre a associação de *C. rosea* e de Si no controle a fitopatógenos no Brasil.

Como mencionado, em cultivo protegido o controle do mofo cinzento acarreta aumento do uso de fungicidas, o que também onera o custo de produção. Para reduzir ambos, é necessário obter alternativas eficazes de manejo mais seguras ambientalmente. Portanto, objetivou-se verificar se a aplicação individual de *C. rosea* ou associada a Si pode: i- ativar os mecanismos de defesa do pepineiro a *B. cinerea*; ii- reduzir a severidade do mofo cinzento e iii- promover o crescimento de plantas de pepino. Avaliou-se, também, se a aplicação de Si e a inoculação de *B. cinerea* podem afetar a colonização endofítica de *C. rosea*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mofo cinzento

O mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. (teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* de Bary), ocorre em mais de 200 culturas incluindo cereais, oleaginosas, fibrosas, ornamentais e hortícolas, principalmente em regiões subtropicais e temperadas (Silvera-Pérez *et al.*, 2010; Cota *et al.*, 2009, 2008; Williamson *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2004a; Ben-Shalom *et al.*, 2003; Sutton *et al.*, 1997).

Os sintomas mais comuns da doença em folhas e frutos são podridão mole, acompanhada de colapso e maceração dos tecidos do parênquima, seguidas de rápida liberação de conídios (Williamson *et al.*, 2007). Em hastes jovens e feridas, podem ocorrer lesões necróticas, o que pode levar ao apodrecimento de todo o ramo. Em pétalas de rosas, os sintomas iniciam-se como pequenas manchas ou bolhas claras que evoluem para o marrom ou avermelhado, podendo resultar em queima (Morandi e Maffia, 2005). O mofo cinzento causa maiores danos em tecidos maduros ou senescentes, apesar de *B. cinerea* poder também infectar tecidos jovens e permanecer quiescente até que as condições ambientais e a fisiologia do hospedeiro favoreçam seu desenvolvimento (Williamson *et al.*, 2007). Em pepino, folhas velhas podem ser infectadas e a infecção da haste pode ser originada pelo crescimento do patógeno através do pecíolo ou de infecções diretas através de ferimentos ocasionados por podas de brotos laterais (Dik e Wubben, 2007).

Botrytis cinerea sobrevive no solo como micélio e escleródios em restos de plantas em decomposição (Araújo *et al.*, 2005). Temperaturas amenas (18-23 °C) e umidade relativa alta favorecem o crescimento, esporulação, liberação dos conídios e germinação, e estabelecimento da infecção. Perdas em produtos mantidos por longos períodos em armazenamento podem ocorrer, mesmo que as temperaturas estejam entre 0 e 10 °C (Garrido e Sônego, 2005). Conídios germinados penetram através de lesões nos tecidos e produzem micélio em pétalas mais velhas, folhas e bulbos mortos (Garrido e Sônego, 2005). Entre 10 a 15 °C pode ocorrer formação de escleródios escuros e irregulares nos órgão afetados (Shaul *et al.*, 1992). Os escleródios normalmente germinam, produzindo micélio típico que pode infectar

diretamente, ou menos comumente, produzindo apotécios e ascósporos (Garrido e Sônego, 2005).

Existe grande diversidade genética em *B. cinerea*, em vista da condição heterocariótica de hifas e esporos do fungo (Morandi e Maffia, 2005). O controle de *B. cinerea* é dificultado, pois tem vários mecanismos de penetração, diversos hospedeiros e pode sobreviver como micélio e/ou conídio ou por períodos prolongados como escleródios em restos de culturas (Williamson *et al.*, 2007).

2.2. Manejo da doença

O manejo do mofo cinzento é difícil, pois o fungo tem uma ampla gama de hospedeiros, múltiplos mecanismos de infecção e pode infectar todos os órgãos de plantas em qualquer estágio de desenvolvimento (Williamson, *et al.*, 2007; Kars e van Kan, 2007). Adicionalmente, o uso de variedades resistentes é difícil em vista de o fungo ter variabilidade genética alta e ser patógeno necrotrófico (Williamson *et al.*, 2007).

Comumente, lança-se mão do controle químico, porém a aplicação de fungicidas pode causar problemas como resíduos tóxicos nos frutos e seleção de isolados resistentes do patógeno (Myresiotis *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009; Bardas *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Veloukas *et al.*, 2011).

O mofo cinzento é favorecido pela alta umidade, iluminação reduzida e temperatura moderada (Dik e Wubben, 2007). Pode-se manejar a doença por meio de práticas culturais como uso de cultivares menos suscetíveis, medidas de saneamento ou manipulação do microclima (Legard *et al.*, 2001, 2000; Mertely *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2001). Há necessidade de se aumentar o espaçamento entre plantas para aumentar a movimentação do ar e a interceptação luminosa, para reduzir o acúmulo de água das chuvas ou irrigação e não ocorra um microclima favorável ao patógeno (Williamson *et al.*, 2007). Em morango, a remoção de folhas e frutos caídos e em decomposição suprime a produção de conídios e reduz a incidência do mofo cinzento (Sutton *et al.*, 1988). Em tomate, a ventilação noturna em casa de vegetação reduziu a severidade do mofo cinzento significativamente (Baptista *et al.*, 2012). Mertely *et al.* (2000) removeram folhas necróticas e senescentes, duas vezes (após o estabelecimento do morango e 3 meses após) ou mensalmente, após o

estabelecimento da planta, e frutos doentes, duas vezes por semana. Para os autores, a remoção de folhas, e a combinação da remoção de folhas e frutos, ambos mensalmente, reduziu significativamente o mofo cinzento nos frutos de morango.

O controle biológico é também estratégia importante de manejo do mofo cinzento (Wang *et al.*, 2009; Cota *et al.*, 2008; Sadfi-Zouaoui *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2007; Freeman *et al.*, 2004; Nobre *et al.*, 2005; Bilu *et al.*, 2004; Morandi *et al.*, 2003, 2001, 2000).

2.3. Controle biológico da doença

Muitos antagonistas suprimem fitopatógenos por meio de competição, produção de metabólitos inibitórios e/ou parasitismo (Elmer e Reglinski, 2006). Bactérias halofílicas quando aplicadas em porções de pecíolos em hastes de folhas destacadas de tomateiro, suprimiram eficientemente *B. cinerea*, com redução do tamanho das lesões (Sadfi-Zouaoui *et al.*, 2008). Reduziram-se a severidade do mofo cinzento em plantas de gerânio transplantadas para substrato contendo *Rhizoctonia* binucleada e *Trichoderma hamatum* 382 (Olson e Benson, 2007). A aplicação de três actinomicetos em solos infestados com *Pythium aphanidermatum* reduziu significativamente o tombamento de plântulas de pepino (El-Tarabily *et al.*, 2009). Actinomicetos endofíticos protegem plantas de diversos fitopatógenos de solos como *Rhizoctonia solani* e *Verticillium dahliae* (Krechel *et al.*, 2002), *Plectosporium tabacinum* (El-Tarabily, 2003), *Gaeumannomyces graminis* fsp. *tritici* (Coombs *et al.*, 2004) e *Fusarium oxysporum* (Cao *et al.*, 2005). Alguns agentes de controle biológico podem ter outros efeitos benéficos em plantas, pois podem melhorar as condições fisiológicas, reduzir estresses abióticos, melhorar a eficiência fotossintética e aumentar a absorção de água e assimilação de nutrientes, o que torna as plantas mais saudáveis e produtivas (Shoresh *et al.*, 2010).

Agentes de controle biológico podem ainda promover o crescimento de plantas aumentando a fotossíntese por meio de enzimas associadas a ela (Shoresh e Harman, 2008; Shoresh *et al.*, 2010). Há evidências de que mecanismos como aumento da absorção de nutrientes e inibição de microflora radicular deletéria são importantes na promoção de crescimento induzida por *Trichoderma* spp. (Harman *et al.*, 2004). Fungos ou bactérias endofíticas, colonizam tecidos de plantas vivas sem

causar sintomas de doença (Wilson, 1995). Plantas de milho em que se aplicou *T. harzianum* T22 foram maiores e mais verdes que as que não receberam, quando cultivadas em campos com baixos teores de nitrogênio (Harman, 2000). O crescimento de plantas de milho, tratadas com o isolado *Williopsis saturnus* (levedura endofítica), foi maior (Nassar e El-Tarabily, 2005). Os autores correlacionam a promoção de crescimento à capacidade de o isolado em produzir *in vitro* altos níveis de duas auxinas, ácido indolacético (IAA) e ácido indolpirúvico (IPYA).

A aplicação do isolado *Trichoderma* T39 em intervalos de 2 dias na concentração de 0,4% em flores de morango resultou em maior redução do mofo cinzento (Freeman *et al.*, 2004). Para os autores, o micoparasitismo e a antibiose estavam envolvidos no biocontrole. Wang *et al.* (2009) avaliaram o antagonismo a *B. cinerea* de quatro isolados bacterianos, que foram atomizados em folhas destacadas de tomateiro. Os autores obtiveram um isolado mais eficiente, que reduziu o tamanho da lesão em 52,4%.

Outro importante agente de biocontrole é *Clonostachys rosea*, que é considerado versátil quanto ao nicho ecológico e é encontrado em solos cultivados e na parte aérea das plantas (Krauss *et al.*, 2001; Sutton *et al.*, 1997). O antagonismo de *C. rosea* à *B. cinerea* envolve competição, micoparasitismo e indução de resistência (Sutton *et al.*, 1997).

2.4. *Clonostachys rosea* como antagonista e promotor de crescimento

Atualmente, há diversos trabalhos com *C. rosea*, o qual ocorre naturalmente no solo, restos culturais, plantas daninhas e cultivadas (Sutton *et al.*, 1997; Nobre *et al.*, 2005). É um saprófita amplamente distribuído no mundo, é antagonista a vários fungos fitopatogênicos (Sutton *et al.*, 1997) e pode se associar a diversos órgãos de plantas, como raízes caules, folhas, sementes e frutos. Morandi *et al.* (2001) observaram que hifas de *C. rosea* penetravam em hifas de *B. cinerea* e as estrangulavam. *Clonostachys rosea* competiu com *B. cinerea* e inibiu sua esporulação em begônia, framboesa, gerânio, morango e tomate (Sutton *et al.*, 1997). Os autores observaram que em tecidos de framboesa onde se aplicou o antagonista, não houve germinação dos conídios de *B. cinerea* e nem formação de apressórios

(Sutton *et al.*, 1997). O antagonista também foi mais eficiente em suprimir a esporulação de *B. cinerea* em folhas de morango que a aplicação de fungicidas (Cota *et al.*, 2008). O isolado canadense PG-88-710 de *C. rosea* reduziu em mais de 99% a esporulação de *B. cinerea* em folhas de roseira, mesmo quando se inoculou o patógeno 24 h antes de aplicar o antagonista (Morandi *et al.*, 2001). Esse isolado competiu com *B. cinerea* e reduziu sua esporulação em morangueiro, eucalipto e roseira, em estudos realizados no Brasil (Valdebenito-Sanhuenza *et al.*, 1997; Morandi *et al.*, 2001, 2003).

Uma característica importante de *C. rosea* é a sua capacidade de se estabelecer endofiticamente em tecidos verdes (Morandi *et al.*, 2001; Sutton *et al.*, 1997, 2002). Geralmente fungos endofíticos protegem mais as plantas hospedeiras de patógenos e insetos, além de melhorarem a absorção de nutrientes o que resulta em maior crescimento e produção (Vega *et al.*, 2008; Wicklow *et al.*, 2005). Além do antagonismo a fungos fitopatogênicos, insetos e nematóides, e sua capacidade de permanecer endofítico em tecidos verdes, *C. rosea* pode ainda promover o crescimento de plantas (Roberti *et al.*, 2008; Sutton *et al.*, 2008).

Clonostachys rosea e *Trichoderma* spp. podem aumentar o desenvolvimento de raízes (Harman, 2000; Roberti *et al.*, 2008; Shores e Harman, 2008; Shores *et al.*, 2010). Raízes mais desenvolvidas podem explorar mais o solo, aumentar a absorção de nutrientes e água e, conseqüentemente, aumentar o desenvolvimento das plantas (Harman, 2000; Shores *et al.*, 2010). Plantas de milho originadas de sementes tratadas com *T. harzianum* foram mais tolerantes à seca em condições de campo, provavelmente em vista do maior desenvolvimento e aprofundamento das raízes, com conseqüente maior absorção de água (Harman, 2000). Hifas de *C. rosea* formaram uma densa rede, colonizando extensivamente raízes de pepino, 7 dias após a aplicação no substrato, e observaram-se *C. rosea* crescendo internamente células da epiderme radicular o que indica colonização pelo antagonista (Chatterton *et al.*, 2008). A aplicação de suspensão de 10^6 conídios de *C. rosea*/mL em sementes de trigo resultou em raízes maiores e mais vigorosas, provavelmente porque *C. rosea* reduziu a atividade de fungos prejudiciais e a quantidade de compostos tóxicos, com aumento da absorção de nutrientes (Roberti *et al.*, 2008). Plantas de gerânio que resultaram de estacas imersas em suspensão de 5×10^6 conídios *C. rosea*/mL após 12 dias, foram mais vigorosas e com maior densidade média da raiz. A aplicação de *C.*

rosea aumentou em 27% o número de plantas enraizadas e aumentou significativamente a quantidade de raízes (Sutton *et al.*, 2008). Em pepinos cultivados em estufa comercial, em placas de fibra de coco e irrigados por gotejamento, aplicou-se *C. rosea* ou *Pseudomonas chlororaphis* (100 mL de suspensão com 10^6 UFC.mL⁻¹), aos 5, 26 e 47 dias do transplante; a produção aumentou em 11,1% com *C. rosea* e 10,5% com *P. chlororaphis* (Sutton *et al.*, 2008).

2.5. Silício no manejo de doenças

A aplicação de Si pode aumentar a massa seca de plantas de arroz, aveia, cevada e trigo entre 2-20% (Lewin e Reiman, 1969; Gali e Smith, 1992) e pode mediar a promoção de crescimento em outras espécies (Marschner *et al.*, 1990; Hossain *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004b; Mali e Aery, 2009; Lee *et al.*, 2010).

O Si é o segundo maior elemento constituinte do solo, logo após o oxigênio (Korndörfer, 2007). Sua aplicação em sistema hidropônico aumentou o comprimento e a biomassa de plantas de soja (Lee *et al.*, 2010). Para os autores, esse incremento pode ser pelo aumento da fotossíntese, conteúdo de clorofila, aumento da atividade da enzima rubisco e aumento dos níveis de giberelinas endógenas. Outros autores sugerem que a promoção de crescimento é em função do reforçamento da parede celular (Hossain *et al.*, 2002). Com a aplicação de Si, ocorreu aumento significativo no comprimento radicular, peso da matéria seca da raiz e área foliar de feijoeiros caupi (Mali e Aery, 2009).

