



**Figura 2. @agZ`crYg a arWaXag gY ja`uarcb Xiaria a YbhY XYgdufjY `a ibcWu`aWiEb
Wcb 6 chrhigWibYrYam gY W`agiZiWarcb gYg•b `gY jYriXaX XY`a YbzYr a YXaX.**

Experimento 2. Evaluación de la eficacia del biocontrol de *Botrytis* cuando se aplican bacterias beneficiosas con y sin calcio adicional.

Enfoque: Se ha demostrado que las aplicaciones de calcio (Ca) reducen la gravedad de la enfermedad de *Botrytis* en petunia y otros cultivos. Este experimento fue diseñado para comparar los efectos del Ca y las bacterias beneficiosas de biocontrol y para determinar si la aplicación de bacterias beneficiosas de Ca+ proporcionaría un mejor control biológico de *Botrytis*. Petunias 'Carpet Red Bright' cultivaron a partir de semillas y se desarrollaron en el invernadero. Los tratamientos con bacterias beneficiosas y On-Gard Ca

(BioWorks) comenzaron cuando las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 4,5 pulgadas y se aplicaron cada dos semanas. Los tratamientos incluyeron cinco bacterias que previamente habían demostrado disminuir la severidad de la enfermedad de *Botrytis*. Estas bacterias incluían *Pseudomonas fluorescens* 89F1, *P. chlororaphis* 14B11, *P. protegens* AP54, *P. frederiksborgensis* 94G2 y *P. protegens* 15H3. Las bacterias se aplicaron individualmente y en combinación bacterias + On-Gard Ca. Los controles no incluían bacterias (solo medio de cultivo LB), LB + On-Gard Ca y el biopesticida Cease. Los tratamientos bacterianos se aplicaron en forma de aspersiones + drench, y On-Gard Ca se roció sobre las plantas a la tasa recomendada (16 fl. oz./100gal) después de que el tratamiento bacteriano se secó por completo en las hojas (al menos 5 horas). después del tratamiento bacteriano. Cuando las petunias estaban floreciendo, las inoculaciones de *Botrytis* y las evaluaciones de la enfermedad ocurrieron como se describe para el experimento 1.

Resumen de resultados: El tratamiento de las plantas con On-Gard Ca mantuvo los síntomas de la enfermedad ligeramente por debajo del control. En los primeros días del desarrollo de la enfermedad (3 y 4 días después de la inoculación de *Botrytis*), las plantas tratadas con bacterias + On-Gard Ca tendían a tener menos enfermedades que las bacterias aplicadas de forma individual para las cepas 14B11 y 89F1. La cepa AP54 aplicada de forma individual tuvo calificaciones de enfermedad más bajas que las aplicaciones de AP54 + On-Gard Ca.

Mensaje para llevar a casa: la adición de On-Gard Ca a los tratamientos bacterianos no siempre tuvo un efecto aditivo en el control de la enfermedad de *Botrytis*. Para algunas cepas de bacterias, la adición de On-Gard Ca mejoró el control de enfermedades. Para otros, no hubo mejoría en el control de la enfermedad cuando se aplicó On-Gard Ca con la cepa bacteriana.

Objetivo 2. Evaluar el efecto de diversas combinaciones de bacterias frente a *Botrytis*.

Experimento 1. Comparación de los efectos de control biológico de bacterias aplicadas en forma individual y en consorcios (grupos) de bacterias.

Enfoque: las plantas de petunia se cultivaron como se describe anteriormente y los tratamientos con bacterias comenzaron al momento del trasplante. Basado en experimentos previos, el método de aplicación para las bacterias beneficiosas fue una combinación aspersión + drench cada dos semanas. Cinco bacterias beneficiosas fueron aplicadas individualmente (obj 1, exp 2). El tratamiento de consorcios 1 incluía cepas de bacterias 89F1+14B11+AP54 y el tratamiento de consorcios 2 incluía 94G2+15H3+14B11. Las inoculaciones de *Botrytis* y las evaluaciones de la severidad de la enfermedad ocurrieron cuando las petunias estaban floreciendo, y fueron como se describe en el objetivo 1.

Resumen de resultados: De los dos tratamientos de consorcios, las evaluaciones de severidad de la enfermedad fueron consistentemente más bajas, con el primer consorcio que contenía 89F1, 14B11 y AP54 en comparación con el segundo consorcio de bacterias que contenía 94G2, 15H3 y 14B1. Si bien ambos consorcios redujeron la gravedad de la enfermedad en comparación con el control (sin bacterias), los

tratamientos que tuvieron la menor gravedad de la enfermedad de 3 a 7 días después de la inoculación con *Botrytis* fueron las bacterias individuales AP54 y Cease. El control de la enfermedad de AP54 fue similar o mejor que Cease en todos los puntos temporales. El área bajo la curva de progreso de la enfermedad

(AUDPC) fue menor con el tratamiento AP54 que cualquiera de los tratamientos de consorcios o cualquiera de los otros tratamientos de bacterias individuales. AUDPC fue menor con el consorcio 1 (que contenía AP54) en comparación con el consorcio 2.

