

Sección (Marcar)

Artículo científico ___

Revisión Bibliográfica ___

Punto de vista ___

Special Issue "Sustentabilidad Organizacional, Desarrollo y Gestión Ambiental" ___

7 **Evaluación *in vitro* de tratamientos antimicrobianos frente *Agrobacterium* aislado de**

8 ***Gypsophila paniculata* L.**

9 ***In vitro* evaluation of antimicrobial treatments against *Agrobacterium* isolated from**

10 ***Gypsophila paniculata* L.**

11 Naranjo Daniela^{1,2}, León Diego^{1*}

12 ¹ Escuela de Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Pontificia Universidad Católica del

13 Ecuador, sede Ibarra. Código Postal 100111, Ibarra, Ecuador.

14 ² Florisol & Co. Código Postal 170316. Quito, Ecuador

RESUMEN

16 El complejo de especies de *Agrobacterium* causa la formación de tumores en cuello en cultivos
 17 ornamentales, entre ellos el cultivo de *Gypsophila paniculata* L., comprometiendo su estado
 18 fitosanitario y la calidad del material propagativo. En este contexto, el presente trabajo tuvo como
 19 objetivo evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de diferentes productos comerciales utilizados
 20 en sistemas agrícolas. Se realizó un ensayo de sensibilidad mediante el método de difusión en
 21 agar por pozos, evaluando once tratamientos, cada uno a las dosis recomendadas por el
 22 fabricante para su uso agrícola, posteriormente con los tres productos con mayor halo de
 23 inhibición neta promedio se desarrolló curvas de dosis – respuesta para obtener la concentración
 24 efectiva media (EC50) mediante un modelo de regresión lineal tipo log – logístico. Los
 25 tratamientos basados en antibióticos del grupo de los aminoglucósidos combinados con
 26 oxitetraciclina, presentaron mayor efecto inhibitorio frente al aislamiento bacteriano, obteniendo
 27 valores de EC50 de 0.353 mg L⁻¹ para estreptomina + oxitetraciclina y 0.453 mg L⁻¹ para
 28 gentamicina + oxitetraciclina, mientras que el tratamiento basado en amonio cuaternario + sulfato
 29 de cobre presentó una menor potencia antibacteriana con 1.935 mg L⁻¹, resultados que sugieren
 30 una mayor sensibilidad del aislamiento bacteriano a compuestos antibióticos que interfieren en
 31 la síntesis proteica en comparación con compuestos de acción desinfectante por contacto. Estos
 32 resultados evidencian el potencial de los antibióticos a bacterias fitopatógenas, sin embargo, la
 33 extrapolación de estos datos a condiciones de campo debe realizarse con cautela debido a que

34 las influencias ambientales y biológicas pueden modificar la eficacia obtenida en condiciones *in*
35 *vitro*.

36 **ABSTRACT**

37 *The Agrobacterium tumefaciens complex causes crown gall formation in ornamental crops,*
38 *including Gypsophila paniculata, compromising plant health and affecting the quality of*
39 *propagative material. In this context, the present study aimed to evaluate in vitro the antibacterial*
40 *activity of different commercial products commonly used in agricultural systems. A sensitivity*
41 *assay was conducted using the agar well diffusion method, evaluating eleven treatments at a*
42 *reference concentration. Subsequently, the three products with the highest average net inhibition*
43 *were selected to construct dose–response curves in order to estimate the median effective*
44 *concentration (EC50) using a log–logistic nonlinear regression model. Treatments based on*
45 *aminoglycoside antibiotics combined with oxytetracycline showed the highest inhibitory effect*
46 *against the bacterial isolate, with EC50 values of 0.353 mg L⁻¹ for streptomycin + oxytetracycline*
47 *and 0.453 mg L⁻¹ for gentamicin + oxytetracycline, whereas the treatment based on quaternary*
48 *ammonium + copper sulfate showed lower antibacterial potency with an EC50 of 1.935 mg L⁻¹.*
49 *These results suggest a greater sensitivity of the bacterial isolate to antibiotics that interfere with*
50 *bacterial protein synthesis compared with disinfectant compounds that act mainly through contact*
51 *mechanisms. The findings highlight the antibacterial potential of antibiotic-based treatments*
52 *against phytopathogenic bacteria; however, extrapolation of these results to field conditions*
53 *should be performed with caution, as environmental and biological factors may influence the*
54 *efficacy observed under in vitro conditions.*

55 **Palabras clave**

56 *Bacterias fitopatógenas, cultivos ornamentales, agalla en corona, inhibición, actividad*
57 *antibacteriana.*

58 **Keywords**

59 *Plant pathogenic bacteria, ornamental crops, crown gall, bacterial inhibition, antibacterial activity.*

60 **1. Introducción**

61 En Ecuador el sector florícola representa un rubro importante en la economía del país. Según el
62 Banco Central del Ecuador (2025) las exportaciones no petroleras alcanzaron USD 29.401,9
63 millones, dentro de las cuales las flores registraron un valor FOB de USD 1.044,7 millones,

64 representando alrededor del 9% de exportaciones ajenas al sector hidrocarburífero y, además,
65 evidenciando un crecimiento interanual del 2.8% con respecto al 2023. Por su parte PRO
66 ECUADOR (2024) señala una tendencia creciente en el sector Flores y Plantas entre el año 2020
67 y 2024 de USD 846 millones a USD 1.040 millones FOB, resaltando entre los principales
68 productos del sector la *Gypsophila* junto con las rosas, flores y capullos frescos.

69 A nivel internacional la *Gypsophila* se encuentra entre las diez principales flores de corte en el
70 mercado y es utilizado típicamente como flor de relleno en ramos, arreglos y bouquets, además
71 posee un valor agregado mediante el teñido y secado para artesanías florales lo que la hace
72 competitiva en el mercado internacional (Mohamad *et al.*, 2025).

73 En condiciones de producción comercial, las flores del cultivo de *Gypsophila paniculata* L. son
74 estériles y no forman semillas, por lo cual, su propagación vegetal se realiza a través de esquejes
75 de tallo en un sistema de producción masivo que asegure plantas libres de patógenos y
76 genéticamente uniformes para el cultivo comercial (Mohamed *et al.*, 2023). En este contexto, la
77 eficacia del sistema de propagación asexual depende en alta proporción del estado fisiológico y
78 sanitario de las plantas madres, Aguilar-Ancota and Mattos-Calderon (2020) recalcan que el
79 establecimiento radicular recae sobre la calidad del tejido basal del esqueje y la sanidad del
80 cuello de la planta madre, particularmente libre de daños fisiológicos o infecciones bacterianas.
81 En la industria florícola, los cultivos destinados para planta madre son manejados bajo estrictos
82 protocolos de ambiente, nutrición y sanidad debido a la facilidad de transferencia de patógenos
83 entre plantas madre por su manipulación constante, lo que afecta el material de cada ciclo de
84 propagación y por ende compromete a programas completos de producción (Faust, Dole and
85 Lopez, 2017)

86 El sistema productivo comercial de *Gypsophila paniculata* L. se ve afectado por diversas
87 enfermedades de origen fúngico, bacterianas y virales las cuales comprometen la estabilidad del
88 cultivo durante sus fases de propagación y producción. Los agentes patógenos más importantes
89 de *G. paniculata* se encuentran especies de *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*,
90 responsables de pudriciones en cuello y raíz, generando marchitez temprana y mortalidad en
91 condiciones de alta humedad (Wolcan *et al.*, 2018). Aguilar-Ancota and Mattos-Calderon (2020)
92 identificaron a *Rhizoctonia solani* como el agente causal de la pudrición en cuello causando
93 necrosis basal, alcanzando mortalidades superiores al 50% en campo y, recientemente en

94 Ecuador se reportó *Fusarium triseptatum* por primera vez, donde se identificaron mortalidades
95 por pudrición en raíz cercanas el 60% en áreas de producción comercial (Huilca-Mejia *et al.*,
96 2024). Adicionalmente en cama madre se ha descrito “deformation disease”, en la cual un
97 consorcio de microorganismos patógenos del sustrato, entre ellos *Agrobacterium* y *Pantoea*
98 *agglomerans* pv. *gypsophilae* reducen hasta en un 50% la producción de esquejes afectando la
99 vulnerabilidad del sistema de propagación (Ben-Yephet *et al.*, 2006).

