

JUGO DE BRÓCOLI EN LA INHIBICIÓN DE *Alternaria alternata* EN ARÚGULA MÍNIMAMENTE PROCESADA. CALIDAD POSTCOSECHA

María Antonia Flores-Córdova¹; María Teresa Martínez-Damián^{1*};
Juan Enrique Rodríguez-Pérez¹; María Teresa Colinas-León¹;
Daniel Nieto-Ángel²

¹Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5. Chapingo, Texcoco, Estado de México. MÉXICO. C.P. 56230.

²Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. MÉXICO. C.P. 56230.

Correo-e: teremd13@gmail.com (*Autora para correspondencia)

RESUMEN

Algunos vegetales de la familia de las *Brassicaceae* poseen propiedades antifúngicas, contra varios microorganismos de importancia económica, atribuidas a los glucosinolatos (GLs) mediante la hidrólisis de la enzima mirosinasa. En el presente estudio, inicialmente en condiciones *in vitro*, se evaluó la germinación de esporas de *Alternaria alternata* en medio de cultivo de papa dextrosa agar, en concentraciones 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01 y 0 µg·µl⁻¹. Posteriormente se verificó el efecto antifúngico del jugo de brócoli mediante la severidad e incidencia del daño y sobre la calidad postcosecha de hojas de arúgula almacenada en temperaturas de 0, 4 °C y ambiente (22 ± 3 °C) por 15 días; para ello, se inocularon con solución de esporas de *Alternaria* (1 x 10⁶) más jugo de brócoli en concentración de 2.98 y 1.49 µg·ml⁻¹; adicionalmente se ensayó un testigo. Ángulo hue, croma, luminosidad, clorofilas, CO₂ y etileno, fueron las variables a medir. Los resultados mostraron que la mínima concentración de jugo de brócoli *in vitro* fue de 0.07 µg·µl⁻¹ con un 100 % de inhibición. La concentración *in vivo* de 2.98 µg·ml⁻¹ con 0 % de daño y temperatura de 0 °C fueron las que conservaron los parámetros de calidad en excelentes condiciones al final del almacenamiento. Por lo que el jugo de brócoli (GLs) puede ser usado en postcosecha para el control de *Alternaria alternata*.

PALABRAS CLAVES ADICIONALES: *Eruca vesicaria* (L.) Cav. subsp. *sativa* (Mill.) Thell., glucosinolatos, bajas temperaturas, color, respiración.

BROCCOLI JUICE IN THE INHIBITION OF *Alternaria alternata* IN MINIMALLY PROCESSED ARUGULA. POSTHARVEST QUALITY

ABSTRACT

Some plants of the *Brassica* family have antifungal properties against various microorganisms of economic importance. These properties are attributed to Glucosinolates (GLs) by hydrolysis of the myrosinase enzyme. This study, initially under *in vitro* conditions, we evaluated the germination of *Alternaria alternata* spores on potato dextrose agar culture medium at concentrations 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01 and 0 µg·µl⁻¹. Subsequently we evaluated the antifungal effect of broccoli juice by severity and incidence of damage on post-harvest quality of arugula leaves stored at 0 and 4 °C and temperature (22 ± 3 °C) for 15 days; for this, leaves were inoculated with *Alternaria* spores solution (1 x 10⁶) plus broccoli juice concentration of 2.98 and 1.49 µg·ml⁻¹; control treatment was tested additionally. Hue angle, chroma, brightness, chlorophyll, CO₂ and ethylene were the variables measured. The results showed that the minimum concentration of broccoli juice was 0.07 µg·µl⁻¹ with 100 % inhibition. *In vivo* the concentration of 2.98 µg·mg⁻¹ with 0 % damage and temperature of 0 °C maintained the quality parameters in excellent condition at the end of storage. So broccoli juice (GLs) can be used in postharvest to control *Alternaria alternata*.

ADDITIONAL KEYWORDS: *Eruca vesicaria* (L.) Cav. subsp. *sativa* (Mill.) Thell., glucosinolates, low temperatures, color, respiration.

INTRODUCCIÓN

Los cambios demográficos y sociales han ejercido un efecto marcado en el consumo de alimentos en el mundo, lo que ha tenido como resultado que se demanden alimentos naturales, de apariencia, valor nutricional y microbiológicamente seguros (García-Iglesias *et al.*, 2006); un ejemplo, son las hierbas aromáticas frescas las cuales, en muchos países en desarrollo, representan el rubro principal de exportación y fuente de divisas. La pérdida del valor del producto y de su calidad, puede ocurrir durante el manejo postcosecha, almacenamiento y distribución, factores que causan considerables pérdidas económicas (González-Aguilar, 2005).

La arúgula (*Eruca sativa* Mill.), es una hierba aromática de origen mediterráneo y gracias a la demanda por la industria de mínimos procesados ha visto resurgir su consumo como un ingrediente de gran demanda, debido a sus hojas, además de enriquecer el sabor de las ensaladas, son una fuente de compuestos antioxidantes, como los polifenoles y vitamina C (Herrero y Romero, 2006). Sin embargo, esta hierba es susceptible al deterioro, así como al daño causado por *Alternaria* sp, hongo patógeno causante de la pérdida de calidad del producto, lo que acorta su tiempo de vida útil. Mantener el producto en refrigeración y envasado, lo salvaguarda frente a posibles alteraciones mecánicas, microbiológicas y biológicas (Artés-Calero, 2006). Asimismo, la calidad de los alimentos mejora significativamente con la incorporación de productos naturales denominados antimicrobianos, sustancias que retardan el crecimiento o inactivan la actividad metabólica de los microorganismos y, por lo tanto, detienen el deterioro del producto (Rodríguez-Sauceda, 2011).

Los principales productos naturales, que se utilizan para el control microbiológico, son metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, glucosinolatos, entre otros. A algunos vegetales, como el brócoli de la familia Brassicaceae se les atribuye la capacidad de sintetizar compuestos ricos en sulfuro, como los glucosinolatos, que contienen nitrógeno, azufre y se biosintetizan a partir de diversos aminoácidos (Bellostas *et al.*, 2004).

Al producirse daño tisular, los glucosinolatos (GLs) se hidrolizan rápidamente por la enzima mirosinasa, y actúan como precursores, relativamente estables de los isotiocianatos, tiocianatos o nitrilos, con propiedades antimicrobianas que pueden ser empleados para controlar diferentes enfermedades fitopatógenas (Zukalová y Vasák, 2002).

El potencial fungicida del género *Brassica* se ha comprobado en estudios *in vitro*, donde el uso de extractos acuosos de nabo inhibió completamente el crecimiento de oosporas de *Aphanomyces euteiches* (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007). Asimismo, aplicaciones de isotiocianato de alilo en vapor redujo 90 % la incidencia de *Penicillium* (Mari *et al.*, 2002). Este mecanismo de acción no está claro; sin embargo, el efecto perjudicial de los tejidos de crucíferas en otros

INTRODUCTION

Demographic and social changes have had a marked effect on food consumption in the world, provoking the demand of natural, microbiologically safe foods with nutritional value (García-Iglesias *et al.*, 2006); an example are the fresh herbs which in many developing countries, represent the main export and source of outside revenue. The loss of product value and quality can occur during postharvest handling, storage and distribution; these are factors that cause considerable economic losses (González-Aguilar, 2005).

Arugula (*Eruca sativa* Mill.) is an aromatic herb from the Mediterranean, thanks to the demand from the industry of minimum processed; its consumption has seen resurgence as high demand ingredient due to its leaves. Arugula leaves improve the taste of salads, and these leaves are a source of antioxidant compounds such as polyphenols and vitamin C (Herrero and Romero, 2006). However, this herb is susceptible to deterioration and damage caused by *Alternaria* sp, pathogen causing the loss of quality, shortening their lifespan. Keeping the product in refrigeration and packaged, helps against possible mechanical, microbiological and biological alterations (Artés-Calero, 2006). Also, the food quality is significantly improved with the addition of natural products called antimicrobial agent, which retard growth or inactivate the metabolic activity of microorganisms and, thus, stop the deterioration of the product (Rodríguez-Sauceda, 2011).

The main natural products, used for microbiological control, are secondary metabolites such as flavonoids, tannins, glucosinolates, among others. Some vegetables, such as broccoli from the Brassicaceae family have the ability to synthesize sulfur-rich compounds such as glucosinolates, which contain nitrogen, sulfur and are biosynthesized from various amino acids (Bellostas *et al.*, 2004).

