



# ESTUDIO DE LA EFICACIA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS Y AGENTES BACTERICIDAS APLICADOS CONTRA *XANTHOMONAS AXONOPODIS*, EL AGENTE CAUSANTE DEL TIZÓN DEL FRIJOL

## SCRUTINIZING THE EFFICACY OF PLANT EXTRACTS AND BACTERICIDAL AGENTS APPLIED AGAINST *XANTHOMONAS AXONOPODIS*, THE CAUSATIVE AGENT OF BEAN BLIGHT

Elias Mjaika Ndifon\*

Alex Ekwueme Federal University Ndufu-Alike, Faculty of Agriculture, Department of Crop Science, PMB 1010 Abakaliki, Nigeria. [<https://ror.org/04thacr56>]

\*Autor para correspondencia: emndi4nn@yahoo.com

Manuscrito recibido el 17 de enero de 2025. Aceptado, tras revisión el 30 de abril de 2025. Publicado el 1 de septiembre de 2025.

### Resumen

El frijol común (un cultivo básico de semilla y una leguminosa importante) es susceptible al tizón del frijol (*Xanthomonas axonopodis*). El estudio controló el tizón del frijol en el laboratorio y en el invernadero utilizando productos botánicos y bactericidas. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y replicado y se registró el porcentaje de germinación, el número de hojas, la longitud del brote, el peso de la semilla, el peso fresco del brote, la incidencia de la enfermedad y la severidad. Por medio del *in vitro*, el control del patógeno dependió de la aplicación de antibióticos: tetraciclina, cefalosporina, lincomicina y eritromicina en orden de eficacia, dando un 52,2–100% de inhibición del patógeno. Los extractos acuosos *in vitro* de *Eucalyptus globulus*, *Aframomum melegueta*, *Ricinus communis* y *Acmella oleracea* inhibieron eficazmente el 25,0–62,5% del crecimiento bacteriano. En el invernadero, los efectos de los bactericidas químicos en las especies de *Xanthomonas* revelaron una diferencia significativa en el número de hojas a los 49 días después de la inoculación (DDI). También la inhibición porcentual de las especies de *Xanthomonas* por los bactericidas osciló entre el 46,2% y el 97,5% entre los 6 y los 56 DDI. La longitud de los brotes fue significativamente diferente bajo la influencia de los extractos vegetales a los 35 y 49 DDI. Los extractos vegetales causaron una inhibición porcentual del patógeno del 36,4% al 90,9% entre los 6 y los 56 DDI. Se requiere la formulación de aplicaciones agrícolas utilizando estos agentes de control.

**Palabras clave:** Bactericidas, tizón común del frijol, proteína vegetal, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas phaseoli*.

---

**Abstract**

Common bean (a major staple seed crop and legume) is susceptible to bean blight (*Xanthomonas axonopodis*). The study controlled bean blight in the laboratory and screen-house using botanicals and bactericides. Completely randomized and replicated design was used and recorded percentage germination, number of leaves, shoot length, seed weight, shoot fresh weight, disease incidence, and severity. *In vitro*, control of the pathogen depended on the application of antibiotics: tetracycline, cephalosporin, lincomycin, and erythromycin in order of efficacy, giving 52.2–100% inhibition of the pathogen. *In vitro*, aqueous extracts of *Eucalyptus globulus*, *Aframomum melegueta*, *Ricinus communis*, and *Acmeilla oleracea* effectively inhibited 25.0–62.5% of the bacterial growth. In screen-house, effects of chemical bactericides on *Xanthomonas* species revealed a significant difference in the number of leaves at 49 days after inoculation (DAI). Also, percentage inhibition of *Xanthomonas* species by the bactericides ranged from 46.2-97.5% from 6-56 DAI. Shoot lengths were significantly different under the influence of plant extracts at 35 DAI and 49 DAI. Plant extracts caused 36.4-90.9% percentage inhibition of the pathogen from 6-56 DAI. Formulation of agricultural applications using these control agents is required.

**Keywords:** Bactericides, common bean blight, plant protein, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas phaseoli*.

---

Forma sugerida de citar: Ndifon, E. Mjaika (2025). Estudio de la eficacia de los extractos de plantas y agentes bactericidas aplicados contra *Xanthomonas axonopodis*, el agente causante del tizón del frijol. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. Vol. 42(2):61-77. <https://doi.org/10.17163/lgr.n42.2025.04>.

---

IDs Orcid:

Elias Mjaika Ndifon: <https://orcid.org/0000-0001-6027-4714>

## 1 Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) es una de las leguminosas más importantes a nivel mundial. Sus formas cultivadas incluyen el frijol francés, frijol blanco, frijol para ensalada, frijol tierno, frijol de vaina y frijol rojo. Entre 2019 y 2022, la producción de frijol común seco alcanzó aproximadamente los 28 millones de toneladas (Kadege et al., 2022; FAOSTAT, 2024). La FAO (1999) y Porch et al. (2013) reportaron que el valor de mercado del frijol supera al de todas las demás especies de leguminosas. Aunque los datos de rendimiento siguen siendo inconsistentes en África, el continente representa aproximadamente 7,8 millones de hectáreas -es decir, cerca del 25%- del área global cultivada con frijol.

El frijol constituye un alimento básico para millones de hogares en África. En África subsahariana -particularmente en países del este como Etiopía, Kenia, Burundi, Tanzania y Uganda-, así como en África occidental, especialmente en Nigeria, el frijol representa una fuente importante de ingresos y seguridad alimentaria (Howard et al., 2005; CABI, 2022; FAO, 1999; Kadege et al., 2022). El frijol se cultiva en todo el mundo no solo por sus semillas y vainas comestibles, sino también por sus hojas y rastrojo, que se utilizan como forraje.

Desde el punto de vista nutricional, el frijol es rico en fibra dietética, proteínas, y vitaminas esenciales (por ejemplo, las vitaminas A y C) y minerales clave como hierro, zinc, cobre, potasio, calcio y magnesio, que aportan entre un 8 y 10% de proteínas por cada 100 g de consumo diario y es especialmente rico en aminoácidos esenciales, particularmente en lisina y triptófano, aunque presenta deficiencia de metionina. Además, contiene niveles mínimos de grasa y cantidades insignificantes de colesterol nocivo (CABI, 2022; Câmara et al., 2013; Chen et al., 2021).

Câmara et al. (2013) y Kadege et al. (2022) han clasificado al frijol como un alimento funcional debido a sus efectos beneficiosos sobre la salud humana. Esto se atribuye a su elevado contenido de compuestos fenólicos, almidones complejos, vitaminas y fructooligosacáridos, que contribuyen a la prevención y manejo de enfermedades cardiovasculares, diabetes y diversos tipos de cáncer. El frijol

puede conservarse mediante secado, cocción y enlatado, o bien ser procesado en forma de harinas alternativas libres de gluten.

No obstante, la producción de frijol se ve limitada por diversos factores, entre ellos las enfermedades, plagas de insectos, baja fertilidad del suelo (especialmente deficiencia de fósforo), estrés abiótico como la sequía, escasa adaptabilidad de las variedades introducidas, acceso restringido a insumos agrícolas y prácticas de manejo subóptimas (Kamani et al., 2005; Akibode and Maredia, 2011; Porch et al., 2013; Beebe et al., 2014; OECD, 2016; Mondo et al., 2019; Kadege et al., 2022).

La escaldadura bacteriana común -causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (familia Lysobacteraceae/Xanthomonadaceae)- se encuentra entre las cinco enfermedades bacterianas más severas que afectan al frijol. Este patógeno infecta el follaje, las vainas, las semillas y los tallos (ISTA, 2007; Muedi and Fourie, 2014; Chen et al., 2021). Según Karavina et al. (2011) y Manju et al. (2024), la severidad de la enfermedad alcanza su punto máximo a temperaturas entre 25 °C y 35 °C, especialmente bajo condiciones de alta pluviosidad y humedad relativa. Estos estudios estiman pérdidas de rendimiento de hasta un 40% bajo dichas condiciones.

