

Verbesina sphaerocephala extracts promote the development of *Cucumis sativus* and reduce the damage caused by *Meloidogyne incognita*

Extractos de *Verbesina sphaerocephala* promueven el desarrollo de *Cucumis sativus* y reduce el daño causado por *Meloidogyne incognita*

Ana Paulina Velasco-Ramírez*, ¹Departamento de Producción Agrícola, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Zapopan Jalisco México, CP 45010; Gil Virgen-Calleros, Laboratorio de Fitopatología, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Zapopan Jalisco México, CP 45010; Rosalba Mireya Hernández-Herrera, Departamento de Botánica y Zoología, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Zapopan Jalisco México, CP 45010; Alejandro Velasco-Ramírez¹, Myriam Patricia Corona-Cervantes¹, Diana Maday Munguía-Lizalde¹, Armando Rafael Hernández-Pérez¹. Autor para correspondencia: pauvela73@hotmail.com

Recibido: 01 de Marzo, 2021.

Aceptado: 13 de Abril, 2021.

Velasco-Ramírez AP, Virgen-Calleros G, Hernández-Herrera RM, Velasco-Ramírez A, Corona-Cervantes MP, Munguía-Lizalde DM and Hernández-Pérez AR. 2021. *Verbesina sphaerocephala* extracts promote the development of *Cucumis sativus* and reduce the damage caused by *Meloidogyne incognita*. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 339-353.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2103-2>

Primera publicación DOI: 23 de Abril, 2021.

First DOI publication: April 23, 2021.

Resumen. Uno de los principales problemas fitosanitarios son los nematodos agalladores del género *Meloidogyne*. El uso de *Verbesina sphaerocephala* podrían sustituir el uso de nematocidas químicos. El objetivo de esta investigación fue probar si extractos acuosos de *V. sphaerocephala* promueven el

Abstract. One of the main phytosanitary problems are root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne*. The use of *Verbesina sphaerocephala* could substitute the use of chemical nematicides. The objective of this research was to test whether aqueous extracts of *V. sphaerocephala* promote development and reduce the damage caused by *M. incognita* in *Cucumis sativus*. Seven treatments were evaluated in *C. sativus* plants grown in pots under greenhouse conditions: control plants without nematodes, plants with nematodes, with nematodes + carbofuran, with nematodes + *Trichoderma*, with nematodes + extract of *V. sphaerocephala* (concentration at 10, 15 and 20%). Three evaluations were carried out to estimate plant height, stem diameter, chlorophyll concentration, number of leaves and flowers, length and weight of roots, galling index, root eggs and larvae in the soil. The results showed that the extracts of

desarrollo y reducen los daños ocasionados por *M. incognita* en *Cucumis sativus*. Se evaluaron siete tratamientos en plantas de *C. sativus* crecidas en macetas en condiciones de invernadero: plantas testigo sin nematodos, plantas con nematodos, con nematodos + carbofuran, con nematodos + *Trichoderma*, con nematodos + extracto de *V. sphaerocephala* (concentración al 10, 15 y 20%). Se realizó tres evaluaciones para estimar altura de planta, diámetro de tallo, concentración de clorofila, número de hojas y flores, longitud y peso de raíces, índice de agallamiento, huevos en raíz y larvas en el suelo. Los resultados mostraron que los extractos de *V. sphaerocephala* al 10 y 15% promovieron el crecimiento de las plantas y disminuyeron los índices de agallamiento de las raíces y el número de larvas de *M. incognita* en el suelo. Los extractos de *V. sphaerocephala* puede ser un potencial biológico para minimizar problemas causados por *M. incognita*.

Palabras claves: nematodo agallador, bioestimulante de crecimiento, extractos botánicos, capitaneja.

Las plantas son una fuente importante de compuestos bioactivos contra plagas agrícolas. En particular las plantas con actividad nematicida y sus derivados tienen el potencial de utilizarse en campo y cubrir parte de la demanda de nematicidas químicos. Se han aislado compuestos químicos de varias familias de plantas, particularmente Asteraceae de manera *in vitro* (α -Terthienyl) (Chitwood, 2002; Oka, 2010, 2012); sin embargo, esos compuestos no han demostrado su efectividad en campo y no se han desarrollado comercialmente (Gommers y Bakker, 1988). *Inula viscosa*, una Asteraceae común en países mediterráneos, ha demostrado tener actividad nematicida debido que en sus brotes produce ácido cóstico y ácido isocóstico compuestos

V. sphaerocephala at 10 and 15% promoted the growth of the plants and decreased the root galling indices and the number of larvae of *M. incognita* in the soil. The extracts of *V. sphaerocephala* can be a biological potential to minimize problems caused by *M. incognita*.

Key words: root-knot nematode, growth biostimulant, botanical extracts, capitaneja.

Plants are an important source of bioactive compounds against agricultural pests. Particularly plants with a nematicide activity and their by-products have the potential of being used on the field and of covering part of the demand for chemical nematicides. Chemical compounds have been isolated from various plant families, particularly Asteraceae, *in vitro* (α -Terthienyl) (Chitwood, 2002; Oka, 2010, 2012). However, these compounds have not yet proven to be effective on the field and have not been commercially developed (Gommers and Bakker, 1988). *Inula viscosa*, a common Asteraceae in Mediterranean countries, has proven to have nematocidal activity, due to the production in its sprouts of cosic and isocostic acids, which were isolated and applied against *Meloidogyne javanica* (Oka, 2001). The extracts of the *Verbesina encelioides* leaves and flowers were also evaluated against the nematode *M. javanica*, with favorable results (Oka, 2012). In addition to the Asteraceae, essential oils and the monoterpene components of other herbaceous plants such as *Ocimum sanctum*, *Xylopiya aethiopica*, *Thymus vulgaris* and others have displayed nematocidal effects (Eloh *et al.*, 2019).

Meloidogyne incognita is one of the most harmful nematodes in agriculture worldwide, with damages in diverse annual and perennial crops. The feeding and development of the females cause

que fueron aislados y aplicados contra *Meloidogyne javanica* (Oka, 2001). Los extractos de las hojas y flores de la *Verbesina encelioides* también se evaluaron contra el nematodo *M. javanica*, con resultados favorables (Oka, 2012). Además de las Asteraceae, los aceites esenciales y sus constituyentes monoterpenos de otras plantas herbáceas como *Ocimum sanctum*, *Xylopiya aethiopica*, *Thymus vulgaris*, entre otras, han demostrado tener efectos nematocidas (Eloh *et al.*, 2019).

Meloidogyne incognita es uno de los nematodos más dañinos en la agricultura mundial, con afectaciones en una diversidad de cultivos anuales y perennes. La alimentación y desarrollo de las hembras provocan engrosamientos de las raíces y genera importantes lesiones al expulsar la masa de huevos hacia el suelo. Cuando se tiene alta densidad de población, el daño a las raíces es mayor que provoca pérdida de rendimiento y calidad de la producción (Aissani *et al.*, 2013; Pavaraj *et al.*, 2012). La estrategia de control más utilizada para el manejo del nematodo es el uso de plaguicidas sintéticos. Sin embargo, dichos plaguicidas incrementan los costos de producción y afectan la dinámica del suelo por el uso de moléculas de los grupos de los organofosforados, carbamatos y algunos productos fumigantes de alta residualidad, causando fuerte problemas de contaminación ambiental (Murcia y Stashenko, 2008; Álvarez *et al.*, 2015).