When tissue damage occurs, the glucosinolates (GLs) are rapidly hydrolysed by the enzyme myrosinase, and act as precursors, relatively stable from isothiocyanates, nitriles or thiocyanates, with antimicrobial properties which can be used for controlling various phytopathogenic diseases (Zukalová and Vasák, 2002).

The fungicidal potential of *Brassica* has been demonstrated in *in vitro* studies, where the use of turnip aqueous extracts completely inhibited the growth of *Aphanomyces euteiches* oospores (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007). Also, applying allyl isothiocyanate in steam reduced the incidence of *Penicillium* at 90 % (Mari *et al.*, 2002). This mechanism of action is unclear; however, the damaging effect of cruciferous tissues on other microorganisms is mainly attributed to the release of glucosinolates products, of volatile degradation (Smolinska *et al.*, 2003).

Degradation products of GLs both volatile and water soluble, can participate in the deletion of certain diseases and

microorganismos, se atribuye principalmente a la liberación de productos glucosinolatos, de degradación volátiles (Smolinska *et al.*, 2003).

Los productos de degradación de GLs, tanto solubles en agua como volátiles, pueden participar en la supresión de algunas enfermedades y ser útiles en el control de patógenos en plantas. Es por ello, que en el presente estudio se evaluó, durante la conservación de hojas de arúgula en refrigeración (0 y 4 °C) y en ambiente (22 ± 3 °C), el efecto de diferentes concentraciones de jugo de brócoli (que contiene GLs) tanto *in vitro* como en vivo, sobre la inhibición de *Alternaria alternata*, así como la calidad y vida de anaquel de arúgula.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del jugo crudo de brócoli

Se empleó brócoli proveniente del mercado de abastos de Texcoco, Estado de México, el cual fue trasladado al laboratorio de Fisiología de Frutales de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Los floretes y tallos de brócoli, fueron desinfectados con hipoclorito de sodio, y molidos en extractor marca Moulinex, mediante la metodología establecida por Brandi *et al.* (2006). El jugo obtenido se dejó reposar 1 hora, con el fin de llevar a cabo el proceso de hidrólisis mediante la enzima mirosina. La muestra se centrifugó a $1,077.04 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ durante 10 min. El sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Método para determinar GLs en brócoli, mediante espectrofotometría

Para el proceso de liofilizado se obtuvo el jugo de brócoli mediante extractor marca Moulinex, el jugo se colocó en viales que fueron congelados a -20 °C, durante 24 horas, posteriormente se instalaron en el liofilizador durante 5 días hasta su deshidratación.

Se tomaron 0.5 mg de extracto de brócoli liofilizado (Jezek *et al.*, 1999), se le adicionaron 7.5 ml de buffer acetato 0.2 M y pH 4.2, 1.5 ml de acetato de plomo y bario 0.5 M. La mezcla se agitó vigorosamente en vortex. Se adicionaron 0.4 g de polivinilpirrolidona (PVPP) y se incubó a temperatura ambiente (22 ± 3 °C), con agitación en vortex, por 15 min. Después se agregaron 1.5 ml de sulfato de sodio 2 M y se centrifugó a $1,187.10 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ por 5 min a temperatura ambiente. Se tomó 0.9 ml del extracto tratado con PVPP, se mezcló con 0.9 ml de hidróxido de sodio 2 M y se incubó por 30 min. A la mezcla se le adicionó 0.138 ml de ácido clorhídrico concentrado y se centrifugó a $418.88 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ por 10 min. Para la determinación espectrofotométrica, 0.5 ml de sobrenadante se mezcló con 0.5 µl de solución de ferricianuro 2 mM en buffer fosfato 0.2 M y pH 7.0. Finalmente se midió la absorbancia de la solución a 420 nm antes de 15 s; se usó buffer fosfato, 0.2 M y pH 7.0, como blanco. Para la construcción de la curva de calibración se utilizó el pa-

be useful in controlling plant pathogens. It is for this reason that in the present study we evaluated the effect of different concentrations of broccoli juice (containing GLs) both *in vitro* and *in vivo* on inhibition of *Alternaria alternata*, and the quality and shelf life of arugula leaves stored at 0 and 4 °C and temperature (22 ± 3 °C).

MATERIALS AND METHODS

Obtaining raw broccoli juice

We used broccoli from the supply market at Texcoco, State of Mexico. The broccoli was carried to the laboratory of Fruit Physiology, Universidad de Chapingo (UACH). The broccoli florets and stems were disinfected with sodium hypochlorite, and milled using an Moulinex juicer, using the methodology established by Brandi *et al.* (2006). The juice obtained was allowed to stand 1 hour, to carry out the hydrolysis process using mirosina enzyme. The sample was centrifuged at $1,077.04 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ for 10 min. The supernatant was stored at -20 °C until use.

Method for determining GLs in broccoli by spectrophotometry

For the freeze-dried process, we used broccoli juice extracted with a Moulinex juicer, the juice was placed in frozen (-20 °C) vials for 24 hours, then placed in the freeze for 5 days until dehydration.

A total of 0.5 mg of lyophilized broccoli extract were taken (Jezek *et al.*, 1999), and we added 7.5 ml of 2 M acetate buffer and pH 4.2, 1.5 ml of lead acetate and 0.5 M of barium. The mixture was stirred vigorously in vortex. A total of 0.4 g of polyvinylpyrrolidone (PVPP) were added and incubated at room temperature (22 ± 3 °C), with vortex agitation, for 15 min. Then, 1.5 ml of 2 M sodium sulfate were added and centrifuged at $1,187.10 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ for 5 min at room temperature. We took 0.9 ml of the treated extract with PVPP, and mixed with 0.9 ml of 2 M sodium hydroxide and incubated for 30 min. To the mixture we added 0.138 ml of concentrated hydrochloric acid and centrifuged at $418.88 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ for 10 min. For the spectrophotometric determination, 0.5 ml of supernatant were mixed with 0.5 µl of 2 mM ferricyanide solution in 0.2 M phosphate buffer and pH 7.0. Finally, we measured the absorbance of the solution at 420 nm within 15 s; we used phosphate buffer, 0.2 M and pH 7.0 as a blank. To elaborate the calibration curve, we used the 5.60×10^{-3} M sinigrin pattern with different dilutions, from 0-90 µl. The regression model was fitted with the spectrophotometer data, to determine the concentration of GLs obtained from the broccoli juice.

Effect of the broccoli juice GLs on *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl *in vitro*

The isolation of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl was obtained from arugula leaves with leaf spot symptoms, from

trón sinigrina 5.60×10^{-3} M con diferentes diluciones, desde 0 hasta 90 μ l. Con los datos del espectrofotómetro se ajustó un modelo de regresión, para determinar la concentración de los GLs obtenidos del jugo de brócoli.

Efecto del jugo de brócoli GLs en *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl *in vitro*

El aislamiento de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl se obtuvo de hojas de arúgula con síntomas de mancha de hoja, procedentes del estado de Morelos. El aislamiento se hizo en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). Las características fueron estudiadas de acuerdo a las claves morfológicas de Barnett y Hunter (1998) y Rotem (1994) y la identificación se realizó mediante secuenciación de ADN.

La inhibición de la germinación de esporas de *A. alternata* fue probada con diferentes concentraciones de jugo de brócoli: 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01, 0 μ g· μ l⁻¹, el cual fue colocado en el medio de cultivo PDA, junto a 20 μ l de la solución de esporas de *A. alternata*. Después, de sembrar la solución de esporas en los recipientes de PDA (que contenían el jugo de brócoli), con la ayuda de un microscopio binocular marca Labomed modelo LX400, USA, se cuantificó la germinación de las esporas de *A. alternata* a las 2, 4 y 6 horas. Se consideraron 100 esporas al azar y de cada concentración se hicieron tres repeticiones. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la fórmula: $IN (\%) = [(a - b) / a] \cdot 100$, donde: a es el total de esporas germinadas del testigo y b el total de esporas germinadas del tratamiento.

Efecto del jugo de brócoli GLs en *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl *in vivo*

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología de Frutales de la UACH, la arúgula fue proporcionada por la empresa Glezte ubicada en Axochiapan, Morelos. La arúgula se lavó y desinfectó con hipoclorito de sodio a 100 ppm. Posteriormente se dividió el material en cuatro grupos para las aplicaciones correspondientes, donde el grupo uno, fue sumergido por 1 min en una concentración de 2.98 μ g·ml⁻¹ de jugo de brócoli más la inoculación de las esporas de *A. alternata* (1×10^6); grupo dos, fue sumergido por 1 min en una concentración de 1.49 μ g·ml⁻¹ de jugo de brócoli más la inoculación de esporas de *Alternaria*; grupo tres, solamente se inoculó con la solución de esporas de *Alternaria* (1×10^6) y el grupo cuatro correspondió al testigo que consistió únicamente en arúgula. Posteriormente se secaron, se envasaron 100 g en charolas rígidas y se almacenaron en refrigeración a 0, 4 °C y temperatura ambiente (22 ± 3 °C), durante 15 días.