Dada la magnitud de las pérdidas de rendimiento asociadas a esta enfermedad, los investigadores han aumentado los esfuerzos para desarrollar estrategias de manejo sostenibles. Chen et al. (2021) señalaron la escasez de opciones eficaces de control químico o biológico para enfermedades bacterianas, lo que limita a los agricultores al uso de prácticas culturales. Sin embargo, confirmaron la eficacia de fungicidas a base de cobre con propiedades bactericidas, estreptomycin, kasugamicina y fertilizantes foliares a base de manganeso en el control de infecciones bacterianas.

Karavina et al. (2011) y Muedi and Fourie (2014) destacaron la efectividad de los bactericidas a base de cobre -incluidos el oxocloruro de cobre, óxido de cobre, sulfato de cobre e hidróxido de cobre-, así como del dietilditiocarbamato de potasio, en el manejo de infecciones foliares bacterianas. Asimismo, los compuestos derivados de plantas como los aceites esenciales muestran un potencial para el control de

la escaldadura bacteriana. Aunque los antibióticos sintéticos como la estreptomycin y la kasugamicina pueden actuar exitosamente sobre patógenos externos, hasta el momento no se ha logrado erradicar *X. axonopodis* del interior de semillas infectadas.

Cámara et al. (2013) y Poch et al. (2013) han mencionado la escasa representación de investigaciones sobre el frijol común, particularmente en África, lo cual contribuye a los bajos rendimientos en la región a pesar de la importancia económica y nutricional del cultivo. En este contexto, el presente estudio evalúa rigurosamente la eficacia antimicrobiana de extractos vegetales seleccionados y compuestos bactericidas frente a *X. axonopodis*, con el objetivo de proponer soluciones de manejo rentables y ecológicamente sostenibles.

## 2 Materiales y Métodos

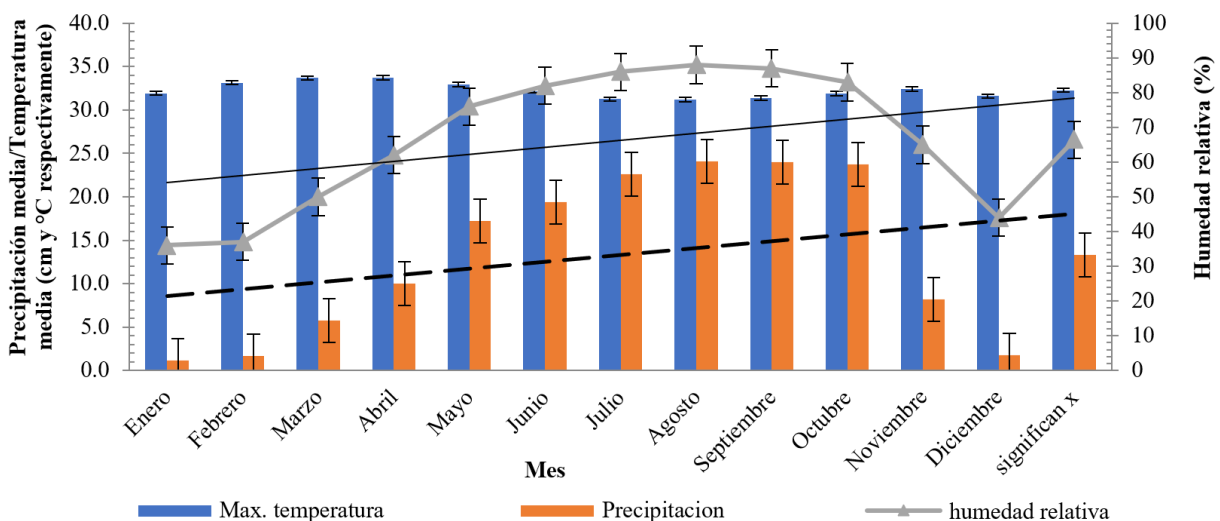
### 2.1 Área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en Nigeria, en la Universidad Federal Alex Ekwueme Ndufu-Alike, Abakaliki (6.069°N, 8.199°E). Las leguminosas como el frijol caupí, frijol común, frijol gandul, maní bambara, soya, frijol mungo, frijol espada, entre otras, se cultivan ampliamente en todas las zonas agroecológicas de África Occidental, incluida Nigeria.

Sin embargo, los rendimientos del frijol en la región suelen estar por debajo del promedio mundial debido a diversas limitaciones en la producción, entre las cuales destacan las plagas y enfermedades. Las condiciones ecológicas necesarias para el cultivo de frijol son similares a las requeridas por *Xanthomonas axonopodis* (Figura 1). Esto constituye un problema para el manejo de este patógeno.

### 2.2 Preparación de los extractos vegetales

Los órganos vegetales (como las semillas de *Ricinus communis*, flores de *Acmella oleracea*, resina de *Eucalyptus globulus* y semillas de *Aframomum melegueta*) utilizados para el control del tizón bacteriano del frijol se recolectaron en Abakaliki y sus alrededores. Estos materiales vegetales se lavaron con agua corriente y posteriormente se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos. Luego, se maceraron hasta obtener una pasta o polvo utilizando un mortero y una maja. Cada extracto contenía 165 g de tejido vegetal por litro de agua destilada estéril y se sometió a extracción durante 24 horas. Las plantas utilizadas fueron: ricino (*Ricinus communis*), planta del dolor de muelas (*Acmella oleracea*), eucalipto azul (*Eucalyptus globulus*) y pimienta de Guinea o grano del paraíso (*Aframomum melegueta*).



**Figura 1.** Patrones típicos de temperatura, humedad relativa y precipitación en los sitios de estudio en Abakaliki, estado de Ebonyi. Figura adaptada de Ndifon (2022).

## **2.3 Preparación de los extractos vegetales**

Las semillas y brotes de frijol rojo utilizados para el ensayo se obtuvieron inicialmente de Jos (en el estado de Plateau), Nigeria. Los órganos de la planta se desinfectaron superficialmente mediante hipoclorito de sodio al 1% durante dos minutos, y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril. Para el aislamiento del patógeno se empleó agar nutritivo autoclavado, enriquecido con fluconazol que contenía glucosa (1 g por litro), según el protocolo (Kado and Heskett, 1970). Se colocaron asépticamente tres semillas por caja de Petri sobre el medio de cultivo.

Las placas se incubaron a  $28\pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Los crecimientos bacterianos observados fueron subcultivados individualmente y examinados para verificar la similitud entre las colonias. Afortunadamente, solo se aisló un tipo de colonia bacteriana a partir de los tejidos del frijol. El subcultivo se continuó con el objetivo de purificar el aislamiento. El patógeno se conservó a  $4^\circ\text{C}$  y se utilizó posteriormente para su caracterización morfológica y bioquímica (Sinclair and Dhingra, 1995; Grimault et al., 2024).

## **2.4 Recuento microbiano total**

Se realizó una dilución seriada hasta  $1 \times 10^6$  del homogeneizado en tubos de ensayo estériles mediante el método de suspensión directa (Ordóñez et al., 2023). Se puso en un pipete un mililitro de la muestra de frijol diluida en cada caja de Petri marcada en serie.

Se utilizó agar nutritivo para el recuento total. Para el cultivo bacteriano se empleó el método de estriado en placa. La esterilización por autoclave se realizó a  $120^\circ\text{C}$ , 15 psi durante 15 minutos. Al finalizar la incubación, se contaron las colonias y se calcularon las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de suspensión. Este procedimiento permitió obtener una estimación precisa del recuento viable de UFC bacterianas.