A aplicação de Si também auxilia no manejo de doenças, pois pode reduzir a severidade, em vista da resistência mediada (Chérif *et al.*, 1994; Schuerger e Hammer, 2003; Rodrigues *et al.*, 2001, 2004; Rémus-Borel *et al.*, 2005; Moyer *et al.*, 2008; Dallagnol *et al.*, 2009; Resende *et al.*, 2009) ou deposição de sílica no apoplasto (Cai *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2005). Houve resistência mediada em pepino a *Pythium* spp. com aplicação de silicato de potássio (Si-K) 1,7 mM (100 ppm) na solução nutritiva (Chérif *et al.*, 1994). Em plantas de arroz cultivadas com silicato de cálcio e inoculadas com *Rhizoctonia solani* após 42 dias do semeio, houve redução significativa da incidência de perfilhos doentes (Rodrigues *et al.*, 2001). Os autores correlacionam os resultados ao acúmulo de Si na camada da cutícula, o que originou uma barreira física que reduziu a extensão da lesão e a intensidade da doença e

mediou resistência. Aplicações foliares de silicato de potássio reduziram a intensidade da ferrugem asiática da soja (Rodrigues *et al.*, 2009). Liang *et al.* (2005) verificaram que a aplicação de Si nas raízes reduziu a severidade do oídio em plantas de pepino e aumentou a atividade de peroxidases, polifenoloxidasas e quitinases. Os autores também observaram que, com aplicações foliares de Si, houve controle satisfatório da doença provavelmente pela barreira física originada pela deposição na superfície foliar ou efeito osmótico do Si, mas não pelo aumento da atividade de enzimas envolvidas na resposta do hospedeiro ao patógeno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimentos Gerais

Realizaram-se os trabalhos na Unidade de Controle Biológico, Laboratório da Interação Planta-Patógeno, casa de vegetação e câmara de crescimento do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Usaram-se sementes de pepino (não tratadas com pesticidas) ‘Caipira’ da empresa ISLA, suscetível ao mofo cinzento. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 5 min, lavadas em água destilada e esterilizada (ADE), secas por 10 min em papel filtro estéril à temperatura ambiente e semeadas em vasos plásticos com capacidade de 1 Kg, com Tropstrato HT Hortaliças[®]. O substrato caracterizava-se por: pH KCl = 5,13; P, K, Fe, Zn, Mn e Cu (Mehlich) = 203,6; 589; 142,6; 11,47; 23,9 e 6,66 mg/dm³, respectivamente; Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ (extrator KCl 1 mol/L¹) = 6,74; 5,65 e 0,59 cmol_c/dm³, respectivamente; H + Al (extrator acetato de cálcio 0,5 mol/L¹ pH 7,0) = 6,4 cmol_c/dm³; soma de bases trocáveis = 13,90 cmol_c/dm³; capacidade de troca catiônica efetiva = 14,49 cmol_c/dm³; capacidade de troca catiônica a pH 7,0 = 20,30 cmol_c/dm³; índice de saturação de bases = 68,50%; índice de saturação de alumínio = 4,1%; fósforo remanescente = 49,70 mg/L¹; matéria orgânica 38,83% e densidade = 0,49 kg/dm³. A concentração de Si disponível no substrato (extração em CaCl₂ 0,01 M) foi de 20,40 mg/dm³. Após a emissão das folhas cotiledonares, adubaram-se as plantas semanalmente com 100 mL de solução nutritiva [40,0 mmol/L¹ KNO₃, 10,0 mmol/L¹ NH₄H₂PO₄, 10,0 mmol/L¹ MgSO₄.7H₂O, 15,0 mmol/L¹ Ca(NO₃).4H₂O, 2,4 mmol/L¹ ZnSO₄.7H₂O, 3,0 mmol/L¹ H₃BO₃, 10,0 mmol/L¹ K₂SO₄, 3,3 mmol/L¹ CH₄N₂O e 7,5 mmol/L¹ NH₄H₂SO₄] (Dallagnol *et al.*, 2012).

Cultivou-se o isolado NCR 61/F de *C. rosea* (Nobre *et al.*, 2005) em meio batata-dextrose-ágar (BDA) em tubos de ensaio inclinados, mantidas sob fotoperíodo de 12 h (15 μmol/cm²/s¹) a 25 °C. Após 10 dias, suspenderam-se os conídios em ADE, filtrou-se em três camadas de gaze, ajustou-se a concentração para 10⁷ conídios/mL¹ com câmara de Neubauer, imergiram-se as sementes na suspensão do antagonista por 30 min e adicionaram-se 20 mL da suspensão nos vasos

imediatamente após o plantio. Executou-se o mesmo procedimento para as plantas-testemunha, que foram tratadas em ADE.

Inoculou-se mistura de dois isolados de *B. cinerea* oriundos de morangueiro em folhas de pepino mantidas em caixas tipo gerbox, que permaneceram sob fotoperíodo de 12h ($15 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{s}^1$) a 20°C . Colocaram-se as folhas sobre telas de nylon, as quais permaneceram sobre espumas umidecidas com ADE dentro das caixas. Inocularam-se as folhas com discos de micélio. A partir da esporulação, efetuou-se o isolamento monospórico, para uso do isolado nos experimentos. Cultivou-se esse isolado em meio BDA em tubos de ensaio inclinados, sob fotoperíodo de 12 h ($15 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{s}^1$) a 20°C . Após 12 dias, suspenderam-se os conídios em ADE, adicionou-se glicose e K_2HPO_4 0,02 M e ajustou-se com hemacitômetro a concentração para 10^6 conídios/ml¹.

Como fonte de Si, usou-se o produto FertiSil[®] (PQ Silica, São Paulo), à base de silicato de potássio (K_2SiO_3) contendo 13% de K_2O , 26,59% de SiO_2 e 12,42% de Si solúvel. Diluiu-se o produto em água desionizada, para obter a concentração final de 2,0 mmol de Si ($0,32 \text{ mL}/\text{L}^1$ de K_2SiO_3), e ajustou-se o pH da solução para 5,5 com HCl ou NaOH. Nas plantas supridas com Si, irrigou-se diariamente com 100 mL desta solução; nas não supridas aplicaram-se 100 mL de solução de cloreto de potássio, com concentração final de 1,23 mmol de K, também dissolvido em água deionizada, com pH ajustado para 5,5, para igualar a quantidade de potássio aplicado em todos os tratamentos (Dallagnol *et al.*, 2012).

3.2 Ensaio 1: Resistência à *B. cinerea* mediada pela aplicação de *C. rosea* e/ou Si

Aos 38 dias após a semeadura, atomizou-se a suspensão de conídios nas folhas com atomizador De Vilbiss N° 15. As plantas inoculadas permaneceram em câmara úmida sob fotoperíodo de 12 h ($15 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{s}^1$) a 18°C por 48 h. Nas plantas-testemunha, atomizou-se ADE.

A partir da combinação ou não de inoculação de *B. cinerea*, aplicação ou não de *C. rosea* e de aplicação ou não de Si, efetuaram-se três experimentos em esquema fatorial. Nesses experimentos, avaliaram-se: i - a severidade final do mofo cinzento e o período de incubação; ii - extravasamento de eletrólitos e iii - a atividade de enzimas relacionadas à resistência. Todos os experimentos foram em esquema fatorial, 2 (inoculação ou não de *B. cinerea*) x 2 (aplicação ou não de *C. rosea*) x 2

(aplicação ou não de Si-K), em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições (uma planta = uma unidade experimental). Executou-se o experimento por duas vezes (de maio a julho e de julho a setembro de 2011).

Avaliaram-se o período de incubação e a severidade final. Para o período de incubação, observaram-se as plantas inoculadas em intervalos de 6 h, até aparecerem os primeiros sintomas do mofo cinzento. Estimou-se a severidade final aos 10 dias após a inoculação, com o programa Quant v. 1.0.1 (Vale *et al.*, 2003).

Na avaliação do extravasamento de eletrólitos, adotou-se a metodologia descrita por Lima *et al.* (2002), modificada. Coletaram-se 21 discos de 1 cm² da primeira folha basal de cada planta, às 0, 72, 120, 168, 192 e 240 horas após a inoculação (hai). Imediatamente após, lavaram-se os discos por duas vezes em água desionizada, transferindo-os para 60 mL de água desionizada a 25 °C. Após 4 h, determinou-se a condutividade elétrica (CE1) em condutivímetro (Tecnoyon mCA-150 - MS Tecnoyon Instrumentação Científica). Após manter as amostras por mais 2 h a 90 °C, determinou-se novamente a condutividade elétrica (CE2). Avaliou-se o extravasamento de eletrólitos (EE), considerando-se a porcentagem de eletrólitos extravasados em relação aos eletrólitos totais, segundo a equação: $EE (\%) = (CE1/CE2) \times 100$. Executou-se o experimento por uma vez (de julho a setembro de 2011).

Na avaliação da atividade das enzimas de defesa, executou-se o experimento por uma vez (de julho a setembro de 2011), e se avaliou a atividade de peroxidases, quitinases, polifenoloxidasas e β -1,3-glucanases.

Coletaram-se a segunda, terceira e quarta folhas de cada planta a partir da base, dos tratamentos inoculados com *B. cinerea* às 0, 72, 120, 168, 192 e 240 hai. De cada folha, retiraram-se três amostras de 1 g, que foram armazenadas em nitrogênio líquido a -80 °C até o momento da análise. Para determinar a concentração de proteínas, usada no cálculo da atividade das enzimas, adotou-se o método de Bradford (1976), e os registros foram em espectrofotômetro digital (Evolution 60, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), a 595 nm utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

Na análise de quitinases, para obter o extrato foliar, usou-se a metodologia descrita por Lanna *et al.* (1996). Para extrair a enzima, macerou-se a amostra com o auxílio de um pistilo e almofariz em nitrogênio líquido até obter um pó fino, que foi

homogeneizado, mantendo-se a amostra em banho de gelo, em 2 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8) contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e 500 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Centrifugou-se o homogeneizado a 20000 x g, a 4°C por 25 min e se armazenou o sobrenadante obtido (extrato bruto da enzima) a 4°C. Detectou-se a atividade enzimática segundo Roberts e Selitrennikoff (1988) e Harman *et al.* (1993): preparou-se uma mistura com 20 µl do extrato vegetal, 470 µl do tampão de reação acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e 10 µl da solução do substrato de *p*-nitrofenil- β -D-N,N'-diacetilquitobiose (PNP) a 2 mg/m⁻¹, incubando-se a 37°C. Após 2 h, adicionou-se 0,5 ml de carbonato de sódio 0,2 M para parar a reação. Determinou-se a absorbância no espectrofotômetro com comprimento de onda de 410 nm. Subtraiu-se o valor de absorbância de cada amostra do valor de absorbância do controle (mistura idêntica à da amostra, com reação paralisada no início). Usou-se, para o cálculo, o coeficiente de extinção molar de 7 M⁻¹ cm⁻¹ (Yedidia *et al.*, 1999). Expressaram-se os resultados em mM/min¹/mg¹ de proteína (atividade específica).

Na análise de peroxidases, para obter o extrato foliar, adotou-se a metodologia descrita por Peixoto (1998). Para extrair a enzima, macerou-se a amostra com o auxílio de um pistilo e almofariz em nitrogênio líquido até obter um pó fino, que foi homogeneizado, mantendo-se sempre a amostra em banho de gelo, em 2 ml 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8) contendo 1 mM de PMSF e 500 mg de PVPP. Centrifugou-se a 20000 x g, a 4°C por 25 min, e se armazenou o sobrenadante obtido (extrato bruto da enzima) a 4°C. Detectou-se a atividade enzimática segundo Kar e Miashra (1976): preparou-se um mistura com 310 µl de água Milli-Q, 280 µl do tampão de reação fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 200 µl da solução do substrato pirogalol 100 mM e 200 µl de peróxido de hidrogênio 100 mM, que permaneceu em banho-maria a 25°C por 4 min para estabilização. Ao meio de reação, adicionaram-se 10 µl do extrato vegetal. O início da reação ocorreu com adição do extrato vegetal à mistura de reação, e se determinou a absorbância no espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm durante 5 min, em intervalos de 60 s. Usou-se o coeficiente de extinção molar 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ para o cálculo da atividade enzimática (Chance e Maehley, 1955). Os valores obtidos foram divididos pela concentração de proteínas no extrato e expressos em mM/min¹/mg¹ de

proteína (atividade específica). Durante todas as etapas, mantiveram-se os tubos de ensaio tampados e envoltos em papel alumínio.

Na análise de polifenoloxidasas, para obter o extrato foliar, adotou-se metodologia descrita por Peixoto (1998). Para extrair a enzima, macerou-se a amostra com o auxílio de um pistilo e almofariz em nitrogênio líquido até obter um pó fino, que foi homogeneizado, mantendo-se a amostra em banho de gelo, em 2 mL 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8) contendo 1 mM de PMSF e 500 mg de PVPP. Centrifugou-se o homogeneizado a 20000 x g, a 4°C por 25 min e se armazenou o sobrenadante obtido (extrato bruto da enzima) a 4°C. Detectou-se a atividade enzimática segundo Kar e Miashra (1976): preparou-se um mistura com 520 µl de água Milli-Q, 250 µl do tampão de reação fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8) e 200 µl da solução do substrato pirogalol 100 mM, que permaneceu em banho-maria a 25°C por 4 min para estabilização. Ao meio de reação, adicionaram-se 30µl do extrato vegetal. O início da reação ocorreu com adição do extrato vegetal à mistura de reação, e se determinou a absorbância no espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm durante 5 min, em intervalos de 60 s. Usou-se o coeficiente de extinção molar 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ para calcular a atividade enzimática (Chance e Maehley, 1955). Os valores obtidos foram divididos pela concentração de proteínas no extrato e expressos em mM/min¹/mg¹ de proteína (atividade específica). Durante todas as etapas, mantiveram-se os tubos de ensaio tampados e envoltos em papel alumínio.

Na análise de β-1,3-glucanases, para obter o extrato foliar, adotou-se a metodologia descrita por Lanna *et al.* (1996). Extraiu-se a enzima macerando-se a amostra com o auxílio de um pistilo e almofariz em nitrogênio líquido até obter um pó fino, que foi homogeneizado, mantendo-se a amostra em banho de gelo, em 2 ml de tampão fosfato de potássio (pH 6,8) a 100 mM contendo 1 mM de PMSF e 500 mg de PVPP. Centrifugou-se o homogeneizado a 20000 x g, a 4°C por 25 min e se armazenou o sobrenadante obtido (extrato bruto da enzima) a 4°C. Determinou-se a atividade enzimática segundo Lever (1972) com modificações: ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em substituição a hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico (Miller, 1956). Preparou-se mistura contendo 20 µl do extrato vegetal, 230 µl do tampão de reação acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 250 µl da solução do substrato de laminarina a 4 mg/ml¹, incubando-se a 45°C por 30 min. Resfriou-se a amostra

mantida em gelo até atingir 30°C e se adicionaram 500 µl de DNS para parar a reação. Determinou-se a absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. O valor de absorvância de cada amostra foi subtraído do valor de absorvância do controle (mistura idêntica a da amostra, com reação paralisada no início). Os resultados foram expressos em unidades de absorvância $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína (atividade específica).