100 En relación con las enfermedades que afectan la región del cuello y base del tallo en *G.*
101 *paniculata*, la agalla en cuello o “crow gall” ha sido ampliamente reportada especialmente en
102 especies de ornamentales y frutales, asociándose a la aparición de tumores de origen bacteriano
103 en tejidos basales al estimular una proliferación celular descontrolada (Wolcan *et al.*, 2018).
104 Chalupowicz *et al.* (2006) reporta que bacterias del género *Agrobacterium* y *Pantoea*
105 *agglomerans* pv. *Gypsophilae* están asociadas a la formación de tumores los cuales interfieren
106 en el transporte de agua y nutrientes al obstruir los tejidos vasculares, reduce el vigor vegetal,
107 disminuye la productividad y en infecciones severas pueden ocasionar la muerte del cultivo hasta
108 en un 60% produciendo pérdidas económicamente significativas en viveros y sistemas
109 comerciales (Arunasri, Vineela and Krishna, 2025; Qian *et al.*, 2025).

110 De acuerdo con Farri and Khezri (2021) el manejo de esta enfermedad se centra principalmente
111 en manejos culturales basados en estrategias preventivas, como la selección de material sano y
112 la erradicación de plantas infectadas y, con lo que respecta a las herramientas de cosecha es
113 imprescindible su desinfección debida que la infección ocurre a través de heridas. En cuanto al
114 control químico, se ha señalado que no existe un tratamiento curativo, sin embargo, se ha
115 reportado el uso de compuestos cúpricos, hipoclorito de sodio u otros desinfectantes para reducir
116 la contaminación superficial y limitar la diseminación del patógenos, aunque estos tratamientos
117 no son efectivos frente a infecciones establecidas (Iličić *et al.*, 2025).

118 En este contexto, diversos estudios han explorado alternativas como el control biológico. Por
119 ejemplo, Arunasri, Vineela and Krishna (2025) exponen que la cepa no patogénica K84 y su
120 derivado K106 son utilizados como agentes preventivos en la producción de agrocin 84, mientras
121 que Li *et al.* (2025) han demostrado que cepas de *Bacillus velezensis* tiene potencial inhibitorio
122 *in vitro* frente al agente causal al activar mecanismos de resistencia sistémica asociada a las vías
123 de jasmonato, etileno y ácido salicílico, sin embargo, los autores recalcan la necesidad de validar

124 su desempeño bajo distintas condiciones, finalmente Selim, Youssef and Khalil (2025) ha
125 explorado la eficacia *in vitro* de ácidos orgánicos y extractos vegetales, sin embargo, aún no
126 existe un método universalmente efectivo.

127 En conjunto, estas investigaciones muestran que la sensibilidad a los compuestos evaluados
128 puede variar entre aislamientos de *Agrobacterium*, lo que apunta a que la eficacia de los
129 tratamientos depende de la cepa bacteriana presente en cada cultivo afectada por la agalla.

130 En este contexto, y considerando la variabilidad en la sensibilidad reportada para aislamientos
131 bacterianos asociados a la enfermedad, es necesario generar evidencia experimental frente al
132 aislado obtenido en el sistema productivo estudiado que permita sustentar decisiones con
133 respecto al manejo fitosanitario. En consecuencia, con el presente estudio se pretende responder
134 a ¿Existen diferencias en la sensibilidad del agente causal de la agalla en cuello en *Gypsophila*
135 *paniculata* L. frente a diferentes agentes de control químicos y biológicos evaluados en
136 condiciones *in vitro*?

137 **2. Materiales y Métodos**

138 **2.1. Ubicación del estudio**

139 La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología de la empresa florícola Florisol
140 & CO., ubicada en la parroquia San José de Minas, cantón Quito, provincia de Pichincha, Ecuador
141 (0.13264° Lat. N; 78.41355° Long. W), a una altitud de 2500 m.s.n.m. durante el periodo Dic 2025
142 – Feb 2026.

143 **2.2. Muestreo**

144 El material vegetal se obtuvo de la cama madre de *Gypsophila paniculata* L. perteneciente a la
145 florícola Florisol & Co. establecida en condiciones bajo invernadero. Se evaluó una cama de 920
146 plantas con 40 semanas de edad.

147 Se seleccionaron seis plantas que presentaban síntomas relacionados con agallas en cuello, las
148 cuales fueron extraídas completamente de la cama madre, para posteriormente cortar el follaje
149 y el sistema radicular, con el fin de aislar la región basal del tallo donde se ubicaron las
150 proliferaciones tumorales.

151 Las muestras de tejido infectado se lavaron en agua corriente hasta eliminar restos de sustrato
152 adherido al material vegetal e inmediatamente se guardó cada muestra en una bolsa hermética
153 tipo Ziploc®. Las muestras se transportaron en un contenedor térmico al laboratorio de

154 fitopatología de la finca para su procesamiento manteniendo una temperatura aproximadamente
155 de 10 °C durante el traslado.

156 **2.3. Aislamiento bacteriano**

157 El aislamiento bacteriano se realizó tomando las referencias metodológicas de Iličić et al. (2025)
158 y Li et al. (2025) para el aislamiento de *Agrobacterium* a partir de tejidos infectados, con las
159 siguientes modificaciones.

160 En el laboratorio, las muestras fueron sometidas a una desinfección superficial por inmersión con
161 hipoclorito de sodio al 1% durante 30 segundos, seguido de tres lavados con agua destilada de
162 1 minuto cada uno. Posteriormente, bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar
163 los tejidos tumorales se cortaron en fragmentos de aproximadamente 2 x 2 mm., utilizando un
164 bisturí esterilizado, en cada corte se eliminó todo el tejido café asociado a procesos de oxidación.
165 Los fragmentos se colocaron en un frasco estéril y se procedió a desinfectar por inmersión con
166 etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de tres lavados con agua destilada esterilizada de 1
167 minuto cada uno.

168 Los fragmentos de cada muestra se maceraron en conjunto en un mortero con agua destilada
169 esterilizada, se adicionó 1 mL de agua por cada fragmento. El macerado se transfirió a un tubo
170 falcon de 15 mL y se dejó reposar durante 5 minutos, a partir del sobrenadante obtenido se
171 prepararon diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , además de una suspensión sin diluir.

172 Las diluciones se sembraron por estría en cajas Petri con medio D1, utilizado para el aislamiento
173 y crecimiento de bacterias del género *Agrobacterium* de acuerdo con Khdeer and Gergees
174 (2025), se establecieron 3 cajas Petri por cada dilución y se incubaron en una estufa
175 bacteriológica a 28 ± 1 °C durante 72 horas.

176 Las colonias individuales fueron seleccionadas y repicadas dos ciclos por estría en el medio D1
177 para su purificación, con el fin de obtener colonias homogéneas y libres de contaminantes
178 (Balouiri, Sadiki and Koraichi, 2015).

