



Evaluación de *Bacillus amyloliquefaciens* en el control de *Botrytis cinerea* en *Rosa* sp.

Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* in the control of *Botrytis cinerea* in *Rosa* sp.

Autores

- ✉ Sandra Verónica Campués Cholca
- ✉ *Lucía del Rocío Vásquez Hernández
- ✉ Telmo Fernando Basantes Vizcaino
- ✉ Galo Jacinto Pabón Garcés

Universidad Técnica del Norte, Ecuador.

*Autor de correspondencia.

Resumen

Las exportaciones de flores en el primer bimestre de 2022, alcanzaron 197 millones de dólares, lo que representó un incremento del 7% en relación al mismo periodo en 2021. Para mantener este ritmo de crecimiento, es importante realizar un control eficiente de patógenos que amenazan la productividad, como es el caso de *Botrytis cinerea*, que causa una gran pérdida en cultivos de rosa. Por ello, el objetivo de esta investigación fue evaluar la efectividad de *Bacillus amyloliquefaciens* en el control de *B. cinerea* en *Rosa* sp. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones, para comparar la frecuencia de aplicación de *B. amyloliquefaciens* versus el manejo químico. El tratamiento de aplicación de *B. amyloliquefaciens* con frecuencia de aplicación cada 4 días (A2) mantuvo un porcentaje de incidencia y severidad entre 0 y 2%, mientras que el tratamiento A1 osciló entre el 10 y 14%. En cuanto a la variable vida en florero el tratamiento A2 obtuvo el 83% de rosas en buen estado, mientras que, el tratamiento A1 alcanzó al 63%. Estos resultados evidenciaron la efectividad del uso de productos biológicos.

Palabras clave: bacterias; control biológico; micología; patología vegetal.

Abstract

In the first two months of 2022, flower exports reached 197 million dollars, representing a 7% increase compared to the same period in 2021. To maintain this growth rate, it is important to efficiently control pathogens that threaten productivity, such as *Botrytis cinerea*, which causes significant crop loss in roses. Therefore, the objective of this research was to evaluate the effectiveness of *Bacillus amyloliquefaciens* in controlling *B. cinerea* in *Rosa* sp. A completely randomized design with four treatments and three replications was used to compare the frequency of application of *B. amyloliquefaciens* versus chemical management. Treatment application of *B. amyloliquefaciens* every 4 days (A2) maintained an incidence and severity percentage between 0 and 2%, while treatment A1 ranged between 10 and 14%. Regarding the variable vase life, treatment A2 achieved 83% of roses in good condition, while treatment A1 reached 63%. These results clearly demonstrate the effectiveness of using biological products.

Keywords: bacteria; biological control; mycology; plant pathology.

Citacion sugerida: Campués Cholca, S. V., Vásquez Hernández, L. del R., Basantes Vizcaino, T. F. y Pabón Garcés, G. J. (2023). Evaluación de *Bacillus amyloliquefaciens* en el control de *Botrytis cinerea* en *Rosa* sp. *La Técnica*, 13(1), 37-46. DOI: <https://doi.org/10.33936/latecnica.v13i1.5542>

Recibido: Febrero 09, 2023

Aceptado: Junio 23, 2023

Publicado: Junio 27, 2023

Introducción

En Ecuador los principales productos de exportación son: banano (*Musa x paradisiaca* L.), cacao (*Theobroma cacao* L.), café (*Coffea* sp.), camarón (*Caridea* sp.), atún (*Thunnus* sp.), y rosas (*Rosa* sp.). El país ocupa el tercer lugar a nivel mundial como exportador de flores cortadas, y las rosas ecuatorianas son reconocidas como las mejores del mundo debido a su calidad fisiológica y su prolongada vida en florero. Las provincias con mayor producción de rosas en Ecuador son: Pichincha, Cotopaxi y Carchi, debido a la suficiente luminosidad y suelos fértiles, los cuales son factores importantes para el crecimiento y desarrollo de rosas (Quinaluisa, 2019).

Dada la importancia económica del cultivo de rosas en Ecuador, se busca mejorar las técnicas de control de plagas y enfermedades mediante la rotación de productos químicos y biológicos. Para combatir *Botrytis cinerea*, se emplea *Bacillus amyloliquefaciens* Priest., bacteria Gram positiva asociada a las plantas que estimula su crecimiento y produce metabolitos secundarios que suprimen la acción de los patógenos. En estudios realizados en diferentes cultivos, se observó que la aplicación de *B. amyloliquefaciens* redujo la pudrición en la cosecha de uva (*Vitis vinifera* L.) (Rivera y Cajan, 2016), disminuyó la afectación de *Botrytis* en arándanos (*Vaccinium myrtillus* L.) del 11 al 0% durante la cosecha (OpenAg®. OpenAgriculture, 2018), eliminó la proliferación del hongo en tomates de riñón (*Solanum lycopersicum* L.) almacenados a 2 °C (Mari et al., 1996), la aplicación de *B. subtilis* resultó altamente efectiva en el control de enfermedades relacionadas con pudrición en limones (*Citrus limon* L.) y fresas (*Fragaria* sp.) inoculados con *B. cinerea*, logrando reducir significativamente la incidencia de la enfermedad (Ambrico y Trupo, 2017). Importante mencionar que en un estudio se aisló e identificó bacterias antagónicas que provocaron manchas foliares en rosas, y entre las bacterias identificadas se encontró a *B. amyloliquefaciens* (Le, 2022).

Los sistemas productivos de rosas de corte destinadas a la exportación enfrentan desafíos importantes; como, el control de enfermedades, especialmente *B. cinerea*, debido a su persistencia y número de hospederos. Sumado a las exigencias de los mercados internacionales con relación al manejo ambiental sostenible de los cultivos, lo que ha generado presión para acelerar la implementación de estrategias de control biológico de enfermedades. La infección necrótica de los pétalos de rosa por *B. cinerea*, provocó el colapso y la muerte de estos tejidos tanto en la etapa de crecimiento como en la postcosecha, lo que generó graves pérdidas económicas (Liu et al., 2018).