## **2.5 Caracterización e identificación de los aislamientos bacterianos**

Para la caracterización e identificación del patógeno se recurrió a pruebas fenotípicas y bioquímicas (IS-

TA, 2007; Rajyalakshmi et al., 2016; Ordóñez et al., 2023; Grimault et al., 2024). Se recomienda emplear una combinación de pruebas para lograr una identificación más precisa. En este estudio se utilizaron opciones tanto fenotípicas como bioquímicas para la identificación del patógeno.

### **2.5.1 Tinción de Gram de los aislamientos bacterianos**

Se extendió una colonia bacteriana sobre un portaobjetos limpio y se flameó brevemente sobre un mechero de Benson. Se añadió solución acuosa de cristal violeta al 0,5% sobre la zona extendida durante 30 segundos y luego se lavó con agua durante un minuto. Posteriormente, se aplicó solución de yodo de Gram durante un minuto y se enjuagó con un frasco lavador. Se procedió a una decoloración rápida con etanol al 95%.

La preparación se tintó con safranina durante 10 segundos, se enjuagó nuevamente con el frasco lavador, se secó y se observó en el microscopio para evaluar la presencia de tinción bacteriana (Rajyalakshmi et al., 2016; Ordóñez et al., 2023).

### **2.5.2 Prueba de motilidad de los aislamientos bacterianos**

La prueba se llevó a cabo utilizando un caldo nutritivo + glucosa que actúa como medio semisólido. Este medio se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. El caldo se vertió en tubos de ensayo y se inoculó mediante la técnica de punción vertical con crecimiento bacteriano joven (cultivado durante 24 horas). La incubación se realizó a  $28\pm 2^\circ\text{C}$ . Se examinaron los tubos para observar el crecimiento y signos de motilidad. Si las bacterias son móviles, el crecimiento se dispersa lateralmente en el medio con el paso del tiempo tras la inoculación por punción.

### **2.5.3 Caracterización morfológica de los aislamientos bacterianos**

Las bacterias se sembraron por estriado sobre el medio respectivo y se incubaron a  $28\pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Al finalizar la incubación, se evaluaron las colonias en cuanto a las características morfológicas y culturales, incluyendo el tipo de margen, naturaleza de la superficie, textura, elevación, forma, color y grado de transparencia o translucidez de la co-

lonia (Wogu and Ofuase, 2014; Rajyalakshmi et al., 2016).

#### 2.5.4 Caracterización bioquímica de los aislamientos bacterianos

El aislamiento bacteriano se identificó mediante las siguientes pruebas bioquímicas: utilización de carbohidratos (empleando glucosa), catalasa, ureasa, esculina, consumo de oxígeno, producción de sulfuro de hidrógeno, hidrólisis de almidón, reducción de nitratos, oxidasa, prueba de KOH y ureasa (Saddler and Bradbury, 2005; Porch et al., 2013; Wogu and Ofuase, 2014; Rajyalakshmi et al., 2016; Grimault et al., 2024).

Las características morfológicas y bioquímicas del aislamiento revelaron que el patógeno corresponde a *X. axonopodis* (asociado al patovar *phaseoli* de acuerdo con la literatura especializada, manuales, resultados de patogenicidad y en contraste con otros agentes bacterianos probables en frijol) (Tabla 1). Se realizaron pruebas de patogenicidad *in vivo* con estos aislamientos, demostrando que el frijol rojo presenta alta susceptibilidad (Grimault et al., 2024).

#### 2.6 Preparación de la cepa bacteriana utilizada en los ensayos *in vitro* e *in vivo*

La escaldadura bacteriana del frijol o escaldadura común del frijol es causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin et al. (sinónimos: *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye; o *Xanthomonas phaseoli* pv. *fuscans* (Burkholder) Starr & Burkholder).

Se incubaron las placas en agar nutritivo a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Se realizó una dilución seriada hasta  $1 \times 10^6$  del cultivo homogeneizado en tubos de ensayo estériles. Se utilizó el estándar 0,5 de McFarland para preparar densidades de inóculo de  $1,0 \times 10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  mediante el método de suspensión directa en agua salina (con NaCl a  $8,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (Wogu and Ofuase, 2014; Ordóñez et al., 2023; Grimault et al., 2024).

### 2.7 Ensayos *in vitro*

#### 2.7.1 Evaluación de bactericidas contra *X. axonopodis*

Se evaluaron *in vitro* los patrones de resistencia a antibióticos y la actividad antimicrobiana de los aislamientos bacterianos mediante el uso de bactericidas químicos. Los antibióticos empleados incluyeron eritromicina, tetraciclina, cefalosporina y lincomicina (todos a una concentración de 500 mg de las formulaciones comerciales por litro) (Wogu and Ofuase, 2014; Rajyalakshmi et al., 2016; Ordóñez et al., 2023). Se incluyó un control negativo utilizando únicamente agua destilada estéril como placebo.

Se utilizó agar nutritivo enriquecido con dextrosa para esta prueba. La superficie del agar se cubrió completamente con el agente antibiótico empleando la técnica de extensión en placa. Las concentraciones utilizadas fueron del 0%, 50% y 100%. Se utilizó un sacabocados de 6 mm de diámetro para realizar asepticamente un orificio en el centro del agar, al cual se aplicaron 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de *X. axonopodis*.

El antibiótico se difundió en el agar inhibiendo el crecimiento del patógeno. La incubación se realizó a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Se observaron las placas en busca de zonas de inhibición; el diámetro (mm) se midió y registró utilizando un calibrador (Saddler and Bradbury, 2005; Mounyr et al., 2016).

#### 2.7.2 Evaluación de extractos vegetales contra *X. axonopodis*

También se evaluaron *in vitro* la resistencia a antibióticos y la actividad antimicrobiana de los aislamientos bacterianos utilizando extractos vegetales. Los extractos evaluados incluyeron *Eucalyptus globulus*, *Acmella oleracea*, *Aframomum melegueta* y *Ricinus communis*. Se incluyó un control negativo entre los tratamientos, el cual fue inoculado con el patógeno sin aplicar ningún agente inhibidor, mostrando por tanto los efectos completos de la infección.

Se utilizó agar nutritivo con fluconazol como medio de cultivo. La prueba se replicó tres veces. Se inoculó toda la superficie del agar utilizando la técnica de extensión en placa con 50  $\mu\text{L}$  de la sus-

pensión de *X. axonopodis* preparada previamente. Se realizó un orificio central aséptico en el agar usando un sacabocados de 6 mm de diámetro, donde se aplicaron 100  $\mu$ L del extracto vegetal.

El extracto se difundió en el agar e inhibió el crecimiento del patógeno. Las placas se incubaron a  $28\pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Se observaron zonas de inhibición y se midió el diámetro del crecimiento (mm) utilizando un calibrador, registrando los datos correspondientes.

## 2.8 Ensayos *in vivo*

### Ensayo 1: Efecto de los extractos vegetales sobre la escaldadura del frijol rojo: consecuencias en el crecimiento y rendimiento de plantas de frijol bajo invernadero

Los extractos vegetales (preparados previamente) se aplicaron a concentraciones de 0,0%, 50% y 100%, preparadas mediante diluciones en progresión aritmética. El ensayo *in vitro* bajo diseño completamente al azar (DCA) incluyó nueve tratamientos: un control, *A. oleracea* (50% y 100%), *E. globulus* (50% y 100%) y *R. communis* (50% y 100%). Las plantas se cultivaron durante 90 días antes de la finalización del ensayo.

### Ensayo 2: Efecto de bactericidas sobre *X. axonopodis* en frijol rojo: consecuencias en el crecimiento y rendimiento de plantas de frijol bajo invernadero

El experimento en macetas, bajo diseño completamente al azar (DCA) y con tres repeticiones, inclu-

yó los siguientes tratamientos: un control negativo, tetraciclina (0%, 50% y 100%), lincomicina (0%, 50% y 100%) y cefalosporina (0%, 50% y 100%). Las plantas se cultivaron durante 90 días antes de concluir el ensayo. Cada fungicida se preparó a una concentración de 500 mg L<sup>-1</sup> a partir de formulaciones comerciales.