La severidad del daño se evaluó cada tercer día, como porcentaje de infección por planta, con una escala diagramatizada elaborada con el programa 2 log. Con esta calificación nominal, se obtuvo el índice poblacional de severidad al aplicar la fórmula: $IS = \sum (X_i N_i) / N$ donde: IS = índice de severidad; X_i = nivel del daño en el momento i; N_i = número

the state of Morelos. The isolation was made with potato dextrose agar (PDA) culture medium. The characteristics were studied according to the morphological keys of Barnett and Hunter (1998) and Rotem (1994), and identification was performed by DNA sequencing.

The inhibition of germination of *A. alternata* spores was tested with different concentrations of broccoli juice: 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01, 0 μ g· μ l⁻¹, placed on the culture medium PDA, next to 20 μ l of solution of *A. alternata* spores. Later, after seeding the solution of spores in containers with PDA (containing broccoli juice), using a Labomed binocular microscope model LX400, USA, the germinating spores of *A. alternata* was quantified at 2, 4 and 6 hours. A total of 100 spores were randomly chosen and from each concentration three replications were made. The percentage of inhibition was calculated by the formula: $IN (\%) = [(a - b) / a] \cdot 100$, where: a is the total number of germinated spores, and b is the total of spores germinated from the treatment.

Effect of broccoli juice GLs on *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl *in vivo*

The experiment was conducted at the laboratory of Fruit Physiology, UACH. The arugula was provided by the company Glezte located in Axochiapan, Morelos. The arugula was washed and disinfected with sodium hypochlorite at 100 ppm. Then, the material was divided into four groups for the respective applications, where group one was immersed for 1 min in a concentration of 2.98 μ g·ml⁻¹ of broccoli juice plus the inoculation of spores of *A. alternata* (1×10^6); group two, was immersed for 1 min in a concentration of 1.49 μ g·ml⁻¹ broccoli juice plus the inoculation of *Alternaria*; group three, arugula was inoculated only with the solution of spores of *Alternaria* (1×10^6) and group four corresponded to the control treatment consisting only of arugula. Later the sample was dried, and 100 g were packaged in rigid trays and stored in refrigeration at 0, 4 °C and room temperature (22 ± 3 °C) for 15 days.

The severity of damage was assessed every third day, as a percentage of plant infection, with a diagramatized scale made with the program 2 log. With this nominal rating, population severity index was obtained by applying the formula: $IS = \sum (X_i N_i) / N$ where: IS = severity index; X_i = level of damage at time i; N_i = number of plants with the level of damage at time i, and N = total number of plants evaluated.

The incidence of leaf damage was determined using the formula: $I \% = (n_i / N) \cdot 100$ where: I (%) = disease incidence in percentage; n_i = number of diseased plants at time i, and N = total number of plants evaluated.

Effect of GLs in postharvest quality of arugula *in vivo*

The broccoli effect on quality and shelf life of arugula leaves was determined by evaluating the variables:

de plantas con el nivel del daño en el momento i , y N = número total de plantas evaluadas.

La incidencia del daño en las hojas se determinó mediante la fórmula: $I \% = (n_i / N) \cdot 100$ donde: I (%) = incidencia de la enfermedad en porcentaje; n_i = número de plantas enfermas en el momento i , y N = número total de plantas evaluadas.

Efecto de GLs en la calidad postcosecha de arúgula en vivo

El efecto del jugo de brócoli en la calidad y vida de anaquel de las hojas de arúgula, fue determinado mediante la evaluación de las variables:

Color. Se midió con un espectrofotómetro de esfera X Rite modelo SP62, el cual mediante un sistema tristímulo permite obtener las dimensiones L , a y b . El parámetro L mide directamente la luminosidad o brillantez y varía de 0, que representa color totalmente oscuro, hasta 100 (máximo brillo). El valor “ a ” representa al color rojo si es positivo y verde si es negativo, y el parámetro “ b ” corresponde al amarillo si es positivo y azul si es negativo (Figueroa *et al.*, 2005).

Clorofila total. Se determinó por el método descrito por Witham *et al.* (1971). Se pesó 0.1 g de tejido fresco, se cortó en pequeños trozos, se maceró con 5 ml de acetona al 100 % v/v y se dejó reposar por 3 min. Posteriormente se uniformizó la muestra con un homogenizador T25 basic IKA Labor-technik, para luego filtrar con gasa. Al residuo se le adicionó acetona hasta aforar a 5 ml y se dejó reposar. Después se aforó a 25 ml con acetona para determinar la absorbancia a A_{662} y A_{645} nm en un espectrofotómetro Genesys thermo scientific (USA). Los cálculos se realizaron de acuerdo con: Clorofila total $(Ca + b) = 7.05 (A_{662}) + 18.09 (A_{645})$ y la concentración se expresó como $mg \cdot g^{-1}$ de peso fresco.

CO₂ y etileno. Se determinaron por el método estático; para ello se colocaron hojas en recipientes de vidrio con volumen de 2.8 litros y tapa hermética durante 1 hora, a temperatura ambiente (25 °C) en luz; posteriormente se extrajeron 5 ml de la muestra con una jeringa (10 ml) y se colocaron en un vacutainer al vacío a -20 °C hasta su evaluación. Se tomó 1 ml de cada muestra y se inyectaron en un cromatógrafo de gases, Varian Star 3400, con detector de ionización de flama (FID) y columna capilar *Chrompak* de 27.5 m de largo, 0.32 mm de diámetro interno y 0.45 mm de diámetro externo, con capa porosa de sílica como fase estacionaria; el gas de arrastre fue helio. Las temperaturas del cromatógrafo fueron de 80, 150, 250 y 170 °C en columna, inyector, auxiliar y detector, respectivamente y se expresaron en $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ y la de etileno en $\mu l \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones. Los datos obtenidos *in vitro* e *in vivo* se sometieron a análisis de varianza y a comparación de medias

Color. Medido con un X Rite sphere spectrophotometer model SP62, which through a tristimulus system allows obtaining L , a and b dimensions. The parameter L directly measures the brightness which ranges from 0, representing fully dark color, up to 100 (maximum brightness). Value “ a ” corresponds to red if it positive and green if it is negative, and the parameter “ b ” corresponds to yellow if it is positive and blue if it is negative (Figueroa *et al.*, 2005).

Total chlorophyll. Was determined by the method described by Witham *et al.* (1971). A total of 0.1 g of fresh tissue was weighed, cut into small pieces, macerated with 5 ml of acetone at 100 % v/v and allowed to stand for 3 min. Later, the sample was standardized with a IKA Labortechnik T25 basic homogenizer, then filtered with gauze. To the residue was added acetone gauging up to 5 ml and allowed to stand. Then, the sample was gauged to 25 ml with acetone to determine the absorbance at A_{662} and A_{645} nm using a Genesys Thermo Scientific spectrophotometer (USA). The calculations were performed according to: Total Chlorophyll $(Ca + b) = 7.05 (A_{662}) + 9.18 (A_{645})$ and the concentration was expressed as $mg \cdot g^{-1}$ fresh weight.

CO₂ and ethylene. Were determined by the static method; for it, leaves were placed in glass containers with a volume of 2.8 liters and airtight lid for 1 hour at room temperature (25 °C) in light; then, 5 ml of the sample were extracted with a syringe (10 ml) and placed in a vacutainer in vacuum at -20 °C until assessment. Then 1 ml of each sample was taken and injected into a gas chromatograph, Varian Star 3400, with flame ionization detector (FID) and capillary column *Chrompak* of 27.5 m long, 0.32 mm internal diameter and 0.45 mm outside diameter with porous silica layer as stationary phase; the carrier gas was helium. Chromatograph temperatures were 80, 150, 250 and 170 °C in column, injector, and detector auxiliary respectively and expressed in $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ and ethylene in $\mu l \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized with three replications. The data obtained *in vitro* and *in vivo* were subjected to analysis of variance and Tukey's mean comparison ($\alpha = 0.05$) using the statistical program SAS® (Statistical Analysis System) version 9.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Broccoli GLs determination by spectrophotometry

The model used was: $Y = -0.0041x + 0.9313$ ($R^2 = 0.97$, $P \leq 0.002$) and the concentration of GLs obtained was $0.0029 mg \cdot ml^{-1}$.