179 **2.4. Caracterización morfológica y pruebas bioquímicas**

180 La caracterización morfológica y bioquímica se realizó siguiendo los procedimientos
181 microbiológicos convencionales descritos para bacterias del género *Agrobacterium* de Filiz
182 Doksöz and Bozkurt (2020) y Bozkurt et al. (2023).

183 Las colonias puras aisladas en el medio D1 fueron evaluadas macroscópicamente considerando
184 su forma, elevación, borde, color y textura. Posteriormente, las colonias se sembraron en medio
185 YEM (Extracto de levadura-manitol, Yeast Extract Mannitol) se incubaron a 28 ± 1 °C durante 24
186 horas para las pruebas bioquímicas.

187 A partir de las colonias frescas se realizó frotis bacteriano para la tinción Gram siguiendo el
188 procedimiento convencional descrito por Capuccino and Welsh (2020), la prueba de catalasa en
189 la cual se adicionó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% sobre una colonia fresca, considerando
190 una respuesta positiva a la formación de burbujas inmediata y la prueba de oxidasa se realizó
191 con un reactivo comercial, considerándose positiva la coloración púrpura en los primeros
192 segundos de la reacción.

193 **2.5. Identificación molecular**

194 La extracción del ADN genómico se obtuvo a partir de cultivos puros de 48 horas sembrados en
195 medio YEM. La biomasa bacteriana fue recuperada por centrifugación y el ADN se aisló
196 siguiendo las recomendaciones de un kit comercial para extracción genómica de bacterias.

197 La calidad e integridad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al
198 1%, y su concentración fue ajustado a $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para su utilización como molde de reacción de
199 PCR.

200 La identificación molecular del aislado bacteriano se realizó mediante la amplificación del gen
201 16S rRNA, marcador ampliamente utilizado en estudios de taxonomía bacteriana debido que la
202 presencia de regiones conservadas intercambiadas con regiones variables, lo que permite
203 identificar a nivel de género (Weisburg *et al.*, 1991).

204 La amplificación se realizó utilizando los cebadores universales 27F (5'-
205 AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3) descritas
206 para la amplificación casi completa del gen 16S rDNA (Weisburg *et al.*, 1991). Khdeer and
207 Gergees (2025) y Bozkurt *et al.* (2023) en sus estudios resaltan que estos primers son
208 ampliamente utilizados para la identificación molecular de especies del género *Agrobacterium* y
209 otros miembros de la familia Rhizobiaceae.

210 Los productos de la PCR se verificaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.
211 Posteriormente fueron enviados al laboratorio especializado IDgen Molecular Services para su
212 purificación y secuenciación mediante el método Sanger.

213 La secuencia del gen 16S rRNA obtenida fue comparada con secuencias depositadas en la base
214 de datos GenBank mediante el algoritmo BLASTn del National Center for Biotechnology
215 Information (NCBI), con el fin de identificar las secuencias con mayor similitud (Camacho *et al.*,
216 2009).

217 Con base a los resultados obtenidos y en las revisiones taxonómicas del género *Agrobacterium*
218 y géneros relacionados se seleccionaron secuencias representativas de las especies para el
219 análisis filogenético. La selección de estas especies se realizó considerando la información
220 taxonómica para *Agrobacterium* reportada por (Flores-Félix *et al.*, 2020).

221 El árbol filogenético fue elaborado por el software MEGA12 versión 12.1.2, mediante el método
222 de Máxima Verosimilitud, y la confiabilidad de las ramas fue evaluada mediante un análisis de
223 Bootstrap con 100 repeticiones (Camacho *et al.*, 2009).

224 **2.6. Ensayo de sensibilidad *in vitro***

225 Los ensayos de sensibilidad *in vitro* de los tratamientos químicos comerciales frente al agente
226 causal de agalla en cuello en *Gypsophila paniculata* L. se evaluó mediante el método de difusión
227 en pocillo en agar (agar well difusión) siguiendo el protocolo de Balouiri, Sadiki and Ibsouda
228 (2016).

229 El inóculo se preparó suspendiendo colonias jóvenes de 48 horas en caldo Trypticase Soya (TSA)
230 hasta alcanzar una turbidez 0.5 en escala McFarland, la cual se sembró uniformemente en tres
231 direcciones sobre cajas Petri con medio agar Mueller-Hinton (MH) con un hisopo estéril.
232 Posteriormente, se realizó cinco pocillos por placa de 6 mm de diámetro con un sacabocados
233 estéril, en cada pocillo se depositó 90 µL del producto correspondiente y se dejó reposar durante
234 5 minutos antes de incubar a 28°C durante 24 horas.

235 La variable de respuesta correspondió a la zona libre de crecimiento bacteriano, es decir, el halo
236 de inhibición en cada tratamiento, para lo cual se promedió dos mediciones perpendiculares
237 realizadas en cada placa, incluyendo el diámetro del pocillo (6 mm).

238 Este método ha sido ampliamente utilizado porque permite evaluar compuestos de distinta
239 naturaleza química bajo condiciones homogéneas, no obstante, debe considerarse que el
240 tamaño del halo de inhibición no solo depende de la actividad antimicrobiana del compuesto, sino
241 también a su capacidad de difusión en el agar (Valgas *et al.*, 2007). Por lo cual, los resultados

242 obtenidos representan una evaluación comparativa y no una determinación absoluta de eficacia
243 bactericida.

244 Se evaluaron 11 tratamientos comerciales (Tabla 1) y con un control negativo, los productos
245 fueron aplicados de acuerdo a la concentración recomendada por el fabricante para uso agrícola.

246 Cada tratamiento fue evaluado con cuatro repeticiones independientes, y cada unidad
247 experimental correspondió a una caja Petri inoculada con el aislamiento bacteriano, en el cual se
248 dispusieron cinco pozos, cuatro contenían tratamientos comerciales y uno el control negativo.

249 **Tabla 1.** Tratamientos comerciales evaluados *in vitro* frente al agente causal de la
250 agalla en cuello.

Tratamiento	Ingrediente activo*	Concentración evaluada*
T1	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1 g L ⁻¹
T2	Mancozeb, Cu ²⁺	1 g L ⁻¹
T3	Estreptomina, Oxitetraciclina	1 g L ⁻¹
T4	Sulfato de gentamicina, Clorhidrato de oxitetraciclina	1 g L ⁻¹
T5	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1 mL L ⁻¹
T6	Kasugamicina	1 g L ⁻¹
T7	Amonio cuaternario	1 mL L ⁻¹
T8	72.5% extracto de Larrea tridentata	1 mL L ⁻¹
T9	Kasugamicina	0.3 mL L ⁻¹
T10	Amonio cuaternario, CuSO ₄ ·5H ₂ O	1 mL L ⁻¹
T11	Ácido oxolínico	1 g L ⁻¹
Control negativo	Agua destilada	1 mL L ⁻¹

251 *El ingrediente activo se indica únicamente con fines descriptivos según la etiqueta del
252 producto comercial; los ensayos se realizaron utilizando las formulaciones comerciales.

253 *Las concentraciones evaluadas están en función de la dosis comercial establecida por
254 el fabricante. Se prepararon en relación v/v o p/v según la naturaleza del producto
255 evaluado.

256
257
258 **2.7. Respuesta dosis-respuesta para estimar concentración efectiva media (EC50)**

259 En base a los resultados del ensayo de sensibilidad, se seleccionaron los tres tratamientos que
260 presentaron los mayores valores de halo neto de inhibición (mm).