Ante esta problemática es importante evaluar alternativas de menor impacto como el uso de estrategias biorracionales, como el uso de *Verbesina sphaerocephala*. Esta Asteraceae es endémica del occidente de México (Jalisco, Michoacán, Nayarit, Guanajuato, Guerrero) (Rzedowski *et al.*, 2011) y se conoce con los nombres comunes de capitaneja, capitana, árnica capitaneja, vara blanca o palo espino, es una especie de uso no tan extendido y, solo se cuenta con información taxonómica y etnobotánica, esta última realizada en la comunidad de

root thickening and produce important lesions when releasing their eggs onto the soil. When the population density is high, damages to the roots are such that it can cause a loss in yield and quality of the production (Aissani *et al.*, 2013; Pavaraj *et al.*, 2012). The most widely used control strategy for nematodes is synthetic pesticides. However, these pesticides increase production costs and affect the dynamics of the soil due to the molecules from the group of organophosphates, carbamates and some high-residue products that lead to important environmental pollution problems (Murcia and Stashenko, 2008; Álvarez *et al.*, 2015).

In the light of this problem, it is increasingly important to evaluate alternatives with lower impacts, such as the use of bio-rational strategies like the use of *Verbesina sphaerocephala*. This Asteraceae is endemic to western Mexico (Jalisco, Michoacán, Nayarit, Guanajuato, Guerrero) (Rzedowski *et al.*, 2011) and it is commonly known as capitaneja, capitana, árnica capitaneja, vara blanca or palo espino. The use of this species is not as extensive and only taxonomic and ethnobotanical information is available, the latter provided by the town of San Martín de las Flores, Jalisco, where the population uses it for its ethnopharmacological properties and agricultural potential (Velasco-Ramírez *et al.*, 2019). It is therefore proposed as a botanical nematocidal control (aqueous extract), since this type of extracts can be produced by the farmers themselves to be used as an alternative to minimize the incidence and damages caused by nematodes in crops of commercial interest, such as cucumbers (*Cucumis sativus*).

The cucumber is the fourth most widely produced crop in the world, with a production of 1.7 million tons in 2016 (Sayedain *et al.*, 2021), and Mexico is the fifth largest producing country in the world, with a production of 826,485 tons. The main cucumber producing states in Mexico are Sinaloa

San Martín de las Flores Jalisco, donde los habitantes la utilizan por su actividad etnofarmacológica y potencial agrícola (Velasco-Ramírez *et al.*, 2019). Por consiguiente, se propone como control nematocida botánico (extracto acuoso); ya que este tipo de extractos pueden ser elaborados por el mismo productor y así utilizarlos como alternativa para minimizar la incidencia y daños ocasionados por nematodos en cultivos de interés comercial, como el pepino (*Cucumis sativus*).

El pepino es la cuarta hortaliza mayormente cultivada en el mundo con una producción de 1,7 millones de toneladas en el 2016 (Sayedain *et al.*, 2021) siendo México el quinto productor mundial con una producción de 826,485 toneladas. Los principales estados productores de esta hortaliza en México son: Sinaloa (268,878 t ha⁻¹), Sonora (152,457 t ha⁻¹), Michoacán (67,653 t ha⁻¹) y el décimo lugar lo ocupa Jalisco (20,454 t ha⁻¹) (SIAP, 2020). A pesar de su importancia, el cultivo presenta mermas considerables en los rendimientos, debido a plagas y enfermedades. Por ejemplo, las enfermedades han sido *Fusarium* spp, *Rhizoctonia* spp, Damping off (*Phytophthora* spp. y *Pythium* spp.), Mancha angul (*Pseudomonas syringae*) y el nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) (Satyendra y Rekha, 2021). Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue probar si extractos acuosos obtenidos de las hojas de *V. sphaerocephala* promueven el desarrollo y reducen los daños causados por *M. incognita* en plantas del pepino (*Cucumis sativus*).

Se recolectaron hojas jóvenes (fase vegetativa) sanas (asintomáticas) de la especie silvestre *Verbesina sphaerocephala* en los cerros aledaños de la comunidad de San Martín de las Flores en el municipio de San Pedro Tlaquepaque, Jalisco (longitud: -103.282778 latitud: 20.585278 a 1540 msnm). Las hojas se secaron a temperatura ambiente en el laboratorio (~26 °C), se pulverizaron en un molino de cuchillas (Hamilton Beach® 80335) y

(268,878 t ha⁻¹), Sonora (152,457 t ha⁻¹), Michoacán (67,653 t ha⁻¹) and Jalisco is the tenth state (20,454 t ha⁻¹) (SIAP, 2020). Despite its importance, the yields of this crop have considerable reductions due to pests and diseases. For example, diseases have included *Fusarium* spp, *Rhizoctonia* spp, Damping off (*Phytophthora* spp. and *Pythium* spp.), angular leaf spot (*Pseudomonas syringae*) and the root-knotting nematode (*Meloidogyne* spp.) (Satyendra and Rekha, 2021). Due to the above, the aim of this investigation was to test whether aqueous extracts taken from the leaves of *V. sphaerocephala* promote the development and reduce damages caused by *M. incognita* in cucumber plants (*Cucumis sativus*).

Several healthy (asymptomatic) young leaves (vegetative phase) of the wild species *Verbesina sphaerocephala* were gathered from the hills surrounding San Martín de las Flores in the municipal area of San Pedro Tlaquepaque, Jalisco (longitude: -103.282778 latitude: 20.585278 at 1540 masl). The leaves were dried at room temperature in the laboratory (~26 °C), pulverized using a blade mill (Hamilton Beach® 80335) and placed under a proximal chemistry test and a phytochemical analysis to determine the main biomolecules contained in the leaves. Next, 100 g of dry weight were placed in 1 L of distilled water, stirring constantly for 15 min, followed by an autoclave at 121 °C for 1 h at 1.2 kg cm². The hot extracts were poured through Whatman No. 40 filter paper and stored in glass jars at 4 °C. The liquid *V. sphaerocephala* extracts were designated as a stock solution; the pH and electric conductivity (CE, dS m⁻¹) were then measured. Finally, the color of the extracts was determined visually. All parameters were evaluated in triplicate.

A *Meloidogyne incognita* population, previously identified with morphometric and pictorial keys (Eisenback *et al.*, 1983) and obtained from the tomato plantation located in the school

fueron sometidas a un análisis de química proximal y análisis fitoquímico para determinar las principales biomoléculas contenidas en las hojas. Posteriormente, 100 g de peso seco se vertió en 1 L de agua destilada con agitación constante durante 15 min, seguido de autoclave a 121 °C por 1 h a 1.2 kg cm². Los extractos calientes fueron pasados a través de papel filtro Whatman No. 40 y almacenados en frascos de vidrio a 4 °C. Los extractos líquidos de *V. sphaerocephala* fueron designados como solución madre, adicionalmente se midió pH y conductividad eléctrica (CE, dS m⁻¹). Finalmente, el color de los extractos se determinó visualmente. Todos los parámetros se evaluaron por triplicado.