Effect of broccoli juice GLs on *Alternaria alternata* in vitro

A. alternata was observed on arugula leaves *in vitro*, which had dark green colony, light brown simple co-

de Tukey ($\alpha = 0.05$) mediante el programa estadístico SAS® (Statistical Analysis System) ver. 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de GLs en brócoli, mediante espectrofotometría

El modelo utilizado fue: $Y = -0.0041x + 0.9313$ ($R^2 = 0.97$, $P \leq 0.002$) y la concentración de GLs obtenida fue de $0.0029 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Efecto del jugo de broccoli GLs en *Alternaria alternata* *in vitro*

Se identificó un cultivo de *A. alternata* en hojas de arúgula *in vitro*, el cual presentó colonia verde oscuro, conidióforos simples de color café claro tabicados, y conidios con septa transversal y longitudinal, características que corresponden a la especie de *Alternaria alternata* de acuerdo a las claves y descripciones de Barnett y Hunter (1998) y Rotem (1994), además confirmada por la secuenciación alineada en el banco de genes (NCBI), lo que corresponde con lo reportado por Andersen *et al.* (2001) y Fraire-Cordero *et al.* (2010).

En la Figura 1 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de jugo de brócoli GLs en la inhibición de la germinación de esporas a las 6 horas a 26°C , en donde se observa que las concentraciones de jugo de brócoli 0.15 , 0.11 y $0.07 \text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, no presentaron la germinación del 0 %, las concentraciones 0.04 , $0.01 \text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ tuvieron menor efecto; aunque los tratamientos con jugo de brócoli GLs disminuyeron el crecimiento del hongo. Se ha demostrado que los GLs tienen efecto en contra de algunos patógenos. Por ejemplo, Sisti *et al.* (2006), probaron jugo acuoso crudo de *Brassica* en la inhibición de *Candida albicans* después de 4 horas de incubación, con $0.054 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, obtuvieron 95 % de inhibición, similar a lo encontrado en este estudio. Mari *et al.* (1996) reportan que los isotiocianatos derivados de los glucosinolatos utilizados en una concentración de $3.6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, fueron probados en diversos hongos controlando totalmente al patógeno en frutos de peras.

Asimismo sustancias volátiles de plantas de *Brassicca rapa* ($20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) inhibieron el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* (Masahiro *et al.*, 2006).

Efecto del jugo de broccoli GLs en *Alternaria alternata* *in vivo*

En el Cuadro 1 se observan los porcentajes de severidad (porcentaje del tejido dañado en relación al total del tejido evaluado) causados por *A. alternata* en hojas de arúgula. El tratamiento sin GLs + inóculo presentó la mayor severidad durante todo el periodo de evaluación; la menor severidad (0 %) se presentó cuando se aplicó $2.98 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de GLs, por lo que es evidente el efecto del jugo de brócoli GLs en el control de la alteración causada por *A. alternata*. El control obtenido en el

nidiophores and conidia with transverse and longitudinal septa, characteristics that correspond to *Alternaria alternata* according to keys and descriptions of Barnett and Hunter (1998) and Rotem (1994), and confirmed by sequencing dress in the gene bank (NCBI), which corresponds with that reported by Andersen *et al.* (2001) and Fraire-Cordero *et al.* (2010).

Figure 1 shows the effect of different concentrations of broccoli juice GLs on the inhibition of spore germination at 6 hours at 26°C , where it is observed that the concentrations of broccoli juice 0.15 , 0.11 and $0.07 \text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, showed no germination of 0 %, the concentrations 0.04 , $0.01 \text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ had less impact; although treatments with broccoli juice GLs decreased fungal growth. It has been shown that the GLs are effective against some pathogens. For example, Sisti *et al.* (2006), tested *Brassica* aqueous raw juice on the inhibition of *Candida albicans* after 4 hours of incubation, with $0.054 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, achieved 95 % inhibition, similar to what was found in this study. Mari *et al.* (1996) report that isothiocyanates derived from glucosinolates used in a concentration of $3.6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, were tested in several fungi totally controlling the pathogen in pear fruits.

Moreover, plant volatiles of *Brassicca rapa* ($20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) inhibited the mycelial growth of *Rhizoctonia solani* (Masahiro *et al.*, 2006).

Effect of broccoli juice GLs on *Alternaria alternata* *in vivo*

Table 1 shows the percentages of severity (percentage of tissue damaged in relation to the total tissue evaluated) caused by *A. alternata* on arugula leaves. Treatment without GLs + inoculum had the highest severity throughout the evaluation period; the lower severity (0 %) was when $2.98 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of GLs was applied, so the effect of broccoli juice GLs in controlling the alteration caused by *A. alternata* is evident. The control obtained in this study was higher than those reported by Troncoso-Rojas *et al.* (2005), who had a reduction of 80 % of damaged caused by *A. alternata* on tomatoes, using isothiocyanates (ITCs) derivatives from the GLs, in concentration of $0.56 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. The present study showed no significant differences until day five of the evaluation, and from day seven, the concentration $2.98 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of GLs was more effective for the control of *A. alternata*; results similar to those of Tiznado-Hernández and Troncoso-Rojas (2006) who showed that the isothiocyanate (ITC) 3-metilsufnil-3-butenil in concentration of $3.6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ completely inhibited the growth of *Monilinia laxa* on pear fruits. Moreover benzyl ITC at concentrations of 0.28 and $0.56 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ completely inhibited the mycelial growth of *A. alternata* in sweet pepper fruits (Troncoso *et al.*, 2005).

As for the room temperature with $22 \pm 3^\circ\text{C}$ showed increased damage caused by *A. alternata* during the storage period; 0 and 4°C had damage statistically similar at three and five

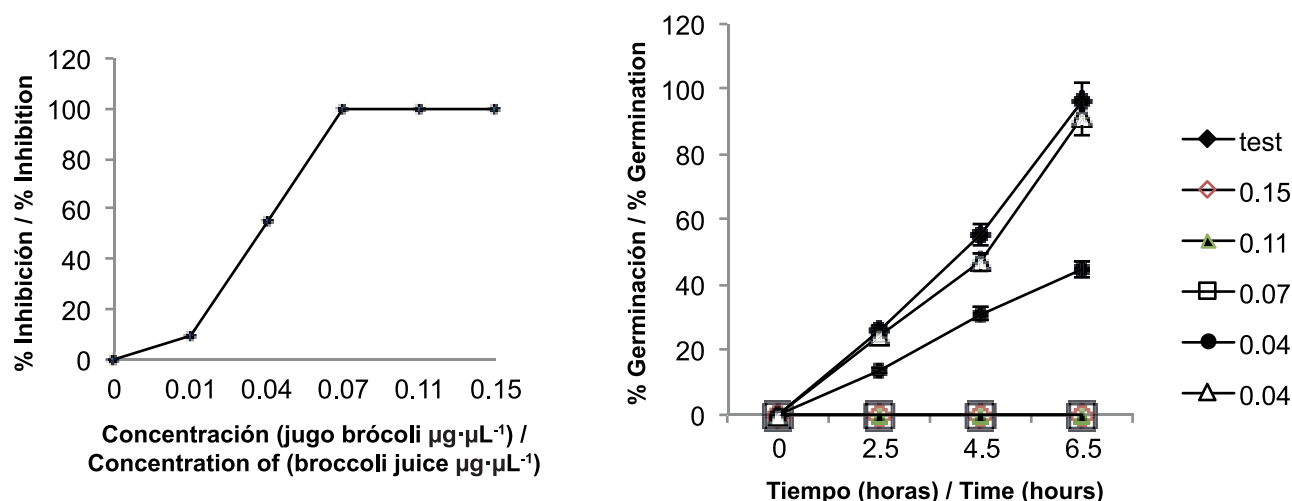


FIGURA 1. Efecto del jugo de brócoli sobre a) la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria* en arúgula a las 6 horas de inoculada y b) el porcentaje de germinación a los distintos tiempos de evaluación.

FIGURE 1. Effect of broccoli juice on a) inhibition of germination of *Alternaria* spore on arugula at 6 hours inoculation b) germination percentage to different evaluation times.

presente estudio fue superior a los reportados por Troncoso-Rojas *et al.* (2005), quienes tuvieron una reducción de 80 % de daño causado por *A. alternata* en tomates, con el uso de isotiocianatos (ITCs) derivados de los GLs, en concentración de $0.56 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. En el presente estudio, no existieron diferencias significativas hasta el día cinco de evaluación, y a partir del día siete, la concentración $2.98 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de GLs fue más efectiva para el control de *A. alternata*; resultados similares a los de Tiznado-Hernández y Troncoso-Rojas (2006) quienes mostraron que el isotiocianato (ITC) 3-metilsufnil-3-butenil en concentración de $3.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ inhibió totalmente el crecimiento de *Monilinia laxa* en frutos de pera. Por otra parte el ITC de bencil en concentraciones de 0.28 y $0.56 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ inhibió por completo el crecimiento micelial de *A. alternata* en frutos de pimiento morrón (Troncoso *et al.*, 2005).