261 Estos productos fueron evaluados mediante el método de difusión de agar por pozos en medio
262 Müller-Hinton siguiendo el mismo procedimiento experimental descrito previamente para el
263 ensayo de sensibilidad, ajustando únicamente las concentraciones del producto comercial
264 aplicado.

265 Para cada producto se prepararon seis concentraciones; 0x, 0.5x, 1x, 1.5x, 2x y 4x definidos en
266 función de la dosis de aplicación agrícola con el objetivo de cubrir un rango inferior y superior a
267 la dosis de uso en campo (Ritz *et al.*, 2015).

268 El efecto antibacteriano se cuantificó mediante el halo neto de inhibición (mm) en diferentes
269 concentraciones con el fin de construir una curva dosis – respuesta para cada producto. A partir
270 de las curvas, se seleccionó el producto con mayor eficacia inhibitorio relativo entre los
271 tratamientos evaluados y se estimó la concentración efectiva media (EC50).

272 **2.8. Análisis estadístico**

273 Para los análisis *in vitro* de sensibilidad se empleó un diseño completamente al azar (DCA), en
274 la cual cada tratamiento correspondió a los once productos comerciales evaluados a la dosis
275 recomendada por el fabricante para uso agrícola, incluyendo un control negativo y cuatro
276 repeticiones por tratamiento. Cada unidad experimental estuvo conformada por una caja Petri
277 con medio Müller-Hinton inoculada con *Agrobacterium radiobacter* y los respectivos pozos con
278 cada tratamiento incluyendo el control negativo.

279 A los datos obtenidos en forma de diámetro de halos de inhibición (mm) se les evaluó los
280 supuestos de normalidad mediante la prueba Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas
281 mediante la prueba de Levene. Los datos no presentaron una distribución normal, por lo cual se
282 realizó un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución Gamma con función de enlace
283 logarítmica. Para ajustar el modelo se añadió una constante (0.01) a los datos (Dunn and Smith,
284 2018).

285 La significancia entre tratamientos se evaluó mediante un análisis de devianza, y las
286 comparaciones múltiples se realizaron con el paquete estadístico emmeans, aplicando un ajuste
287 de Tukey.

Comentado [LTDM1]: citar

288 Para la construcción de la curva dosis – respuesta se utilizó la respuesta el halo neto de inhibición
289 (mm) de los tres productos con mayor inhibición. Para cada tratamiento se ajustó un modelo de
290 regresión no lineal tipo log-logístico de cuatro parámetros (LL.4) utilizando el paquete *drc* en el
291 software estadístico R versión 4.5.2. Este modelo es ampliamente empleado en estudios de
292 bioensayos para describir mecanismos de dosis – dependientes de naturaleza sigmoideal y
293 estimar parámetros como la concentración efectiva media (EC50) (Ritz *et al.*, 2015).

294 Las EC50 se estimó con un intervalo de confianza del 95% mediante el método delta, con un
295 nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

296 **2.9. Uso de herramientas de inteligencia artificial**

297 Durante la elaboración del manuscrito se utilizaron herramientas de inteligencia artificial, como
298 ChatGTP (OpenAI) y Consensus, como apoyo para la búsqueda de literatura científica
299 complementaria, mejora de la redacción del texto y la traducción de algunos contenidos.

300 La recopilación de literatura base, el análisis crítico de la información científica, la interpretación
301 de resultados y las conclusiones del estudio fueron realizados y verificados por los autores.

302 **3. Resultados y Discusión**

303 **3.1. Sintomatología y caracterización macroscópica**

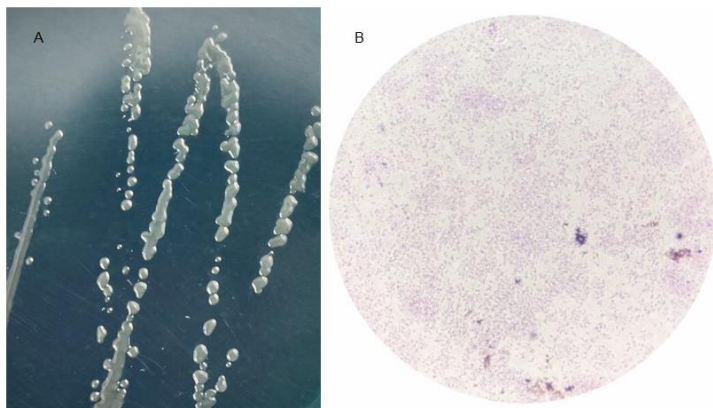
304 Las plantas de *Gypsophila paniculata* L. evaluadas presentaron proliferaciones tumorales
305 ubicadas en la zona del cuello y raíz pivotante. Las agallas mostraron un crecimiento irregular,
306 consistencia firme y coloración marrón oscura (Figura 1A-B), características que coinciden con
307 lo reportado en la literatura (Escobar and Dandekar, 2003), además se observó deformación del
308 cuello y reducción del sistema radicular, observándose ausencia de raíces en la zona afectada,
309 características relacionadas con la transferencia del T-DNA hacia las células vegetales, lo que
310 provoca una hiperplasia e hipertrofia celular (Bozkurt *et al.*, 2023)



311

312 **Figura 1.** Sintomatología de agalla del cuello en plantas madre de *Gypsophila paniculata*. (A)
313 Proliferación tumoral del cuello. (B) Visión general de las plantas afectadas evidenciando
314 compromiso radicular.

315 A partir del tejido tumoral se obtuvo un aislamiento bacteriano que en medio D1 selectivo en el
316 cual se evidenció colonias mucosas circulares, convexas con coloración crema amarillenta
317 (Figura 2). Las pruebas bioquímicas (Tabla 2) revelaron bacilos Gram negativos y una reacción
318 positiva a catalasa y oxidasa lo que refuerza compatibilidad con *Agrobacterium*, de acuerdo a las
319 descritas previamente en *G. paniculata* por Chalupowicz et al. (2006).



320

321 **Figura 2.** Caracterización morfológica y microscópica del aislamiento bacteriano obtenido del
322 tejido tumoral de *Gypsophila paniculata*. (A) Colonias en medio D1. (B) Tinción Gram.

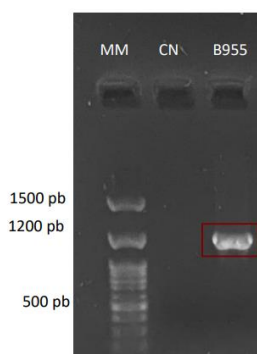
323 **Tabla 2.** Características morfológicas y bioquímicas del aislamiento bacteriano del tejido
324 tumoral en *Gypsophila paniculata* L.