Ante lo expuesto anteriormente este estudio tuvo como objetivo evaluar la aplicación de *B. amyloliquefaciens* en el control de *B. cinerea* en *Rosa* sp. variedad Orange Crush, en la Florícola Flores de la Montaña, provincia de Pichincha, Ecuador.

Materiales y métodos

Descripción del área de estudio

La investigación se llevó a cabo en la Florícola Flores de la Montaña, empresa perteneciente a la Compañía Falcon-Farms en Ecuador. La finca abarca una extensión de 56 hectáreas, de las cuales 39 se destinan a la producción de rosas de exportación para el mercado americano, mientras que el resto corresponde a edificaciones. La finca se encuentra ubicada en el cantón Cayambe, específicamente en la parroquia Juan Montalvo, en la panamericana norte Km 1½, diagonal al parque Yaznan de la ciudad de Cayambe, en la provincia de Pichincha.

A una altitud de 2.830 msnm, en una región donde la temperatura promedio anual oscila entre los 10 a 18 °C. Durante las noches y en las estaciones más frías, las temperaturas descienden por debajo de los 10 °C, mientras que durante el día y en las estaciones más cálidas, superan los 18 °C. Los niveles de humedad varían entre el 60 y el 90%. La luz solar directa y la radiación ultravioleta (UV) inhiben el crecimiento y la propagación del hongo.

Instrumentos y análisis estadístico utilizados en el ensayo

Los equipos utilizados durante las aplicaciones de *Bacillus* en el ensayo, fueron una bomba Maruyama para la aplicación del producto; un tanque de 200 L para la mezcla del producto; una manguera de aspersion para aplicar el producto en el campo; una lanza aguilón ID9-ID8 como instrumento de aplicación. Entre los insumos y reactivos utilizados se incluyeron el agua como vehículo para la mezcla, la cepa R6-CDX de *B. amyloliquefaciens* (concentración de $1,6 \times 10^9$ UFC·mL⁻¹) como bacteria para el control de *Botritis*, y ácido cítrico para regular el pH de la solución.

Para analizar los datos cuantitativos obtenidos de forma experimental se procedió a utilizar un análisis de varianza (ADEVA) con prueba de medidas LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). Para el análisis de varianza, se presentaron dos fuentes de variación la frecuencia de aplicación (FA) y el error experimental. Para este estudio hubo un total de 11 grados de libertad; tres grados de libertad para frecuencia de aplicación y ocho grados de libertad para el error experimental. El análisis de estos componentes permitió evaluar la importancia relativa de cada fuente de variación y determinar si hubo diferencias significativas entre los grupos o tratamientos. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software InfoStat.

Factores en estudio

Se estudió la frecuencia de aplicación del biofungicidas para el control de *Botrytis* en el cultivo de rosas, con una dosis de $3 \text{ cc} \cdot \text{L}^{-1}$ según la recomendación del producto (la dosis fue fija para todos los tratamientos durante todo el proceso de experimentación). Se identificó como factor A, a la frecuencia de aplicación; como A1, al testigo (manejo convencional de la finca); A2, a la aplicación cada 4 días; A3, a la aplicación cada 6 días; A4, a la aplicación cada 8 días. Además, se estableció, tres repeticiones para cada aplicación, dando un total de 12 unidades experimentales. El área total del experimento fue de $2.304,60 \text{ m}^2$ (tabla 1).

El ensayo estuvo ubicado en el área de Flores 4, en el bloque 47, de la finca Falcon-Farms (Flores de la Montaña) de Ecuador

(figura 1a). La ubicación de los tratamientos con sus respectivas repeticiones en campo, estuvo distribuida en tres camas de la variedad Orange Crush (figura 1b).

Tabla 1. Desglose de las unidades experimentales y frecuencia de aplicación para cada tratamiento del experimento.

Tratamiento	Unidades experimentales	Frecuencia de aplicación
A1	3	Testigo
A2	3	Aplicación cada 4 días
A3	3	Aplicación cada 6 días
A4	3	Aplicación cada 8 días