3.3 Ensaio 2: Promoção de crescimento e redução da severidade de *B. cinerea* pela aplicação de *C. rosea* e/ou Si

Aos 30 dias após a semeadura, atomizou-se a suspensão de conídios nas folhas com atomizador De Vilbiss N° 15. As plantas inoculadas permaneceram em câmara úmida sob fotoperíodo de 12 h ($15 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{s}^1$) a 18°C por 48 h. Nas plantas-testemunha, atomizou-se ADE.

A partir da combinação ou não de inoculação de *B. cinerea*, aplicação ou não de *C. rosea* e de aplicação ou não de Si, efetuaram-se três experimentos em esquema fatorial. Nesses experimentos, avaliaram-se: i- a severidade do mofo cinzento; ii- a promoção de crescimento e iii- a colonização endofítica de *C. rosea*. Todos os experimentos foram em esquema fatorial, 2 (inoculação ou não de *B. cinerea*) x 2 (aplicação ou não de *C. rosea*) x 2 (aplicação ou não de Si-K), em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições (duas plantas = uma unidade experimental). Executou-se o experimento por duas vezes (de junho a agosto e de outubro a dezembro de 2011).

Para avaliar a severidade do mofo cinzento, fotografaram-se as cinco primeiras folhas das plantas inoculadas a partir da base, a partir do aparecimento dos primeiros sintomas, e prosseguiu-se com as fotografias a cada dois dias, totalizando sete avaliações. As plantas permaneceram protegidas por armações de ferro e plástico transparente para evitar contaminação (Figura 1). Estimou-se a severidade do mofo cinzento nas folhas com o programa Quant v. 1.0.1 (Vale *et al.*, 2003). Com os valores de severidade, calculou-se a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), com a equação $\text{AACPD} = \sum [(y_i + y_{i+1})/2 \times d_{ti}]$, em que $y_i + y_{i+1}$ são os valores de severidade em duas avaliações consecutivas e d_{ti} o intervalo entre as avaliações (Shaner e Finney, 1977).

Na avaliação da promoção de crescimentos, determinou-se o comprimento das plantas e o peso da matéria seca de parte aérea e do sistema radicular após 50 dias da semeadura. Destacaram-se a parte aérea e o sistema radicular que foi lavado em água corrente, ambos foram cortados, colocados individualmente em sacos de papel e secos em estufa com circulação de ar forçada a 60 °C por 72 h até peso constante.

Na avaliação da colonização endofítica por *C. rosea*, determinou-se a colonização endofítica após 50 dias da semeadura. Cortaram-se fragmentos de 1 cm de comprimento de raízes e da haste (nas partes inferior, mediana e superior das hastes) e discos de 1 cm de diâmetro de folhas (retiradas nas partes inferior, mediana e superior). Passaram-se, sucessivamente, os fragmentos/discos em etanol a 70% por 30 s, hipoclorito de sódio a 1% por 1 min e em ADE. Após secos na câmara de fluxo laminar, transferiram-se os três fragmentos/discos para o meio seletivo de *C. rosea* (Park *et al.*, 1992) em três placas de Petri (um fragmento/disco por placa), incubando-se a 25 °C, 12 h de fotoperíodo. Verificou-se a presença de *C. rosea* nos fragmentos após 12 dias, sob o microscópio estereoscópico, confirmando-se sob microscópio de luz. Calculou-se a frequência da presença de *C. rosea*, e obteve-se a média de dez repetições (uma unidade experimental = duas plantas).

3.4 Determinação da concentração foliar de Si

Realizou-se análise de concentração de Si foliar nos ensaios 1 e 2. Retiraram-se as folhas das plantas de cada repetição no término dos experimentos. Posteriormente, as folhas foram lavadas com água desionizada, secas por 72 h a 60°C e maceradas até obter um pó fino em moinho tipo Willey e a concentração foliar de Si foi determinada por análise colorimétrica (Korndörfer *et al.*, 2004).

3.5 Análises estatísticas

Antes da análise de variância, confirmaram-se a independência, plotando-se os resíduos em função da ordem dos ensaios, e a normalidade dos erros experimentais com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando se executou um experimento por duas vezes, testou-se a homogeneidade das variâncias, com o teste de Levene. Todas as análises foram realizadas com o programa SAS v. 9.1.

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio 1: Resistência a *B. cinerea* mediada pela aplicação de *C. rosea* e/ou Si

Com relação ao período de incubação (PI) e severidade final, efetuou-se análise conjunta das duas execuções do experimento, pois houve homogeneidade das variâncias de período de incubação ($P = 0,94$) e de severidade final ($P = 0,42$). Em ambos, não ocorreu o mofo cinzento nas plantas-testemunha.

As médias do PI nas folhas não tratadas, tratadas com *C. rosea*, tratadas com Si e na combinação *C. rosea*-Si foram 90h, 153h, 141h e 131h, respectivamente, com efeito significativo da aplicação de *C. rosea* ($P = 0,003$) e da interação *C. rosea* x Si ($P = 0,002$). Quando não se aplicou Si, o PI foi menor sem *C. rosea* que com o antagonista ($P = 0,0002$). Quando se aplicou Si, o PI com e sem *C. rosea* não diferiram ($P = 0,915$). Quando não se aplicou *C. rosea*, o PI foi menor sem Si que com Si ($P = 0,0011$). Quando se aplicou *C. rosea*, o PI com e sem Si não diferiram ($P = 0,3478$) (Figura 2).

As médias da severidade final nas folhas não tratadas, tratadas com *C. rosea*, tratadas com Si e tratadas com a combinação *C. rosea*-Si foram 23,5%, 6,5%, 14% e 12%, respectivamente, com efeito significativo da aplicação de *C. rosea* ($P = 0,0064$) e da interação *C. rosea* x Si ($P = 0,0243$) mas não de Si ($P = 0,5609$). Quando não se aplicou Si, a severidade final foi menor com *C. rosea* que sem o antagonista ($P = 0,0010$). Quando se aplicou Si, as severidades finais com e sem *C. rosea* não diferiram ($P = 0,7116$). Quando não se aplicou *C. rosea*, as severidades finais com e sem Si não diferiram ($P = 0,1115$). Quando se aplicou *C. rosea*, as severidades finais com e sem Si não diferiram ($P = 0,0934$) (Figura 3).

Com relação ao extravasamento de eletrólitos (EE), quando se avaliou o EE às 240 hai, houve efeito significativo da aplicação de *C. rosea* ($P = 0,0001$) e da interação *C. rosea* x Si ($P = 0,0191$) nas plantas inoculadas e não inoculadas respectivamente. Nas plantas inoculadas com *B. cinerea*, o EE foi maior nas plantas onde não se aplicou *C. rosea* que nas onde se aplicou. Nas plantas onde não se inoculou *B. cinerea*, quando não se aplicou *C. rosea*, o EE foi maior quando se aplicou Si que quando não se aplicou ($P = 0,0460$). Quando se aplicou *C. rosea*, o EE com e sem Si não diferiram ($P = 0,2322$). Quando não se aplicou Si, o EE foi

maior quando se aplicou *C. rosea* que quando não se aplicou ($P = 0,0289$). Quando se aplicou Si, o EE com e sem *C. rosea* não diferiram ($P = 0,4877$) (Figura 4).

Com relação a atividade de enzimas, para as polifenoloxidasas (PPO), houve efeito significativo da interação *C. rosea* x Si às 120, 168, 192 e 240 hai ($P = 0,0376$, $P = 0,0424$, $P = 0,0097$ e $P = 0,0026$, respectivamente). O primeiro pico enzimático ocorreu às 72 hai, porém não houve efeito significativo da aplicação de *C. rosea*, aplicação de Si e aplicação conjunta. Os dois maiores picos enzimáticos ocorreram às 192 e 240 hai, com efeito significativo da interação *C. rosea* x Si em ambos os intervalos ($P = 0,0097$ e $P = 0,0020$ respectivamente). Às 192 hai, quando não se aplicou Si, a atividade foi maior ($P = 0,0442$), com a aplicação que sem aplicação de *C. rosea*. Às 240 hai, quando se aplicou *C. rosea*, a atividade enzimática foi maior ($P = 0,0201$) sem aplicação que com aplicação de Si. Quando não se aplicou Si, a atividade foi maior ($P = 0,0128$) com aplicação que sem aplicação de *C. rosea* (Figura 5).

Para as peroxidases (POX), ocorreram dois picos pronunciados: às 72 e 168 hai. No primeiro, houve efeito significativo das aplicações isoladas de Si ($P = 0,0497$) e de *C. rosea* ($P = 0,0107$). A atividade enzimática foi 37% maior quando se aplicou Si que quando não se aplicou. Quando se aplicou *C. rosea*, a atividade enzimática foi 57% maior que quando não se a aplicou. No segundo pico, houve efeito significativo da interação *C. rosea* x Si ($P = 0,0478$). Quando não se aplicou *C. rosea*, a atividade enzimática foi maior ($P = 0,0236$) com aplicação que sem aplicação de Si. Quando se aplicou Si, a atividade enzimática foi maior ($P = 0,0143$) sem a aplicação que com a aplicação de *C. rosea* (Figura 5).

Para as β -1,3-glucanases (GLU), os picos ocorreram às 72 e 120 hai. Às 72 hai, detectou-se efeito significativo das aplicações isoladas de *C. rosea* ($P = 0,0425$) e de Si ($P < 0,0001$). Quando se aplicou Si, a atividade enzimática foi 44% maior que quando não se aplicou. Quando se aplicou *C. rosea*, a atividade enzimática foi 8% maior que quando não se aplicou. Às 120 hai, detectou-se efeito significativo das aplicações isoladas de *C. rosea* ($P = 0,0051$) e de Si ($P = 0,0226$). Quando se aplicou Si, a atividade enzimática foi 38% maior que quando não se aplicou. Quando se aplicou *C. rosea*, a atividade enzimática foi 56% maior que quando não se aplicou (Figura 5).

Para as quitinases (QUI), os picos ocorreram às 120 e 168 hai. Às 120 hai, detectou-se efeito significativo da aplicação isolada de *C. rosea* ($P = 0,0101$). Quando se aplicou *C. rosea*, a atividade enzimática foi 55% maior que quando não se aplicou. Às 168 hai detectou-se efeito significativo da aplicação isolada de *C. rosea* ($P = 0,0073$), com a qual a atividade enzimática foi 63% maior que quando não se aplicou (Figura 5).

4.2 Ensaio 2: Promoção de crescimento e redução da severidade de *B. cinerea* pela aplicação de *C. rosea* e/ou Si

Efetuiu-se análise conjunta da severidade das duas execuções do experimento, em vista da homogeneidade das variâncias ($P = 0,5578$). Não ocorreu o mofo cinzento nas plantas-testemunha.

As médias da AACPD nas folhas não tratadas, nas tratadas com *C. rosea*, nas tratadas com Si e naquelas com a combinação de *C. rosea* e Si foram 558, 308, 375 e 585 respectivamente. Houve efeito significativo da interação Si x *C. rosea* ($P < 0,0001$). Quando não se aplicou Si, a AACPD foi menor ($P = 0,0004$) com aplicação que sem aplicação de *C. rosea*. Quando se aplicou Si, a AACPD foi menor ($P = 0,0010$) sem aplicação que com aplicação de *C. rosea*. Quando não se aplicou *C. rosea*, a AACPD foi menor ($P = 0,0046$) com aplicação que sem aplicação de Si. Quando se aplicou *C. rosea*, a AACPD foi menor ($P < 0,0001$) sem aplicação que com aplicação de Si.

Ajustou-se o modelo linear de regressão de severidade em função do tempo nas plantas-testemunha e nas tratadas com *C. rosea*, Si e combinação de *C. rosea* e Si em vista do alto valor de R^2 . As taxas de progresso do mofo cinzento foram 50% maiores nas plantas não tratadas (controle) e nas tratadas com combinação de *C. rosea* e Si que naquelas com aplicação isolada de Si ou de *C. rosea* (Figura 6).

Nas duas execuções do experimento, houve efeito significativo da aplicação de *C. rosea* no comprimento da parte aérea, no peso da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular. Com aplicação de *C. rosea*, o comprimento foi maior em cerca de 11 e 10%, o peso da matéria seca da parte aérea maior em cerca de 9 e 20% e o peso da matéria seca do sistema radicular em cerca de 66 e 69% que sem aplicação, na primeira e segunda execuções, respectivamente (Tabela 1).

Não houve efeito significativo da aplicação de Si no comprimento da parte aérea, massa seca da parte aérea e massa seca do sistema radicular.

Com relação a colonização endofítica de *C. rosea*, não se recuperou *C. rosea* das plantas não tratadas com o antagonista. O fungo colonizou todos os órgãos das plantas cujas sementes foram tratadas. Em geral, maior frequência de colonização ocorreu no terço inferior da planta, que corresponde ao sistema radicular, haste e folha basal. A frequência de colonização de *C. rosea* foi maior nas plantas inoculadas com *B. cinerea* que nas não inoculadas (Figura 7).

4.3 Concentração foliar de Si

Efetuuou-se análise conjunta da concentração foliar de Si das duas execuções do ensaio 1 em vista da homogeneidade das variâncias ($P = 0,0561$). As médias da concentração de Si nas folhas não tratadas e tratadas com Si foram $0,46 \text{ dag/kg}^1$ e $0,81 \text{ dag/kg}^1$ respectivamente, com efeito significativo da aplicação de Si ($P < 0,0001$) (Figura 8).

Efetuuou-se análise conjunta da concentração foliar de Si das duas execuções do ensaio 2 em vista da homogeneidade das variâncias ($P = 0,0501$). Houve efeito significativo da aplicação de Si ($P < 0,0001$). As médias da concentração de Si nas folhas não tratadas e tratadas com Si foram $0,41 \text{ dag/kg}^1$ e $0,76 \text{ dag/kg}^1$ respectivamente (Figura 8). Houve efeito significativo da aplicação de *C. rosea* ($P = 0,0475$). As médias da concentração de Si nas folhas não tratadas e tratadas com *C. rosea* foram $0,54 \text{ dag/kg}^1$ e $0,64 \text{ dag/kg}^1$ respectivamente (Figura 8). Houve efeito significativo da interação *C. rosea* x *B. cinerea* ($P = 0,0096$) (Figura 8). Quando não se aplicou *C. rosea*, a concentração de Si foliar foi menor com *B. cinerea* que sem o patógeno ($P = 0,0058$). Quando se aplicou *C. rosea*, a concentração de Si foliar com e sem *B. cinerea* não diferiram ($P = 0,7035$). Quando se inoculou *B. cinerea*, a concentração de Si foliar foi menor sem *C. rosea* que com ($P = 0,0191$). Quando não se inoculou *B. cinerea*, a concentração de Si foliar com e sem *C. rosea* não diferiram ($P = 0,7093$) (Figura 8).