Característica	Resultado
Morfología en D1	Colonias circulares, convexas, mucosas, color crema amarillento
Tinción Gram	Bacilos Gram negativos
Catalasa	Positiva
Oxidasa	Positiva

325

326 3.2. Identificación molecular

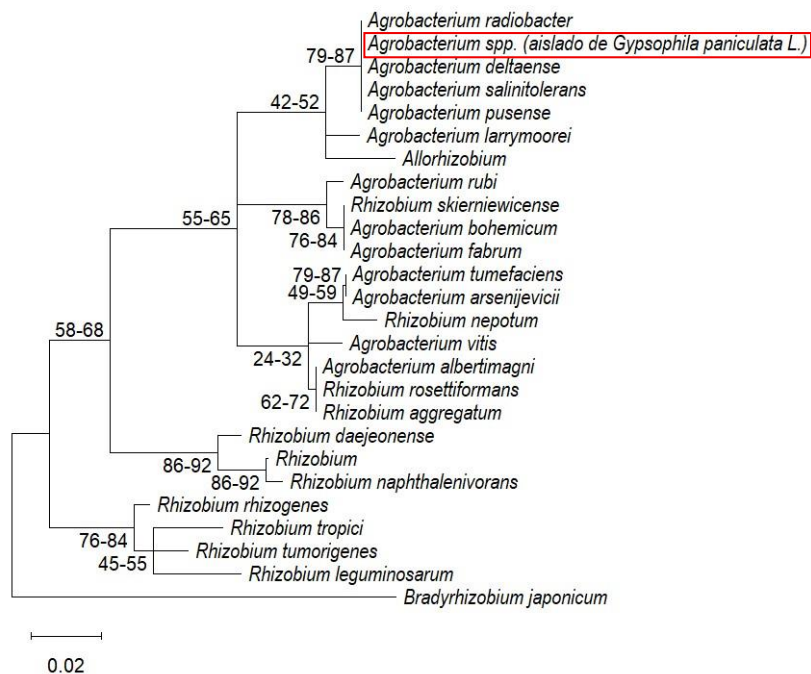
327 La amplificación del gen 16S rRNA mediante los cebadores 27F/1492R evidenció en la
328 electroforesis en gel de agarosa al 1% un fragmento bien definido e intenso de 1.302 pb (Figura
329 3) y la usencia de productos inespecíficos. Resultados que respaldan a los de Bozkurt et al.
330 (2023) y Khdeer and Gergees (2025) los cuales obtuvieron fragmentos de 1.450 y 1400 pb
331 respectivamente al amplificar el gen 16S rRNA, determinando que este gen tiene regiones
332 altamente conservadas que permite diferenciar a nivel de género de una amplia diversidad
333 taxonómica de eubacterias (Weisburg *et al.*, 1991).



334

335 **Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación del gen 16S
336 rRNA obtenido por PCR con los cebadores universales 27F/1492R. MM: marcador de peso
337 molecular, CN: control negativo.

338 El árbol filogenético (Figura 4) obtenido mostró que el aislamiento denominado en la investigación
 339 como *Agrobacterium* sp. (*Gypsophila* isolate) se agrupa dentro del clado correspondiente al
 340 complejo de especies *Agrobacterium*, presentando una estrecha relación filogenética con
 341 secuencias reportadas en el NCBI de *Agrobacterium radiobacter*, junto con otras especies
 342 relacionadas como *Agrobacterium deltaense*, *Agrobacterium salinitolerans*, *Agrobacterium*
 343 *pusense* y *Agrobacterium larrymoorei*, lo que evidencia su afinidad con este linaje dentro de la
 344 familia Rhizobiaceae.



345 0.02

346 **Figura 4.** Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA del aislamiento
 347 *Agrobacterium* spp. (aislado de *Gypsophila paniculata* L.) en relación con especies
 348 representativas del género *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Allorhizobium*. El árbol fue construido
 349 mediante el método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) utilizando el software
 350 MEGA. Los valores de Bootstrap obtenidos a partir de 1000 repeticiones se indican en los
 351 nodos. La barra de escala representa 0.02 sustituciones por sitio nucleotídico.

352 Este agrupamiento filogenético es consistente con los resultados obtenidos mediante el análisis
353 de similitud de secuencia con la base de datos GenBank mediante BLAST en la cual se mostró
354 una identidad del 99.92% con *Agrobacterium radiobacter*.

355 Sin embargo, recientes investigaciones han señalado que el gen 16S rRNA presenta una
356 capacidad limitada para identificar aislados bacterianos de *Agrobacterium* a nivel de especie,
357 debido a la alta conservación de esta región dentro del género, motivo por el cuál, la identificación
358 taxonómica a nivel de especie debe realizarse a través de múltiples genes constitutivos mediante
359 un enfoque Análisis de secuencia multilocus de los genes recA, atpD y rpoB (Flores-Félix *et al.*,
360 2020).

361 Desde un punto de vista taxonómico, el género *Agrobacterium* ha experimentado múltiples
362 revisiones sistemáticas en las últimas décadas. Recientemente se ha determinado que
363 *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium radiobacter* actualmente son sinónimos
364 taxonómicos, es decir, corresponden a la misma especie dentro del denominado *Agrobacterium*
365 *tumefaciens species complex* (Bozkurt *et al.*, 2023; Khdeer and Gergees, 2025). La diferencia
366 histórica entre ambas especies radicaba principalmente en su comportamiento biológico, las
367 bacterias capaces de inducir tumores se clasificaban como *A. tumefaciens* y las que no inducían
368 tumores pertenecía al género *A. radiobacter*, sin embargo, las últimas revisiones taxonómicas
369 han demostrado que la inducción de agallas no depende de la especie sino de la presencia o
370 ausencia de plásmidos tumorígenos (Ti) los cuales son capaces de transferir ADN a las células
371 vegetales para desencadenar la proliferación tumoral (Young *et al.*, 2001).

372 En este contexto, la identificación de *A. radiobacter* debe interpretarse dentro del complejo
373 *Agrobacterium tumefaciens species complex*, cuya capacidad tumorígena se determina por la
374 presencia de plásmidos Ti, cuya evaluación no fue parte del alcance de la presente investigación,
375 sin embargo, futuras investigaciones podrían abordar la detección de genes asociados a
376 plásmidos Ti con el objetivo de profundizar el potencial patogénico del agente causal asociado a
377 la formación de agalla. Por lo tanto, considerando las limitaciones del marcador 16S rRNA para
378 la resolución taxonómica dentro de este complejo, el aislamiento fue reportado en esta
379 investigación como *Agrobacterium* spp. (aislado de *Gypsophila paniculata* L.).

380 3.3. Análisis de sensibilidad bacteriana

381 Los tratamientos comerciales evaluados mostraron diversos niveles de inhibición en el
 382 crecimiento de *Agrobacterium* spp. (aislado de *Gypsophila paniculata* L.) bajo condiciones *in*
 383 *vitro*, las cuales se evidencian en la longitud del halo promedio (Tabla 3).

384 **Tabla 3.** Respuesta inhibitoria del aislado bacteriano frente a tratamientos comerciales
 385 expresada como halo de neto promedio (mm ± EE).

Tratamiento	Ingrediente activo	Halo inhibición (mm) ± EE	Grupos estadístico
T4	Sulfato de gentamicina, Clorhidrato de oxitetraciclina	33.38 ± 0.53	a
T3	Estreptomina, Oxitetraciclina	24.25 ± 0.53	a
T10	Amonio cuaternario, CuSO ₄ ·5H ₂ O	3.25 ± 0.53	b
T7	Amonio cuaternario	1.63 ± 0.53	b
T1	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00 ± 0.53	c
T2	Mancozeb, Cu ²⁺	0.00 ± 0.53	c
T5	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00 ± 0.53	c
T6	Kasugamicina	0.00 ± 0.53	c
T8	72.5% extracto de Larrea tridentata	0.00 ± 0.53	c
T9	Kasugamicina	0.00 ± 0.53	c
T11	Ácido oxalínico	0.00 ± 0.53	c

386 **Nota.** Los valores expresados corresponden a la media ± error estándar (n = 4).

387 La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk indicaron que los datos evaluados no siguen una
 388 distribución normal ($W = 0.55182$; $p = 2.19 \times 10^{-10}$), siendo este valor de p inferior al nivel de
 389 significancia ($p < 0.05$). De igual manera, la homogeneidad de varianzas entre tratamientos se
 390 evaluó mediante la prueba de Levene, evidenciándose que el valor p de 0.00226 es menor al

391 nivel de significancia ($p < 0.05$), por lo cual no existe homogeneidad, las varianzas entre
392 tratamientos son diferentes.