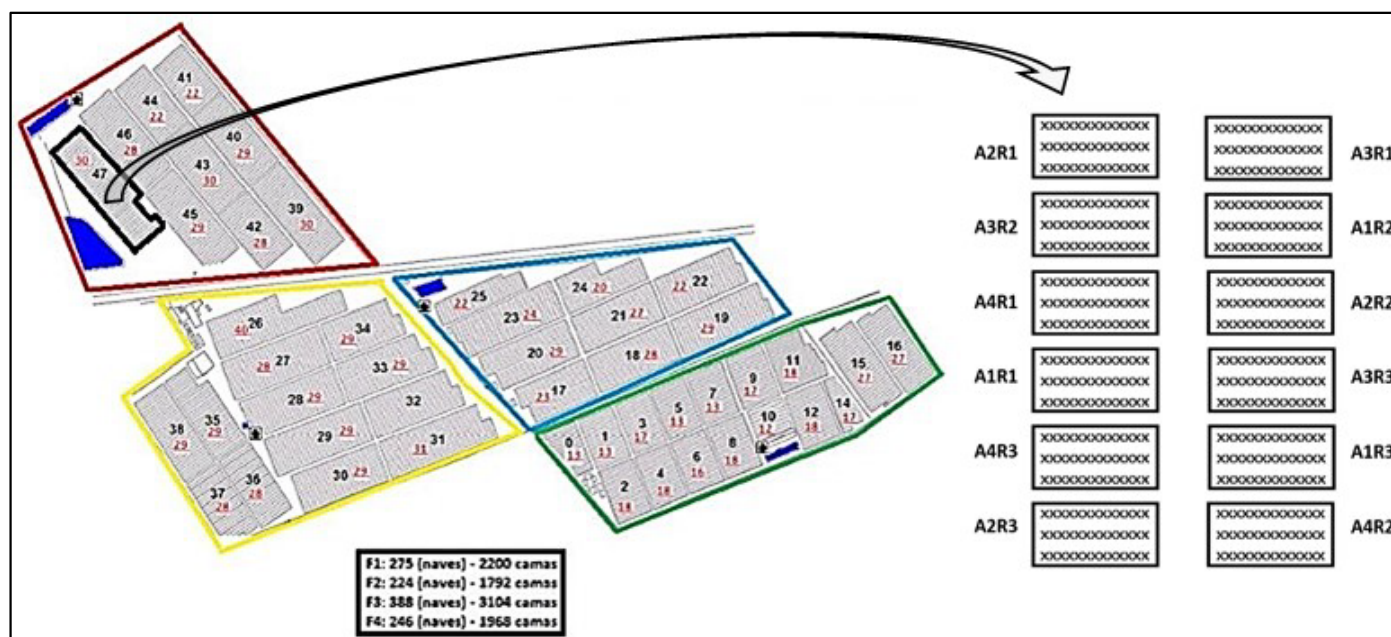


Figura 1. Ubicación del experimento área-bloque. a. Ubicación del área de Flores 4, en el bloque 47, de la finca Falcon-Farms. b. Distribución de tratamientos y repeticiones en campo.

Adaptado de la ubicación de áreas e invernaderos Falcon-Farms de Ecuador S.A. (2020).

Para la aspersión de *B. amyloliquefaciens* cepa R6-CDX, se aplicó una dosis de $3 \text{ cc} \cdot \text{L}^{-1}$ según la recomendación del producto. El volumen por camas fue de $6 \text{ L} \cdot \text{camas}^{-1}$, la aplicación para *Botrytis* en la etapa de botón floral se realizó de acuerdo con lo indicado por Gestiones y Representaciones Chía (2019). Todos los tratamientos durante el primer mes recibieron aplicaciones de *Bacillus* cada 8 días para inocular el producto. Luego las aplicaciones fueron realizadas de acuerdo con la frecuencia de cada tratamiento (A2: 4 días, A3: 6 días, A4: 8 días).

Tanto para la mezcla como para realizar la aspersión se utilizaron equipos de protección. Además, se verificó la temperatura (menor a 28°C) y humedad relativa (inferior al 40%) dentro del bloque 47, de la finca Falcon-Farms. para la correcta asimilación del producto y evitar estrés en la planta. Se realizó una premezcla del producto para garantizar la correcta disolución, donde por cada 3 cc del producto se colocó 1 L de agua, seguidamente

se agregó el adherente (INEX-A-Cosmoagro) a $0,3 \text{ cc} \cdot \text{L}^{-1}$ y finalmente se reguló el pH a 5 para su aplicación con ácido cítrico ($5 \text{ g} \cdot \text{tanque}^{-1}$). Para garantizar el volumen por cama se realizó el aforo de discos y se reguló el tiempo de aspersión por cama, también se aseguró que el producto cubrió toda con la ubicación de papel hidrosensible (Gestiones y Representaciones Chía, 2020).

Diseño experimental

Este estudio evaluó las frecuencias de aplicación de *B. amyloliquefaciens* cepa R6-CDX en el control de *Botrytis*, se manejó un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones, para determinar la influencia del biofungicida sobre el desarrollo del hongo en el cultivo de rosas. En el diseño experimental, se utilizaron tres repeticiones con un total de 12 unidades experimentales. Cada repetición se compuso de cuatro unidades experimentales, lo que resultó en un total de 12 unidades

para todo el experimento (figura 1). Se utilizó el programa Microsoft Excel (software estadístico) para generar asignaciones aleatorias de los tratamientos a las repeticiones. Con la prueba de medidas LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) (Badii et al., 2007).

Se dividió al estudio en tres fases, la primera correspondió con el monitoreo en campo realizado por 13 semanas; la segunda fase comprendió el estudio de las rosas en cámara húmeda donde se tomaron datos durante 12 semanas; y, la tercera fase que permitió examinar la vida en florero de las rosas durante siete semanas.

Al iniciar el monitoreo en campo se tomaron datos tales como: número de bloques, semanas y fechas; luego se procedió a ubicar 20 flores en punto de corte 3, en las cuales se observó la presencia o no de pústulas, tejido blando o esporulación del hongo, con esta información se calculó el porcentaje de incidencia y severidad del patógeno. La inspección se realizó todos los días desde el inicio hasta el fin de las aplicaciones, procedimiento que se llevó a cabo durante 3 meses de evaluación.

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ de flores afectadas}}{N^{\circ} \text{ de flores totales}} \times 100 \quad (1)$$

Para medir la severidad de la infección, se utilizó una escala visual (G1, G2, G3) la cual se basó en la apariencia de las lesiones causadas por la enfermedad. Para establecer la severidad se calculó el porcentaje de la superficie de los pétalos que estaban cubiertos por signos, manchas o pústulas de la enfermedad (Agrios, 2005), para lo cual se aplicó la ecuación (2).

Cámara húmeda

Para la ejecución de la segunda fase, se seleccionaron cinco rosas en un índice de corte 3 sin follaje, ubicadas en tinas con agua

En la primera fase se determinó la incidencia y severidad de *B. cinerea* después de aplicados los tratamientos, se tomaron los datos a las 7:00 de la mañana, de las 20 rosas en un índice de corte 3 por cada tratamiento (este punto de corte estuvo dado, cuando el caracol fue definido, mostrando el centro, la coloración de los pétalos fueron más brillantes y llamativos, y el patrón tuvo forma de una copa). Se monitoreó la presencia de pecas en la flor (la flor positiva fue la que presentó pecas o lesiones), aspecto no deseable en las rosas.

Para establecer el porcentaje de incidencia de *B. cinerea*, se empleó la observación directa, determinando la presencia de lesiones o síntomas característicos en los botones florales; se registró el número de plantas infectadas con relación al número total de plantas evaluadas. Para establecer la incidencia se calculó el porcentaje de rosas afectadas respecto del total de rosas evaluadas o monitoreadas en los tratamientos (Agrios, 2005), para lo cual se aplicó la ecuación (1).