5. DISCUSSÃO

Clonostachys rosea é agente de controle biológico de *B. cinerea* (Sutton *et al.*, 1997, 2002; Morandi *et al.*, 2000, 2001, 2003, 2008; Cota *et al.*, 2008, 2009; Nobre *et al.*, 2005), com diferentes modos de antagonismo, como micoparasitismo, competição por nutrientes e indução de resistência (Sutton *et al.*, 1997). Neste estudo, com a aplicação de *C. rosea* em sementes e substrato, pode-se aventar ter ocorrido a potencialização da resistência. Em geral, a aplicação de *Clonostachys rosea* nas sementes e no substrato reduziu a intensidade do mofo cinzento em plantas de pepino, com aumento do período de incubação e reduções da severidade final e do extravasamento de eletrólitos. No presente estudo, aparentemente *C. rosea* modulou enzimas relacionadas à defesa da planta: quando aplicado em sementes e substrato, reduziu-se a intensidade do mofo cinzento, quando estava separado espacialmente de *B. cinerea* nas folhas. Nessas, aumentou-se a atividade de enzimas associadas à defesa. Verificou-se a potencialização de proteínas relacionadas à patogênese (PRs) e defesa por *C. rosea* em plantas de trigo infectadas com *Fusarium culmorum* (Roberti *et al.*, 2008). Os autores trataram sementes com *C. rosea*; 7, 8, 9 e 10 dias após o tratamento, houve aumento de proteínas PR4 e da atividade de algumas isoformas de peroxidase e quitinase. A aplicação de um isolado de *Gliocladium roseum* (sin. *C. rosea*) em raízes de fumo aumentou a atividade de enzimas β -1,3-glucanases, quitinases e peroxidases em folhas inoculadas com *Erysiphe orontii* (Lahoz *et al.*, 2004). Assim, aparentemente, o isolado brasileiro de *C. rosea* potencializou a resistência de pepineiro a *B. cinerea*. Similarmente, detectou-se aumento da atividade de polifenoloxidase, peroxidase, β -1,3-glucanase e quitinase. Ademais quando aplicado isoladamente, *C. rosea* reduziu a severidade do mofo cinzento. Isto pode ser uma evidência de potencialização da resistência, pois o antagonista foi aplicado distante do local de inoculação de *B. cinerea*.

Provavelmente, micoparasitismo e competição também ocorreram, pois *C. rosea* foi recuperado, principalmente, das folhas em que se inoculou o patógeno. Esses dois últimos mecanismos são os mais comumente associados ao antagonismo de *C. rosea* à *B. cinerea* (Sutton *et al.*, 1997; Morandi *et al.*, 2000, 2001, 2003, 2006, 2008) e para desconsiderá-los, demandam-se estudos ultraestruturais.

No presente estudo, em vista das variações de β -1,3-glucanases, peroxidases, quitinases e polifenoloxidasas, sugere-se a hipótese de que a *C. rosea* modulou resistência a *B. cinerea*. Outros microrganismos também potencializaram a atividade de enzimas de defesa. *Rhizoctonia* spp. potencializaram peroxidases, β -1,3-glucanases, quitinases e resistência em feijoeiros, de formas local e sistêmica (Xue *et al.*, 1998). Em plantas de pepino tratadas com *Trichoderma harzianum* na rizosfera, a atividade de quitinases e peroxidases aumentou em folhas e raízes (Yedidia *et al.*, 1999). O tratamento de raízes de *Arabidopsis thaliana* com *T. harzianum* T39, também potencializou a resistência, com redução dos sintomas nas folhas causados pela inoculação de *B. cinerea* (Korolev *et al.*, 2008). Com aplicação de *T. harzianum* T39 nas raízes, plantas de alface, fumo, pimenta e tomate foram mais resistentes à *B. cinerea* indicando potencialização da resistência (De Meyer *et al.*, 1998). Portanto, em vista dos resultados obtidos no presente estudo *C. rosea* provavelmente potencializou as vias de defesa de plantas de pepino a *B. cinerea*.

Clonostachys rosea também aumentou o período de incubação de *Botrytis cinerea*. O período de incubação nas plantas-testemunha foi cerca de 90h, quando o patógeno pôde se estabelecer e causar infecção. Para haver controle do mofo cinzento, é necessário que a planta ative os mecanismos de defesa antes que se estabeleça a relação parasitária estável com o hospedeiro. As atividades de POX e GLU foram induzidas dentro deste período por *C. rosea*. A enzima POX está envolvida na proteção celular ao estresse oxidativo, o qual remove H₂O₂ e induz a formação de lignina em resposta a infecção por patógenos (Van Loon, 1997), sua atividade associa-se à resistência a doenças (Hammerschmidt *et al.*, 1981) e o seu aumento segue a dinâmica da infecção por patógenos (Schneider, 1994). Neste estudo, a aplicação de *C. rosea* aumentou significativamente a atividade da POX às 72 hai. Este aumento é importante nos estádios iniciais da infecção, para conter o avanço do patógeno. Kumar *et al.* (2009) verificaram altos níveis de POX em plantas de algodão expressando uma endoquitinase de *T. virens*, com aumento da resistência a *R. solani*. Portanto, quanto mais cedo se potencializa as defesas do hospedeiro, maior é o período de incubação o que retarda o aparecimento dos primeiros sintomas e por consequência reduz a taxa de progresso de algumas doenças. Aparentemente *C. rosea* modulou a atividade de POX, como visto, esta enzima protege contra estresses oxidativos e portanto, influencia na redução aos danos às membranas celulares. Esta

redução no dano às membranas pôde ser percebida pela redução do extravasamento de eletrólitos pela aplicação *C. rosea* em relação ao tratamento controle. Isto pode afetar indiretamente a severidade da doença o qual foi significativamente reduzida pela aplicação de *C. rosea*.

Em geral, a enzima PPO acumula-se em locais de ferimentos nas plantas (Chen *et al.*, 2000). Já se detectou o aumento das atividades de PPO e POX em folhas de pepino infectadas por patógenos e nas células ao redor da infecção (Avdiushko *et al.*, 1993). No presente estudo, não houve um pico proeminente de PPO em qualquer data de coleta, mas com a aplicação isolada de *C. rosea*, a atividade da enzima manteve-se significativamente mais alta após 192 hai, e portanto indicando que os fenóis foram oxidados para originarem quinonas as quais são mais tóxicas a microrganismos (Mayer, 2006).

A GLU, que faz parte da família PR-2, tem atividade antifúngica (Theis e Stahl, 2004), promove a hidrólise da parede celular de fungos e inibe o seu crescimento. Os oligômeros liberados em função da hidrólise agem como moléculas moduladoras de resistência (Sharma *et al.*, 2011). No presente estudo, houve efeito significativo da aplicação de *C. rosea* em quase todas as datas, e a aplicação aumentou a atividade de GLU. Houve dois picos de atividade, um menor às 72 hai e o outro maior às 120 hai. Em ambos, houve efeito da aplicação de *C. rosea*.

A enzima QUI catalisa a degradação de quitina da parede celular de fungos produzindo oligossacarídeos (Ferreira *et al.*, 2007) que podem modular a resistência. Neste estudo, houve aumento significativo da atividade de QUI com aplicação de *C. rosea* às 120 e 168 hai, quando ocorreram dois picos, principalmente às 168 hai. Tanto as enzimas GLU quanto as QUI são enzimas hidrolíticas que estão envolvidas diretamente na degradação da parede celular de fungos fitopatogênicos principalmente os hemibiotrófico e necrotróficos (Anguelova-Mehar *et al.*, 2001). Provavelmente estas enzimas foram moduladas significativamente por *C. rosea* por ser este um antagonista eficiente à *B. cinerea*.

Clonostachys rosea reduziu significativamente os danos às membranas celulares em plantas inoculadas com *B. cinerea* medidos em EE. *Botrytis cinerea* é um patógeno necrotrófico e secreta inúmeras toxinas no interior do seu hospedeiro afim de facilitar sua colonização (Kars e van Kan, 2007). Zhang *et al.* (1996) trataram plantas de abeto negro (*Picea mariana*) com *B. cinerea* e *G. roseum* para

verificar alterações fisiológicas. Os autores verificaram que quando essas plantas foram tratadas somente com *B. cinerea*, o EE foi superior a 50%. Já plantas tratadas tanto com *B. cinerea* e *C. rosea* o EE ficou em torno de 10% ao longo das datas de avaliações e este valor foi semelhante em plantas tratadas somente com o antagonista *G. roseum* (Zhang *et al.*, 1996). Esses dados corroboram com os aqui apresentados. Isto indica que *C. rosea* não ocasiona danos às membranas celulares e ainda mantém essas membranas íntegras com redução significativas dos danos causados por *B. cinerea*.

Algumas espécies de plantas acumulam o Si em diferentes proporções, em vista da disponibilidade do elemento no solo e da capacidade de absorção (Chérif *et al.*, 1994). Ainda não se elucidaram totalmente os mecanismos pelos quais o Si protege as plantas de fitopatógenos, mas sabe-se que a deposição de sílica amorfa no apoplasto foliar e parede celular previnem a penetração de fitopatógenos, pois reduz a suscetibilidade a enzimas que degradam a parede celular (Currie e Perry, 2007). Ademais, o ácido monossilícico é biologicamente ativo e induz o desenvolvimento mais rápido e extensivo das defesas naturais da planta (Fauteux *et al.*, 2005). A atividade desse ácido foi primeiro demonstrada em plantas de pepino tratadas com Si, nas quais houve aumento na atividade de QUI, POX, PPO e flavonóides (Fawe *et al.*, 1998). No geral, as espécies de plantas são classificadas como acumuladoras, intermediárias ou não acumuladoras de Si (Takahashi *et al.*, 1990). O pepineiro é considerado uma planta intermediária (Takahashi *et al.*, 1990). Isto foi confirmado neste estudo pois em ambos os ensaios houve maior acúmulo de Si nas plantas que receberam Si na forma de silicato de potássio que em plantas que não receberam. No presente trabalho, a aplicação de Si aumentou o período de incubação, provavelmente ou pelo efeito de barreira física em decorrência do acúmulo de Si ou potencialização das enzimas de defesa do pepineiro.

Respostas de defesa da planta podem depender do modo de patogênese, com ativação de defesas dependente de ácido salicílico (AS) a patógenos biotróficos e ativação das respostas dependente de etileno (ET) e ácido jasmônico (AJ) a necrotróficos (Mc Dowell e Dangl, 2000). Aparentemente, o AS atua na redução do tamanho das lesões causadas por *B. cinerea*, pois Ferrari *et al.* (2003) acreditam haver nesta via alguma síntese de fenilalanina-amônia-liase (FAL) que é responsável pela redução. Porém, quando Korolov *et al.* (2008) usaram mutantes de *A. thaliana*

insensíveis a AS, não houve aumento significativo na suscetibilidade das plantas tratadas com *T. harzianum* ao mofo cinzento, levando a crer que a via AS tem pouca importância na resistência a *B. cinerea* (Grovin e Levine, 2000). Portanto, provavelmente, a via de atuação do Si demande AS, cujo principal efeito é a morte celular programada para evitar o acesso do patógeno a água e nutrientes. Isto funciona bem com patógenos biotróficos e hemibiotróficos, para os quais as células do hospedeiro tem que estar vivas, pelo menos nos estádios iniciais da infecção. Contudo, patógenos necrotróficos matam as células. A infecção de *B. cinerea* induz sintomas semelhantes à morte celular programada, e qualquer sistema de resistência que induza essa morte será inefetivo, pelo contrário, facilitará a colonização do patógeno. Neste estudo, a aplicação de Si atrasou o período de incubação provavelmente pelo efeito de barreira física, pois o composto se acumula abaixo da cutícula formando uma camada dupla de cutícula-Si, que interfere com a penetração do patógeno (Cai *et al.*, 2009). No presente estudo, a aplicação de Si também potencializou a atividade das enzimas de defesa, similar ao observado por Chérif *et al.* (1994) que observaram aumento na atividade das enzimas PPO, POX e QUI em raízes de pepino infectadas com *Pythium* sp.

No ensaio 1, Si aumentou o período de incubação, porém não reduziu significativamente a severidade final nem o EE quando comparado ao tratamento controle. Provavelmente Si atrasou a colonização do patógeno, porém com o estabelecimento de *B. cinerea* os efeitos foram tão ou mais agressivos que os efeitos no tratamento controle. Silício não foi capaz de controlar o avanço do patógeno após o mesmo se estabelecer e também não foi capaz de reduzir os danos às membranas causados por ele. Resultados estes contrários ao encontrados por Zhu *et al.* (2004). Esses autores verificaram o efeito do Si no cultivo de plantas de pepino com cloreto de sódio para induzir estresses oxidativos e verificaram que nessas plantas o EE foi reduzido significativamente pela aplicação de Si. Neste caso, as plantas de pepino não foram inoculadas com qualquer patógeno, diferentemente do realizado neste trabalho, o que indica portanto que Si, provavelmente, não seja eficiente em reduzir danos membranares causados por *B. cinerea*.

Neste estudo, a aplicação conjunta de Si e *C. rosea* resultou em menor atividade das enzimas PPO e GLU que com a aplicação isolada de *C. rosea* ou de Si em determinadas datas. Assim, pode estar havendo efeito antagônico entre a

aplicação de *C. rosea* e Si, em determinados momentos após a inoculação de *B. cinerea*. Outra hipótese é que podem ter ocorrido alterações nas isoformas das enzimas impossíveis de serem detectadas pelo método (Resende *et al.*, 2000). Demandam-se estudos mais detalhados para entender as alterações na interação patógeno-hospedeiro-antagonista-Si. O que pode estar ocorrendo é que as enzimas têm diferentes isoformas, e provavelmente *C. rosea*, Si ou a própria planta esteja reprimindo o gene que expressa a isoforma de enzimas do outro. Determinadas enzimas, como as peroxidases, podem ter isoformas reprimidas pela planta para manter a enzima em nível abaixo do tóxico (Roberti *et al.*, 2008) ou mesmo para reduzir a alta demanda de energia que a ativação dessas enzimas necessita. Para os autores, *C. rosea* reprimiu duas isoformas de peroxidases.