393 Como los datos no siguen una distribución normal se realizó el análisis de devianza del modelo
394 lineal generalizado (GLM) con distribución Gamma y enlace logarítmico lo cual evidenció una
395 diferencia significativa de los tratamientos sobre la inhibición bacteriana en forma de halo ($X^2 =$
396 343.96 ; $gl = 10$; $p < 2.2 \times 10^{-16}$). Las comparaciones múltiples realizadas mediante emmeans con
397 ajuste de Tukey permitieron identificar diferencias significativas entre tratamientos, estableciendo
398 que el tratamiento T4 presentó mayor halo neto de inhibición promedio (33.38 ± 0.85 mm),
399 seguido del T3 (24.25 ± 0.60 mm), el T10 (3.25 ± 0.48 mm) y T7 (1.63 ± 0.13 mm) presentó una
400 menor inhibición (Tabla 3). En contraste, el resto de tratamientos no presentaron actividad
401 inhibitoria bajo las condiciones *in vitro*.

402 La mayor respuesta inhibitoria del T4 y el T3 se atribuye a la presencia de antibióticos de amplio
403 espectro en su composición química como gentamicina, estreptomycin y oxitetraciclina, los
404 cuales son ampliamente utilizados para el control de bacterias fitopatógenas porque interfieren
405 en la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, proceso esencial para asegurar la supervivencia de
406 las células bacterianas (McManus *et al.*, 2002). En el caso de aminoglucósidos, la estreptomycin
407 y gentamicina se unen de manera irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano
408 provocando errores en la traducción proteica, mientras que las tetraciclinas como a oxitetraciclina
409 se unen reversiblemente al ribosoma bacteriano bloqueando la incorporación de aminoácidos
410 durante la traducción, es decir, inhiben la síntesis proteica (Van Hoek *et al.*, 2011; Verhaegen *et*
411 *al.*, 2023). Estos resultados concuerdan a los obtenidos por McManus *et al.* (2002) donde
412 reportan la eficacia de antibióticos como estreptomycin y oxitetraciclina para el manejo de
413 bacterias Gram negativas debido a su capacidad para penetrar la envoltura celular bacteriana e
414 inhibir los procesos metabólicos mencionados. Asimismo, el tratamiento T7 mostró una actividad
415 inhibitoria limitada, esto se debe a que los compuestos a base de amonio cuaternario actúan
416 principalmente como desinfectantes de contacto porque alteran la permeabilidad de la membrana
417 celular, sin embargo, su acción es más efectiva en condiciones de contacto directo que en
418 sistemas de difusión en agar, es decir, el amonio cuaternario necesita entrar en contacto físico
419 con la bacteria (Salah, Parkin and Allan, 2021).

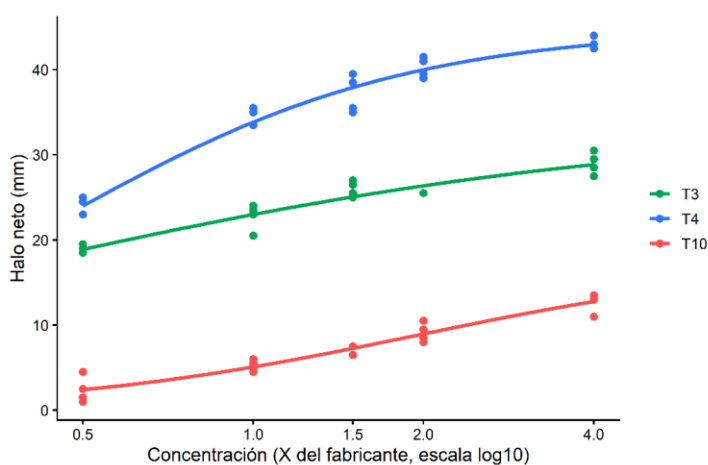
420 Por otro lado, los tratamientos en base a kasugamicina, ácido oxolínico y compuestos cúpricos
421 no mostraron actividad inhibitoria, lo cual se relaciona a variaciones en la susceptibilidad
422 bacteriana frente a estos antibióticos. Se ha documentado la presencia de genes de resistencia
423 a antibióticos agrícolas en bacterias fitopatógenas, especialmente Gram negativas de los
424 géneros, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Agrobacterium* (McManus *et al.*, 2002;
425 Partridge *et al.*, 2018). Es importante considerar que el aislado bacteriano fue recuperado de
426 tejidos vegetales expuestos a compuestos antibacterianos en sistemas productivos, lo cual
427 puede haber contribuido a una posible resistencia en evaluaciones *in vitro*. Asimismo, la limitada
428 formación de halos podría estar relacionada con la difusión de los compuestos en el agar, la cual
429 depende de las propiedades físico químicas como el peso molecular y la solubilidad; en este
430 contexto, kasugamicina presenta un peso molecular de 379.4 g mol⁻¹, sulfato de gentamicina
431 entre 477 a 575 g mol⁻¹, y el ácido oxolínico de 261.3 g mol⁻¹, características que pueden influir
432 en su coeficiente de difusión en el agar ya que se ha reportado que compuestos con pesos
433 moleculares cercanos o superiores a 400 – 500 g mol⁻¹ presentan movilidad limitada en medios
434 sólidos, lo que puede ser traducido en ausencia de halos de inhibición (Balouiri, Sadiki and
435 Ibnsouda, 2016).

436 Finalmente, los tratamientos basados en compuestos cúpricos tampoco evidenciaron inhibición,
437 lo cual contrasta con diversos reportes que destacan la acción del cobre para el control de
438 enfermedades bacterianas en sistemas agrícolas (Lamichhane *et al.*, 2018). El proceso
439 antimicrobiano de estos compuestos se asocia a la liberación de iones Cu²⁺ y su interacción con
440 componentes celulares bacterianos, sin embargo, en ensayos *in vitro* en medios sólidos, como
441 el agar, la eficacia de estos compuestos puede verse limitada debió a su baja capacidad de
442 difusión, reduciendo la formación de halos de inhibición (Yu *et al.*, 2023).

443 **3.4. Análisis dosis – respuesta y estimación de la EC50 de los tratamientos con mayor** 444 **actividad inhibitoria**

445 Los tres tratamientos con mayor actividad antibacteriana fueron evaluados en relación - dosis
446 respuesta frente al aislado bacteriano obtenido, en la cual, se evidenció una relación
447 directamente proporcional entre el halo de inhibición y la concentración aplicada.

448 Las curvas dosis – respuesta se representaron mediante un modelo matemático en función log -
 449 logística de cuatro parámetros (LL.4). En la Figura 5 se observa que la relación entre la
 450 concentración y el halo de inhibición fue sigmoïdal, con diferencias entre la pendiente y el nivel
 451 máximo de inhibición de los tratamientos. La tendencia observada en las curvas dosis –
 452 respuesta evidencian una relación positiva entre la concentración del compuesto y el diámetro
 453 del halo de inhibición.



454

455 **Figura 5.** Curvas dosis – respuestas de los tratamientos T3, T4 y T10 frente a *Agrobacterium*
 456 sp. (*Gypsophila isolate*), ajustados a un modelo log-logístico (LL.4).

457 La estimación de la concentración efectiva media (EC50) confirmó diferencias en la potencia
 458 entre tratamientos (Tabla 4). El T3 presentó la menor EC50 de 0.353 g L⁻¹, seguida de T4 con
 459 0.453 g L⁻¹ y T10 con 1.935 g L⁻¹, lo que indica que el T3 con ingrediente activo de Oxitetraciclina
 460 y Estreptomycin, requiere una concentración menor para alcanzar el 50% del efecto máximo y,
 461 por ende, exhibe una mayor potencia inhibitoria.