(10 L) individuales por tratamiento, separadas con 2 cm entre flor y flor a temperatura ambiente (figura 2). Los datos obtenidos fueron registrados en el formato establecido de acuerdo con el grado de afectación del hongo (G1: presencia o no de pústulas, G2: tejido blando, G3: esporulación del hongo), con lo cual se calculó el porcentaje de incidencia y severidad (Ecuaciones 1 y 2). El monitoreo se realizó cada ocho días (Gestiones y Representaciones Chía, 2019).

$$\text{Severidad (\%)} = \frac{((N^{\circ} \text{ de flores G1} \times 1) + (N^{\circ} \text{ de flores G2} \times 2) + (N^{\circ} \text{ de flores G3} \times 3))}{(N^{\circ} \text{ de flores totales} \times 3)} \times 100 \quad (2)$$



Figura 2. Proceso para la instalación del ensayo en cámara húmeda, para evaluar la incidencia y severidad. a. Selección de cinco rosas en un índice de corte 3 sin follaje; b. Ubicación de las rosas en tinas con agua (10 L) individuales por tratamiento; c. Rosas separadas con 2 cm entre flor y flor a temperatura ambiente.

Donde:

G1: grado uno, cuando presentó pústulas, G2: grado dos, tejido blando, G3: grado tres, presentó esporulación.

Vida en florero

Para esta determinación se inició con la elaboración de 12 ramos cada uno con 12 tallos, los cuales fueron empacados según protocolos comerciales del producto; seguido a esto se inició la simulación de viaje (para simular la ruptura de la cadena de frío en las zonas de embarque, el segundo día del viaje simulado se sacaron las cajas a temperatura ambiente durante 8 horas y luego se volvieron a ingresar a los cuartos fríos hasta completar el tiempo de almacenamiento establecido).

Una vez se completó el tiempo, se empezó con el procedimiento de evaluación en florero, para esto se procedió a abrir los bonches (ramos de rosas) y se cortó los tallos en la base, aproximadamente 2,5 cm, también se eliminó parte del follaje de los tallos. Finalmente se llenó cada florero con agua (2 L) y se añadió el sobre de preservante ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), y se etiquetó cada florero (Gestiones y Representaciones Chía, 2020). Para valorar la calidad de vida en florero de los tratamientos en estudio, las rosas fueron monitoreadas durante 15 días, donde se pudo observar la apertura, decoloración, deformidad, deshidratación, caída de pétalos, pedúnculo caído, necrosis en los bordes de los pétalos, senescencia y amarillamiento del follaje (daños por *Botrytis*) (figura 3).



Figura 3. Proceso para la instalación del ensayo para la evaluación de la vida en florero de las rosas. a. Clasificación y bonchado de ramos de 12 tallos, cosechados de cada tratamiento en evaluación. b. Empacado y sunchado de los ramos de acuerdo a estándares comerciales del producto; c. Colocación de rosas en floreros con la etiqueta donde constó el nombre de la variedad, la fecha y tratamientos.

Resultados y discusión

Monitoreo en campo

Incidencia

Durante la primera semana de evaluación, se registró una incidencia del 3% en los tratamientos A1 (testigo con aplicación química) y A4 (aplicación cada 8 días), mientras que el tratamiento A3 (aplicación cada 6 días) presentó una incidencia del 0%. En

la cuarta semana, se observó que el tratamiento A4 mostró una mayor incidencia, la cual correspondió al 5% en comparación con el tratamiento A2 (aplicación cada 4 días), que tuvo 1%. En la séptima semana, se observó un aumento en la incidencia de los tratamientos con aplicación biológica. El tratamiento A2 mostró un 7% de incidencia, seguido por el A3 con un 6%, el A4 con un 5% y el A1 con 1%. Esto reveló una diferencia del 6% entre los tratamientos de aplicación química y biológica (figura 4).

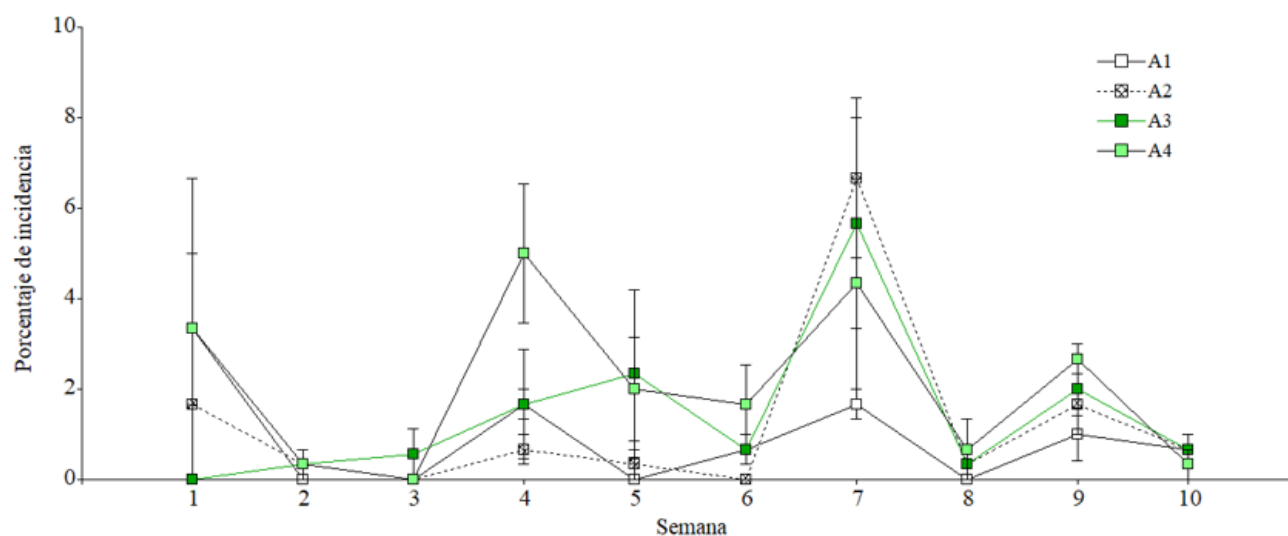


Figura 4. Porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* en *Rosa* sp., durante el monitoreo en campo.