Una población de *Meloidogyne incognita* previamente identificada a través de claves morfométricas y pictóricas, (Eisenback *et al.*, 1983) y obtenida del cultivo de jitomate ubicado en el invernadero escuela del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, se aisló para su cría y reproducción *in vivo* en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) en bolsas de polietileno con capacidad de 3 kg (20 x 15 cm) en condiciones de invernadero en el área de Fitopatología del CUCBA.

Para la obtención del inóculo se lavaron las raíces con agua corriente, se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm de longitud, se pesaron 10 g y se colocaron en una batidora. Posteriormente, se agregaron 20 mL de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0.5% y 180 mL de agua destilada batiéndose durante 3 min. A continuación, se filtró por un tamiz de 25 µm, donde quedaron retenidos los huevos y se almacenaron en un vaso de precipitado; la suspensión de huevos se aforó a 200 mL. Del vaso de precipitados se tomó una alícuota de 1 mL de la suspensión de huevos y con ayuda de las cuadrículas de una caja contadora de disección se realizó el conteo en el microscopio compuesto (Hussey y Barker, 1973). A los 20 días después de la siembra,

greenhouse of the Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) of the Universidad de Guadalajara, was isolated for its growth and reproduction *in vivo* on tomato plants (*Solanum lycopersicum*) in 3 kg (20 x 15 cm) polyethylene bags, under greenhouse conditions in the Phytopathology area of the CUCBA.

To obtain the inoculant, the roots were washed using tap water, cut into pieces of approximately 1 cm in length, 10 g were dried and placed in a blender. Next, 20 mL of sodium hypochlorite solution (NaOCl) at 0.5% were added, along with 180 mL of distilled water, mixing for 3 min. It was then filtered through a 25 µm sieve, where the eggs remained and were later stored in a cup containing a precipitate; the suspension with eggs was diluted to 200 mL. A 1 mL aliquot was taken from the egg suspension from the precipitates cup, and with the help of the grid of a dissection counting box, counting began under the compound microscope (Hussey and Barker, 1973). Twenty days after planting, using 24 polyethylene bags, the nematode was inoculated by emptying 105 mL of the egg suspension into every pot, distributed into three orifices, each one 5 cm deep. In this way, 3,030 eggs were inoculated in each pot.

The experiment was carried out in September 2019 in the CUCBA greenhouse using paraíso Enza Zaden cucumber seeds (100 seeds), previously sterilized in a 10% sodium hypochlorite solution for 30 min and then rinsed with distilled water. The seeds were planted in a germination tray with a mixture of peat substrate and vermiculite, 50:50 (sterilized in an autoclave at 121 °C for 20 min at 1.21 kg cm²), and irrigated on a daily basis at field capacity. They were left to grow in the greenhouse for 30 days and transplanted in plastic pots with a homogenized mixture of sand substrate and leaf soil, previously sterilized in an autoclave in a 70:30 proportion. The plants were kept in the greenhouse

en 24 bolsas de polietileno se procedió a la inoculación del nematodo, vaciando 105 mL maceta⁻¹ de la suspensión de huevos, distribuidos en tres orificios de 5 cm de profundidad. De esta manera se inocularon 3,030 huevos a cada maceta.

El experimento se llevó a cabo en septiembre del 2019 en el invernadero del CUCBA con semillas de pepino paraíso Enza Zaden (100 semillas) previamente esterilizadas en una solución de hipoclorito sodio al 10% durante 30 min y posteriormente enjuagadas con agua destilada, fueron sembradas en una charola de germinación en una mezcla de sustrato de turba y vermiculita 50:50 (esterilizado en autoclave a 121 °C por 20 min a 1.21 kg cm²), las cuales se dio riego diario a capacidad de campo. Se dejaron crecer en el invernadero durante 30 días y posteriormente se trasplantaron en macetas de plástico de una mezcla homogeneizada de sustrato de arena y suelo de hojas previamente esterilizado en autoclave en una proporción 70:30. Las plantas se mantuvieron en el invernadero a 27-32 °C bajo condiciones de luz natural con riegos cada dos días y fertilización cada 72 h, utilizando el fertilizante Poly-Feed® (19-19-19) con una dosis de 1g L⁻¹ hasta concluir el experimento.

Se montaron siete tratamientos diferentes: 1: Testigo, plantas sin nematodos (P), 2: plantas con nematodos (P+N), 3: plantas con nematodos y carbofuran (Furadan®) 350 g L⁻¹ (P+N+C), 4: plantas con nematodos y *Trichoderma* sp. 200 mL L⁻¹ (P+N+T), 5: plantas con nematodos y extracto de *V. sphaerocephala* al 25% (P+N+V 25%), 6: plantas con nematodos y extracto de *V. sphaerocephala* al 15% (P+N+V 15%) y 7: plantas con nematodos y extracto de *V. sphaerocephala* al 10% (P+N+V 10%). La aplicación de los extractos fue de 50 mL por maceta. Todos los tratamientos se aplicaron después del segundo día de trasplante y directamente después de la inoculación. El experimento fue organizado en un diseño de bloques al azar con cinco repeticiones (macetas) y se repitió dos veces.

at 27-32 °C under sunlight, irrigated every 2 days and fertilized every 72 h using the fertilizer Poly-Feed® (19-19-19) with a dose of 1g L⁻¹ until the end of the experiment.

Seven different treatments were set up: 1: Control, plants without nematodes (P), 2: plants with nematodes (P+N), 3: plants with nematodes and carbofuran (Furadan®) 350 g L⁻¹ (P+N+C), 4: plants with nematodes and *Trichoderma* sp. 200 mL L⁻¹ (P+N+T), 5: plants with nematodes and a 25% *V. sphaerocephala* extract (P+N+V 25%), 6: plants with nematodes and 15% *V. sphaerocephala* extract (P+N+V 15%) and 7: plants with nematodes and a 10% *V. sphaerocephala* extract (P+N+V 10%). We applied 50 mL of extract for every pot. All treatments were applied two days after transplanting and directly after inoculation. The experiment was organized in a random block design with five repetitions (pots) and was carried out twice.

Three evaluations were carried out (every 10 days) during the initial growth of the crop until the end of the end of the experiment and the variables considered were plant height (cm, from the apical meristem to the main root), stem diameter (mm), concentration of chlorophyll [SPAD (Soil Plant Analysis Development)- 502], number of leaves and of flowers. By the end of the experiment, 40 days later, plants and roots were removed, washed with drinkable tap water and the root length was recorded (cm), along with the index of root knotting and the number of eggs in 10 g of roots. On the other hand, larvae were extracted and counted out of 20 g of roots, following Bridge and Page (1980) and a record was made of the dry weight of the tissue, which was kept at 60 °C for 48 h in a Felisa® brand drying oven. Finally, the number of larvae in 100 g of soil per treatment were counted, based on Baermann's funnel technique from moist substrate (Barker, 1985).

Se realizaron tres evaluaciones (cada 10 días) durante el crecimiento inicial del cultivo hasta concluir el experimento y se consideraron las variables de altura de la planta (cm, desde el meristemo apical a la raíz principal), diámetro del tallo (mm), concentración de clorofila [SPAD (Soil Plant Analysis Development)- 502], número de hojas y número de flores. Al término del experimento, 40 días después, las plantas junto con la raíz fueron removidas, lavadas con agua potable de grifo y posteriormente se registró longitud de las raíces (cm), índice de agallamiento y número de huevos en 10 g de raíz. Por otro lado, se realizó la extracción y conteo de larvas en 20 g de raíz de acuerdo a lo establecido por Bridge y Page (1980) y se registró el peso seco del tejido, el cual se mantuvo a 60 °C durante 48 h en un horno de secado marca felisa®. Finalmente, se contabilizaron número de larvas en 100 g de suelo por tratamiento, basado en la técnica del embudo de Baermann a partir de sustrato húmedo (Barker, 1985).