462 **Tabla 4.** Concentración efectiva media (EC50) estimada frente *Agrobacterium* spp. (aislado de
 463 *Gypsophila paniculata* L.).

Tratamiento	Valor de inhibición (mm)	EC50	Error estándar	IC 95% (LI – LS)
-------------	--------------------------	------	----------------	------------------

T3	24.25 ± 0.60	0.353	0.072	0.204 – 0.502
T4	33.38 ± 0.85	0.453	0.022	0.406 – 0.500
T10	3.25 ± 0.48	1.935	0.599	0.685 – 3.185

464 **Nota.** EC50: concentración efectiva media. LI y LS: límite inferior y superior a un intervalo de
465 confianza al 95%

466 Al comparar estos resultados con investigaciones anteriores se observa que bacterias
467 pertenecientes al género *Agrobacterium* presentan una sensibilidad a antibióticos del grupo de
468 las tetraciclinas. (Li *et al.*, 2019) reporta una concentración inhibitoria mínima de 0.13 µg mL⁻¹ de
469 oxitetraciclina para *Agrobacterium tumefaciens*, es decir, la concentración suficiente para inhibir
470 completamente el crecimiento bacteriano, en contraste, la presente investigación requirió
471 concentraciones mayores para alcanzar el 50% de inhibición, con valores de EC50 de 0.353 a
472 0.453 g L⁻¹. Esta diferencia podría revelar una menor sensibilidad del aislamiento evaluado,
473 Sundin and Wang (2018) ha documentado que bacterias fitopatógenas presentan distintos niveles
474 de sensibilidad a antibióticos del grupo de tetraciclina debido a la presencia de mecanismos de
475 resistencia asociados a genes tet asociados a bombas de flujo y proteínas de protección
476 ribosomal los que reducen la acumulación intracelular del antibiótico. Esta variabilidad en
477 respuesta a antibióticos también ha sido sustentada por Sundin and Wang (2018) en bacterias
478 fitopatógenas Gram negativas, donde explica los diferentes rangos de susceptibilidad a
479 tetraciclinas y aminoglucósidos entre cepas.

480 Al comparar los tratamientos más prometedores, se evidencia que T3 presentó mayor potencia
481 antibacteriana seguido del T4. Ambos tratamientos incluyeron en sus formulaciones
482 oxitetraciclina por lo que las diferencias expuestas en la investigación pueden atribuirse
483 principalmente al aminoglucósido presente en cada combinación. En este contexto, la
484 estreptomycinina ha sido uno de los antibióticos más relevantes en el manejo fitosanitarios de
485 enfermedades bacteriana fitopatógenas Gram negativas como *Erwinia*, *Pseudomonas*,
486 *Xanthomonas* y *Agrobacterium* (McManus *et al.*, 2002), mientras que la gentamicina aunque
487 pertenece al mismo grupo de los aminoglucósidos, la investigación sobre su aplicación en
488 fitopatología ha sido más limitada porque su aplicación principalmente es en medicina humana y
489 veterinaria (Lamichhane *et al.*, 2018) .

490 En conjunto, los resultados evidencian que tratamientos basados en antibióticos presentaron
491 mayor potencial antibacteriano en comparación con productos alterno, como en caso de amonio
492 cuaternario, el T10 que presentó un EC50 mayor, comportamiento asociado a la naturaleza de
493 este compuesto, actuando principalmente como desinfectante, cuya eficacia depende del tiempo
494 de exposición sobre las células bacterianas (Copes and Ojiambo, 2023).

495 En este contexto, los resultados aportan evidencia experimental sobre la susceptibilidad del
496 aislamiento evaluado y contribuyen a identificar alternativas con mayor potencial antibacteriano
497 para su manejo en sistemas productivos.

498 **4. Conclusiones**

499 El análisis molecular de la secuencia del gen 16S rRNA mediante la construcción del árbol
500 filogenético permitieron ubicar al aislado bacteriano obtenido de las agallas en *Gypsophila*
501 *paniculata* L. dentro del género *Agrobacterium*, mostrando una alta similitud con la especie
502 *Agrobacterium radiobacter*. Sin embargo, debido a la alta conservación de gen 16S RNA entre
503 especies del género el aislamiento fue reportado como *Agrobacterium* spp. (aislado de
504 *Gypsophila paniculata* L.).

505 El método de difusión en agar presenta limitaciones asociadas a la capacidad de difusión de los
506 compuestos en el medio de cultivo. Los ensayos *in vitro* mostraron diferencias significativas en
507 la actividad inhibitoria frente a *Agrobacterium* spp., destacándose T4 (gentamicina +
508 oxitetraciclina) y T3 (estreptomycin + oxitetraciclina) con los mayores halos de inhibición. No
509 obstante, estos resultados deben validarse en condiciones de campo.

510 El análisis de las curvas dosis – respuestas evidenció diferencias significativas en la eficacia
511 antibacteriana de los tratamientos evaluados. El tratamiento T3, con ingrediente activo
512 estreptomycin y oxitetraciclina presentó el menor valor de la concentración efectiva media
513 (EC50), 0.353 g L⁻¹, lo que indica una mayor potencia inhibitoria del producto químico frente al
514 agente bacteriano. En términos comparativos, el T3 fue el tratamiento más eficaz, seguido por el
515 T4, y el T10 presentó menor eficacia de inhibición.

516 **Agradecimientos**

517 Un especial agradecimiento a Florisol & Co. por el apoyo institucional y las facilidades brindadas
518 para el desarrollo de la fase experimental.

Comentado [LTD2]: debería indicar cuales son los mejores y cuales son los peores y porque

519 **Referencias**

- 520 Aguilar-Ancocota, R. and Mattos-Calderon, L. (2020) "Etiology and control of *Gypsophila*
521 *paniculata* L. stem base rot in the Caraz Valley, Ancash," *Peruvian Journal of Agronomy*,
522 4(1), p. 17. Available at: <https://doi.org/10.21704/pja.v4i1.1461>.
- 523 Arunasri, P., Vineela, D. and Krishna, V. (2025) "Agrobacterium: An Economically Significant
524 Plant Pathogen," *Journal of Scientific Research and Reports*, 31(6), pp. 464–477.
525 Available at: <https://doi.org/10.9734/jsrr/2025/v31i63144>.
- 526 Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S.K. (2016) "Methods for in vitro evaluating antimicrobial
527 activity: A review," *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Xi'an Jiaotong University, pp. 71–
528 79. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- 529 Balouiri, M., Sadiki, M. and Koraichi, S. (2015) "Methods for in vitro evaluating antimicrobial
530 activity: A review," *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), pp. 71–79.
- 531 Banco Central del Ecuador (2025) *Balanza comercial (Ene–Dic 2025)*. Available at:
532 <https://www.bce.fin.ec/estadisticas-economicas/> (Accessed: February 20, 2026).
- 533 Ben-Yephet, Y. *et al.* (2006) "Effect of nutrition on deformation disease in *Gypsophila paniculata*,
534 mother plants," *Phytopathology*, 96(7), pp. 771–776. Available at:
535 <https://doi.org/10.1094/PHTO-96-0771>.
- 536 Bozkurt, I.A. *et al.* (2023) "Molecular characterization of stem gall disease caused by
537 *Agrobacterium tumefaciens* (= *Agrobacterium biovar 1*) on Citrus trees as a new host, in
538 the Eastern Mediterranean region of Turkey," *Journal of Plant Diseases and Protection*,
539 130(1), pp. 13–21. Available at: <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00678-5>.
- 540 Chalupowicz, L. *et al.* (2006) "Comparative anatomy of gall development on *Gypsophila*
541 *paniculata* induced by bacteria with different mechanisms of pathogenicity," *Planta*,
542 224(2), pp. 429–437. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0229-9>.
- 543 Copes, W.E. and Ojiambo, P.S. (2023) "A Systematic Review and Quantitative Synthesis of the
544 Efficacy of Quaternary Ammonium Compounds in Disinfesting Nonfungal Plant
545 Pathogens," *Plant Disease*, 107(10), pp. 3176–3187. Available at:
546 <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-21-2751-RE>.