Este estudio permitió observar una disminución significativa en el porcentaje de incidencia de *Botrytis* en *Rosa* sp. var. Orange Crush, para los tratamientos A2 y A3, los cuales mantuvieron porcentajes bajos entre el 0 y 2% con relación a la aplicación química A1 (testigo). Similares resultados se observaron en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) donde al usar productos químicos en el control de *Botrytis* hubo una incidencia del 14%; mientras que al realizar el control de este patógeno con *B. amyloliquefaciens* se observó una incidencia del 10%; y al realizar la aplicación combinada de un producto químico más *B. amyloliquefaciens*, se presentó una incidencia del 8% (CERTIS agricultura sostenible y rentable, 2021).

De la misma manera, en fresa (*Fragaria* sp.) al aplicar *B. amyloliquefaciens*, se presentó un 61,22% de inhibición, lo que denotó valores significativos en el control de *Botrytis*; además, la aplicación de *Bacillus* mejoró la calidad de las hojas, flores y frutos de la fresa, lo que optimizó la productividad del cultivo (Htwe-Maung et al., 2021). Con lo mencionado se corroboró

el favorable efecto de la aplicación de *B. amyloliquefaciens*; además, de ser una opción propicia para ingresar a la rotación de productos como herramienta para prevenir y/o controlar *Botrytis* por su característica biológica, que permite cuidar al ambiente al disminuir el uso de agroquímicos.

Severidad

En la semana 1 los tratamientos A1 y A4 presentaron una severidad del 10%, A2 presentó un 6% y A3 de 0%; en la semana 4 el tratamiento A4 tuvo el 14% de severidad, mientras que los tratamientos A1, A2, A3 estuvieron entre el 1 y el 5% estableciendo una diferencia del 13% entre el tratamiento A4 y A2. En la semana 7 se evidenció que los tratamientos biológicos tuvieron una severidad alta, donde el tratamiento A2 llegó al 21%, seguido de A3 en el 19% y A4 en el 14% mientras que el tratamiento A1 se mantuvo en el 5%, por lo que en las aplicaciones químicas se mantuvieron bajas durante toda la investigación (figura 5).

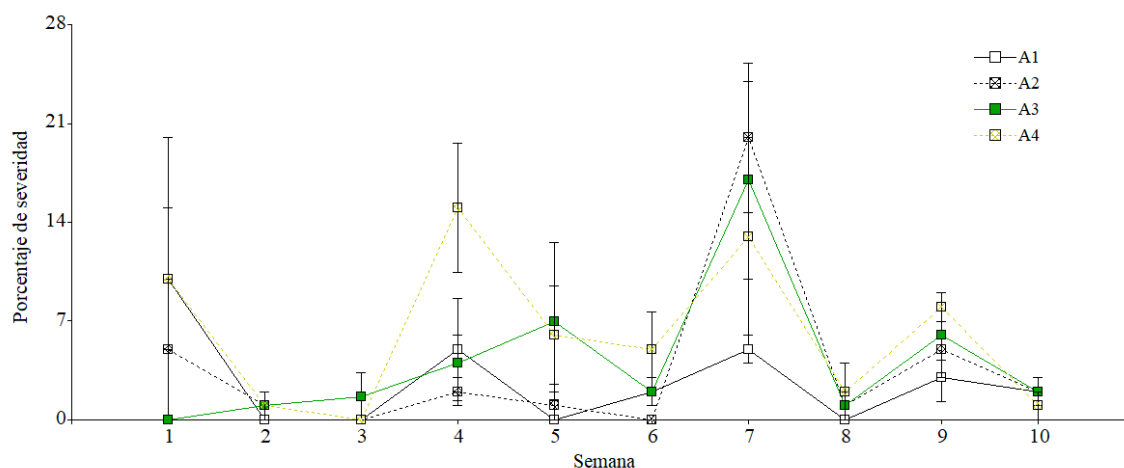


Figura 5. Porcentaje de severidad de *Botrytis cinerea* en *Rosa* sp., durante el monitoreo en campo.

Este estudio permitió observar que al inicio de la investigación los cuatro tratamientos presentaron una severidad entre el 0 y 10%, en las semanas dos y tres se redujo hasta por debajo del 3%. En la semana cuatro el tratamiento A4 presentó 14% de severidad, mientras que los tratamientos A1, A2 y A3 estuvieron por debajo del 5%. En la semana 7 se evidenció que los tratamientos biológicos tuvieron una severidad superior en comparación al tratamiento químico. Sin embargo, en las semanas 8, 9 y 10 se observó una disminución en la severidad (menos del 8%).

Este antecedente concordó con lo encontrado en un ensayo realizado en *V. vinifera*, este permitió evidenciar que al primer año de aplicado el *Bacillus* se observó que hubo una disminución

en la severidad del 37% con respecto al testigo, en el segundo año se redujo el 58% (Calvo-Garrido et al., 2019), esto indicó que el realizar aplicaciones a largo plazo se redujo el grado de afectación del patógeno, lo que mejoró la calidad del producto final. El principal modo de antibiosis que actuó en la relación bacteria-hongo fue la producción de lipopéptidos como la iturina que fue la responsable de inhibir al hongo (Pedraza-Herrera et al., 2020).