Em geral, a atividade de todas as enzimas foi maior com a aplicação de Si que no tratamento controle, em determinadas datas, mas não reduziu significativamente a severidade final no ensaio 1 nem o EE em relação ao tratamento controle. Para patógenos biotróficos e hemibiotróficos, a aplicação de Si reduz a severidade das doenças (Cherif *et al.*, 1994; Samuels *et al.*, 1994; Fawe *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2004). *Botrytis cinerea* é patógeno necrotrófico e secreta várias enzimas e/ou metabólitos para invadir os tecidos dos hospedeiros, matar as células e induzir a liberação de carboidratos. Muitos desses compostos atuam extracelularmente na interface planta-fungo ou no tecido do hospedeiro distante do crescimento de hifas (Kars e van Kan, 2007). Na invasão de tecidos por *B. cinerea*, ocorre um processo de ativação de morte celular programada à distância da hifa (Govrin e Levine, 2000), o que implica que fatores difusíveis têm atividade direta ou indireta. *Botrytis cinerea* pode atrasar uma rápida resposta de defesa pela produção de 2-metil-succinato, o qual estimula a via de sinalização do ácido abscísico (Asselbergh *et al.*, 2007). A morte celular programada pode providenciar uma abertura a patógenos necrotróficos (Kliebenstein e Rowe, 2008) e isto pode ter ocorrido no presente estudo.

É conhecido que *C. rosea* pode se desenvolver endofítica ou epifiticamente em superfície de órgãos vegetais sadios (Sutton *et al.*, 1997; Nobre *et al.*, 2003). No presente estudo, recuperou-se *C. rosea* de órgãos, mesmo após 50 dias da aplicação. Portanto, considera-se que o antagonista colonizou endofiticamente o pepineiro. A recuperação de microrganismos após esterilização rigorosa é uma evidência indireta

da capacidade desses microrganismos serem endofíticos (Schulz e Boyle, 2005). Em observações histoquímicas, verificou-se a ocorrência de *C. rosea* em epiderme de folhas de pepino (Chatterton *et al.*, 2008) e raízes (Chatterton e Punja, 2009), o que reforça os resultados obtidos no presente estudo. Isolados de *C. rosea* que colonizam raízes ou folhas, também foram agentes de controle biológico de doenças de cereais transmitidas pelas sementes (Lubeck, 2002) e de *Botrytis cinerea* em folhas de morango e framboesa (Peng e Sutton, 1991; Sutton *et al.*, 1997). Seria vantagem interessante na prática para o biocontrole do mofo cinzento do pepineiro, se o fungo sobreviver e se seu efeito como antagonista persistir nas folhas a partir da aplicação em semente.

Foi interessante o fato de que a frequência de recuperação de *C. rosea* foi superior nas plantas inoculadas com *B. cinerea* que nas não inoculadas. A liberação de nutrientes dos sítios de infecção pode favorecer o crescimento de agentes de controle biológico. Níveis de *Trichoderma harzianum* foram superiores em raízes com maior densidade de *Pythium ultimum* (Green *et al.*, 2001). A colonização de folhas e pétalas de vários hospedeiros por *C. rosea* é principalmente rápida e intensiva quando os tecidos estão senescentes e mortos (Sutton *et al.*, 1997). Como *B. cinerea* induz a senescência e morte dos tecidos (Swartzberg *et al.*, 2008), a frequência de colonização de *C. rosea* nas plantas inoculadas com o patógeno foi superior que plantas não inoculadas neste estudo. Somente após 20 dias da inoculação com o patógeno é que os órgãos de pepineiros foram plaqueados em meio seletivo, intervalo que provavelmente foi fundamental para que *C. rosea* pudesse colonizar as plantas, principalmente em direção aos órgãos das plantas onde o patógeno havia se estabelecido, por liberação de nutrientes ou alguma outra sinalização.

O isolado de *C. rosea* testado também promoveu o crescimento de plantas de pepino, similar ao obtido por Sutton *et al.* (2008). Provavelmente, os efeitos benéficos de *C. rosea* no crescimento e produtividade sejam mediados pela sua influência nos hormônios, fatores de sinalização e aquisição de nutrientes na planta (Sutton *et al.*, 2008) e solubilização de nutrientes (Ravnskov *et al.*, 2006). *Clonostachys rosea* é conhecido por promover crescimento em diferentes espécies de plantas (Jensen *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 2005; Ravnskov *et al.*, 2006; Roberti *et al.*, 2008; Sutton *et al.*, 2008). No presente estudo, como a promoção de crescimento

foi significativamente superior em plantas de pepino tratadas com o antagonista que em plantas não tratadas, conclui-se que houve interação do fungo e o pepineiro. Deve-se conduzir o estudo por mais tempo, para se certificar de que *C. rosea* beneficiou o pepineiro, principalmente em termos de produtividade.

No presente estudo, a aplicação de Si não afetou o crescimento, o peso da matéria seca do sistema radicular e da parte aérea do pepineiro. Apesar de o Si não ser considerando elemento essencial para o crescimento, afeta o crescimento de plantas (Yu *et al.*, 2010). Considerando-se que o pepineiro pode absorver (Yu *et al.*, 2010) e acumular (Górecki e Danielski-Bush, 2009) quantidades grandes de Si, deve-se realizar avaliações por mais tempo para se verificar se a promoção de crescimento resulta em aumento de produtividade, como observado por Sutton *et al.* (2008).

No ensaio 2, a aplicação isolada de Si reduziu a severidade do mofo cinzento. Vários autores verificaram que essa aplicação de Si reduz a severidade de doenças do pepineiro (Mohaghegh *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2005) inclusive do mofo cinzento (Segarra *et al.*, 2007). A redução da severidade pode estar relacionada à potencialização da resistência, pois verificou-se que a aplicação de Si aumentou a atividade das enzimas relacionadas à defesa da planta. Neste estudo, a aplicação de Si reduziu a taxa de progresso da doença pelo efeito já conhecido de barreira física, pois o Si se acumula abaixo da cutícula formando uma camada dupla de cutícula-Si, que interfere com a penetração do patógeno (Cai *et al.*, 2009) ou potencialização das enzimas relacionadas à defesa da planta.

Apesar da aplicação separada de *C. rosea* e Si haver reduzido a severidade do mofo cinzento, o uso conjunto dos dois tratamentos reduziu a eficiência, pois o efeito da aplicação conjunta não diferiu do tratamento sem a aplicação de ambos. Com a aplicação de cinco concentrações de Si, reduziu-se significativamente o crescimento micelial e produção de conídios de *T. harzianum*, quando comparadas à não aplicação do elemento (Rachniyom e Jaenaksorn, 2008). Para os autores, *Pythium aphanidermatum* foi mais inibido por *T. harzianum* quando aplicado sozinho que combinado ao Si, mas não fizeram hipóteses para explicar estes resultados. Possivelmente, os efeitos de Si e de *C. rosea* sejam independentes, fato observado nos efeitos de Si e de agentes de biocontrole de *Sphaerotheca fuliginea*, agente do oídio do pepineiro (Dik *et al.*, 1998). Provavelmente o Si poderia estar mediando algum mecanismo de defesa na planta à *C. rosea*. Assim quando *B. cinerea* foi

inoculado, a planta poderia ter gasto energia precocemente ativando suas defesas e ficando suscetível ao mofo cinzento. É provável que os efeitos de *C. rosea* e de Si envolvam rotas complexas, moléculas de sinalização podem interagir sinérgica ou antagonicamente e combinação de tratamentos pode aumentar ou reduzir mecanismos de defesa, como comentado por Dinh *et al.* (2008). Demandam-se mais estudos para o entendimento dessa provável interação antagônica de Si e *C. rosea*, pois já se relataram resultados contrários aos aqui obtidos (Tian *et al.*, 2005; Kidane e Laing, 2008).

Com base nos resultados obtidos neste estudo, *C. rosea* reduziu a severidade do mofo cinzento, potencializou as enzimas relacionadas à defesa em pepineiro e promoveu o crescimento de plantas de pepino. Evidenciou-se, também, que o isolado aqui usado colonizou endofiticamente as plantas de pepino. Observando-se esses efeitos, conclui-se que a incorporação do antagonista em um sistema de manejo integrado trará efeitos positivos em reduzir a intensidade da doença, consequentemente reduzindo o uso de fungicidas. Este estudo relata, pela primeira vez, que um isolado de *C. rosea* brasileiro, tem potencial em mediar a resistência e aumentar as atividades de enzimas relacionadas à defesa de pepineiro a *B. cinerea*. Apesar do efeito comprovado de Si em proteger plantas, neste estudo a aplicação do composto gerou resultados contrários entre os dois ensaios quanto a severidade do mofo cinzento, mas potencializou as enzimas de defesa. Plantas tratadas com Si foram colonizadas por *C. rosea*, com frequência similar à em plantas não tratadas. Em geral, a aplicação simultânea de Si e *C. rosea* aumentou significativamente as enzimas de defesa, mas não reduziu a severidade do mofo cinzento. Em resumo, o isolado de *C. rosea* tem potencial como agente de biocontrole e em melhorar o vigor de plantas de pepino, para ser adotado no manejo integrado do mofo cinzento.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que:

- O isolado NCR61/F de *C. rosea* tem potencial em induzir a atividade de enzimas relacionadas à defesa do pepineiro à *B. cinerea*;
- O antagonista foi eficiente em reduzir a severidade do mofo cinzento, reduzir a perda de eletrólitos, aumentar o período de incubação da doença e promover o crescimento de plantas de pepino;
- O antagonista colonizou endofiticamente plantas de pepino;
- A aplicação de Si mediou a atividade de enzimas relacionadas à defesa;
- Com a aplicação de Si, obtiveram-se resultados divergentes quanto à redução do mofo cinzento; e
- O Si não foi eficiente em promover o crescimento de plantas de pepino.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, D., 2006. Manual de Culturas Hortícolas. Vol. 2. Lisboa: Presença, 326 p.
- Anguelova-Mehar, V.S., Van Der Mesthuizen, A.J., Pretorius, Z.A., 2001. β -1,3-glucanase and chitinase activities and the resistance response of wheat to leaf rust. *Journal Phytopathology*. 149, 381-384.
- Araújo, A.E., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., Capdeville, G., Grossi, J.A.S., 2005. Sobrevivência de *Botrytis cinerea* como micélio em restos de culturas de rosas e como escleródios no solo. *Fitopatologia Brasileira*. 30, 516-521.
- Asselbergh, B., Curvers, K., Franca, S.C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Van Breusegem, F., Hofte, M. 2007. Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology*. 144, 1863-1877.
- Avdiushko, S.A., Ye, X.S., Kuc, J., 1993. Detection of several enzymatic activities in leaf prints of cucumber plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 42, 441-454.
- Baptista, F.J., Bailey, B.J., Meneses, J.F., 2012. Effect of nocturnal ventilation on the occurrence of *Botrytis cinerea* in Mediterranean unheated tomato greenhouses. *Crop Protection*. 32, 144-149.
- Bardas, G.A., Veloukas, T., Koutitab, O., Karaoglanidis, G.S., 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. *Pest Management Science*. 66, 967-973.
- Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C., Fallik, E., 2003. Controlling gray mold caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*. 22, 285-290.
- Bilu, A., Dag, A., Elad, Y., Shafir, F., 2004. Honey bee dispersal of biocontrol agents: an evaluation of dispersing devices. *Biocontrol Science and Technology*. 14, 607-617.
- Borel, F.C., Saraiva, R.M., Macedo, P.E.F., Mansur, H.M., Cota, L.V., Alfenas, A.C., Mizubuti, E.S.G., Maffia, L.A., 2010. Inibição de *Botrytis cinerea* em eucalipto por *Clonostachys rosea* em diferentes concentrações XLIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Cuiabá. *Tropical Plant Pathology*. 35, S69-S69.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.

Brandão Filho, J.U.T., Callegari, O., 1999 Cultivo de hortaliças de frutos em solo em ambiente protegido. Informe Agropecuário. 20, 64-68.

Cai, K., Gao, D., Chen, J., Luo, S., 2009. Probing the mechanisms of silicon-mediated pathogen resistance. *Plant Signaling & Behavior*. 4, 1-3.

Caldas, R.R., 2008. Característica de recipiente e densidade de planta de pepino, cultivada em substrato de fibra de coco com fertirrigação. Faculdade de Engenharia – Unesp, Campus de Ilha Solteira-SP, p.53. Dissertação (Mestre em Agronomia).

Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., Zhou, S., 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiology Letters*. 247, 147–152.

Cardoso, A.I.I., Silva, N.D., 2003. Avaliação de híbridos de pepino tipo japonês sob ambiente protegido em duas épocas de cultivo. *Horticultura Brasileira*. 21, 170-175.

Chance, B., Maehley, A.C., 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*. 2, 764-75.

Chatterton, S., Punja, Z.K., 2009. Chitinase and beta-1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*. 55, 356-367.

Chatterton, S., Jayaraman, J., Punja, Z., 2008. Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* fsp. *catenulata*. *Biological Control*. 46, 267-278.

Chen, C., Bélanger, R., Benhamou, N., Paulitz, T., 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 56, 13-23.

Chérif, M., Asselin, A., Bélanger, R., 1994. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology*. 84, 236-242.

Coombs, J.T., Michelsen, P.P., Franco, C.M.M., 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological Control*. 29, 359-366.

Cota, L.V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Macedo, P.E.F., 2009. Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. *Biological Control*. 50, 222-230.

Cota, L.V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Macedo, P.E.F., Antunes, R.F., 2008. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control*. 46, 515-522.

Currie, H.A., Perry, C.C., 2007. Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies. *Annals of Botany*. 100, 1383-1389.

Dallagnol, L.J., Rodrigues, F.A., Tanaka, F.A.O., Amorim, L., Camargo, L.E.A., 2012. Effect of potassium silicate on epidemic components of powdery mildew on melon. *Plant Pathology*. 61, 323-330.

Dallagnol, L.J., 2010. Epidemiologia e bioquímica do controle do oídio do meloeiro por silício. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba-SP, p.66. Tese (Doutorado).

De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y., Höfte, M., 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of plant Pathology*. 104, 279–286,

Dik, A.J., Wubben, J.P., 2007. Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, B., Delen, N. (Eds.) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht. Kluwer academic publishers. pp. 319-334.

Dik, A.J., Elad, Y., 1999. Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climatic conditions. *European Journal of Plant Pathology*. 105, 123-137.

Dik, A.J., Verhaar, M.A., Bélanger, R.R., 1998. Comparison of three biological control agents against cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in semi-commercial-scale glasshouse trials. *European Journal of Plant Pathology*. 104, 413-423.

Dinh, S.Q., Joyce, D.C., Irving, D.E., Wearing, A.H., 2008. Effects of multiple applications of chemical elicitors on *Botrytis cinerea* infecting Geraldton waxflower. *Australasian Plant Pathology*. 37, 87-94.