En cuanto a la temperatura ambiente con $22 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ se presentó mayor daño causado por *A. alternata* durante el periodo de almacenamiento; en 0 y $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ el daño fue estadísticamente igual en tres y cinco días de conservación; sin embargo, a partir del día siete existieron diferencias significativas, en donde sólo la temperatura de $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ proporcionó control adecuado sobre la presencia de *A. alternata*. Esto coincide con Koukounaras *et al.* (2007) ya que las hojas de arúgula se pueden refrigerar con buenos resultados a $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, con vida de almacén máximo de 16 días. Los mismos autores señalan que con $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ se genera un ligero deterioro de la calidad del producto y su vida útil se reduce a 3 días, resultado similar a lo obtenido en este estudio con $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Se obtienen mejores resultados con temperatura de $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para prolongar la vida de anaquel de arúgula.

days of preservation; however, from day seven we observed significant differences, where only the temperature of $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ provided adequate control of *A. alternata*. This coincides with Koukounaras *et al.* (2007) as the arugula leaves can be successfully cooled to $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, with maximum storage life of 16 days. The same authors report that at $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ we can observe a slight deterioration in the quality of the product and its life is reduced 3 days, similar to that obtained in this study with $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Better results are obtained with $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ to prolong the shelf life of arugula.

The results obtained give a clear picture of the effect of GLs on the inhibition of *A. alternata* on arugula leaves; however, the mode of action of the GLs is not yet fully established, but is believed to cause breaking of the cell wall and cell membrane degradation of enzymes, inhibition of protein synthesis and pathogen gene system (Rodríguez-Sauceda, 2011).

In terms of incidence percentage of *A. alternata* (Table 2), the concentration of $2.98 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of GLs presented 0 % incidence and treatment without GLs + inoculum had greater incidence with 87.5 % at the end of lifespan. Monfor *et al.* (2007) found that *Brassica* species grown in Georgia, USA, as turnips, broccoli and radish contain properties that act against soil fungi, which decreased 80 % incidence of these microorganisms.

From day five of storage, we observed significant differences in the effects of treatments evaluated; however, from the ninth day, the concentration of $2.98 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of GLs, maintained incidence of 0 %, the above coincides with the result obtained in severity.

CUADRO 1. Efecto de las concentraciones de GLs y temperaturas (0 y 4 °C) y ambiente (22 ± 3 °C) de almacenamiento en la severidad de *Alternaria* en hojas de arúgula.TABLE 1. Effect of the concentrations of GLs at 0 and 4 °C and room temperature (22 ± 3 °C) in the severity of *Alternaria* on arugula leaves.

Factor / Nivel Factor / Level	% de Severidad de <i>Alternaria</i> / % Severity of <i>Alternaria</i>							
µg·ml ⁻¹ GLs	Día 0 / Day 0	Día 3 / Day 3	Día 5 / Day 5	Día 7 / Day 7	Día 9 / Day 9	Día 11 / Day 11	Día 13 / Day 13	Día 15 / Day 15
Concentraciones / Concentrations								
Sin GLs sin inóculo / Without GLs without inoculum	0	5.50 b	9.26 a	13.8 b	4.16 b	9.03 b	13.1 b	17.3 b
Sin GLs + inóculo / Without GLs + inoculum	0	6.90 a	12.9 b	22.6 a	13.1 a	17.3 a	19.8 a	37.2 a
1.49 GLs + inóculo / 1.49 GLs + inoculum	0	1.80 c	5.09 c	6.90 c	0.69 c	2.08 c	3.40 c	3.40 c
2.98 GLs + inóculo / 2.98 GLs + inoculum	0	1.30 c	3.70 c	5.00 d	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d
DMSH / LSD		0.90	2.02	1.80	2.81	2.78	2.50	2.50
Temperatura °C / Temperature °C								
22	0	11.8 a	22.5 a	32.2 a	-	-	-	-
4	0	0.00 b	0.69 b	3.10 b	5.90 a	9.30 a	11.6 a	17.7 a
0	0	0.00 b	0.00 b	1.04 c	3.10 b	4.80 b	6.59 b	11.6 b
DMSH / LSD		0.73	1.58	1.41	1.40	1.45	1.31	2.60

Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con $P \leq 0.05$). DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: glucosinolatos.

Means with the same letter within columns are not different (Tukey con $P \leq 0.05$). LSD: Least significant difference. GLs: glucosinolates.

Los resultados obtenidos, dan una idea clara del efecto de los GLs sobre la inhibición de *A. alternata* en las hojas de arúgula, sin embargo, el modo de acción de los GLs aún no está plenamente establecido, aunque se cree que puede causar rompimiento de la pared celular y membrana celular, degradación de enzimas, inhibición de síntesis de proteína y sistema génico del patógeno (Rodríguez-Sauceda, 2011).

En cuanto al porcentaje de incidencia de *A. alternata* (Cuadro 2), la concentración de 2.98 µg·ml⁻¹ de GLs presentó 0 % de incidencia y el tratamiento sin GLs + inóculo la mayor incidencia con 87.5 % al final de la vida útil. Monfor *et al.* (2007) comprobaron que especies de *Brassica* cultivadas en Georgia, EUA, como el nabo, brócoli y rábano, contienen propiedades que actúan contra hongos del suelo, los cuales disminuyeron 80 % la incidencia de estos microorganismos.

A partir del día cinco de almacenamiento, se presentaron diferencias significativas, en los efectos de tratamientos evaluados; sin embargo, a partir del día nueve la concentración de 2.98 µg·ml⁻¹ de GLs, mantuvo incidencia de 0 %, lo anterior coincide con el resultado obtenido en severidad.

En la temperatura de 22 °C hubo mayor incidencia del hongo, entre 0 y 4 °C no se detectaron diferencias estadísticas

At 22 °C, there was a higher incidence of the fungus, between 0 and 4 °C, no differences were detected at three to five days. From day seven, the incidence rates were statistically different, reaching final values of 50.0 and 35.4 % at 0 and 4 °C respectively. This implies that the ideal temperature to preserve arugula leaves is 0 °C.

Hue angle

Regarding the hue angle, there were significant differences between the concentrations of GLs for daily evaluation (Table 3). From day three, treatment with 2.98 µg·ml⁻¹ of GLs + inoculum was statistically superior to all other treatments followed by 1.49 µg·ml⁻¹ of GLs + inoculum. The green color is an important attribute for the perception of freshness in arugula leaves, so the use of GLs favors retention of green color and maintains its quality (Char *et al.*, 2012). Inoculum treatment with inoculum and without GLs had the lowest averages ranging from 111 (green) and 98 yellow during the 15 days of evaluation and had higher leaf damage; well, it could be mention that the fungus inhibited the phosphorylation because it binds to the chloroplast and generates color loss (Pavón-Moreno *et al.*, 2012). Koukounaras *et al.*, (2009), in a study performed in arugula, obtained values of 126-122, with slightly decrease, keeping the green color, a situation

CUADRO 2. Efecto de las concentraciones de GLs y temperaturas (0 y 4 °C) y ambiente (22 ± 3 °C) de almacenamiento en la incidencia de *Alternaria* en hojas de arúgula.TABLE 2. Effect of the concentrations of GLs at 0 and 4 °C and room temperature (22 ± 3 °C) in the incidence of *Alternaria* on arugula leaves.

Factor / Nivel Factor / Level	% Incidencia / % Incidence							
µg·ml ⁻¹ GLs	Día 0 / Day 0	Día 3 / Day 3	Día 5 / Day 5	Día 7 / Day 7	Día 9 / Day 9	Día 11 / Day 11	Día 13 / Day 13	Día 15 / Day 15
Concentraciones / Concentrations								
Sin GLs sin inóculo / Without GLs without inoculum	0	22.2 a	38.8 a	41.6 a	29.1 b	37.5 b	50.0 b	58.3 b
Sin GLs + inóculo / Without GLs + inoculum	0	27.7 a	30.ab	52.7 a	50.0 a	62.5 a	75.0 a	87.5 a
1.49 GLs + inóculo / 1.49 GLs + inoculum	0	11.1 b	19.4 b	25.0 b	4.16 c	8.30 c	20.8 c	20.8 c
2.98 GLs + inóculo / 2.98 GLs + inoculum	0	8.30 b	16.6 b	22.2 b	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d
DMSH / LSD		9.38	9.38	15.3	18.8	9.87	18.8	18.8
Temperatura °C / Temperature °C								
22	0	52.0 a	75.0 a	85.4 a	-	-	-	-
4	0	0.00 b	4.16 b	14.5 b	29.1 a	33.3 a	41.6 a	50.0 a
0	0	0.00 b	0.00 b	6.20 c	12.5 b	20.8 b	31.2 b	35.4 b
DMSH / LSD		7.30	7.35	12.0	9.80	9.87	9.80	7.60

Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con $P \leq 0.05$). DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: glucosinolatos.