## 2.9 Recolección y análisis de datos

El porcentaje de germinación se calculó dividiendo el número total de semillas germinadas entre el número total de semillas sembradas por parcela, multiplicado por 100%. El vigor de las plántulas se determinó utilizando una escala (Ndifon, 2023). Se evaluó la severidad de la enfermedad utilizando la escala presentada en la Tabla 1.

El porcentaje de inhibición del patógeno se calculó utilizando la ecuación 1.

$$PI = \left( \frac{C - T}{C} \right) * 100\% \quad (1)$$

Donde, *PI* es el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno. *C* es el radio cubierto por el patógeno en el control negativo. Y *T* es el radio cubierto por el patógeno en la placa tratada.

Tabla 1. Escala de severidad de la enfermedad.

Clasificación	Gravedad %	Descripción de la gravedad en brotes/hojas
0	0,0-0,99 %	Sin lesiones, buen color de las hojas y plantas vigorosas
1	1-3.0 %	Síntomas visibles difíciles de discernir
2	3,1-10 %	Algunas lesiones de tizón en la planta
3	10,1-20 %	Ligeramente más lesiones de tizón que en 1
4	20,1-30 %	Pequeñas lesiones de tizón con esporulación limitada
5	30,1-40 %	Plantas con pocas superficies grandes de tizón y esporulación
6	40,1-50 %	Abundante y generalmente grandes superficies de tizón con esporulación
7	50,1-60 %	Plantas con lesiones grandes, tejido clorótico y necrótico
8	60,1-70 %	Esporulación y lesiones coalescentes muy discernibles
9	70,1-80 %	Gran esporulación, lesiones coalescentes y pocas hojas caídas Hojas
10	80,1-90 %	Caída de hojas muy desenfrenada, gran esporulación y lesiones coalescentes
11	90,1-100 %	Caída de hojas más alta, hojas caídas, plantas muertas

Los datos recolectados incluyeron: porcentaje de germinación, vigor de las plántulas, número de hojas, longitud del brote, diámetro del tallo, número de ramas, peso de semillas, peso fresco del brote, número de vainas, incidencia y severidad de la escaldadura. Se registró la incidencia de la escaldadura dividiendo el número de plantas infectadas entre el número total de plantas en el tratamiento evaluado, multiplicado por 100%.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), y las medias se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan (DMRT) con un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$ .

### 3 Resultados y Discusión

Los resultados de la caracterización fenotípica y de las pruebas bioquímicas realizadas sobre la bacteria se presentan en la Tabla 2. Estas pruebas, junto con la evidencia reportada en la literatura científica (Schaad et al., 2001; Lacy and Lukezic, 2004; Saddler and Bradbury, 2005; ISTA, 2007; Wogu and Ofuase, 2014; Rajyalakshmi et al., 2016; Ordóñez et al., 2023; Grimault et al., 2024), permitieron confirmar la identidad del microorganismo *Xanthomonas axo-*

*nopodis*.

El control del patógeno *in vitro* mediante el uso de bactericidas se ejecutó exitosamente y sus resultados se muestran en la Figura 2.

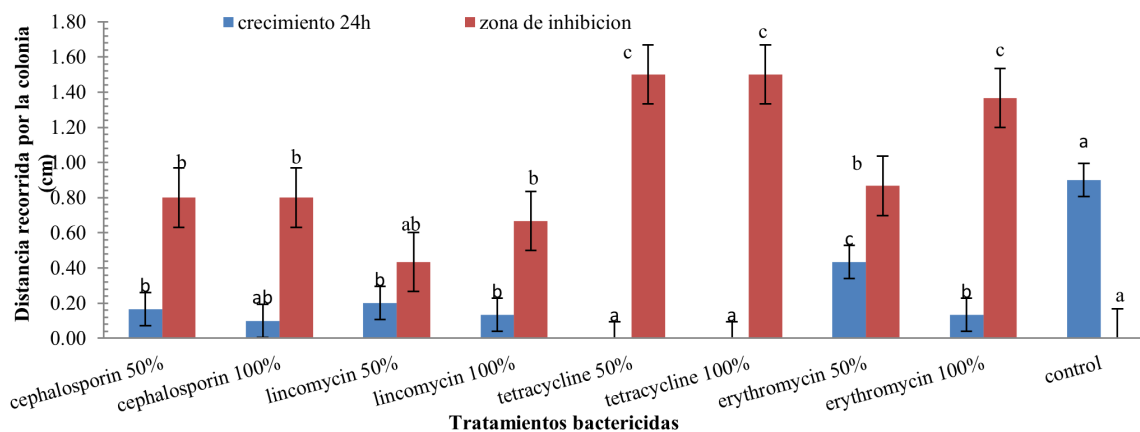
La eficacia de la tetraciclina (a concentraciones del 50% y 100%) fue significativamente superior al resto de los tratamientos (Tabla 3). Los demás tratamientos —eritromicina al 50%, lincomicina y cefalosporina (cada uno al 50% y 100%)— también presentaron una eficacia superior al control. Los bactericidas lograron una excelente inhibición del crecimiento bacteriano, con porcentajes de inhibición comprendidos entre el 52,2% y el 100%, según el tamaño de la zona de inhibición observada.

Los extractos vegetales también controlaron eficazmente a *X. axonopodis in vitro*, generando una reducción del crecimiento radial (Tabla 3). Estos extractos produjeron un rango de inhibición del patógeno entre el 28,8% y el 62,5%. Los tratamientos más eficaces fueron *Eucalyptus globulus* al 100%, *Aframomum melegueta* al 100%, *Ricinus communis* al 100% y al 50%, seguidos de *Acmella oleracea* al 100%, todos ellos con una acción destacada contra *X. axonopodis in vitro*.

**Tabla 2.** Caracterización de la cepa bacteriana utilizada.

Caracterización de la cepa bacteriana utilizada											
Características morfológicas	Tinción de Gram	Motilidad	Borde de la colonia	Superficie	Textura	Elevación	Forma de la colonia	Color	Transparencia		
<b>características</b>	-	+	Entero	Brillante	Lisa	Elevada	Circular, convexa, irregular	Anaranjado-amarillo	-		
Características bioquímicas	Utilización de glucosa (carbohidrato)	Catalasa	Producción de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ )	Hidrólisis del almidón	Oxidasa	Prueba de KOH	Fermentación en medio Oxi-Fem	Hidrólisis de esculina	Aeróbico / oxígeno	Reducción de nitratos	Ureasa
<b>rasgos*</b>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-

\*Los rasgos pueden ser positivos (+) o negativos (-). El símbolo + o - indica el tipo de respuesta del organismo frente al agente utilizado. Las respuestas esperadas se indican con +, mientras que la ausencia de respuesta esperada se indica con -.



**Figura 2.** Efecto de los bactericidas sintéticos sobre *X. axonopodis* *in vitro*.

Los promedios acompañados por la(s) misma(s) letra(s) no difieren significativamente entre sí según la prueba de rangos múltiples de Duncan (DMRT) con un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$ .

**Tabla 3.** Inhibición del crecimiento de *X. axonopodis* por bactericidas vegetales y químicos seleccionados *in vitro*.