Los datos recopilados del experimento se analizaron mediante ANOVA de una vía para cada variable por tratamiento y tiempos de evaluación y una prueba de comparación de medias Tukey ($p < 0.05$) utilizando el software estadístico Statgraphics® Centurion XV (New Jersey, United States) para Windows.

Las evaluaciones de química proximal de *V. sphaerocephala* mostraron 17.7% de proteínas, 10.4% de fibra cruda, 15.2% de cenizas totales, 4.6% de extracto etéreo, 2.9% de Nitrógeno, 45.2% de Carbohidratos y 6.8% de humedad; lo cual contiene una gran cantidad de carbohidratos, que explica la alta capacidad de absorción de agua. El análisis fitoquímico (Cuadro 1) arrojó resultados donde demuestran la presencia de metabolitos secundarios fenólicos y alcaloides en extractos acuosos obtenidos de las hojas, que muchos de ellos pueden estar presentes en la interacción planta patógeno y función

The data gathered from the experiment were analyzed with a one-way ANOVA for each variable per treatment and evaluation times and Tukey's mean comparison test ($p < 0.05$) using the statistical software Statgraphics® Centurion XV (New Jersey, United States) for Windows.

The proximal chemistry evaluations performed on *V. sphaerocephala* displayed 17.7% proteins, 10.4% raw fiber, 15.2% total ashes, 4.6% ethereal extract, 2.9% nitrogen, 45.2% carbohydrates and 6.8% moisture, which contains a large amount of carbohydrates, thus explaining the high capacity to absorb water. The phytochemical analysis (Table 1) gave results that show the presence of phenolic and alkaloid secondary metabolites in aqueous extracts obtained from leaves, most of which may be present in the plant-pathogen interaction and the defensive function against parasites or insects due to their toxicity, respectively. The pH values for the *V. sphaerocephala* extracts were alkaline (8.33), the CE was 1 and 1.3 dS m⁻¹ and the color was dark green.

The effect of the *V. sphaerocephala* extracts on the development of *C. sativus* plants for the variable of height was significantly ($P = 0.0103$) higher in treatment P+N during the first evaluation with an average of 24.6 cm; in the second evaluation, the treatment of P+N+V10% obtained a higher growth, with 26 cm, and in the third evaluation, the treatment of P+N+V25% obtained an average of 27.2 cm (Figure 1A). The stem diameter was significantly ($P = 0.0514$) greater in treatments P+N+T and P+N+V15% during the first evaluation with averages of 0.48 y 0.50 mm respectively. In the second evaluation, the diameter of the stems of the plants in treatment P+N+V25% was significantly ($P = 0.06521$) greater, with an average of 0.50 mm. At the end of the experiment, the diameter of the stems of the plants in treatments P+N+V10% and P+N+V15% was significantly ($P = 0.09524$) greater,

**Cuadro 1. Análisis fitoquímico cualitativo de *Verbesina sphaerocephala*.
Table 1. Qualitative phytochemical analysis of *Verbesina sphaerocephala*.**

Constituyentes fitoquímicos	Prueba realizada	Tipo de extracción					
		Extracto acuoso			Extracto metanólico		
		Hoja	Tallo	Flor	Hoja	Tallo	Flor
Saponinas	Ensayo de poder tensoactivo	-	-	-	-	-	-
Fenoles	Reacción con cloruro férrico	++	+	+	++	+	+
	Reacción con dicromato de potasio	++	+	+	++	+	+
Flavonoides	Reacción con NaOH 20%.	-	-	+	-	-	-
	Shinoda	-	-	+	-	-	-
Alcaloides	Dragendorff's:	++	-	++	-	-	-
	Mayer's	++	-	++	-	-	-
	Wagner's	++	-	++	-	-	-
	Hager's:	++	-	++	-	-	-

Los valores se expresan como positivo (+), resultados muy claros (++), negativo (-); no aplicable (NA). ♦ Values are expressed as positive (+), very clear results (++), negative (-); not applicable (NA)

defensiva frente a parásitos o insectos por su toxicidad, respectivamente. Los valores de pH para los extractos de *V. sphaerocephala* fueron alcalinos (8.33) y la CE fue de 1 a 1.3 dS m⁻¹ y el color fue verde intenso.

El efecto de los extractos de *V. sphaerocephala* sobre el desarrollo de plantas de *C. sativus* para la variable altura de planta fue significativamente (P= 0.0103) mayor en el tratamiento P+N durante la primera evaluación con un promedio de 24.6 cm, en la segunda evaluación el tratamiento de P+N+V10% obtuvo un mayor crecimiento con 26 cm y en la tercera evaluación el tratamiento de P+N+V25% obtuvo un promedio de 27.2 cm (Figura 1A). El diámetro del tallo fue significativamente (P= 0.0514) mayor en los tratamientos P+N+T y P+N+V15% durante la primera evaluación con promedios de 0.48 y 0.50 mm respectivamente. En la segunda evaluación, el diámetro del tallo de las plantas del tratamiento P+N+V25% fue significativamente (P= 0.06521) mayor con un promedio de 0.50 mm. Al final del experimento el diámetro del tallo de las plantas de los tratamientos P+N+V10% y P+N+V15% fue significativamente (P= 0.09524)

with values of 0.56 and 0.51 mm respectively (Figure 1B). Regarding the number of leaves, in the first evaluation, treatments P+N, P+N+T and P+N+C were greater (P= 0.0605), with an average of eight leaves, in the second evaluation, treatment P+N+V10% obtained the highest (P= 0.0001) number of leaves (12), and in the third evaluation, all plants treated with *V. sphaerocephala* displayed a higher (P= 0.0009) average number of leaves (10) in comparison with the other treatments (Figure 1C). The number of flowers was higher (P= 0.0517) in treatment P+N with six flowers per plant on average in the first evaluation. In the second evaluation, the highest number of flowers was found in treatment P+N+V10% (P= 0.0001), with an average of nine flowers. In the third evaluation, the highest number of flowers was found in treatments P, P+N and P+N+C, since all plants treated with *V. sphaerocephala* were already in the stage of fruition (Figure 1D). The index of chlorophyll recorded in the first evaluation was similar in all treatments (P= 0.0565). In the second evaluation, treatments P+N+T, P+N+C, P+N+V15% and P+N+V25% displayed a higher chlorophyll index than the rest