Means with the same letter within columns are not different (Tukey with $P \leq 0.05$). LSD: Least significant difference. GLs: glucosinolates.

en tres y cinco días. A partir del día siete, los porcentajes de incidencia fueron estadísticamente diferentes, hasta llegar a valores finales de 50.0 y 35.4 % en 0 y 4 °C respectivamente. Lo anterior implica que la temperatura ideal para la conservación de las hojas de arúgula es 0 °C.

Ángulo hue

En relación al ángulo hue, hubo diferencias significativas entre las concentraciones de GLs durante todos los días de evaluación (Cuadro 3). A partir del día tres, el tratamiento con 2.98 µg·ml⁻¹ de GLs + inóculo fue estadísticamente superior al resto de tratamiento seguido por 1.49 µg·ml⁻¹ de GLs + inóculo. El color verde es un importante atributo para la percepción de frescura en hojas de arúgula, por lo que el empleo del GLs favorece la permanencia del color verde y mantiene su calidad (Char *et al.*, 2012). El tratamiento con inóculo y sin GLs tuvo los promedios más bajos que oscilaron entre 111 (verde) y 98 amarillo durante los 15 días de la evaluación y presentó mayores daños en las hojas; así, se podría hacer referencia a que el hongo inhibió la fosforilación debido a que se une al cloroplasto y genera pérdida de color (Pavón-Moreno *et al.*, 2012). Koukounaras *et al.*, (2009), en un trabajo también realizado en arúgula, obtuvieron valores de 126 a 122, con poco decremento, manteniendo el color

that was also observed in this work. With respect to temperature, storage at 0 °C, statistically outperformed other temperatures employed, regarding color maintenance from day 3 to 15 day storage, retaining more effectively the green color because higher values were obtained, situation observed by Koukounaras *et al.* (2007) who argue that the arugula leaves can be refrigerated at 0 °C with good results. Moreover, we agree with Marie *et al.* (2012) who found that at 2 °C, arugula kept their green color up to 7 days; however, at 20 °C for 4 to 6 days, the yellowing was intense, and therefore, there was no loss of product quality.

Chroma

With respect to chroma, significant differences were observed in treatment 2.98 µg·ml⁻¹ of GLs + inoculum which showed the lowest loss of color saturation ($P \leq 0.05$) and without GLs + inoculum had the greatest loss of saturation, having at the end a yellow color (Table 4). These results are consistent with arugula leaves, where the chroma of the leaves increased from 26.39 to 34.22 after 14 days of storage, with loss of shelf life (Koukounaras *et al.*, 2008). Temperatures of 0, 4 and 22 °C were statistically different from day three until day 15 of storage, where the temperature of 22 °C had the highest value with 39.0 at 7 days and the low-

CUADRO 3. Efecto de las concentraciones de GLs y temperaturas (0 y 4 °C) y ambiente (22 ± 3 °C) de almacenamiento en ángulo hue en hojas de arúgula.

TABLE 3. Effect of the concentrations of GLs at (0 and 4 °C) and room temperature (22 ± 3 °C) in hue angle on arugula leaves.

Factor / Nivel Factor / Level	Ángulo hue / Hue angle							
µg·ml ⁻¹ GLs	Día 0 / Day 0	Día 3 / Day 3	Día 5 / Day 5	Día 7 / Day 7	Día 9 / Day 9	Día 11 / Day 11	Día 13 / Day 13	Día 15 / Day 15
Concentraciones / Concentrations								
Sin GLs sin inóculo / Without GLs without inoculum	116	113 c	111 c	108 c	108 c	106 c	103 c	102 c
Sin GLs + inóculo / Without GLs + inoculum	116	111 d	105 d	105 d	105 d	102 d	101 d	98.4 d
1.49 GLs + inóculo / 1.49 GLs + inoculum	116	114 b	112 b	111 b	111 b	110 b	110 b	109 b
2.98 GLs+ inóculo / 2.98 GLs+ inoculum	116	116 a	115 a	114 a	114 a	114 a	113 a	112 a
DMSH / LSD		0.36	0.41	0.30	0.30	0.40	0.37	0.46
Temperatura °C / Temperature °C								
22	116	113 b	107 c	94.3 c	-	-	-	-
4	116	113 b	112 b	112 b	109 b	107 b	106 b	104 b
0	116	114 a	113 a	113 a	110 a	109 a	107 a	106 a
DMSH / LSD		0.28	0.32	0.32	0.16	0.21	0.19	0.24

Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con $P \leq 0.05$). DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: glucosinolatos.

Means with the same letter within columns are not different (Tukey con $P \leq 0.05$). LSD: Least significant difference. GLs: glucosinolates.

verde, situación que, también se observó en este trabajo. En relación a la temperatura, el almacenamiento a 0 °C, superó estadísticamente a las otras temperaturas empleadas, en cuanto a la mantención del color del día 3 al 15 de almacenamiento, reteniendo con mayor eficacia el color verde pues se obtuvieron valores más altos, situación observada por Koukounaras *et al.* (2007) quienes afirman que las hojas de arúgula pueden refrigerarse con buenos resultados a 0 °C. Además, se coincide con Marie *et al.* (2012) quienes encontraron que con 2 °C, la arúgula mantuvo su color verde hasta 7 días; sin embargo, con 20 °C durante 4 y 6 días, el amarillamiento fue intenso, y por consecuencia hubo pérdida de la calidad del producto.

Croma

En cuanto a croma, se apreciaron diferencias significativas, en el tratamiento 2.98 µg·ml⁻¹ de GLs + inóculo que presentó la menor pérdida de saturación de color ($P \leq 0.05$) y sin GLs + inóculo tuvo la mayor pérdida de saturación, tornándose al final de un color amarillo (Cuadro 4). Estos resultados concuerdan con estudio de hojas de arúgula, donde el croma de las hojas aumentó de 26.39 a 34.22 después de 14 días de almacenamiento, con una pérdida de la vida de anaquel (Koukounaras *et al.*, 2008). Las temperaturas de 0, 4 y 22 °C, fueron estadísticamente diferentes desde el día tres hasta el día 15 de almacenamiento, en donde la temperatura de 22 °C, tuvo el

est at 0 °C, considered as the most appropriate temperature to maintain the color intensity of the product, a situation that is also seen in the results of the hue angle, where the green color remains.

Brightness

Table 5 shows that there were significant differences of brightness among all treatments, where it is seen that the concentration of 2.98 µg·ml⁻¹ increased slightly from 32.4 to 34.0 during the 15 days of storage, indicating that brightness was retained. In contrast, treatment without GLs + inoculum showed higher brightness with value L which increased from 32.4 to 49.0, losing brightness. Regarding the temperatures of the day, from day three all were statistically different. At 22 °C, arugula showed higher brightness with value of 50.2, while at 0 °C the value was 39.1, coinciding with the results of hue and chroma. This would indicate that the combination of GLs plus temperature of 0 °C produces a positive effect in preventing the loss of brightness and quality after 15 days of shelf life. Koukounaras *et al.* (2007, 2008) state that leaves stored at 10 °C show a large change in the color parameters, with brightness values of 41.3 to 56.11 in mature leaves, which means browning of tissues due to oxidative reactions (Guevara *et al.*, 2003), unlike the results obtained in this study, where the loss of light was very low, so that the treatment used, keeps the leaf quality in better conditions.

CUADRO 4. Efecto de las concentraciones de GLs y temperaturas (0 y 4 °C) y ambiente (22 ± 3 °C) de almacenamiento en croma en hojas de arúgula.

TABLE 4. Effect of the concentrations of GLs and temperatures at (0 and 4 °C) and room temperature (22 ± 3 °C) in chroma on arugula leaves.