Cámara húmeda

Incidencia

Los tratamientos biológicos presentaron una incidencia menor al del testigo químico, fue así que el tratamiento A2 a los 8 días

tuvo un 35% de incidencia, y entre los días 40 y 80 presentó una incidencia entre el 1 y 25%, seguido de los tratamientos A3 y A4 que estuvieron en un rango de 50 al 75%; mientras que el tratamiento A1 (testigo químico) presentó una incidencia entre

el 50 al 100%, excepto el día 64 que bajó (figura 6). El análisis estadístico del porcentaje de incidencia en cámara húmeda mostró que hubo interacción entre los factores días y tratamientos ($F=2,08$; $GI=36, 102$; $P=<0,0023$) (tabla 2).

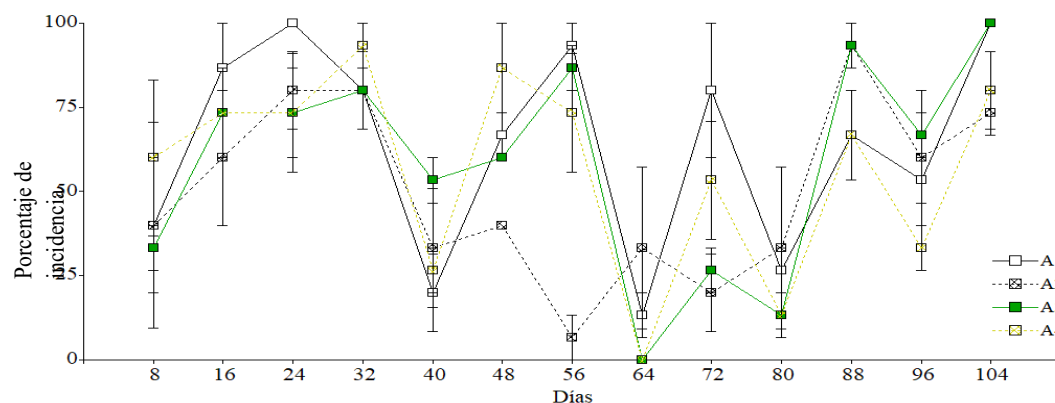


Figura 6. Porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* en *Rosa* sp., en cámara húmeda.

Tabla 2. ADEVA del porcentaje de incidencia en cámara húmeda.

Fuentes de variación	Grados de libertad de FV	Grados de libertad del error	Valor F	Valor p
Días	12	102	15,55	<0,0001
Tratamiento	3	102	2,50	0,064
Días x Tratamiento	36	102	2,08	0,0023

Al indagar sobre bacterias termófilas del suelo con amplio espectro antifúngico contra *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, y *B. cinerea*, se encontró a *B. amyloliquefaciens* la cual mostró porcentajes favorables para el control de *Botrytis*; al poner en contacto a *B. amyloliquefaciens* con el hongo *Botrytis* se presentó el 100% de inhibición del patógeno (Jamal et al., 2015). Esto reforzó lo obtenido en este ensayo, donde se observó que mientras más corta fue la frecuencia de aplicación, mayor control del patógeno se tuvo.

Otro estudio, evaluó racimos de uva en maduración, los cuales fueron encubados con *B. amyloliquefaciens* durante 13 días, luego

fueron inoculadas con *B. cinerea* por 7 días a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 100%; como consecuencia *B. amyloliquefaciens* controló del 44,1 al 72,4% la incidencia del patógeno (Fedele et al., 2020). Esto robusteció otro aspecto obtenido en este ensayo, donde se encontró que los tratamientos biológicos presentaron menor incidencia en comparación al tratamiento químico.

Severidad

El tratamiento A1 presentó un porcentaje de severidad de entre el 40 y 80% desde el día 16 hasta el día 32, y los picos se dieron en los días 56, 72 y 104 los cuales estaban entre el 80 y 100%. En tanto, que el tratamiento A2 presentó una severidad de entre el 20 y 40%, desde el día 8 hasta el día 32, a partir del día 40 se presentó una disminución hasta el día 80 llegando a tener una severidad de entre el 20 y 0%. Los tratamientos A3 y A4 mostraron una severidad entre 20 y 80%, al día 56 llegaron a tener el 100% de severidad (figura 7). El análisis de varianza del porcentaje de severidad en cámara húmeda expresó que hubo interacción entre los factores días y tratamientos ($F=3,00$; $GI=36, 102$; $P=<0,0001$) (tabla 3).

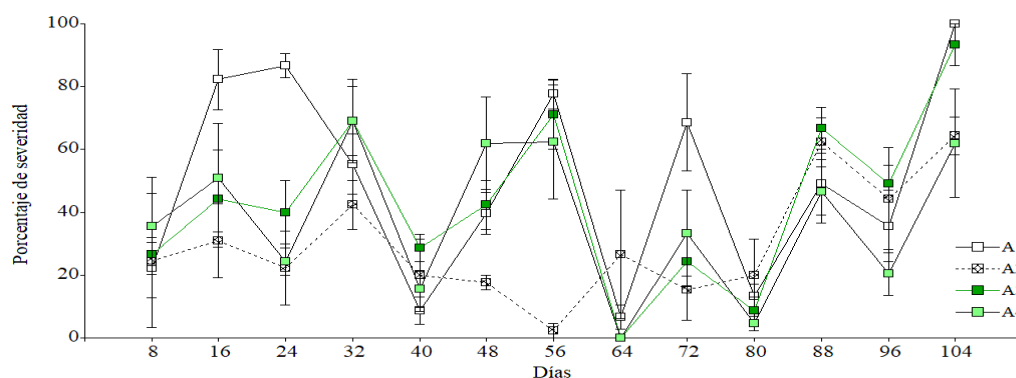


Figura 7. Porcentaje de severidad de *Botrytis cinerea* en *Rosa* sp., en cámara húmeda.

Tabla 3. ADEVA del porcentaje de severidad en cámara húmeda.