Bactericidas químicos	% de inhibición
Cefalosporina 50 %	81,1
Cefalosporina 100 %	88,9
Lincomicina 50 %	77,8
Lincomicina 100 %	85,6
Tetraciclina 50 %	100,0
Tetraciclina 100 %	100,0
Eritromicina 50 %	52,2
Eritromicina 100 %	85,6
Extractos vegetales	% de inhibición
<i>Aframomum melegueta</i> 100 %	53,8
<i>Aframomum melegueta</i> 50 %	28,8
<i>Eucalyptus globulus</i> 100 %	62,5
<i>Eucalyptus globulus</i> 50 %	33,8
<i>Acmella oleracea</i> 100 %	46,3
<i>Acmella oleracea</i> 50 %	33,6
<i>Ricinus communis</i> 100 %	53,8
<i>Ricinus communis</i> 50 %	50,1

Mientras tanto, el control del patógeno *in vitro* mediante extractos vegetales también fue exitoso y se presenta en la Figura 3. La zona de inhibición fue registrada 48 horas después de la inoculación. Se observó que *Eucalyptus globulus* al 100% generó la mayor zona de inhibición, seguido por *Acmella oleracea* (100%), luego *Aframomum melegueta* (100%) y *Eucalyptus* sp. al 50%, antes que *A. melegueta* al 50%.

Los efectos de los bactericidas químicos sobre

las especies de *Xanthomonas* revelaron diferencias significativas en el número de hojas entre los tratamientos a los 49 días después de la inoculación (DAI), como se muestra en la Figura 4. No se encontraron diferencias significativas en la longitud de los brotes. El porcentaje de inhibición de *Xanthomonas* por los bactericidas osciló entre el 46,2% y el 97,5% a lo largo del tiempo, siendo más alto al inicio del ensayo (20 DAI) para todos los químicos, con una disminución progresiva con el tiempo.

Los extractos vegetales no causaron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto al número de hojas en invernadero (Figura 5). No obstante, la longitud de los brotes sí presentó diferencias significativas bajo la influencia de los extractos vegetales a los 35 y 49 DAI, aunque estas diferencias

no fueron consistentes en el tiempo. El porcentaje de inhibición del patógeno varió entre 36,4% y 90,9%, destacándose *E. globulus* al 50% y 100% como los tratamientos más eficaces, seguido de *R. communis* al 100% y *A. oleracea* al 50%.

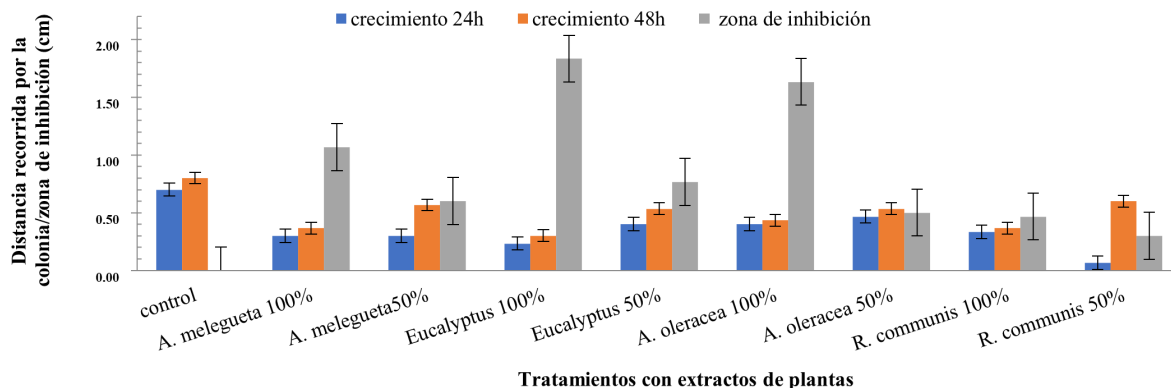


Figura 3. Efecto de los extractos vegetales sobre *X. axonopodis* in vitro.

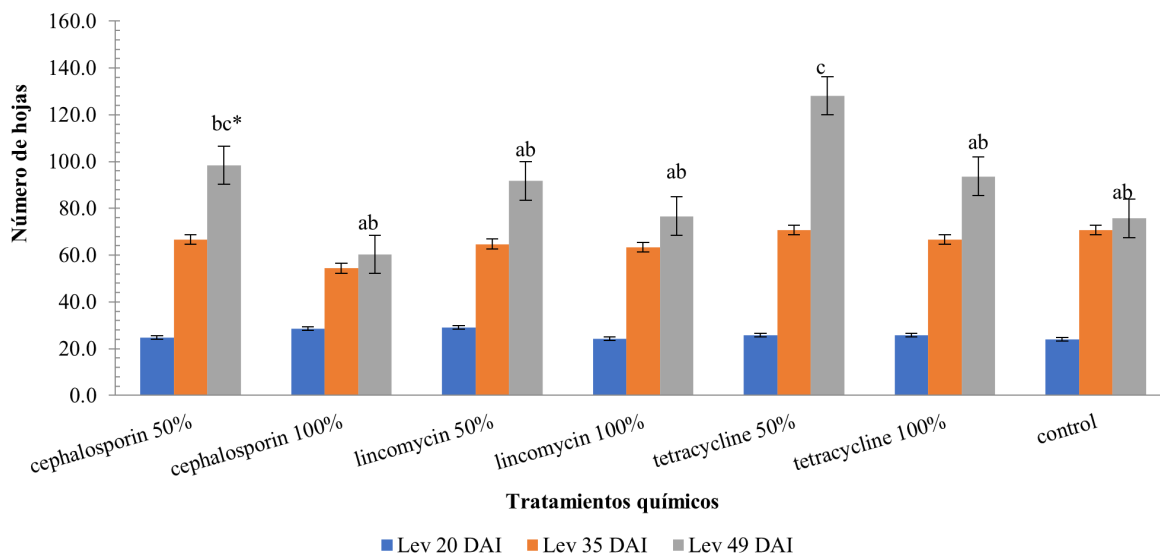


Figura 4. Efectos de los bactericidas sintéticos sobre el crecimiento del cultivo y *X. axonopodis* en invernadero. \*Los valores con la(s) misma(s) letra(s) no difieren estadísticamente según la prueba de rangos múltiples de Duncan (DMRT),  $p \leq 0,05$ .

El peso fresco de las vainas y el peso de las semillas no mostraron diferencias significativas entre tratamientos cuando se aplicaron bactericidas químicos contra el patógeno (Figura 6). Sin embargo, se observaron diferencias entre los promedios de tratamiento cuando se compararon los pesos sin el

análisis estadístico formal. Es probable que, en estas variedades de frijol de crecimiento indeterminado, las diferencias en rendimiento puedan evidenciarse más adelante. El peso fresco del brote varió significativamente en comparación con el control.

De forma similar, en la Figura 7, el peso fresco de vainas y de semillas fue, en general, menor que en el ensayo con bactericidas químicos. El tiempo hasta la aparición de la primera flor fue mayor en los tratamientos con extractos vegetales en comparación con los tratamientos químicos. La causa de esta diferencia no está clara. Es probable que los agentes químicos favorezcan la floración o la formación de vainas, o que haya algún factor presente en el tejido vegetal que promueva la prolongación del crecimiento vegetativo. Estas suposiciones no han sido probadas. Aunque se observaron diferencias visibles entre pesos de semillas, brotes y vainas, estas no fueron estadísticamente significativas.

Finalmente, se adjunta la Figura 8 para mostrar la magnitud del daño que las enfermedades bacterianas pueden causar a las plantas, incluidos los frijoles. Se muestran plántulas muertas plantadas en ensayos de campo y tejidos de frijol dañados durante el experimento. La calidad de las imágenes tomadas *in vitro* fue baja, por lo que no se incluyen. El ensayo se repetirá en campo cuando se disponga de formulaciones químicas más seguras.

La escaldadura del frijol es sin duda una enfermedad devastadora que puede dejar al agricultor sin hojas ni frutos. Afecta sin distinción el forraje, el heno y las semillas. Lamentablemente, es imposible tener un control perfecto una vez que la enfermedad se establece en campo, lo que impli-

ca la imposibilidad de exportación o importación hacia países donde el producto podría alcanzar precios preferenciales. Los investigadores se esfuerzan constantemente por garantizar una producción sana, lo cual permite que los productores obtengan ganancias, valoren sus cultivos y adopten tecnologías modernas de producción.