Factor / Nivel Factor / Level µg·ml ⁻¹ GLs	Croma / Chroma							
	Día 0 / Day 0	Día 3 / Day 3	Día 5 / Day 5	Día 7 / Day 7	Día 9 / Day 9	Día 11 / Day 11	Día 13 / Day 13	Día 15 / Day 15
Concentraciones / Concentrations								
Sin GLs sin inóculo / Without GLs without inoculum	22.1	22.0 c	25.6 b	30.4 b	26.6 b	28.8 b	31.4 b	33.2 b
Sin GLs + inóculo / without GLs + inoculum	22.1	23.9 a	27.5 a	34.5 a	30.4 a	32.7 a	35.0 a	36.7 a
1.49 GLs + inóculo / 1.49 GLs + inoculum	22.1	22.6 b	24.2 c	23.7 c	23.7 c	24.4 c	24.8 c	26.2 c
2.98 GLs + inóculo / 2.98 GLs + inoculum	22.1	22.2 c	23.4 d	24.0 d	24.0 d	23.3 d	23.4 d	23.6 d
DMSH / LSD		0.29	0.32	0.37	0.37	0.34	0.41	0.32
Temperatura °C / Temperature °C								
22	22.1	23.2 a	28.5 a	39.0 a	-	-	-	-
4	22.1	22.6 b	24.0 b	25.3 b	24.8 b	26.0 b	27.6 b	29.0 b
0	22.1	22.3 c	23.0 c	23.9 c	27.1 a	28.6 a	29.7 a	30.8 a
DMSH / LSD		0.228	0.251	0.182	0.196	0.178	0.219	0.169

Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con $P \leq 0.05$). DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: glucosinolatos.

Means with the same letter within columns are not different (Tukey with $P \leq 0.05$). LSD: Least significant difference. GLs: glucosinolates.

valor más alto con 39.0 a los 7 días y el más bajo se presentó a los 0 °C, considerándose como la temperatura más adecuada para mantener la intensidad del color en el producto, situación que también se observa en los resultados obtenidos en el ángulo hue, donde se mantiene el color verde.

Luminosidad

En el Cuadro 5, se observa que hubo diferencias significativas de luminosidad entre todos los tratamientos, en donde se aprecia que la concentración de 2.98 µg·ml⁻¹ tuvo un ligero incremento de 32.4 a 34.0 durante los 15 días de almacenamiento, lo que indica que conservó su brillantez. En cambio, el tratamiento sin GLs + inóculo, presentó mayor luminosidad con valor L que aumentó de 32.4 a 49.0, perdiendo la brillantez. En relación con las temperaturas, a partir del día tres todas fueron estadísticamente diferentes. Con 22 °C, la arúgula presentó mayor luminosidad con valor de 50.2, mientras que en 0 °C fue de 39.1, coincidiendo con los resultados de hue y croma. Esto indicaría, que la combinación de GLs más temperatura de 0 °C produce un efecto positivo al evitar la pérdida de brillantez y de calidad después de 15 días de conservación del producto. Koukounaras *et al.* (2007, 2008) mencionan que las hojas almacenadas a 10 °C muestran una gran alteración en los parámetros de color, con valores de luminosidad de 41.3 a 56.11 en hojas maduras, lo que implica oscurecimiento de los tejidos como consecuencia de reacciones oxidativas (Guevara *et al.*, 2003), a diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, donde la pérdida de luminosidad fue muy baja, por

Total chlorophyll

With 2.98 µg·ml⁻¹ of GLs + inoculum we obtained lower total chlorophyll loss, with a content of 0.55 mg·g⁻¹ after 15 days of storage, while without GLs + inoculum had the highest loss, ending with 0.36 mg·g⁻¹, so 2.98 µg·ml⁻¹ of GLs allowed the conservation of the total chlorophyll (Table 6). The values obtained in this study are higher than those found by Koukounaras *et al.* (2007), which states that arugula has a chlorophyll content of 0.49 µg·g⁻¹. At the same time, the levels found are different from those mentioned by Nicola *et al.* (2010) with 0.58 mg·g⁻¹. Moreover, we found significant differences among all concentrations applied during the 15 days. The highest total chlorophyll content occurred with arugula with 2.98 µg·ml⁻¹ of GLs + inoculum, which means a decrease of 36 % at day 15. With respect to temperatures, 22 °C had increased chlorophyll loss during the storage period, compared to 0 and 4 °C. According to the observed, the concentration of 2.98 µg·ml⁻¹ of GLs + inoculum was the best, to preserve, chlorophyll, which coincides with greater hue angle and brightness. Also, Nicola *et al.* (2010) confirm that low temperatures slow the loss of chlorophyll, since at 12 °C we obtained a decrease of 53 % in 10 days.

CO₂

Breathing in arugula treated with 2.98 µg·ml⁻¹ of GLs, presented at 15 days of storage a production of 3.37 mg of CO₂·kg⁻¹·h⁻¹ (Table 7), significantly lower than 9.76 of CO₂·kg⁻¹·h⁻¹

CUADRO 5. Efecto de las concentraciones de GLs y temperaturas (0 y 4 °C) y ambiente (22 ± 3 °C) de almacenamiento en luminosidad en hojas de arúgula.

TABLE 5. Effect of the concentrations of GLs at (0 and 4 °C) and room temperature (22 ± 3 °C) in brightness on arugula leaves.

Factor / Nivel Factor / Level	Luminosidad / Brightness							
µg·ml ⁻¹ GLs	Día 0 / Day 0	Día 3 / Day 3	Día 5 / Day 5	Día 7 / Day 7	Día 9 / Day 9	Día 11 / Day 11	Día 13 / Day 13	Día 15 / Day 15
Concentraciones / Concentrations								
Sin GLs sin inóculo / Without GLs without inoculum	32.4	30.2 c	33.5 b	36.0 b	36.0 b	38.0 b	39.6 b	40.9 b
Sin GLs + inóculo / Without GLs + inoculum	32.4	32.7 a	35.8 a	44.7 a	41.7 a	43.4 a	46.0 a	49.0 a
1.49 GLs + inóculo / 1.49 GLs + inoculum	32.4	32.1 b	33.4 b	34.3 c	34.3 c	35.2 c	36.0 c	36.8 c
2.98 GLs+ inóculo / 2.98 GLs+ inoculum	32.4	32.0 b	32.7 c	33.1 d	33.1 d	33.5 d	33.6 d	34.0 d
DMSH / LSD		0.29	0.29	0.45	0.45	0.45	0.39	0.44
Temperatura °C / Temperature °C								
22	32.4	32.3 a	35.8 a	50.2 a	-	-	-	-
4	32.4	31.7 b	33.4 b	35.2 b	35.7 b	37.0 b	38.0 b	39.1 b
0	32.4	31.1 c	32.3 c	33.9 c	36.8 a	38.1 a	39.6 a	41.3 a
DMSH / LSD		0.234	0.233	0.283	0.237	0.239	0.205	0.235

Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con $P \leq 0.05$). DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: glucosinolatos.

Means with the same letter within columns are not different (Tukey con $P \leq 0.05$). LSD: Least significant difference. GLs: glucosinolates.

lo que el tratamiento aplicado, mantiene en mejores condiciones la calidad de la hoja.

Clorofila total

Con 2.98 µg·ml⁻¹ de GLs + inóculo se obtuvo la menor pérdida de clorofila total con un contenido de 0.55 mg·g⁻¹ después de 15 días de almacenamiento, mientras que sin GLs + inóculo se presentó la mayor pérdida, finalizando con 0.36 mg·g⁻¹, por lo que 2.98 µg·ml⁻¹ de GLs permitió la conservación de la clorofila total (Cuadro 6). Los valores obtenidos en este estudio son superiores a los encontrados por Koukounaras *et al.* (2007), donde señalan que la arúgula presenta un contenido de clorofilas de 0.49 µg·g⁻¹. Al mismo, tiempo los niveles encontrados son diferentes a los mencionados por Nicola *et al.* (2010) con 0.58 mg·g⁻¹. Por otra parte, se encontraron diferencias significativas entre todas las concentraciones aplicadas durante los 15 días. El mayor contenido de clorofila total de arúgula ocurrió con 2.98 µg·ml⁻¹ de GLs + inóculo, lo que significa una disminución, en el día 15, de 36 %. En relación con las temperaturas, la de 22 °C tuvo mayor pérdida de clorofila durante el periodo de almacenamiento, respecto a 0 y 4 °C. De acuerdo con lo observado, la concentración de 2.98 µg·ml⁻¹ de GLs + inóculo fue la mejor, al preservar, la clorofila, lo que coincide con mayor ángulo hue y luminosidad. Asimismo, Nicola *et al.* (2010) confirman que bajas temperaturas retardan la pérdida de clorofila, toda vez que con 12 °C obtuvieron un decremento de 53 % en 10 días.

produced by arugula without GLs + inoculum, with significant differences from day three until the end of storage. Martínez-Sánchez *et al.* (2008) evaluated the breathing of different “baby” arugula leaves, with values between 300 and 940 nmol CO₂·kg⁻¹·g⁻¹, which showed that the rate of breathing changes strongly to small temperature variations. Breathing was constant, around 4.94 mg of CO₂·kg⁻¹·h⁻¹ at 0 and 4 °C, while under room temperature, on the third day of storage, an increase of 8.84 mg de CO₂·kg⁻¹·h⁻¹ of CO₂ was recorded, resulting in loss of nutrients and water vapor (González-Aguilar, 2005).