Elad, Y., Malathrakis, N.E., Dik, A.J., 1995. Biological control of *Botrytis* incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. *Crop Protection*. 15, 224–240.

Elad, Y., Shtienberg, D., 1995. *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integrated Pest Management Reviews*. 1,15–29.

Elmer, P.A.G., Reglinski, T., 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*. 55, 155-177.

El-Tarabily, K.A., 2003. An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupine caused by *Plectosporium tabacinum*. *Australian Journal of Botany*. 51, 257–266.

El-Tarabily, K.A., Nassar, A.H., Hardy, G.E.S.J., Sivasithamparam, K., 2009. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*. 106, 13-26.

Fauteux, F., Rémus-Borel, W., Menzies, J.G., Bélanger, R.R., 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 249, 1-6.

Fawe, A., Abou-Zaid, M., Menzies, J.G., Bélanger, R.R., 1998. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology*. 88, 396-401.

Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M., 2003. Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *The Plant Journal*. 35, 193–205.

Ferreira, R., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C., Chen, Z., Batista, L., Duarte, J., Borges, A., Teixeira, A., 2007. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*. 8, 677-700.

Filgueira, F.A.R., 2008. *Novo Manual de Olericultura*. Terceira edição. Viçosa, MG: Editora UFV. 421p.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. *Agriannual 2011: anuário da agricultura brasileira*. São Paulo: Argos comunicação. 400-402.

Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., Nitzani, Y., Kirshner, B., Rav-David, D., Bilu, A., Dag, A., Shafir, S., Elad, Y., 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology*. 110, 361–370.

Gali, H.V., Smith, C.C., 1992. Effect of silicon on growth, fertility, and mineral composition of an annual brome, *Bromus secalinus* L. (Gramineae). *American Journal of Botany*. 79, 1259–1263.

Garrido, L.R., Sônego, O.R., 2005. Podridão cinzenta da uva: epidemiologia, sintomatologia e controle. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir059.pdf>>. Acesso em: 06/02/2012.

Górecki, R.S., Danielski-Busch, W., 2009. Effect of silicate fertilizers on yielding of greenhouse cucumber (*Cucumis sativus* L.) in container cultivation. *Journal of Elementology*. 14, 71-78.

Govrin, E.M., Levine, A., 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*. 10,751–57.

Green, H., Heiberg, N., Lejbølle, K., Jensen, D.F., 2001. The use of a GUS transformant of *Trichoderma harzianum*, strain T3a, to study metabolic activity in the spermosphere and rhizosphere related to biocontrol of *Pythium* damping-off and root rot. *European Journal of Plant Pathology*. 107, 349-359.

Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M., Kuc, J., 1981. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology*. 20, 73-82.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature reviews. Microbiology. 2, 43-56.

Harman, G.E., 2000. Myths and dogmas of biocontrol - Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease. 84, 377-393.

Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway, R.M., Pietro, A.D., Peterbauer, C., Tronsmo, A., 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology. 83, 313-18.

Hausbeck, M.K., Moorman, G.W., 1996. Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flower crops. Plant Disease. 80, 1212-1219.

Hossain, M.T., Mori, R., Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Fujii, S., Yamamoto, R., Hoson, T., 2002. Growth promotion and an increase in cell wall extensibility by silicon in rice and some other Poaceae seedlings. Journal of Plant Research. 115, 23-27.

Jensen, B., Knudsen, I.M.B., Jensen, D.F., 2000. Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. European Journal of Plant Pathology. 106, 233-242.

Johansen, A., Knudsen, I.M.B., Binnerup, S.J., Winding, A., Johansen, J.E., Jensen, L.E., Andersen, K.S., Svenning, M.M., Bonde, T.A., 2005. Non-target effects of the microbial control agents *Pseudomonas fluorescens* DR54 and *Clonostachys rosea* IK726 in soils cropped with barley followed by sugar beet: a greenhouse assessment. Soil Biology e Biochemistry. 37, 2225-2239.

Kar, M., Mishra, D., 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology. 57, 315-319.

Kars, I., van Kan, J.A.L., 2007. Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis*. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, B., Delen, N. (Eds.) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht. Kluwer academic publishers. pp. 99-118.

Kidane, E., Laing, M., 2008. Integrated control of *Fusarium* wilt of banana (*Musa* spp.). International conference on banana and plantain in Africa: Harnessing international Partnerships to Increase Research Impact., pp. 315-321.

Kim, H.J., Lee, S.H., Kim, C.S., Lim, E.K., Choi, K.H., Kong, H.G., Kim, D.W., Lee, S.W., Moon, B.J., 2007. Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation. Journal of Microbiology and Biotechnology. 17, 438-444.

Kliebenstein, D.J., E Rowe, H.C., 2008. Ecological costs of biotrophic versus necrotrophic pathogen resistance, the hypersensitive response and signal transduction. *Plant Science*. 174, 551-556.

Köhl, J., Gerlagh, M., De Haas, B.H., Krijger, M.C., 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. *Phytopathology*. 88, 568-575.

Korndörfer, G.H., Oliveira, L.A., 2010. Uso do silício em culturas comerciais. Anais do V simpósio brasileiro sobre silício na agricultura. Viçosa-MG 3-25.

Korndörfer, G.H., 2007. Uso do silício na agricultura. Informações agronômicas, Piracicaba. International Plant Nutrition Institute. p 9-11.

Korndörfer, G.H., Pereira, H.S., Nolla, A., 2004. Análise de silício: solo, planta e fertilizante. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia. 2 ed. 34p. (boletim técnico).

Korolov, N., Rav David, D., Elad, Y., 2008. The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Biological Control*. 53, 667–683.

Krauss, U., Soberanis, W., 2001. Biocontrol of cocoa pod disease with mycoparasite mixtures. *Biological Control*. 22, 149–158.

Krechel, A., Faupel, A., Hallmann, J., Ulrich, A., Berg, G., 2002. Potato associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Canadian Journal of Microbiology*. 48, 772–786.

Kumar, V., Parkhi, V., Kenerley, C.M., Rathore, K.S., 2009. Defense-related gene expression and enzyme activities in transgenic cotton plants expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens* in response to interaction with *Rhizoctonia solani*. *Planta*. 230, 277–291.

Lahoz, E., Contillo, R., Porrone, F., 2004. Induction of systemic resistance to *Erysiphe orontii* Cast in tobacco by application on roots of an isolate of *Gliocladium roseum* Bainier. *Journal of Phytopathology*. 152, 465-470.

Lalla, J.G., Laura, V.A., Seabra Júnior, S., Cardoso, A.I.I., 2010. Capacidade combinatória e heterose de linhagens de pepino do grupo japonês para caracteres de produção. *Horticultura Brasileira*. 28, 337-343.

Lanna, A.C., Oliveira, M.G.A., Barros, E.G., Moreira, M.A., 1996. Kinetic parameters of leaf lipoxygenases pool from normal soybean genotypes and from a line devoid of seed lipoxygenases. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 8, 87-92.

- Lee, S.K., Sohn, E.Y., Hamayun, M., Yoon, J.Y., Lee, I.J., 2010. Effect of silicon on growth and salinity stress of soybean plant grown under hydroponic system. *Agroforest Systems*. 80, 333-340.
- Legard, D.E., Xiao, C.L., Mertely, J.C., Chandler, C.K., 2000. Effects of plant spacing and cultivar on incidence of *Botrytis* fruit rot in annual strawberry. *Plant Disease*. 84, 531-538.
- Legard, D.E., Xiao, C.L., Mertely, J.C., Chandler, C.K., 2001. Management of *Botrytis* fruit rot in annual winter strawberry using captan, thiram and iprodione. *Plant Disease*. 85, 31-39.
- Leroux, P., 2007. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Elad, Y., Williamson, P., Tudzynsky, P., Delen, N., (Eds.) *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht. Kluwer academic publishers. pp. 195-222.
- Lever, M., 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry*. 47, 273-279.
- Lewin, J., Reimann, B.E.F., 1969. Silicon and plant growth. *Annual Review of Plant Physiology*. 20, 289-304.
- Li, G.Q., Huang, H.C., Acharya, S.N., Erickson, R.S., 2004a. Biological control of blossom blight of alfafa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. *Plant Disease*. 88, 1246-1251.
- Li, Q.F., Ma, C.C., Li, H.P., Xiao, Y.L., Liu, X.Y., 2004b. Effects of soil available silicon on growth, development and physiological functions of soybean. *Chinese Journal of Application Ecology*. 15, 73-76.
- Liang, Y.C., Sun, W.C., Si, J., Romheld, V., 2005. Effects of foliar- and root-applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. *Plant Pathology*. 54, 678-685.
- Lima, A.L.S., DaMatta, F.M., Pinheiro, H.A., Totola, M.R., Loureiro, M.E., 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*. 47, 239-247.
- Liu, W., Sutton, J.C., 2002. Effectiveness of microbial agents to protect against *Pythium* root rot in hydroponic cucumber. *Biological and Cultural Tests for Control of Plant Diseases*. 18, 1-2.
- Lubeck, M., 2002. GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. *Mycological Research*. 106, 815-826.
- Macedo, P.E.F., Mansur, H.M., Cota, L.V., Silva, J.C., Maffia, L.A., 2008. Antagonismo de *Clonostachys rosea* a *Botrytis cinerea* em tomateiro e morangueiro,

em diferentes temperaturas e concentrações de esporos. XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte. Tropical Plant Pathology. 33, S140-S140.

Mali, M., Aery, N.C., 2009. Effect of silicon on growth, biochemical constituents, and mineral nutrition of cowpea. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 40, 1041-1052.

Marschner, H., Oberle, H., Cakmak, I., Römheld, V., 1990. Growth enhancement by silicon in cucumber (*Cucumis sativus*) plants depends on imbalance in phosphorus and zinc supply. Plant and Soil. 124, 211-219.

Mayer, A.M., 2006. Polyphenoloxidases in plants e fungi: Going places? A review. Phytochemistry. 67, 2318-2331.

McDowell, J.M., Dangl, J.L., 2000. Signal transduction in the plant immune response. Trends in Biochemical Sciences. 25, 79-82.

Mertely, J.C., Chandler, C.K., Xiao, C.L., Legard, D.E., 2000. Comparison of sanitation and fungicides for management of *Botrytis* fruit rot of strawberry. Plant Disease. 84, 1197-1202.

Miller, G.L., 1956. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytica Chemistry. 31, 426-428.

Mohaghegh, P., Khoshgoftarmanesh, A.H., Shirvani, M., Sharifnabi, B., 2011. Effect of silicon nutrition on oxidative stress induced by *Phytophthora melonis* infection in cucumber. Plant Disease. 95, 455-460.

Morandi, M.A.B., Mattos, L.P.V., Santos, E.R., Bonugli, R.C., 2008. Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. Crop Protection. 27, 77-83.

Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., Barbosa, J.G., Cruz, C.D., 2006. Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. Biocontrol Science and Technology. 16, 619-630.

Morandi, M.A.B.; Maffia, L.A., 2005. Manejo Integrado do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*. EMBRAPA, Jaguariúna. 35p.

Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., Barbosa, J.G., 2003. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. Biological Control. 26, 311-317.

Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Sutton, J.C., 2001. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. Phytoparasitica. 29, 103-113.

Morandi, M.A.B., Sutton, J.C., Maffia, L.A., 2000. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology*. 106, 439-448.

Moyer, C., Peres, N.A., Datnoff, L.E., Simonne, E.H., Deng, Z., 2008. Evaluation of silicon for managing powdery mildew on gerbera daisy. *Journal of Plant Nutrition*. 31, 2131-2144.

Myresiotis, C.K., Karaoglanidis, G.S., Tzavella-Klonari, K., 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxylanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*. 91, 407-413.

Nassar, A. H., El-Tarabily, K. A., Sivasithamparam, K., 2005. Promotion of plant growth by auxin-producing yeast isolate of *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils*. 42, 97-108.

Nobre, S.A.M., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Cota, L.V., Dias, A.P.S., 2005. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control*. 34, 132-143.

Nobre, S.A.M., 2003. Especialização fisiológica de *Botrytis cinerea* e biocontrole do patógeno com *Clonostachys rosea* obtido em condições brasileiras. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, p. 75. Tese (Doutorado em Fitopatologia).

Olson, H., Benson, D., 2007. Induced systemic resistance and the role of binucleate *Rhizoctonia* and *Trichoderma hamatum* 382 in biocontrol of *Botrytis* blight in geranium. *Biological Control*. 42, 233-241.

Park, Y.H., Stack, J.P., Kenerley, C.M., 1992. Selective isolation and enumeration of *Gliocladium virens* and *G. roseum* from soil. *Plant Disease*. 76, 230-235.

Peixoto, P.H.P., 1998. Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) com tolerância diferencial ao alumínio. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, p.109. Tese (Doutorado).

Peng, G., Sutton, J.C., 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 13, 247-257.

Rachniyom, H., Jaenaksorn, T., 2008. Effect of soluble silicon and *Trichoderma harzianum* on the in vitro growth of *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Agricultural Technology*. 4, 57-71.

Ravnskov, S., Jensen, B., Knudsen, I.M.B., Bødker, L., Funck Jensen, D., Karliński, L., Larsen, J., 2006. Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*. 38, 3453-3462.

Rémus-Borel, W., Menzies, J.G., Bélanger, R.R., 2005. Silicon induces antifungal compounds in powdery mildew-infected wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 66, 108-115.

Resende, M.L.V., Nojosa, G.B.A., Aguilar, M.A.G., Silva, L.H.C.P., Niella, G.R., Carvalho, G.A., Giovanini, G.R., Castro, R.M., 2000. Perspectivas da indução de resistência em cacaueteiro contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotiadiazole (BTH). *Fitopatologia Brasileira*. 25, 149-156.

Resende, R.S., Rodrigues, F.A., Soares, J.M., Casela, C.R., 2009. Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. *European Journal of Plant Pathology*. 124, 533-541.

Reynolds, O.L., Keeping, M.G., Meyer, J.H., 2009. Silicon-augmented resistance of plants to herbivorous insects: a review. *Annals of Applied Biology*. 155, 171-186.

Roberti, R., Veronesi, A., Cesari, A., Cascone, A., Diberardino, I., Bertini, L., Caruso, C., 2008. Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science*. 175, 339-347.

Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P., 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology*. 134, 169-176.

Rodrigues, F.A., Duarte, H.S.S., Domiciano, G.P., Souza, C.A., Korndörfer, G.H., Zambolim, L., 2009. Foliar application of potassium silicate reduces the intensity of soybean rust. *Australasian Plant Pathology*. 38, 366-372.

Rodrigues, F.A., McNally, D.J., Datnoff, L.E., Jones, J.B., Labbé, C., Benhamou, N., Menzies, J.G., Bélanger, R.R., 2004. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology*. 94, 177-183.