Howard et al. (2005) argumentaron que los agentes causantes de la escaldadura del frijol pueden controlarse mediante fungicidas químicos (con acción bactericida). Buruchara et al. (2010) coincidieron al indicar que el tratamiento de semillas con compuestos de cobre y estreptomycin, así como la restricción de labores agrícolas durante lluvias, ha demostrado ser eficaz. Muedi and Fourie (2014) respaldaron esta postura, aunque enfatizaron que estos productos no eliminan bacterias ya establecidas en cultivos o suelos, sino que solo reducen su propagación. Estos resultados se confirmaron tanto *in vitro* como *in vivo*.

No obstante, Karavina et al. (2011) señalaron que el uso de estas medidas es viable únicamente a corto plazo y sostuvieron que es posible el control de la escaldadura del frijol mediante el uso de semillas libres de patógenos y productos químicos. Por ello, este estudio se llevó a cabo con el fin de probar la utilidad de los bactericidas en la producción de frijol común.

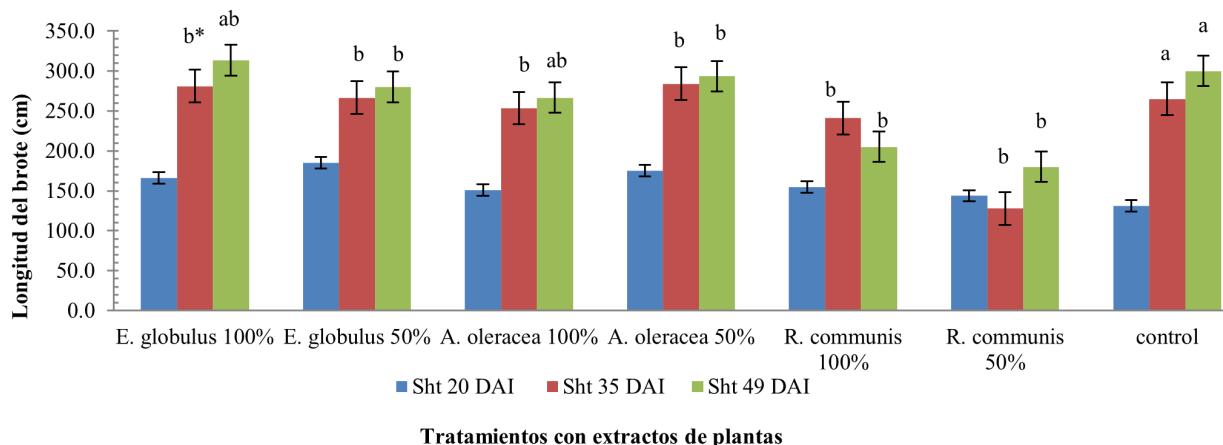


Figura 5. Efectos de los extractos vegetales sobre el crecimiento del cultivo y *X. axonopodis* en invernadero.

\*Los valores con la(s) misma(s) letra(s) no difieren estadísticamente según DMRT,  $p \leq 0,05$ .

La investigación sobre el control de escaldadura bacteriana del frijol mediante extractos vegetales es escasa. El control de hongos con extractos vegetales ha sido ampliamente documentado. Wavare et al. (2017) informaron que los extractos acuosos de flores de *Tagetes erecta* mostraron actividad antifúngica contra *Sclerotium rofsii* en condiciones de invernadero.

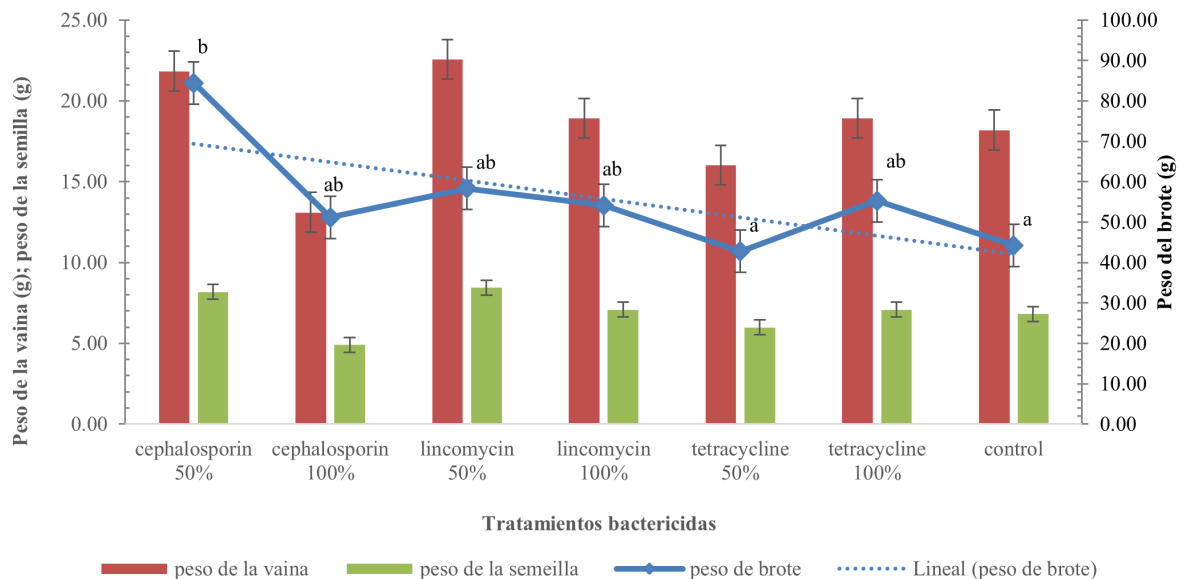
Sanasam et al. (2018) demostraron que los extractos de ajo y cúrcuma inhibieron (67,7%) a *S. rofsii*. Ndifon et al. (2022) indicaron que extractos de jengibre y ajo aplicados como tratamiento de semillas y suelo controlaron significativamente la marchitez por *Fusarium* durante el cultivo de *Solanum aethiopicum*.

Hussain et al. (2009) demostraron que seis extractos vegetales, incluyendo *Eucalyptus camaldulensis*, inhibieron especies fúngicas al suprimir el crecimiento micelial. Ndifon and Lum (2021) informaron que todos los extractos evaluados (incluido *Eucalyptus globulus*) inhibieron significativamente el crecimiento de *Aspergillus niger* en comparación con el control. Las especies vegetales utilizadas en este estudio ya han mostrado una alta eficacia contra

hongos en nuestro laboratorio. Si bien en el presente estudio se observó un efecto prometedor, no lograron superar la eficacia de los bactericidas sintéticos. Por tanto, estos siguen teniendo un papel importante en el manejo de la escaldadura del frijol.

Dado que las enfermedades bacterianas de las plantas suelen tratarse con fungicidas como óxidos y oxicluros de cobre, y considerando que existen numerosas investigaciones sobre extractos vegetales frente a hongos, este estudio se diseñó con la esperanza de que algunos extractos eficaces contra hongos también lo fueran contra bacterias. Esto supondría una ventaja si los materiales de control resultan ser pesticidas de doble propósito.

Muchos investigadores han advertido sobre la toxicidad de los pesticidas químicos para los seres humanos, los animales y el medio ambiente. Sin embargo, son escasas las alternativas que se ofrecen a los agricultores para controlar la escaldadura del frijol. Las prácticas culturales y el uso de materiales resistentes pueden ser útiles en parcelas pequeñas o campos aislados. El fitomejoramiento se ve dificultado por la elevada tasa de autopolinización del frijol.



**Figura 6.** Efectos de *Xanthomonas sp.* sobre el peso del brote, de la vaina y de la semilla por planta bajo la influencia de bactericidas en invernadero.