Fuentes de variación	Grados de libertad de FV	Grados de libertad del error	Valor F	Valor p
Días	12	102	16,48	<0,0001
Tratamiento	3	102	8,82	<0,0001
Días x Tratamiento	36	102	3	<0,0001

Al optimizar los componentes de *B. amyloliquefaciens* por mutagénesis se obtuvo una versión mejorada, con siete veces más metabolitos antifúngicos, los cuales al ser aplicados en tomates infectados de *B. cinerea*, inhibió el crecimiento del patógeno hasta el 100% (Masmoudi et al., 2017). Este antecedente permitió interpretar lo observado en el tratamiento A2 de esta investigación, el cual presentó una baja severidad respecto al resto de tratamientos, debido a que acumuló mayor cantidad de *Bacillus*, lo que proporcionó una alta protección a la planta contra el patógeno. De igual forma en un estudio que inoculó *B. cinerea* con *B. amyloliquefaciens* a una concentración de 3×10^3 UFC·mL⁻¹ se mostró una inhibición del 84,04% del patógeno (Hamdache et al., 2018).

Vida en florero

En el análisis de varianza de la variable vida en florero, no hubo interacción entre los factores días y tratamientos (F= 1,18; Gl= 45, 510; P= >0,2049), por lo que se aceptó la hipótesis alternativa que el hongo se controló mediante una aplicación biológica. Se observó que el tratamiento A2 presentó el mayor número de rosas sin presencia del patógeno, esto fue el 80% de rosas sanas durante los 15 días; a diferencia de los tratamientos A1 y A3, los cuales fueron estadísticamente iguales, estos presentaron el 33% de rosas infectadas, el 66% de rosas permanecieron sanas durante los 15 días. El tratamiento A4 presentó el 42% de rosas infectadas. Esto permitió observar que mientras más corto fue el tiempo de aplicación del producto la vida de la rosa mejoró sustancialmente, pudiendo mantener las rosas más de ocho días en el florero.

El análisis de varianza mostró que no hubo interacción entre los factores: tratamientos y largo de tallo (F= 0,66; Gl= 12, 118; P= >0,7848). Sin embargo, entre los factores número de cosechas y largo de tallo hubo interacción altamente significativa (F= 5,36; Gl= 8, 118; P= <0,0001) independientemente de la frecuencia de aplicación tanto del testigo químico como del biológico (tabla 4).

En este estudio, el 80% de las rosas en florero del tratamiento A2 permanecieron sin la presencia del patógeno durante 15 días. *Bacillus amyloliquefaciens* se usó como producto para

contrarrestar a *B. cinerea* durante el proceso de poscosecha en cereza (*Prunus cerasus*), se aplicó a frutos con pequeñas heridas, de los cuales el 75% de frutos permanecieron sanos (Gotor-Vila et al., 2017).

Tabla 4. ADEVA vida en florero-largo del tallo.

Fuentes de variación	Grados de libertad de FV	Grados de libertad de Error	Valor F	Valor p
Número cosechas	2	118	2,79	0,0652
Tratamiento	3	118	1,25	0,2939
Largo del tallo	4	118	133,73	<0,0001
Número cosechas x Tratamiento	6	118	0,96	0,4573
Número cosechas x Largo del tallo	8	118	5,36	<0,0001
Tratamiento x Largo del tallo	12	118	0,66	0,7848
Número cosechas x Tratamiento x Largo del tallo	24	118	1,21	0,2508

Rosa sp. var. Orange Crush, desde la clasificación hasta llegar a vida en florero, sufrió cambios bruscos de temperatura, menores a 2 °C en la prueba de vuelo hasta temperaturas ambiente; a pesar de esta travesía ningún tratamiento presentó la presencia del patógeno. Lo mismo sucedió en arándanos (*V. myrtillus*) almacenados por 30 días a una temperatura de 0 °C, donde hubo una disminución del hongo de 28,2 a 10,5% (UPL OpenAG, 2017). Es así que se reforzó, el que *B. amyloliquefaciens* fue un inhibidor de mohos fungosos, en especial de *B. cinerea*, durante el proceso poscosecha y distribución (Rotolo et al., 2017).

Al aplicar *B. amyloliquefaciens* más aceite de tomillo (*Thymus* sp.) y limoncillo (*Cymbopogon citratus*) para el almacenamiento en poscosecha de melocotón (*P. persica*), a una temperatura de 25 °C por 5 días, se observó que todos los frutos permanecieron sanos hasta su consumo, es decir, el control del patógeno fue del 100% (Arrebola et al., 2010). Esto permitió identificar que al combinar *Bacillus* con otros productos se puede potenciar su efectividad.

Conclusiones

El análisis de los datos de incidencia y severidad, tanto en el campo como en la cámara húmeda, respalda la eficacia del control biológico como una alternativa valiosa para reducir el uso de productos químicos en el control de *Botrytis*. El tratamiento A2, con una frecuencia de aplicación cada 4 días y una dosis de 3 cc·L⁻¹, se identifica como el mejor en el control de *Botrytis* en el cultivo de rosa. La acumulación de *B. amyloliquefaciens*

en el cultivo contribuyó a reducir tanto la incidencia como la severidad del patógeno, lo que resultó en una disminución del uso de pesticidas nocivos para el medio ambiente y la salud humana.

En cuanto a la vida en florero, se observaron buenas condiciones tanto en el botón floral como en las hojas, manteniendo una duración de 8 a 15 días, dentro del rango esperado para una rosa en florero. El tratamiento A2 también mostró la menor cantidad de tallos eliminados debido a *Botrytis* en las tres evaluaciones, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el campo y la cámara húmeda. No se observó eliminación de tallos por problemas como decoloración de pétalos, deshidratación, amarillamiento del follaje ni defoliación. La mayoría de los tallos eliminados fueron a causa de la enfermedad por hongos *Botrytis* y por apertura excesiva. Es destacable que los tratamientos con aplicación biológica exhibieron un alto porcentaje (80%) de tallos con buenas condiciones de apertura y calidad del follaje hasta el día 15 de evaluación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés en la presente publicación en ninguna de sus fases.