Rodrigues, F.A., Benhamou, N., Datnoff, L.E., Jones, J.B., Bélanger, R.R., 2003. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology*. 93, 535-46.

Rodrigues, F.A., Datnoff, L.E., Korndörfer, G.H., Seebold, K.W., Rush, M.C., 2001. Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. *Plant Disease*. 85, 827-832.

Sadfi-Zouaoui, N., Essghaier, B., Hannachi, I., Hajlaoui, M.R., Boudabous, A., 2008. First report on the use of moderately halophilic bacteria against stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. *Annals of Microbiology*. 57, 337-339.

Samuels, A., Glass, A., Menzies, J., Ehret, D., 1994. Silicon in cell walls and papillae of *Cucumis sativus* during infection by *Sphaerotheca fuliginea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 44, 237-242.

- Schneider, S., 1994. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 45, 291-304.
- Schuerger, A.C., Hammer, W., 2003. Suppression of powdery mildew on greenhouse-grown cucumber by addition of silicon to hydroponic nutrient solution is inhibited at high temperature. *Plant Disease*. 87, 177-185.
- Schulz, B., Boyle, C., 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*. 109, 661-686.
- Segarra, G., Casanova, E., Borrero, C., Avilés, M., Trillas, I., 2007. The suppressive effects of composts used as growth media against *Botrytis cinerea* in cucumber plants. *European Journal of Plant Pathology*. 117, 393-402.
- Shaner, G., Finney, R.E., 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology*. 67, 1051-1056.
- Sharma, N., Sharma, K.P., Gaur, R.K., Gupta, V.K., 2011. Role of chitinase in plant defense. *Asian Journal Biochemistry*. 6, 29-37.
- Shaul, O., Elad, Y., Kirsher, B., Volpin, H., Zielsin, N., 1992. Control of *Botrytis cinerea* in cut rose flowers by gibberellic acid, ethylene inhibitors and calcium. *International Botrytis symposium: Advances in Botrytis research*. Crete (Greece). p 5-10.
- Shoresh, M., Harman, G.E., Mastouri, F., 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*. 48, 1-23.
- Shoresh, M., Harman, G.E., 2008. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant Physiology*. 147, 2147-2163.
- Silvera-Pérez, A.E., Valdebenito-Sanhueza, R.M., Duarte, V., Santos, H.P., Felippeto, J., 2010. Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. *Tropical Plant Pathology*. 35, 163-169.
- Sun, H., Wang, H., Chen, Y., Li, H., Chen, C., Zhou, M., 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in China. *Plant Disease*. 94, 551-556.
- Sutton, J., Liu, W., Ma, J., Brown, W., Stewart, J., Walker, G., 2008. Evaluation of the fungal endophyte *Clonostachys rosea* as an inoculant to enhance growth, fitness and productivity of crop plants. *Acta Horticulturae*. 279-286.
- Sutton, J.C., Liu, W., Huang, R., Owen-Going, N., 2002. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in defoliated

stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology*. 12, 413-426.

Sutton, J.C., Li, D.-W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P., Valdebenito-Sanhueza, R.M., 1997. *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease*. 81, 316-328.

Sutton, J.C., James, T.D.W., Dale, A., 1988. Harvesting and bedding practices in relation to grey mould of strawberry. *Annals of Applied Biology*. 113, 167–175.

Swartzberg, D., Kirshner, B., Rav-David, D., Elad, Y., Granot, D., 2008. *Botrytis cinerea* induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the *IPT* gene. *European Journal of Plant Pathology*. 120, 289-297.

Takahashi, E., Ma, J.F., Miyake, Y., 1990. The possibility of silicon as an essential for higher plants. *Comments Agricultural Food Chemical*. 2, 99-122.

Theis, T., Stahl, U., 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61, 437-455.

Tian, S., Qin, G., Xu, Y., 2005. Synergistic effects of combining biocontrol agents with silicon against postharvest diseases of jujube fruit. *Journal of Food Protection*. 68, 544-550.

Valdebenito-Sanhueza, R.M., Sutton, J.C., Perazzolo, I., Czermainski, A.B.C., 1997. Controle biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. *Fitopatologia Brasileira*. 22, 69-73.

Vale, F.X.R., Fernandes Filho, E.I., Liberato, J.R., 2003. QUANT. A software plant disease severity assessment. 8th International congress of plant pathology, Christchurch New Zealand. p.105.

Van Loon, L.C., 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*. 103, 753-765.

Vega, F., Posada, F., Catherineaime, M., Pavaripoll, M., Infante, F., Rehner, S., 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*. 46, 72-82.

Veloukas, T., Leroch, M., Hahn, M., Karaoglanidis, G.S., 2011. Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease*. 95, 1302-1307.

Wang, S., Hu, T., Jiao, Y., Wei, J., Cao, K., 2009. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* EB-28, an endophytic bacterium strain displaying biocontrol activity against *Botrytis cinerea* Pers. *Frontiers of Agriculture in China*. 3, 247-252.

Wicklow, D.T., Roth, S., Deyrup, S.T., Gloer, J.B., 2005. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*. 109, 610-618.

- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J.A., 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*. 8, 561-580.
- Wilson, D., 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*. 73, 274-276.
- Xiao, C.L., Chandler, C.K., Price, J.F., Duval, J.R., Mertely, J.C., Legard, D.E., 2001. Comparison of epidemics of *Botrytis* fruit rot and powdery mildew of strawberry in large plastic tunnel and field production systems. *Plant Disease*. 85, 901-909.
- Xue, L., Charest, P., Jabaji-Hare, S., 1998. Systemic induction of peroxidases, 1,3 beta glucanases, chitinases and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. *Biological Control*. 88, 359-365.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I., 1999. Induction of defense responses in cucumber plant (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 1061-1070.
- Yu, Y., Schojoerring, J.K., Du, X., 2010. Effects of silicon on the activities of defense-related enzymes in cucumber inoculated with *Pseudoperonospora cubensis*. *Journal of Plant Nutrition*. 34, 243-257.
- Zhang, C., Hu, J., Wei, F., Zhu, G., 2009. Evolution of resistance to different classes of fungicides in *Botrytis cinerea* from greenhouse vegetables in eastern China. *Phytoparasitica*. 37, 351-359.
- Zhang, P.G., Sutton, J.C., Tan, W., Hopkin, A.A., 1996. *Gliocladium roseum* reduces physiological changes associated with infection of black spruce seedlings by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 18, 7-13.
- Zhao, H., Kim, Y.K., Huang, I., Xiao, C.I., 2010. Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. *Postharvest Biology and Technology*. 56, 12-18.
- Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., Yu, J., 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science*. 167, 527-533.



Figura 1. Armações de ferro e plástico transparente para proteção das plantas de pepino durante a condução dos experimentos.

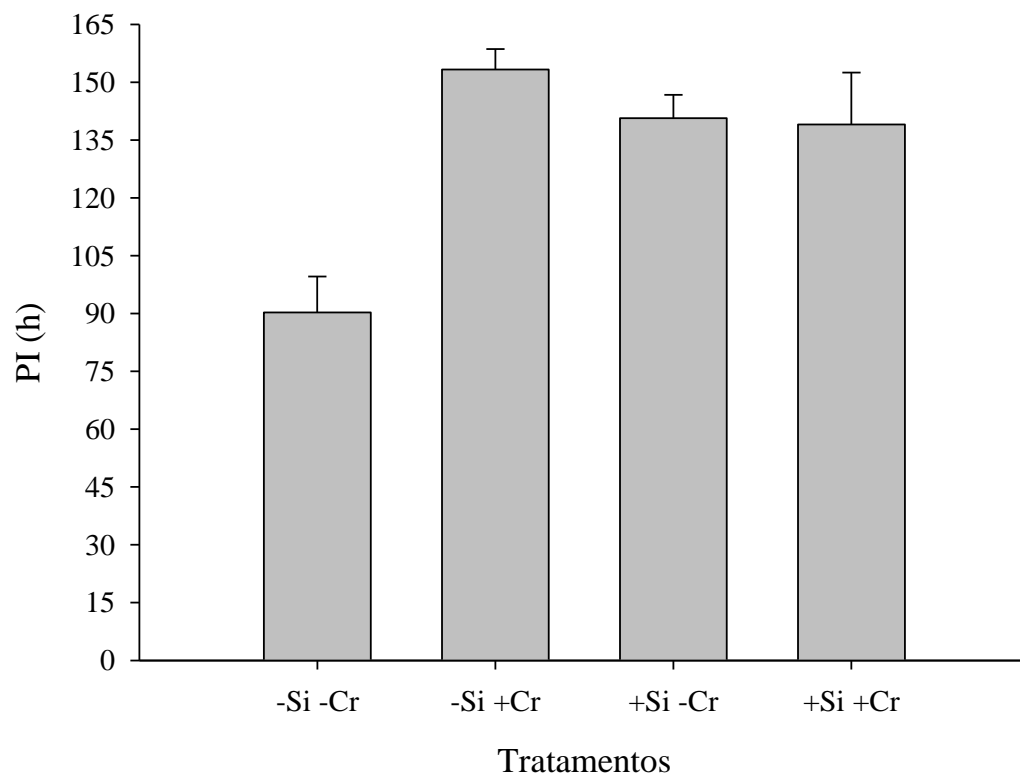


Figura 2. Período de incubação (PI) de *B. cinerea* em folhas de pepino supridas com 0 (-Si) ou 2 mmol de silício/L¹ (+Si) e tratadas (+Cr) ou não (-Cr) com 10⁷ conídios de *Clonostachys rosea*/mL¹. Os dados representam a média de seis repetições. Barras representam o erro padrão da média.

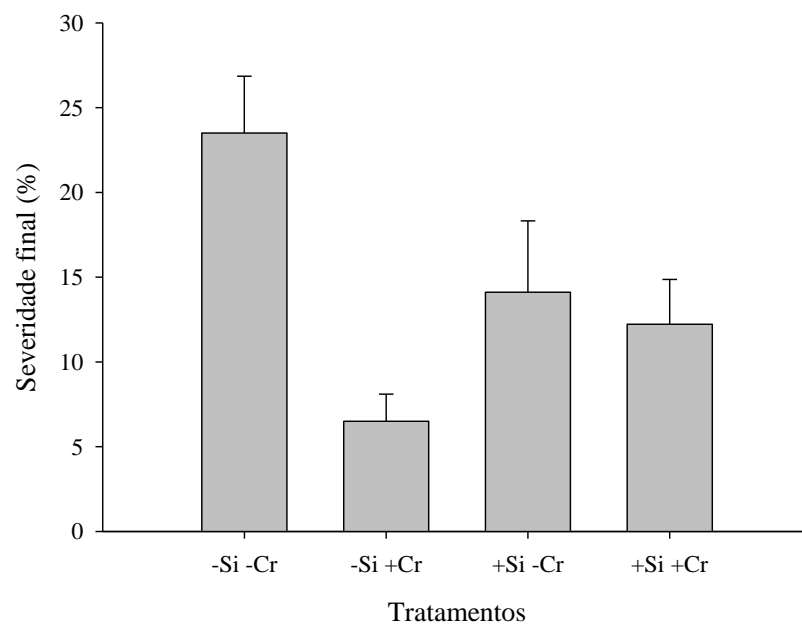


Figura 3. Severidade final do mofo cinzento em folhas de pepino tratadas com 2 mmol de silício/L¹ (+Si) ou não (-Si) e/ou com 10⁷ conídios de *Clonostachys rosea*/mL¹ (+Cr) ou não (-Cr). Os dados representam a média de seis repetições. Barras representam o erro padrão da média.

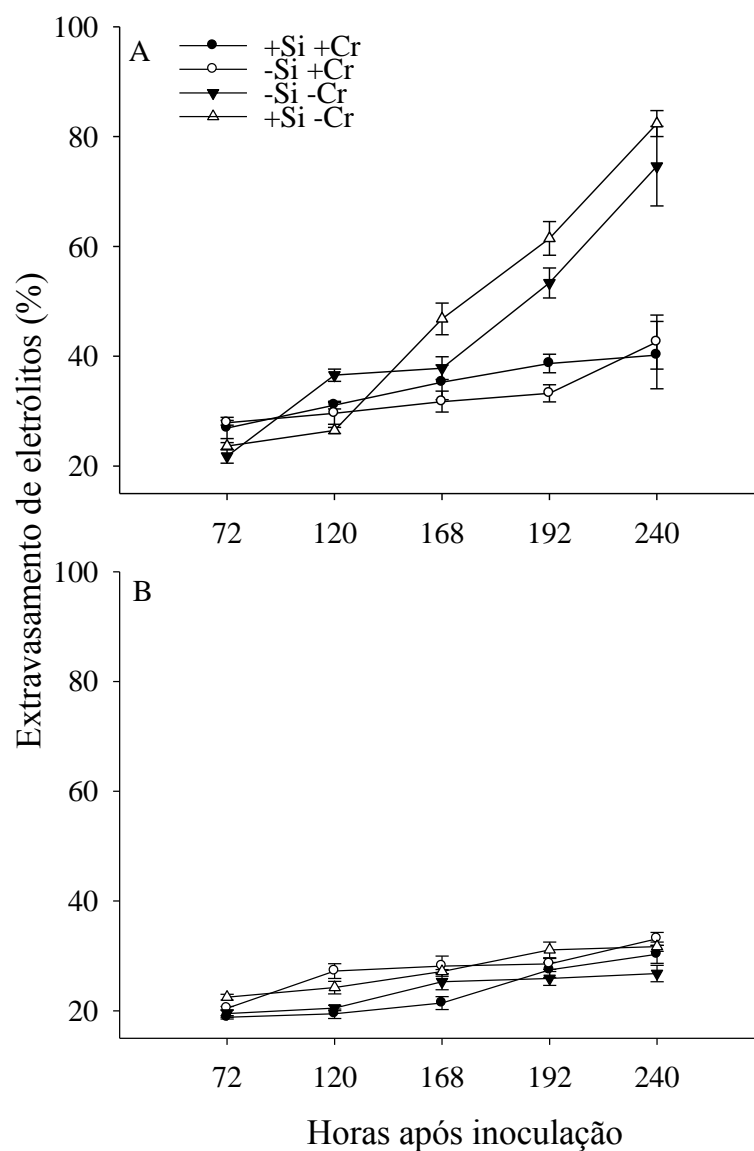


Figura 4. Extravasamento de eletrólitos (EE) em folhas de pepino tratadas com 2 mmol de silício/L¹ (+Si) ou não (-Si) e/ou com 10⁷ conídios de *Clonostachys rosea*/mL¹ (+Cr) ou não (-Cr) e/ou inoculadas com 10⁶ conídios de *Botrytis cinerea*/mL¹ (A) ou não (B), em diferentes intervalos após a inoculação de *B. cinerea*. Os dados representam a média de três repetições em cada intervalo. Barras representam o erro padrão da média.