\*Los valores con la(s) misma(s) letra(s) no difieren estadísticamente según DMRT,  $p \leq 0,05$ .

No obstante, la resistencia a este agente patógeno es compleja y pueden coexistir múltiples variantes del mismo. La resistencia a la escaldadura común del frijol es particularmente compleja, ya que se han descrito 26 loci de resistencia cuantitativa. Hasta la fecha, los estudios transcriptómicos posteriores a la infección son escasos, y los mecanismos moleculares que subyacen a la susceptibilidad o resistencia son en gran parte desconocidos (Foucher et al., 2020).

Se puede incrementar la resistencia seleccionando por resistencia horizontal más que por resistencia vertical (García-Espinosa, 1997; Muimui et al., 2011). Estos resultados proporcionan una base para comprender mejor la herencia compleja de la resistencia a la escaldadura del frijol en variedades mesoamericanas (Ambachew et al., 2021). Estas son solo algunas referencias para motivar a los investi-

gadores a trabajar en el mejoramiento genético para la resistencia a esta enfermedad.

En situaciones complejas de enfermedad, la tolerancia o resistencia a la escaldadura puede ser mínima. ISTA (2007), Karavina et al. (2011) y Chen et al. (2021) recomiendan un enfoque integrado de manejo de enfermedades que incluya cuarentena, prácticas culturales y uso de variedades resistentes.

Trutmann et al. (1993) destacaron la eficacia de manipular el microclima en campos pequeños como medida viable de control. El manejo integrado de este patógeno probablemente será la herramienta más eficaz en manos de los agricultores. Esta investigación continúa actualmente en campo, con el objetivo de incorporar elementos de manejo integrado de la escaldadura común del frijol.

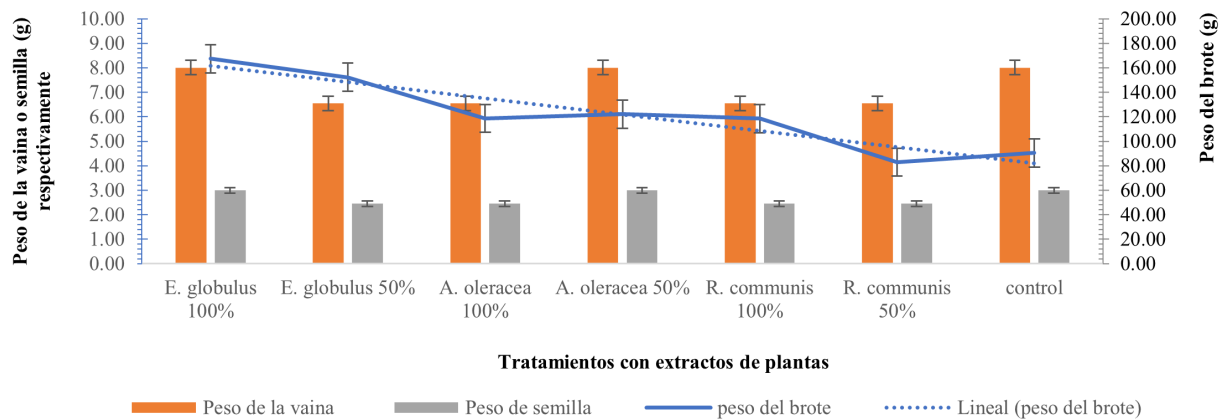


Figura 7. Efectos de *Xanthomonas sp.* sobre el peso del brote, de la vaina y de la semilla por planta bajo la influencia de extractos vegetales en invernadero.

## 4 Conclusiones

La exploración del potencial de los extractos vegetales y agentes bactericidas aplicados contra *Xanthomonas axonopodis* (la bacteria fitopatógena responsable de la escaldadura del frijol) reveló que el patógeno puede gestionarse eficazmente mediante el uso de productos botánicos y bactericidas. La linc-

micina, eritromicina, cefalosporina y tetraciclina demostraron una alta efectividad frente al microorganismo. De igual manera, *Eucalyptus globulus*, *Acemilla oleracea*, *Aframomum melegueta* y *Ricinus communis* mostraron eficacia frente al patógeno. No obstante, los antibióticos sintéticos superaron en todo momento a los extractos vegetales en términos de control.



**Figura 8.** Síntomas de la escaldadura del frijol durante el ensayo. **Arriba:** izquierda = hoja infectada en invernadero; centro = síntomas iniciales en invernadero; derecha = plántula moribunda en campo. **Abajo:** izquierda y centro = plantas sintomáticas y sanas; derecha = plántulas gravemente infectadas o muertas.

El uso de estos extractos vegetales y bactericidas permite la producción de plantas de frijol sanas. Sin embargo, se continuará investigando sobre la disponibilidad, formulación, seguridad e integración de estos agentes para el manejo sostenible de bacterias en la producción de frijol. Este estudio se desarrolló sin contratiempos en el laboratorio, pero en el invernadero el trabajo fue considerablemente más complejo debido al riesgo de contaminación. En condiciones de campo, la ejecución será aún más desafiante; por tanto, será necesario contar con instalaciones estandarizadas para continuar con esta línea de investigación.

## Contribución de los autores

E.M.N.: Conceptualización, Curación de datos, Análisis formal, Adquisición de financiación, Investigación, Metodología, Recursos, Software, Supervisión, Validación, Visualización, Escritura– borrador original, Escritura– revisión y edición.

## Referencias

Akibode, S. and Mareid, M. (2011). Global and regional trends in production, trade, and consumption of food legume crops. Technical report, Department of Agricultural, Food and Resource

- Economics, Michigan State University. Online: <https://n9.cl/od4h0>.
- Ambachew, D., Joshua, J., Mmbaga, M., and Blair, M. (2021). Sources of resistance to common bacterial blight and charcoal rot disease for the production of mesoamerican common beans in the southern united states. *Plants*, 10(5):998. Online: <https://bit.ly/4fvdm2R>.
- Beebe, S. E., Rao, I. M., Devi, M. J., and Polania, J. (2014). Common beans, biodiversity, and multiple stresses: Challenges of drought resistance in tropical soils. *Crop and Pasture Science*, 65(7):667–675. Online: <https://n9.cl/ofof4>.
- Buruchara, R., Mukankusi, C., and Ampofo, K. (2010). Bean disease and pest identification and management. Technical report, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), PABRA. Online: <https://n9.cl/6fqrf>.
- CABI (2022). *Phaseolus vulgaris* (common bean) datasheet. CABI Compendium, Crop Protection Compendium. Online: <https://n9.cl/eflev>.
- Câmara, C. R. S., Urrea, C. A., and Schlegel, V. (2013). Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a functional food: Implications on human health. *Agriculture*, 3(1):90–111. Online: <https://n9.cl/w1ku0r>.
- Chen, N. W. G., Ruh, M., Darrasse, A., Foucher, J., Briand, M., Costa, J., Studholme, D. J., and Jacques, M. (2021). Common bacterial blight of bean: a model of seed transmission and pathological convergence. *Molecular Plant Pathology*, 22(12):1464–1480. Online: <https://n9.cl/4gyr5a>.
- FAO (1999). *Phaseolus* bean: post-harvest operations. inpho post-harvest compendium. Online: <https://n9.cl/f3szn>.
- FAOSTAT (2024). Dry bean production in 2022. crops/regions/worldlist/production quantity/year (pick lists). FAOSTAT Statistical Database. Online: <https://n9.cl/jl8if4>.
- Foucher, J., Ruh, M., Préveaux, A., Carrère, S., Pelletier, S., Briand, M., Serre, R., Jacques, M., and Chen, N. W. G. (2020). Common bean resistance to *Xanthomonas* is associated with up-regulation of the salicylic acid pathway and down-regulation of photosynthesis. *BMC Genomics*, 21:566. Online: <https://n9.cl/40wty>.
- García-Espinosa, R. (1997). Breeding for horizontal resistance in bean: an example from Mexico. *Bio-technology and Development Monitor*, 33(5).
- Grimault, V., Olivier, V., Rolland, M., Darrasse, A., and Jacques, M. A. (2024). Chapter 7: Validated seed health testing methods. international rules for seed testing, effective 1 January 2024, 7 21: Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. phaseoli and *Xanthomonas axonopodis* pv. phaseoli var. fuscans in *Phaseolus vulgaris* (bean) seed. Technical report, The International Seed Testing Association (ISTA), Richtiarkade 18, CH-8304 Wallisellen, Switzerland. Online: <https://n9.cl/45kwdv>.
- Howard, F. S., James, R. S., Robert, H., and Robert, L. F. (2005). *Compendium of beans diseases*. APS Publishing. Online: <https://n9.cl/squjl>.
- Hussain, F., Abid, M., Shahid, S., Farzana, S., and Akbar, M. (2009). Anti-fungal activity of some medicinal plants on different pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Botany*, 47(5):2009–2013. Online: <https://n9.cl/exkpr>.
- ISTA (2007). Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris*. annex to chapter 7. seed health testing methods. Technical report, International Rules for Seed Testing, Bassersdorf, Switzerland. Online: <https://n9.cl/9v9xf>.
- Kadege, E. L., Venkataramana, P., Assefa, T., Ndunguru, J. C., Mukankusi, C. M., Rubyogo, J. C., and Mbega, E. R. (2022). Pathogenicity and approaches for management of anthracnose in common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Africa. *International Journal of Agriculture and Biology*, 28(4):269–280. Online: <https://n9.cl/k9ir6>.
- Kado, C. and Heskett, M. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomas*. *Phytopathology*, 60:969–976. Online: <https://n9.cl/9lh2>.
- Karavina, C., Mandumbu, R., Parwada, C., and Tibugari, H. (2011). A review of the occurrence, biology and management of common bacterial blight. *Journal of Agricultural Technology*, 7(6):1459–1474. Online: <https://n9.cl/nmpjm>.