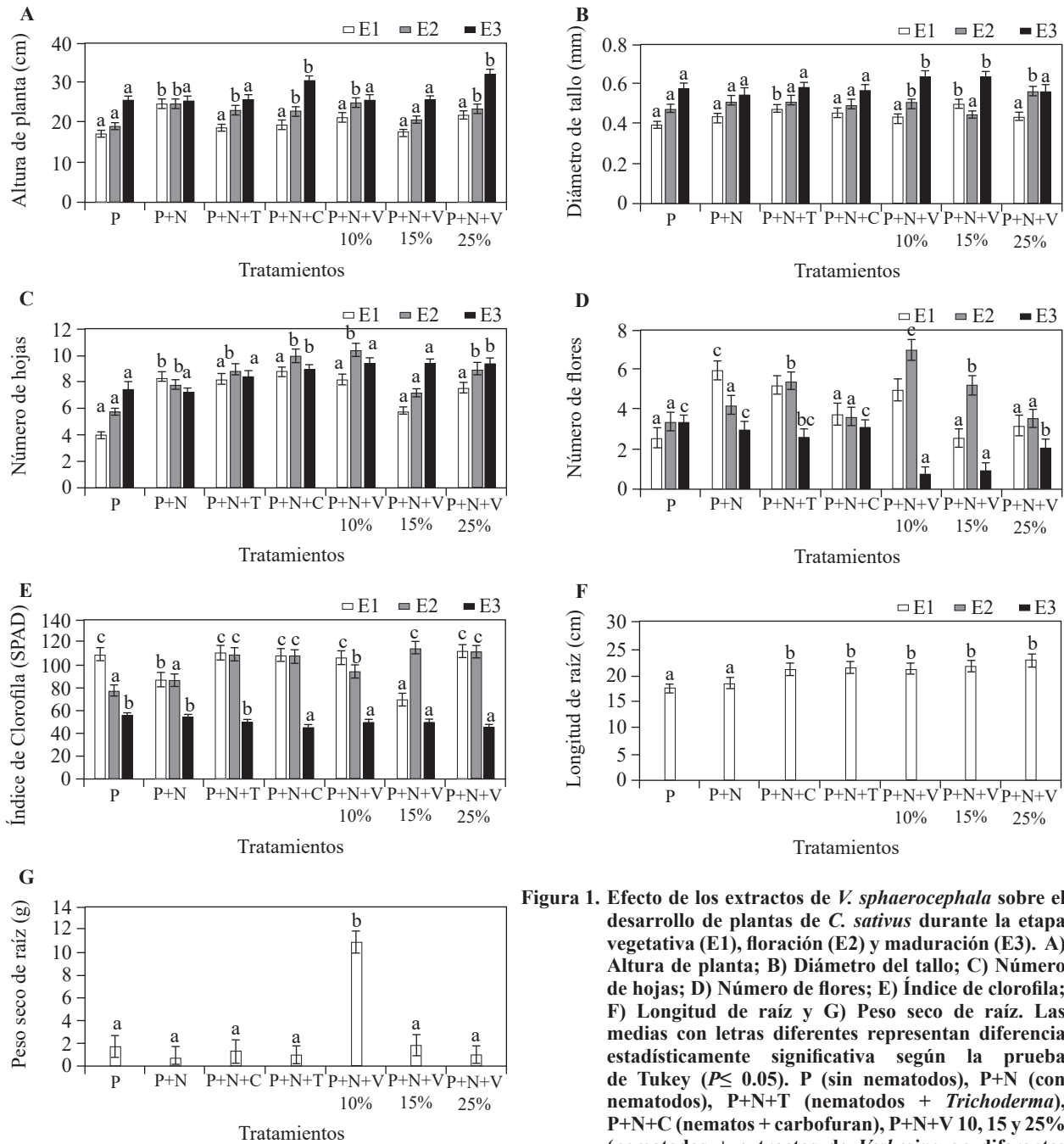


Figura 1. Efecto de los extractos de *V. sphaerocephala* sobre el desarrollo de plantas de *C. sativus* durante la etapa vegetativa (E1), floración (E2) y maduración (E3). A) Altura de planta; B) Diámetro del tallo; C) Número de hojas; D) Número de flores; E) Índice de clorofila; F) Longitud de raíz y G) Peso seco de raíz. Las medias con letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). P (sin nematodos), P+N (con nematodos), P+N+T (nematodos + *Trichoderma*), P+N+C (nematodos + carbofuran), P+N+V 10, 15 y 25% (nematodos + extractos de *Verbescina* en diferentes concentraciones).

Figure 1. Effect of the extracts of *V. sphaerocephala* on *C. sativus* plant development during the vegetative state (E1), flowering (E2) and maturation (E3). A) Plant height; B) Stem diameter; C) Number of leaves; D) Number of flowers; E) Chlorophyll index; F) Root length, and G) Dry weight of root. Means with different letters represent statistical differences according to Tukey's test ($P \leq 0.05$). P (without nematodes), P+N (with nematodes), P+N+T (nematodes + *Trichoderma*), P+N+C (nematodes + carbofuran), P+N+V at 10, 15 and 25% (nematodes + *Verbescina* extracts in different concentrations).

mayor con valores de 0.56 y 0.51 mm respectivamente (Figura 1B). Con lo que respecta al número de hojas, en la primera evaluación los tratamientos P+N, P+N+T y P+N+C fueron mayores ($P=0.0605$) obteniendo ocho hojas promedio, en la segunda evaluación el tratamiento P+N+V10% obtuvo el mayor ($P=0.0001$) número de hojas (12) y en la tercera evaluación todas las plantas tratadas con *V. sphaerocephala* presentaron mayor ($P=0.0009$) número de hojas promedio (10) respecto a las plantas de los demás tratamientos (Figura 1C). El número de flores fue mayor ($P=0.0517$) en el tratamiento P+N con seis flores por planta en promedio en la primera evaluación. En la segunda evaluación el mayor número de flores se observó en el tratamiento P+N+V10% ($P=0.0001$) obteniendo un promedio de nueve flores. En la tercera evaluación la mayor cantidad de flores se registró en los tratamientos P, P+N y P+N+C, debido a que todas las plantas tratadas con *V. sphaerocephala* ya se encontraban en etapa de fructificación (Figura 1D). El índice de clorofila registrado en la primera evaluación fue similar en todos los tratamientos ($P=0.0565$). En la segunda evaluación los tratamientos P+N+T, P+N+C, P+N+V15% y P+N+V25% presentaron un índice de clorofila mayor al resto de los tratamientos. En la tercera evaluación hubo un decremento significativo en todos los tratamientos debido a la carga floral y fructífera en las plantas (Figura 1E).

La longitud de raíces en todos los tratamientos de *V. sphaerocephala* fueron significativos ($P=0.0968$) con un promedio de 25 cm (Figura 1F). El peso seco de raíz fue significativamente ($P=0.0650$) mayor para el tratamiento P+N+V10% con un promedio de 1.7 g (Figura 1G).

El efecto de los extractos de *V. sphaerocephala* sobre la afectación de *M. incognita* en plantas de *C. sativus*, 50 días después del trasplante, presentaron un índice de agallamiento menor ($P=0.05124$)

of the treatments. In the third evaluation, there was a significant decrease in all treatments, due to the number of fruits and flowers in the plants (Figure 1E).

The root length in all *V. sphaerocephala* treatments were significant ($P=0.0968$), with an average of 25 cm (Figure 1F). The dry weight of the roots was significantly ($P=0.0650$) higher for treatment P+N+V10% with an average of 1.7 g (Figure 1G).