Referencias bibliográficas

- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier. In: Elsevier Inc. all rights reserved. <https://doi.org/10.1242/jcs.207373>
- Ambrico, A., y Trupo, M. (2017). Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold. *Postharvest Biology and Technology*, 134, 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.08.001>
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R. and Korsten, L. (2010). Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Protection*, 29(4), 369-377. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.08.001>
- Badii, M. H., Castillo, J., Rodríguez, M., Wong, A., y Villalpando, P. (2007). Diseños experimentales e investigación científica. *Revista Innovaciones de Negocios*, 4(2), 283-330. <https://doi.org/10.29105/rinn4.8-5>
- Calvo-Garrido, C., Roudet, J., Aveline, N., Davidou, L., Dupin, S. and Fermaud, M. (2019). Microbial antagonism toward *Botrytis* bunch rot of grapes in multiple field tests using one *Bacillus ginsengihumi* strain and formulated biological control products. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00105>
- CERTIS agricultura sostenible y rentable. (2021). AMYLO-X® WG. *Fungicida-bactericida de origen natural*, I(1), 3. España. https://www.certiseurope.es/fileadmin/ES/Descargas/Productos/Solution_Finder/AMYLO-X_WG/Folleto_Amylo-X_WG_Lechuga.pdf
- Fedele, G., Brischetto, C. and Rossi, V. (2020). Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grape berries as influenced by temperature and humidity. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01232>
- Gestiones y Representaciones Chía. (2019). *Monitoreo directo plagas y enfermedades*. Colombia.
- Gestiones y Representaciones Chía. (2020). *Procedimiento para la simulación de viaje y evaluación de vida en florero*. Colombia.
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Casals, C., Torres, R., De Cal, A., Guijarro, B. and Usall, J. (2017). Biological control of brown rot in stone fruit using *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 under field conditions. *Crop Protection*, 102, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.08.010>
- Hamdache, A., Ezziyyani, M. and Lamarti, A. (2018). Effect of preventive and simultaneous inoculations of *Bacillus amyloliquefaciens* (Fukumoto) strains on conidial germination of *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. *Anales de Biología*, 40, 65-72. <https://doi.org/10.6018/analesbio.40.08>
- Htwe-Maung, C. E., Seon-Baek, W., Gyu-Choi, T. and Yong-Kim, K. (2021). Control of grey mould disease on strawberry using the effective agent, *Bacillus amyloliquefaciens* Y1. *Biocontrol Science and Technology*, 31(5), 468-482. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1867707>
- Jamal, Q., Lee, Y. S., Jeon, H. D., Park, Y. S. and Kim, K. Y. (2015). Isolation and biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 against fungal plant pathogens. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 48(5), 485-491. <https://doi.org/10.7745/kjssf.2015.48.5.485>
- Le, U. T. (2022). Isolation and identification of the antagonistic bacteria against *Xanthomonas* spp. causing the leaf spot from *Rosa* spp. *Can Tho University Journal of Science*, 14, 68-73. <https://doi.org/10.22144/ctu.jen.2022.030>
- Liu, X., Cao, X., Shi, S., Zhao, N., Li, D., Fang, P., Chen, X., Qi, W. and Zhang, Z. (2018). Comparative RNA-Seq analysis reveals a critical role for brassinosteroids in rose (*Rosa hybrida*) petal defense against *Botrytis cinerea* infection. *BMC Genetics*, 19(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12863-018-0668-x>
- Mari, M., Guizzardi, M., Brunelli, M. and Folchi, A. (1996). Postharvest biological control of grey mould (*Botrytis cinerea* pers.: Fr.) on fresh-market tomatoes with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection*, 15(8), 699-705. [https://doi.org/10.1016/s0261-2194\(96\)00042-7](https://doi.org/10.1016/s0261-2194(96)00042-7)
- Masmoudi, F., Ben Khedher, S., Kamoun, A., Zouari, N., Tounsi, S. and Trigui, M. (2017). Combinatorial effect of mutagenesis and medium component optimization on *Bacillus amyloliquefaciens* antifungal activity and

efficacy in eradicating *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, 197, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.01.001>

OpenAg®. OpenAgriculture. (2018). *Producto biológico para el control de Botrytis*. Biofungicida Amylo-X. Blanca Luz Pinilla. https://cl.uplonline.com/download_links/3yAT39PptG8VSANk9u3PhuyWaWvBUQQYLpXm2UG.pdf

Pedraza-Herrera, L. A., Lopez-Carrascal, C. E. y Uribe-Vélez, D. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 112-125. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>

Quinaluisa, C., Villamar, R., Díaz, E., Moncayo, O., López, J. and Jazayeri, S. (2021). State of the art of floriculture

in Ecuador: Historical and current economic context, genetic improvement and carbon footprint. *Nexo Agropecuario*, 9(1), 111-120. <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/nexoagro/article/view/32799>

Rivera, T., y Cajan, J. (2016). Productos biológicos y químicos para el control de pudrición gris y ácida en el cultivo de vid (*Vitis vinifera* L.) en condiciones de campo, Chongoyape 2015. UCV-HACER. *Revista de Investigación y Cultura*, 5(2).

Rotolo, C., De Miccolis Angelini, R. M., Dongiovanni, C., Pollastro, S., Fumarola, G., Di Carolo, M., Perrelli, D., Natale, P. and Faretra, F. (2017). Use of biocontrol agents and botanicals in integrated management of *Botrytis cinerea* in table grape vineyards. *Pest Management Science*, 74(3), 715-725. <https://doi.org/10.1002/ps.4767>

Contribución de los autores

Autores	Contribución
Sandra Verónica Campués Cholca	Propuesta y diseño de la investigación, análisis e interpretación de los datos.
Lucía del Rocío Vásquez Hernández	Revisión bibliográfica, realizó la preparación y edición del manuscrito, interpretación de datos, corrección de estilo.
Telmo Fernando Basantes Vizcaíno	Corrección de estilo, y revisión del contenido del manuscrito.
Galo Jacinto Pabón Garcés	Revisión bibliográfica, corrección de redacción, revisión final del escrito.