- Kimani, P. M., Buruchara, R., Ampofo, K., Pyndji, M., Chirwa, R., and Kirkby, R., editors (2005). *Breeding beans for smallholder farmers in Eastern, Central and Southern Africa: constraints, achievements and potential*. Pan-African Bean Research Network (PABRA) Millennium Workshop.
- Lacy, G. H. and Lukezic, F. L. (2004). *Pathogenic prokaryotes*, chapter Plant pathology concepts and laboratory exercises. CRC Press LLC. Online: <https://n9.cl/bm217>.
- Manju, B. E., Neh, A. T., and Bihwih, A. N. (2024). Evaluation of rhizobium and nitrogen fertilizer for the control of bacterial blight in green beans (*Phaseolus vulgaris* l.) varieties. *African Journal of Agricultural Research*, 20(6):426–433. Online: <https://n9.cl/p6lfu>.
- Mondo, M. J., Kimani, P. M., and Narla, R. D. (2019). Validation of effectiveness marker-assisted game selection for multiple disease resistance in common bean. *African Crop Science Journal*, 27(4):585–612. Online: <https://n9.cl/jjn4v>.
- Mounyr, B., Moulay, S., and Saad, K. I. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2):71–79. Online: <https://n9.cl/n4cmb>.
- Muedi, H. and Fourie, D. (2014). Bacterial diseases of dry beans: Every producer's nightmare. Online: <https://n9.cl/0bkxh>.
- Muimui, K. K., Kimani, P. M., and Muthomi, J. W. (2011). Resistance and inheritance of common bacterial blight in yellow bean. *African Crop Science Journal*, 19(4):277–287. Online: <https://n9.cl/ixhwf>.
- Ndifon, E. M. (2022). Management of *Fusarium anthophilum* (pathogen of cereals and white yams) using different measures. *Journal of Botanical Research*, 4(4):12–20. Online: <https://n9.cl/wowmy>.
- Ndifon, E. M. (2023). Host-parasite interactions between *Solanum aethiopicum*, *Meloidogyne incognita*, and *Fusarium oxysporum* f.sp. melongenae as portrayed by disease traits and crop yield. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*, 33(3):461–477. Online: <https://n9.cl/xwe6c>.
- Ndifon, E. M., Chiv, M., Iyang, P., Ankrumah, E., Emeka, C. P. O., and Chinaka, C. (2022). Effect of plant extracts on *Fusarium oxysporum* f.sp melongenae wilt and growth of african garden egg (*Solanum aethiopicum* l.) in makurdi. *Notulae Scientia Biologicae*, 14(2):10912. Online: <https://n9.cl/dikbf>.
- Ndifon, E. M. and Lum, A. F. (2021). Assessment of white yam tuber rot disease and *in vitro* management of *Aspergillus niger* in ebonyi state, nigeria. *International Journal of Bioscience*, 19(4):32–40. Online: <https://n9.cl/og1f2>.
- OECD (2016). *Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 6: OECD Consensus Documents*, chapter Chapter 4. Common bean (*Phaseolus vulgaris*). OECD Publishing. Online: <https://bit.ly/4lxetkB>.
- Ordóñez, Y. F., Ruano, J., Avila, P., Berutti, L., Guerrero, P. C., and Ordóñez, P. E. (2023). *In vitro* antimicrobial activity of plant species against the phytopathogens; *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora infestans*, and *Neopestalotiopsis javaensis*. *Agriculture*, 13(10):2029. Online: <https://n9.cl/lfiv4>.
- Porch, T. G., Beaver, J. S., Debouck, D. G., Jackson, S. A., Kelly, J. D., and Dempewolf, H. (2013). Use of wild relatives and closely related species to adapt common bean to climate change. *Agronomy*, 3(2):433–461. Online: <https://n9.cl/yk1pyb>.
- Rajyalakshmi, K., Roopa, B., Saikat, D. M., Priyanka, D., Vadlamudi, S., and Subramaniam, G. (2016). Characterization of potential probiotic bacteria isolated from sorghum and pearl millet of the semi-arid tropics. *African Journal of Biotechnology*, 15(16):613–621. Online: <https://n9.cl/9ptwt9>.
- Saddler, G. S. and Bradbury, J. F. (2005). *Bergey's manual® of systematic bacteriology*, chapter Xanthomonadales ord. nov. Springer, Boston, M. A. Online: <https://n9.cl/nnsuf>.
- Sanasam, S., Sanatombi Devi, R. K., Beenakumari Devi, N., and Shashikumar Singh, O. (2018). Antagonistic activities of plant extracts against the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*, during pre-harvest horticultural practice - a component of integrated disease management. *International Journal of Current Research in Life Sciences*, 7(11):2813–2815. Online: <https://n9.cl/wowmy>.

- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. APS Press. St. Paul, MN, 3 edition. Online: <https://n9.cl/fogjj4>.
- Sinclair, J. B. and Dhingra, O. D. (1995). *Basic plant pathology methods*. CRC Press, 2 edition. Online: <https://n9.cl/i837b>.
- Trutmann, P., Voss, J., and Fairhead, J. (1993). Management of common bean diseases by farmers in the central african highlands. *International Journal of Pest Management*, 39(3):334–342. Online: <https://n9.cl/uq9uvk>.
- Wavare, S. H., Gade, R. M., and Shitole, A. V. (2017). Effect of plant extracts, bio agents and fungicides against *Sclerotium rolfsii* causing collar rot in chickpea. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 79(4):513–520. Online: <https://n9.cl/tmjism>.
- Wogu, M. D. and Ofuase, O. (2014). Microorganisms responsible for the spoilage of tomato fruits, *Lycopersicon esculentum*, sold in markets in benin city, southern nigeria. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 2(7):459–466. Online: <https://n9.cl/69v5y>.