547 Farri, K. and Khezri, M. (2021) "Integrate management method of plants crown gall disease,"
548 *Plant Pathology Science*, 10(2), p. 2021. Available at:
549 <https://doi.org/10.2982/PPS.10.2.116>.

550 Faust, J.E., Dole, J.M. and Lopez, R.G. (2017) *The Floriculture Vegetative Cutting Industry*,
551 *Horticultural Reviews*. Available at: <https://doi.org/doi.org/10.1002/9781119281269.ch3>.

552 Filiz Doksöz, S. and Bozkurt, İ.A. (2020) "A new and simple pathogenicity test using carrot slices
553 for *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, causal disease agent of olive knot," *Journal*
554 *of Plant Pathology*, 102(4), pp. 1173–1177. Available at: [https://doi.org/10.1007/s42161-](https://doi.org/10.1007/s42161-020-00601-7)
555 [020-00601-7](https://doi.org/10.1007/s42161-020-00601-7).

556 Flores-Félix, J.D. *et al.* (2020) "History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium*,"
557 *Systematic and Applied Microbiology*. Elsevier GmbH. Available at:
558 <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126046>.

559 Van Hoek, A.H.A.M. *et al.* (2011) "Acquired antibiotic resistance genes: An overview," *Frontiers*
560 *in Microbiology*. Frontiers Research Foundation. Available at:
561 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>.

562 Huilca-Mejia, V. *et al.* (2024) "Disease Note Diseases Caused by Fungi and Fungus-Like
563 Organisms First Report of *Fusarium triseptatum* Causing Crown Rot on *Gypsophila*
564 *paniculata* in Pichincha, Ecuador," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108, p. 3022. Available
565 at: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-25>.

566 Iličić, R. *et al.* (2025) "Isolation and characterization of *Agrobacterium vacciniicorymbosi* sp. nov.
567 originating from crown galls in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in Serbia," *Scientific*
568 *Reports*, 15(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-23123-7>.

569 Khdeer, A.Q.S. and Gergees, R.N. (2025) "Genetic diagnosis of phytopathogenic *Agrobacterium*
570 *tumefaciens* isolates from *Cydonia oblonga* trees by PCR using 16SrRNA primers,"
571 *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 33(1). Available at:
572 <https://doi.org/10.15421/0225005>.

573 Lamichhane, J.R. *et al.* (2018) "Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in
574 agriculture. A review," *Agronomy for Sustainable Development*. Springer-Verlag France.
575 Available at: <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>.

576 Li, J. *et al.* (2019) "The in Planta Effective Concentration of Oxytetracycline against 'Candidatus
577 Liberibacter asiaticus' for Suppression of Citrus Huanglongbing," *Phytopathology*,
578 109(12), pp. 2046–2054. Available at: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-19-0198-R>.

579 Li, Y. *et al.* (2025) "Biocontrol of Crown Gall Disease of Cherry Trees by *Bacillus velezensis*,"
580 *Plants*, 14(3), p. 475. Available at: <https://doi.org/10.3390/plants14030475>.

581 McManus, P.S. *et al.* (2002) "Antibiotic use in plant agriculture," *Annual Review of*
582 *Phytopathology*, pp. 443–465. Available at:
583 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927>.

584 Mohamad, A.Y. *et al.* (2025) "Effect of active and passive modified atmosphere packaging on
585 extending the postharvest life of *Gypsophila paniculata* L. (Bristol Fairy) flowers," *Journal*
586 *of Applied Horticulture*, 27(2), pp. 327–333. Available at:
587 <https://doi.org/10.37855/jah.2025.v27i02.61>.

588 Mohamed, S.M. *et al.* (2023) "Optimizing Medium Composition and Environmental Culture
589 Condition Enhances Antioxidant Enzymes, Recovers *Gypsophila paniculata* L.
590 Hyperhydric Shoots and Improves Rooting In Vitro," *Plants*, 12(2). Available at:
591 <https://doi.org/10.3390/plants12020306>.

592 Partridge, S.R. *et al.* (2018) "Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance,"
593 *Clinical Microbiology Reviews*, 32. Available at: <http://cmr.asm.org/>.

594 PRO ECUADOR (2024) *Monitoreo de exportaciones-sectores (Ene-Dic 2024)*. Quito.

595 Qian, Q. *et al.* (2025) "Comparison of root and inter-root soil microbial communities of plants
596 infected with crown gall disease of YinHong plum (*Prunus salicina* Lindl.) based on
597 metagenomes," *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 140. Available at:
598 <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2025.102874>.

599 Ritz, C. *et al.* (2015) "Dose-response analysis using R," *PLoS ONE*, 12(12).

600 Salah, I., Parkin, I.P. and Allan, E. (2021) "Copper as an antimicrobial agent: Recent advances,"
601 *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, pp. 18179–18186. Available at:
602 <https://doi.org/10.1039/d1ra02149d>.

603 Sawwan, J.S. *et al.* (1993) *Propagation of Gypsophila paniculata "Bristol Fairy" by stem-tip*
604 *cuttings, Source*.

605 Selim, R.E., Youssef, H.F.B. and Khalil, M.S. (2025) "Efficacy of ascorbic acid, citric acid and
606 *Thevetia* sp. extract against *Agrobacterium tumefaciens* and *Meloidogyne incognita*
607 infecting guava," *Scientific reports*, 15(1), p. 35405. Available at:
608 <https://doi.org/10.1038/s41598-025-21658-3>.

609 Sundin, G.W. and Wang, N. (2018) "Antibiotic Resistance in Plant-Pathogenic Bacteria," *Annual*
610 *Review of Phytopathology*, 12. Available at: [https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417)
611 [080417](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417).

612 Valgas, C. *et al.* (2007) "Screening methods to determine antibacterial activity of naturak
613 products," *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, pp. 369–380.

614 Verhaegen, M. *et al.* (2023) "On the use of antibiotics to control plant pathogenic bacteria: a
615 genetic and genomic perspective," *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media SA.
616 Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1221478>.

617 Weisburg, W.G. *et al.* (1991) *16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study*,
618 *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. Available at: <https://journals.asm.org/journal/jb>.

619 Wolcan, S.M. *et al.* (2018) "Diseases of *Gypsophila*," in R.J. MacGovern and W.H. Elmer (eds.)
620 *Handbook of Florists Crops Diseases*. Springer International Publishing, pp. 561–582.
621 Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-39670-5_19.

622 Young, J. *et al.* (2001) "A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the
623 genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942," *International*
624 *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, pp. 89–103. Available at:
625 <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-89>.

626 Yu, Y. *et al.* (2023) "Double- or Triple-Tiered Protection: Prospects for the Sustainable Application
627 of Copper-Based Antimicrobial Compounds for Another Fourteen Decades," *International*
628 *Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
629 Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms241310893>.

630