Mensaje para llevar a casa: este experimento confirmó que hemos identificado múltiples bacterias que pueden reducir la gravedad de la enfermedad de *Botrytis*, sin embargo, las combinaciones específicas que aplicamos en este experimento con Petunia no mejoraron la eficacia. Es posible que bacterias como AP54 ya controlen *Botrytis* utilizando múltiples modos de acción o que las tres bacterias combinadas en este experimento puedan inhibir el crecimiento y la acción de otras bacterias en lugar de actuar sinérgicamente. Esto se evaluará más a fondo en el año 2.

Planes para el año 2

Objetivo 3: identificar posibles modos de acción (mecanismos) para el control de Botrytis. La mayoría de los agentes de biocontrol ejercen el control de los patógenos a través de uno o más modos de acción o mecanismos. Pueden afectar indirectamente la gravedad de la enfermedad al competir con el patógeno por los nutrientes o el espacio, o al inducir resistencia en la planta. Algunas bacterias beneficiosas pueden interferir directamente con el patógeno a través del parasitismo o mediante la producción de compuestos antimicrobianos. Conocer los modos de acción de bacterias de biocontrol específicas ayudará a optimizar los métodos de aplicación y mejorar la eficacia. Para caracterizar los modos de acción que utilizan las bacterias de Ohio State University (OSU) para controlar la Botrytis, realizaremos una serie de ensayos que analizan las actividades enzimáticas como proteasas, quitinasas y celulasas que las bacterias pueden utilizar para inhibir el patógeno fúngico. También realizaremos ensayos de placas de difusión para determinar si las bacterias producen sustancias químicas como antibióticos que pueden difundirse a través de los medios e inhibir directamente la *Botrytis*. Un ensayo de placa invertida en el que la bacteria y la Botrytis se encuentran en el mismo espacio de aire pero no físicamente en la misma placa nos dirá si la bacteria produce compuestos volátiles que pueden inhibir al patógeno. El ADN genómico de todas las bacterias OSU se ha secuenciado por completo, por lo que podemos complementar los ensayos de microbiología con análisis que identifiquen genes dentro de los genomas de bacterias que podrían estar involucrados en la inducción de resistencia u otros modos de acción.

Objetivo 4. Evaluar la eficacia de las mejores cepas bacterianas en múltiples especies vegetales susceptibles a Botrytis. Es importante que cualquier MBCA tenga una amplia gama de huéspedes para que sea eficaz en el control de Botrytis en las diversas especies de plantas cultivadas en invernaderos. Este objetivo evaluará las cepas bacterianas más efectivas en tres especies de plantas adicionales. Se incluirán plantas muy susceptibles a la Botrytis, como los geranios.

Objetivo 5. Evaluar el uso de bacterias biocontroladoras de OSU en inmersión para flores cortadas para el control de Botrytis durante la vida de florero. Las esporas de botrytis son omnipresentes y el moho gris puede ser un problema durante el envío y la venta al por menor de flores cortadas. Las cabezas de las flores se pueden sumergir en agentes de biocontrol para prevenir la aparición del tizón Botrytis en las flores cortadas. En estos experimentos, se obtendrán de tres a cinco especies de flores. Los tratamientos bacterianos incluirán las dos bacterias principales del grupo OSU (mencionado anteriormente) y Cease. Cease contiene *Bacillus subtilis* QST713 y ha sido etiquetado para inmersión poscosecha en flores cortadas. Las cabezas de flores se sumergirán en Cease o en el cultivo de bacterias individuales y luego se dejarán secar. Los tallos cortados se colocarán en jarrones con agua y se mantendrán durante tres días en un ambiente húmedo para permitir el desarrollo de síntomas de Botrytis. Si la presión del inóculo natural no causa la

enfermedad, inocularemos las flores con *Botrytis cinerea* como se describió anteriormente para los estudios de invernadero de toda la planta. La vida útil del florero se evaluará en una sala de evaluación interior con una temperatura establecida de 21° C y con iluminación fluorescente durante 12 horas. Las calificaciones de la enfermedad de Botrytis serán como se desarrollaron previamente.

¿Porque es esto importante? Saber más sobre las condiciones que afectan la eficacia de las bacterias beneficiosas de biocontrol nos permitirá crear consorcios o combinaciones de bacterias que sean aún más efectivas en numerosas especies de plantas y bajo diferentes ambientes de invernadero. Estas cepas bacterianas beneficiosas tienen el potencial de formularse en MBCA para la industria de invernaderos ornamentales. Los productos de control biológico agregados a un plan de manejo integrado de plagas pueden ayudar a la industria de los invernaderos ornamentales a avanzar hacia un sistema de producción más sostenible.