The effect of the *V. sphaerocephala* extracts on the damage of *M. incognita* on *C. sativus* plants 50 days after transplanting, presented a lower rate of root-knotting ($P=0.05124$) in comparison with the treatment P+N. The roots of treatments P+N+V10% and P+N+T presented the lowest index of root-knotting (14.3%), followed by the treatments with extracts at 15%, Carbofuran and extracts at 25%. Plants with treatments *V. sphaerocephala* at 10% (P+N+V10%) presented no root-knots or egg masses, and these extracts were found to reduce the reproduction of females and the hatching of eggs (Figure 2A). Significant differences ($P=0.0001$) were found for the number of eggs in 10 g of roots in treatment P+N and the lowest values were found in treatments P+N+V10%, P+N+V15% and *Trichoderma*, which caused reductions of 20, 23.6 and 24.8% in the number of eggs in comparison with the control treatment (Figure 2B).

Regarding the number of larvae in the substrate, the treatments with carbofuran and with *V. sphaerocephala* extracts at 15% presented the lowest number, with 100 and 200 larvae, respectively. The larva population density in these treatments was significantly lower than the larva population densities presented in the control treatment. On the contrary, the treatment with *Trichoderma* displayed the highest number of larvae (380) for every 100 g of substrate. The *V. sphaerocephala* extracts did not entirely stop larvae from developing, probably

respecto al tratamiento P+N. Las raíces de los tratamientos P+N+V10% y P+N+T presentaron el menor índice de agallamiento (14.3%); seguidas de los tratamientos con extractos al 15%, Carbofuran y extractos al 25%. Se observó que las plantas con el tratamiento *V. sphaerocephala* al 10% (P+N+V10%) no se encontraron agallas ni masas de huevos, observando que dichos extractos disminuyeron la reproducción de las hembras y eclosión de los huevos (Figura 2A). El número de huevos en 10 g de raíz se observaron diferencias significativas ($P=0.0001$) en el tratamiento P+N, los valores más bajos se encontraron en los tratamientos P+N+V10%, P+N+V15% y *Trichoderma*, los

since these products only paralyze the nematodes instead of causing their death (Figure 2C).

Studies have pointed out the presence of terpenoid and flavonoid compounds and of free aromatic acids (Bohlmann *et al.*, 1980) in species such as *V. virgata* (Martínez *et al.*, 1983), *V. sordescens* (Bohlmann *et al.*, 1982), *V. glabrata* and *V. luetzelgurgii* (Bohlmann *et al.*, 1980). This investigation presents the first phytochemical study of *V. sphaerocephala* (Table 1), in which the presence of phenols (phenolic and/or polyphenols, mainly) that function as antioxidants and may have preventive properties for some diseases and are involved as regulators in defensive processes of

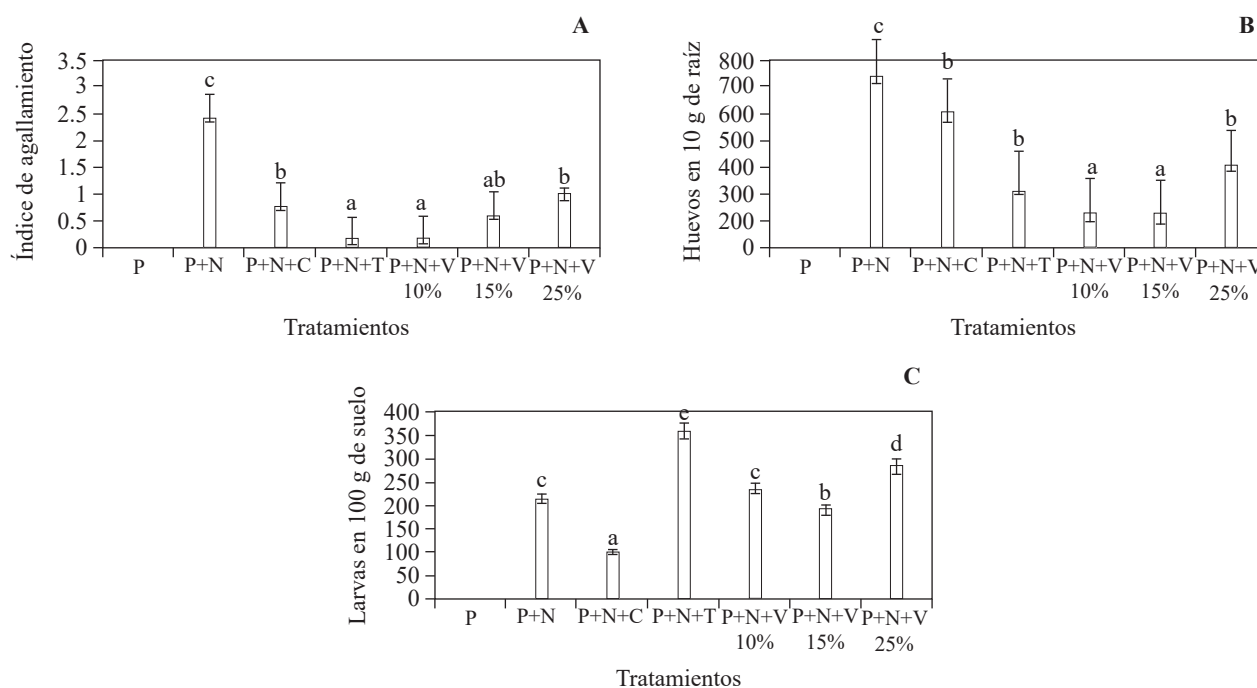


Figura 2. Efecto de los extractos de *V. sphaerocephala* sobre la afectación causada por *M. incognita* en plantas de *C. sativus*. A. Índice de agallamiento. B. Huevos en 10 g de raíz. C. Larvas en 100 g de suelo. Las medias con letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). P (sin nematodos), P+N (con nematodos), P+N+T (nematodos + *Trichoderma*), P+N+C (nematodos + carbofuran), P+N+V al 10, 15 y 25% (nematodos + extractos de *Verbesina* en diferentes concentraciones).

Figure 2. Effect of the *V. sphaerocephala* extracts on the damage caused by *M. incognita* on *C. sativus* plants. A. Root-knotting index. B. Eggs in 10 g of roots. C. Larvae in 100 g of soil. Means with different letters represent statistical differences according to Tukey's test ($P \leq 0.05$). P (without nematodes), P+N (with nematodes), P+N+T (nematodes + *Trichoderma*), P+N+C (nematodes + carbofuran), P+N+V at 10, 15 y 25% (nematodes + *Verbesina* extracts in different concentrations).

cuales provocaron una reducción en un 20, 23.6 y 24.8%, en el número de huevos en comparación al tratamiento control (Figura 2B).

Respecto al número de larvas en el sustrato, los tratamientos con aplicación de carbofuran y con extractos de *V. sphaerocephala* al 15% presentaron el menor número 100 y 200 larvas respectivamente. La densidad de población de larvas en estos tratamientos fue significativamente menor a las densidades de población de larvas presentada en el tratamiento control. Por el contrario, en el tratamiento con aplicación de *Trichoderma* se registró el mayor número de larvas (380 larvas) por 100 g de sustrato. Los extractos de *V. sphaerocephala* no impidieron por completo el desarrollo de las larvas; probablemente porque estos productos solo paralizan los nematodos sin provocarles la muerte (Figura 2C).