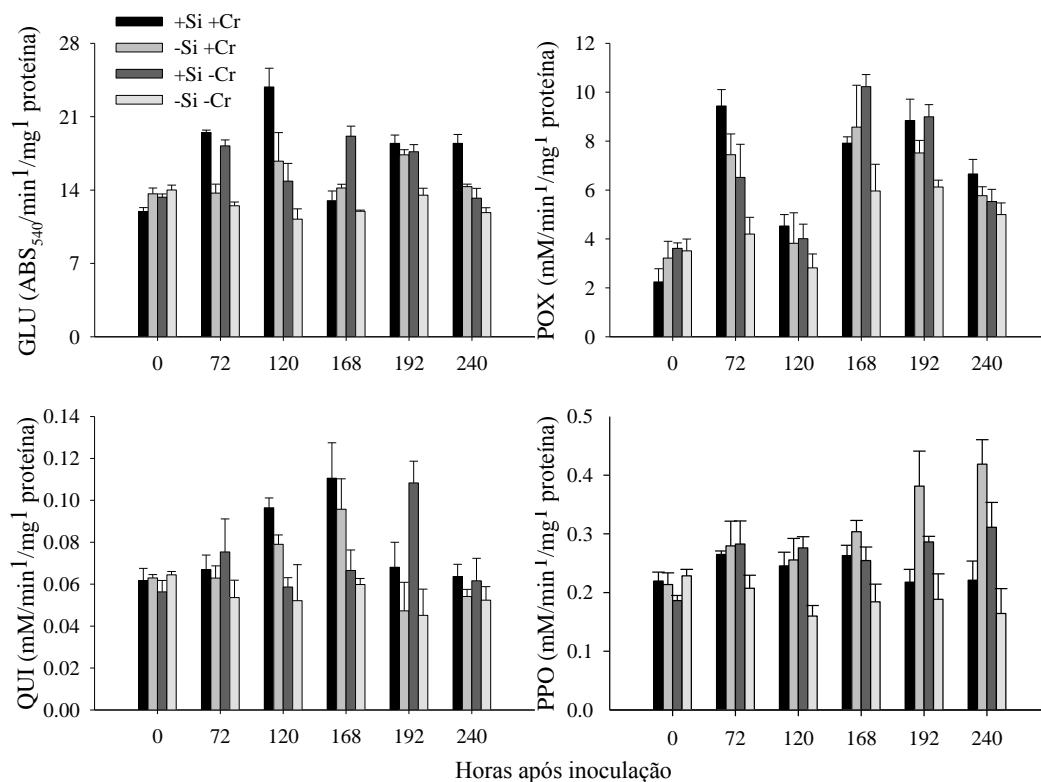


Figura 5. Atividade de polifenoloxidasas (PPO), peroxidases (POX), β -1,3-glucanases (GLU) e quitinasas (QUI) em folhas de pepino tratadas com 2 mmol de silicato de potássio/L¹ (+Si) ou não (-Si) e/ou 10⁷ conídios de *Clonostachys rosea*/mL¹ (+Cr) ou não (-Cr) e inoculadas com 10⁶ conídios de *Botrytis cinerea*/mL¹. Os dados representam a média de três repetições em cada intervalo. Barras representam o erro padrão da média.

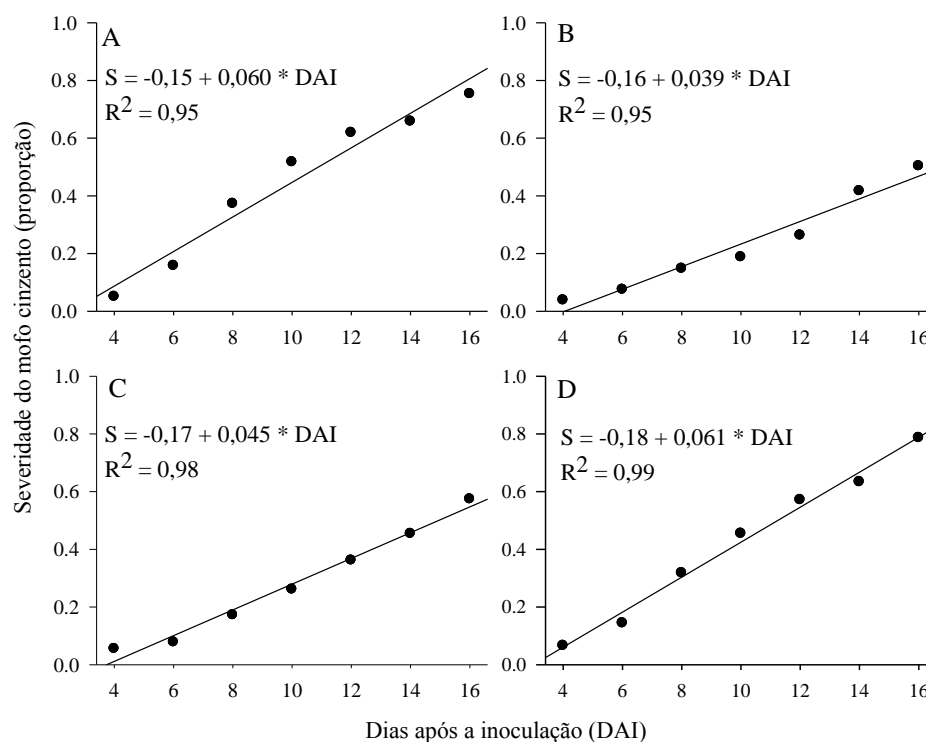


Figura 6. Curva de progresso do mofo cinzento causado por *B. cinerea* em folhas de pepineiro tratadas com: A - Silício e com *Clonostachys rosea*; B- *Clonostachys rosea* apenas; C- Silício apenas; e D- água destilada e esterilizada. Nos tratamentos, usaram-se 2 mmol de silicato de potássio L⁻¹ e 10⁷ conídios de *Clonostachys rosea*.mL⁻¹. Valores da severidade da doença observada (proporção) são representados por símbolo, enquanto a linha representa o valor da severidade da doença estimada por uma equação ajustada pelo modelo linear. Cada ponto é a média de dez repetições.

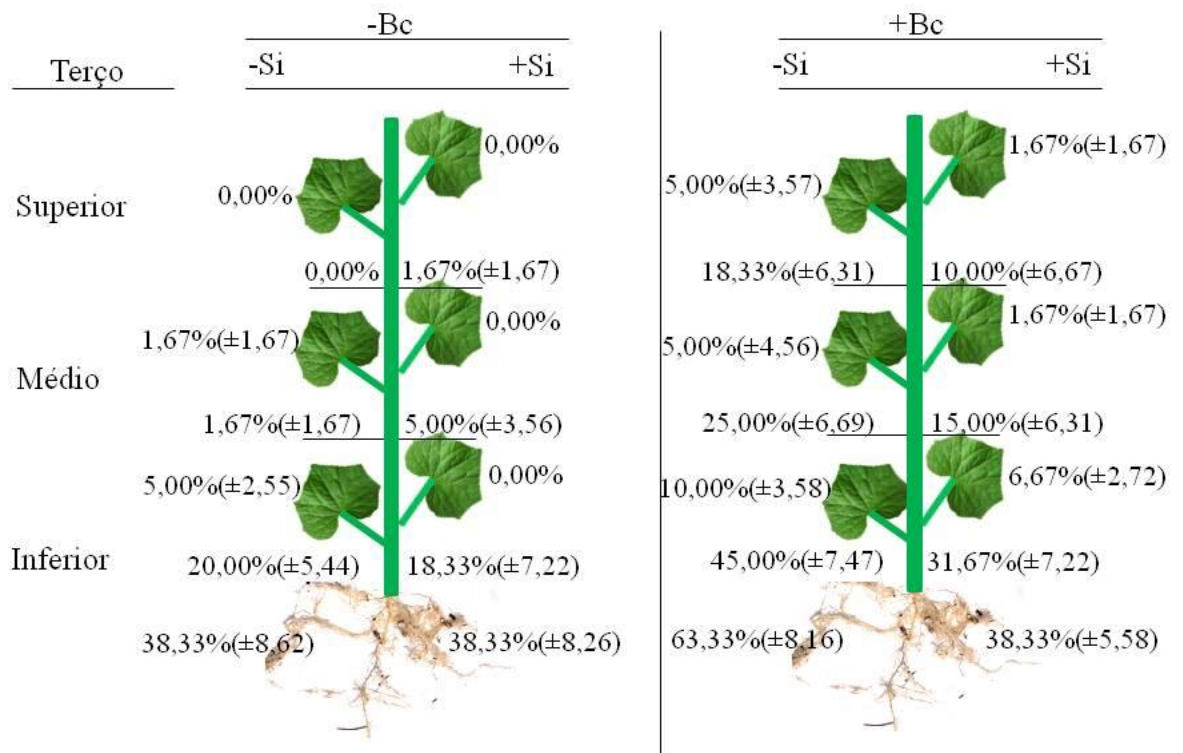


Figura 7. Frequência de isolamento de *Clonostachys rosea* de órgãos de plantas de pepino cujas sementes foram tratadas com suspensão de 10^7 conídios do antagonista. mL^{-1} , coletados após 50 dias do plantio. No substrato, aplicaram-se 100 mL de solução de 2 mmol (+Si) ou não (-Si). Aos 30 dias do plantio, atomizou-se suspensão com 10^6 conídios de *Botrytis cinerea*. mL^{-1} nas plantas (+Bc) ou não (-Bc). Valores entre parênteses representam o erro padrão da média.

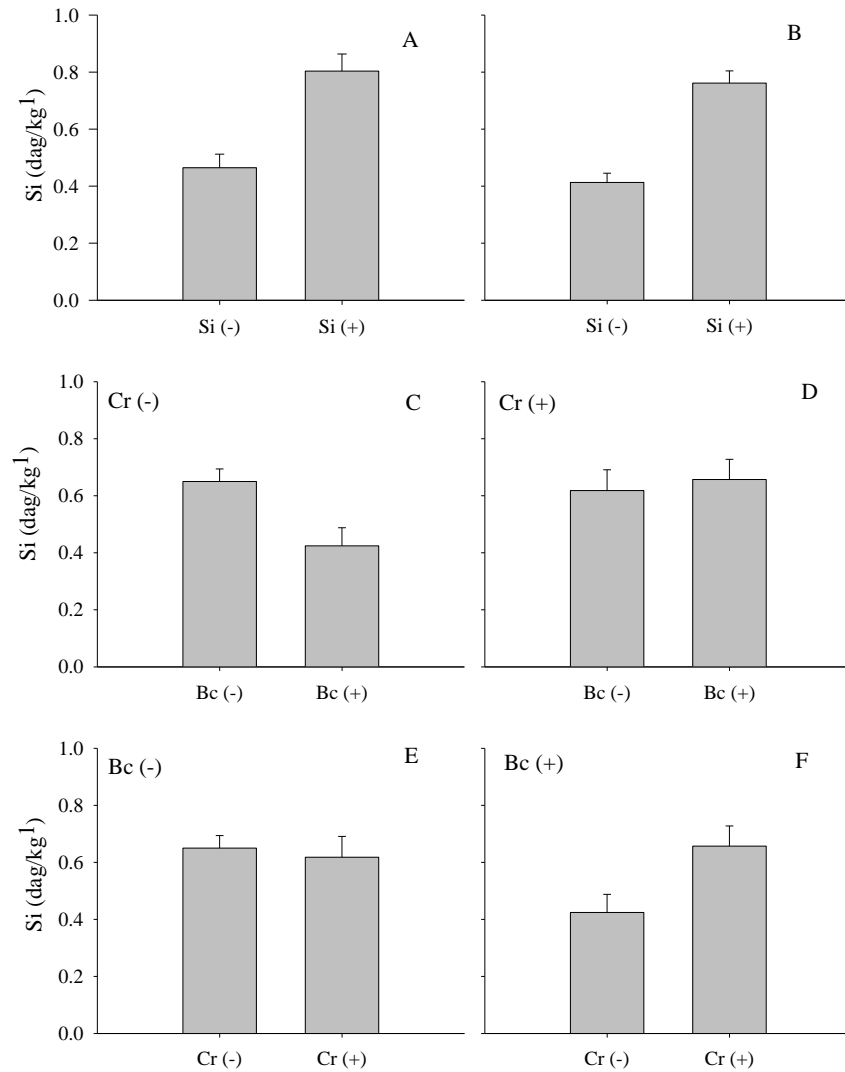


Figura 8 Concentração foliar de silício (Si). Em plantas do ensaio 1 (A) e aplicação de si (+) ou não si (-) de silício; ensaio 2 e aplicação de si (+) ou não si (-) de silício; C: ensaio 2 com interação *C. rosea* x *B. cinerea*, inoculação Bc (+) ou não Bc (-) de *B. cinerea* dentro de não aplicação Cr (-) de *C. rosea*; D: ensaio 2 com interação *C. rosea* x *B. cinerea*, inoculação Bc (+) ou não Bc (-) de *B. cinerea* dentro de aplicação Cr (+) de *C. rosea*; E: ensaio 2 com interação *C. rosea* x *B. cinerea*, aplicação Cr (+) ou não Cr (-) de *C. rosea* dentro de não inoculação Bc (-) de *B. cinerea*; F: : ensaio 2 com interação *C. rosea* x *B. cinerea*, aplicação Cr (+) ou não Cr (-) de *C. rosea* dentro de inoculação Bc (+) de *B. cinerea*. Nos tratamentos si (+), Cr (+) e Bc (+) usaram-se 2 mmol de silicato de potássio/L¹, 10⁷ conídios de *C. rosea*/mL¹ e 10⁶ conídios de *B. cinerea*/mL¹ respectivamente. Nos tratamentos si (-), Cr (-) e Bc (-), usaram-se 1,23 mmol de cloreto de potássio, água destilada e esterilizada e água destilada e esterilizada, respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Nos ensaios 1 e 2 os dados representam a combinação de dois experimentos ($n=6$) e ($n=10$) respectivamente.

Tabela 1. Comprimento, peso seco da parte aérea e do sistema radicular de plantas de pepino tratadas (+) ou não (-) com *Clonostachys rosea* e valores de F e nível de significância (P) da análise de variância.

<i>Clonostachys rosea</i>	Comprimento (cm)		Peso seco (g)			
			Parte aérea		Sistema radicular	
	1 ^{a*}	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
+	96,64	187,52	4,95	8,22	1,01	1,13
-	87,00	171,42	4,53	6,84	0,61	0,67
F	17,61	5,76	8,47	6,01	47,65	20,95
P	0,0002	0,017	0,0062	0,0192	<0,0001	<0,0001

*1^a e 2^a execuções do experimento.