Estudios han indicado la presencia de compuestos terpenoide, flavonoide y ácidos aromáticos libres (Bohlmann *et al.*, 1980) en especies como *V. virgata* (Martínez *et al.*, 1983), *V. sordescens* (Bohlmann *et al.*, 1982), *V. glabrata* y *V. luetzelgurgii* (Bohlmann *et al.*, 1980). En esta investigación se presenta el primer estudio fitoquímico de *V. sphaerocephala* (Cuadro 1) donde fue evidente la presencia de fenoles (ácidos fenólicos y/o polifenoles principalmente) que funcionan como antioxidantes y pueden tener propiedades preventivas de algunas enfermedades e implicados como reguladores en procesos defensivos en las plantas e incluso con efectos alelopáticos (Willians *et al.*, 2004); también fue clara la presencia de alcaloides cuyas propiedades han sido documentadas como sustancias protectoras de las plantas contra el ataque de bacterias, virus, hongos y herbívoros (Bruneton, 2001). Con base a estos resultados, se pretende investigar en un futuro las actividades antioxidantes e inhibitoria de radicales, así como el tipo de alcaloides que contiene *V. sphaerocephala* para determinar su modo de acción.

plants, and even have allelopathic effects (Willians *et al.*, 2004), became evident. Also clear was the presence of alkaloids, which have properties that have been documented as protective of plants against the attack of bacteria, viruses, fungi and herbivores (Bruneton, 2001). Based on these results, there is an intention for future investigations of the antioxidant and inhibiting activities of radicals, as well as the type of alkaloids found in *V. sphaerocephala* to determine the way in which they react.

During the evaluations throughout the experiment, the 10 and 25% *V. sphaerocephala* extracts in all variables showed that they stimulate plant development, even in pots and in the presence of *M. incognita*, as mentioned by Mora *et al.* (2013), who point out that several *Verbesina* species contain active organic compounds as growth regulators.

According to the results obtained in each of the cucumber growth variables in pots, the 10% *Verbesina* extracts were efficient for plant height, number of leaves, flowers, chlorophyll index and dry weight of roots, as indicated by Oka (2012) in an investigation carried out on *V. encelioides* aqueous extracts, in which the nematocidal activity of *M. javanica* and the effect on the growth of *Inula viscosa*. The investigation coincides with the results of this investigation, in which *Verbesina* was found to be an efficient bio-stimulant, since it acted on the physiology of cucumber plants in different ways, and vigor and crop yield were not affected by the infestation of *M. incognita*.

Regarding the damage of *M. incognita* on cucumber plants, *Trichoderma* improves the resistance of the roots to the. Because it is considered an inoculant that promotes the growth and provides benefits and protection to the plants, it may have stimulated root development, helping reduce damage caused by nematodes (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). Baños *et al.* (2010) recommend the

Durante las evaluaciones a lo largo del experimento, los extractos de *V. sphaerocephala* al 10 y 25% en todas las variables demostraron que estimulan el desarrollo de la planta aun en condiciones de maceta y con la presencia de *M. incognita* tal como lo mencionan Mora *et al.* (2013), donde hacen referencia que varias especies de *Verbesina* tienen compuestos orgánicos activos como reguladores de crecimiento.

De acuerdo con los resultados obtenidos en cada una de las variables de crecimiento de pepino en maceta, los extractos de *Verbesina* al 10% fueron eficientes para altura de planta, número de hojas, flores, índice de clorofila y peso seco en raíz, como señala Oka (2012) en una investigación hecha con extractos acuosos de *V. encelioides* donde evaluó la actividad nematocida de *M. javanica* y el efecto en el crecimiento de *Inula viscosa*, la cual coincide con estos resultados donde *Verbesina* es eficaz como bioestimulante, ya que actuó sobre la fisiología de las plantas de pepino de diferentes formas y no se vio afectado el vigor y rendimiento del cultivo ante la infestación por *M. incognita*. Lo que respecta a la afectación de *M. incognita* sobre las plantas de pepino indicaron que *Trichoderma* mejoró la resistencia de las raíces a los síntomas de agallamiento. Es posible que al ser considerado como inoculante que promueve el crecimiento y brinda beneficios y protección a las plantas haya estimulado el desarrollo a las raíces lo que ayuda a disminuir la afectación por nematodos (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). Baños *et al.* (2010) recomiendan el uso de *Trichoderma* spp. en el manejo de *Meloidogyne* spp. en hortalizas, ya que afirman ser un biorregulador efectivo contra nematodos de este género por medio de sus toxinas e hifas. Por otro lado, la aplicación de *Trichoderma* no mostró actividad nematocida, ya que se encontró mayor número de nematodos en el suelo. Es posible que al

use of *Trichoderma* spp. in the management of *Meloidogyne* spp. in vegetables, since they proved to be an effective bioregulator against nematodes of this genus due to its toxins and hyphae. On the other hand, applying *Trichoderma* showed no nematocidal activity, since a greater number of nematodes were found on the soil. Stimulating the development of roots may have allowed a greater number of females to establish their feeding site, leading to a higher reproduction rate. It must be pointed out that the cucumber crop is susceptible to the attack of the *M. incognita* nematode, as expressed by Julca *et al.* (2001). Similar results were reported by Oka (2012) who, using *V. encelioides*, evaluated aqueous leaf extracts against *M. javanica*. Vázquez-Sánchez *et al.* (2018) determined the effectiveness of aqueous extracts of *V. sphaerocephala* leaves against *Nacobus* immobilizing the nematode, hindering their ability to feed and invade host leaves. Extracts of garlic (*Allium sativum*), marigold (*Tagetes erecta*), papaya (*Carica papaya*) and Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) have also been used to determine the nematocidal effects on *Meloidogyne* spp. in bean plants (*Phaseolus vulgaris*) (Parada and Guzmán, 1997). The use of *Tagetes zypaquirensis* essential oils has also been useful in the management of the nematode *Meloidogyne* spp. as published by Álvarez *et al.* (2015) and recommended by Elo *et al.* (2019) in an evaluation carried out with the selection of 10 plants grown in West Africa against *M. incognita*.

This investigation determined that the use of aqueous extracts of *V. sphaerocephala* at 10 and 15% may have the biological potential to minimize damages on roots caused by *M. incognita*. It is therefore necessary to carry out more rigorous studies to determine the effect of the extracts on the reproduction rate of *M. incognita*.

estimular el desarrollo de las raíces haya permitido que mayor número de hembras establecieran su sitio de alimentación, con la consiguiente mayor tasa de multiplicación. Hay que destacar, que el cultivo de pepino es susceptible al ataque del nematodo *M. incognita* como lo manifiesta Julca *et al.* (2001).

Resultados similares fueron reportados por Oka (2012), utilizando *V. encelioides*, quien evaluó extractos acuosos de hojas para combatir el nematodo *M. javanica*. Vázquez-Sánchez *et al.* (2018) determinó la efectividad de extractos acuosos de hojas de *V. sphaerocephala* contra *Nacobus* inmovilizando al nematodo, los cuales bloquearon la alimentación y capacidad para invadir las raíces de la planta huésped. Extractos de ajo (*Allium sativum*), cempasúchil (*Tagetes erecta*), papayo (*Carica papaya*) y barrenillo (*Cynodon dactylon*) también han sido utilizados para determinar los efectos nematocidas sobre *Meloidogyne* spp. en frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Parada y Guzmán, 1997). La aplicación de aceites esenciales de *Tagetes zypaquirensis* también ha sido útil para el manejo del nematodo *Meloidogyne* spp. como lo da a conocer Álvarez *et al.* (2015) y lo recomienda Eloh *et al.* (2019) en una evaluación hecha con la selección de 10 plantas cultivadas en África occidental para combatir *M. incognita*.

En esta investigación se determinó que el uso de extractos acuosos de *V. sphaerocephala* al 10 y 15% puede tener un potencial biológico para minimizar la afectación de las raíces causada por *M. incognita*. Por lo cual, es necesario realizar estudios más rigurosos para determinar el efecto de los extractos sobre la tasa de multiplicación de *M. incognita*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Sandra Fabiola Velasco-Ramírez por sus aportaciones técnicas e interpretación en los análisis fitoquímicos de *V. sphaerocephala*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks to Dr. Sandra Fabiola Velasco-Ramírez for her technical contributions and interpretation in the phytochemical analyses of *V. sphaerocephala*.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

#### LITERATURA CITADA

- Aissani N, Tedeschi P, Maietti A, Brandolini V, Garau VL, and Caboni P. 2013. Nematicidal Activity of Allylthiocyanate from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Roots against *Meloidogyne incognita*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61(20): 4723-4727. <http://dx.doi.org/10.1021/jf4008949>
- Álvarez DE, Botina JA, Ortiz AJ y Botina LL. 2015. Evaluación nematocida del aceite esencial de *Tagetes zypaquirensis* en el manejo del nematodo *Meloidogyne* spp. Revista de Ciencias Agrícolas 33(1): 22-33. <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.163301.3>
- Baños YS, Concepción AB, Lazo RC, González IA y Morejón LP. 2010. Efecto de enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. en el manejo de *Meloidogyne* spp. Revista Brasileira de Agroecología 5(2): 224-233. [https://orgprints.org/id/eprint/24512/1/Ba%C3%B1os\\_Efecto.pdf](https://orgprints.org/id/eprint/24512/1/Ba%C3%B1os_Efecto.pdf)
- Barker KR. 1985. Nematode extraction and bioassays. In: Barker KR, Carter CC, Sasser JN (eds) An advanced treatise on Meloidogyne, vol 2. Methodology. North Carolina University Graphics, Raleigh, 19-35p.
- Bohlmann F, Genz M, Gupta K, Dhar K, Ahmed M, King M and Robinson H. 1980. Eudesmane derivatives from *Verbesina* species. Phytochemistry 19(11): 2391-2397. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)91034-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)91034-3)
- Bohlmann F, Zdero C, Robinson H and King MR. 1982. Two new eudesmane cinnamates from *Verbesina sordescens*. Phytochemistry 21(7): 1663- 1664. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(82\)85036-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(82)85036-X)
- Bridge J and Page SLJ. 1980. Estimation of Root-knot Nematode Infestation Levels on Roots Using a Rating Chart. Tropical Pest Management 26(3): 296-298. <http://dx.doi.org/10.1080/09670878009414416>
- Bruneton J. 2001. Farmacognosia. Fitoquímica Plantas Medicinales. Segunda Edición. Editorial Acribia. 1100p.
- Chitwood DJ. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. Annual Review Phytopathology 40(1): 221-249. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.032602.130045>
- Eisenback JD, Hirschmann H, Sasser JN Y Triantaphyllou AC. 1983. Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) con una clave pictórica. International Meloidogyne Project, North Carolina 55p.

- Eloh K, Kpegba K, Sasanelli N, Koumaglo HK and Caboni P. 2019. Nematicidal activity of some essential plant oils from tropical West Africa. *International Journal of Pest Management* 1-11. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1576950>
- Gommers FJ and Bakker J. 1988 Physiological diseases induced by plant responses or products. *In: Poinar GO, Jansson H-B (eds) Diseases of nematodes, vol 1. CRC Press, Boca Raton, 3-22p*
- Hernández-Melchor DJ, Ferrera-Cerrato R y Alarcón A. 2019. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science* 35(1): 98-112. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hussey RS and Barker KR. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-1028
- Julca A, Gallego E, Sánchez J y Cordovilla P. 2001. Agua y nematodos parásitos de las plantas. *Revista Horticultura* 154: 1-7. [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_Hort/Hort\\_2001\\_154\\_20\\_26.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Hort/Hort_2001_154_20_26.pdf)
- Martínez AM, De Vivar RA, Ortega A, Quintero ML, García C and Fronczek RF. 1983. Eudesmane triols from *Verbesina virgata*. *Phytochemistry* 22(4): 979-982. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)85035-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)85035-3)
- Mora FDL, Alpan VJ, McCracken and Nieto M. 2013. Chemical and biological aspects of the genus *Verbesina*. *The Natural Products Journal* 3(2):140-150.
- Murcia OAM y Stashenko E. 2008. Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia. *Agro Sur*. 36(2):11. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2008.v36n2-03>
- Oka Y. 2010. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments. *Applied Soil Ecology* 44(2):101-115. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.11.003>
- Oka Y. 2012. Nematicidal activity of *Verbesina encelioides* against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and effects on plant growth. *Plant Soil*. 355(1-2): 311-322. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-011-1100-8>
- Oka Y, Ben-Daniel B and Cohen Y. 2001. Nematicidal activity of powder and extracts of *Inula viscosa*. *Nematology* 3(8):735-742. <https://doi.org/10.1163/156854101753625245>
- Parada RY y Guzmán RF. 1997. Evaluación de extractos botánicos contra el nematodo *Meloidogyne* sp., en frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomía Mesoamericana* 8(1): 108 - 114. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/24745>
- Pavaraj M, Bakavathiappan Ga and Baskaran S. 2012. Evaluation of some plant extracts for their nematicidal properties against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Biopesticides* 106-110. [http://www.jbiopest.com/users/LW8/efiles/Vol\\_5\\_0\\_106\\_110F.pdf](http://www.jbiopest.com/users/LW8/efiles/Vol_5_0_106_110F.pdf)
- Rzedowski J, Calderón de Rzedowski G y Carrillo-Reyes P. 2011. Compositae. Tribu Heliantheae II (géneros Lagascea-Zinnia). *Flora del Bajío y de Regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, México.*
- Satyendra S and Rekha B. 2021. Bio-management of soil borne pathogens infesting cucumber (*Cucumis sativus* L.) under protected cultivation system. *Biological Control* 157: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104569>
- Sayedain FS, Ahmadzadeh M, Fattah S and Bode H. 2021. Soil application of entomopathogenic nematodes suppresses the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in cucumber. *Journal of Plant Diseases and Protection* 1-9. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00367-1>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. Atlas-Agroalimentario. [inforural.com.mx](http://inforural.com.mx). (Consulta abril 2021).
- Vázquez-Sánchez M, Medina-Medrano JR, Cortez-Madrigal H, Angoa-Pérez MV, Muñoz-Ruiz CV, and Villar-Luna E. 2018. Nematicidal activity of wild plant extracts against second-stage juveniles of *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 48(2): 136-144. <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/107822>
- Velasco-Ramírez AP, Velasco-Ramírez SF y Velasco-Ramírez A. 2019. Uso en medicina tradicional de *Verbesina sphaerocephala* A. Gray (Asteraceae) en la comunidad de San Martín de las Flores, Jalisco, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 18(2): 144-154. [https://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/articulo\\_4\\_-\\_1566\\_-\\_144\\_-\\_154.pdf](https://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/articulo_4_-_1566_-_144_-_154.pdf)
- Williams CA and Graver RJ. 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Reports* 21(4): 539-573. <https://doi.org/10.1039/B311404J>