Ethylene

Table 8 shows that arugula treated with 2.98 µg·ml⁻¹ of GLs recorded at 15 days a production of 0.33 µl·kg⁻¹·h⁻¹ ethylene, unlike treatment without GLs + inoculum was which had a production of 0.67 µl·kg⁻¹·h⁻¹. From day three of storage, we observed statistical differences among treatments. Koukounaras *et al.* (2009) report that after one day of storage, the concentration of ethylene significantly increased, reaching 2 µl·liter⁻¹ declining to 0.5 µl·liter⁻¹ at day 14 of storage. The authors note that a concentration of 1 µl·liter⁻¹ arugula leaves turn yellow.

At 0 °C, ethylene production of arugula leaves was 0.40 µl·kg⁻¹·h⁻¹ with a slight decrease; however, at room temperature it increased to 0.83 µl·kg⁻¹·h⁻¹ with significant differences between the temperatures evaluated from day three until day 15 of storage. Able *et al.* (2005) obtained similar

CUADRO 6. Efecto de las concentraciones y temperaturas (0 y 4 °C) y ambiente (22 ± 3 °C) de almacenamiento en clorofila total mg·g⁻¹ en arúgula.

TABLE 6. Effect of the concentrations of GLs at (0 and 4 °C) and room temperature (22 ± 3 °C) in total chlorophyll mg·g⁻¹ on arugula.

Factor / Nivel Factor / Level	Clorofila Total mg·g ⁻¹ / Total chlorophyll mg·g ⁻¹							
µg·ml ⁻¹ GLs	Día 0 / Day 0	Día 3 / Day 3	Día 5 / Day 5	Día 7 / Day 7	Día 9 / Day 9	Día 11 / Day 11	Día 13 / Day 13	Día 15 / Day 15
Concentraciones / Concentrations								
Sin GLs sin inóculo / Without GLs without inoculum	0.76	0.60 c	0.55 c	0.55 c	0.52 c	0.48 c	0.48 c	0.42 c
Sin GLs + inóculo / Without GLs + inoculum	0.76	0.55 d	0.48 d	0.48 d	0.46 d	0.43 d	0.39 d	0.36 d
1.49 Ls + inóculo / 1.49 Ls + inoculum	0.76	0.67 b	0.63 b	0.63 b	0.62 b	0.59 b	0.53 b	0.50 b
2.98GLs+ inóculo / 2.98GLs+ inoculum	0.76	0.72 a	0.68 a	0.68 a	0.66 a	0.64 a	0.60 a	0.55 a
DMSH / LSD		0.005	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003
Temperatura °C / Temperature °C								
22	0.76	0.60 c	0.50 c	0.37 c	-	-	-	-
4	0.76	0.64 b	0.60 b	0.57 b	0.54 b	0.51 b	0.46 b	0.41 b
0	0.76	0.69 a	0.66 a	0.62 a	0.59 a	0.56 a	0.52 a	0.50 a
DMSH / LSD		0.004	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001

Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con $P \leq 0.05$). DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: glucosinolatos.

Means with the same letter within columns are not different (Tukey with $P \leq 0.05$). LSD: Least significant difference. Gls: glucosinolates.

CUADRO 7. Efecto de las concentraciones de GLs y temperaturas (0 y 4 °C) y ambiente (22 ± 3 °C) de almacenamiento de respiración mg de CO₂·kg⁻¹·h⁻¹, en arúgula.

CUADRO 7. Effect of the concentrations of GLs at (0 and 4 °C) and room temperature (22 ± 3 °C) of respiration mg of CO₂·kg⁻¹·h⁻¹ on arugula leaves.

Factor / Nivel Factor / Level	Respiración mg de CO ₂ ·kg ⁻¹ ·h ⁻¹ / Respiration mg of CO ₂ ·kg ⁻¹ ·h ⁻¹							
µg·ml ⁻¹ GLs	Día 0 / Day 0	Día 3 / Day 3	Día 5 / Day 5	Día 7 / Day 7	Día 9 / Day 9	Día 11 / Day 11	Día 13 / Day 13	Día 15 / Day 15
Concentraciones / Concentrations								
Sin Gls sin inóculo / Without Gls without inoculum	3.31	5.29 b	6.11b	6.41 b	4.69 b	5.04 b	5.29 b	5.27 b
Sin Gls + inóculo / Without Gls + inoculum	3.31	5.99 a	7.03 a	8.37 a	6.67 a	7.83 a	8.39 a	9.76 a
1.49 Gls + inóculo / 1.49 Gls + inoculum	3.31	3.90 c	4.72 c	5.34 c	4.04 b	3.91 c	4.04 c	4.07 c
2.98 Gls+ inóculo / 2.98 Gls+ inoculum	3.31	3.29 d	3.57 c	4.08 d	3.25 c	3.20 d	3.30 d	3.37 d
DMSH / LSD		.3244	0.417	0.449	0.729	0.848	0.888	1.01
Temperatura °C / Temperature °C								
22	3.21	6.54 a	7.73 a	8.84 a	-	-	-	-
4	3.21	3.95 b	4.56 b	5.26 b	5.20 b	5.71 a	6.00 a	6.27 a
0	3.21	3.36 c	3.79 c	4.06 c	4.13 a	4.35 b	4.51b	4.94 b
DMSH / LSD		0.254	0.326	0.352	0.382	0.444	0.465	0.534

Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con $P \leq 0.05$). DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: glucosinolatos.

Means with the same letter within columns are not different (Tukey with $P \leq 0.05$). LSD: Least significant difference. Gls: glucosinolates.

CO₂

La respiración en arúgula tratada con 2.98 µg·ml⁻¹ de GLs, presentó a los 15 días de almacenamiento una producción de 3.37 mg de CO₂·kg⁻¹·h⁻¹ (Cuadro 7), significativamente menor que 9.76 mg de CO₂·kg⁻¹·h⁻¹ producido por la arúgula sin GLs + inóculo, con diferencias significativas a partir del día tres y hasta el final de almacenamiento. Martínez-Sánchez *et al.* (2008) evaluaron la respiración de diferentes hojas “baby” de arúgula, con valores entre 300 y 940 nmol CO₂·kg⁻¹·g⁻¹, lo que mostró que la tasa de respiración se modifica fuertemente ante pequeñas variaciones de temperatura. La respiración se

values from 0.9 to 0.5 µl·kg⁻¹·h⁻¹ at 2 °C relatively low compared to those found by Char *et al.* (2012) reporting values of 77.7 to 47.6 µl·kg⁻¹·h⁻¹ at 5 °C.

CONCLUSIONS

The quality of arugula leaves and shelf life had a better conservation applying GLs and stored at 0 °C, allowing to preserve color and quality. GLs broccoli juice had antifungal effect, which represents a potential alternative for the control of *Alternaria alternata* during postharvest handling of arugula.

CUADRO 8. Efecto de las concentraciones de GLs y temperaturas (0 y 4 °C) y ambiente (22 ± 3 °C) de almacenamiento en etileno µl·kg⁻¹·h⁻¹ 100 ml, en hojas de Arúgula.

CUADRO 8. Effect of the concentrations of GLs at (0 and 4 °C) and room temperature (22 ± 3 °C) in ethylene µl·kg⁻¹·h⁻¹ 100 ml on arugula leaves.

Factor / Nivel Factor / Level	Etileno $\mu\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ / Ethylene $\mu\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$							
$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ GLs	Día 0 / Day 0	Día 3 / Day 3	Día 5 / Day 5	Día 7 / Day 7	Día 9 / Day 9	Día 11 / Day 11	Día 13 / Day 13	Día 15 / Day 15
Concentraciones / Concentrations								
Sin Gls sin inóculo / Without Gls without inoculum	0.30	0.53 b	0.59 b	0.67 b	0.56 b	0.53 b	0.52 b	0.55 b
Sin Gls + inóculo / Without Gls + inoculum	0.30	0.62 a	0.75 b	0.86 a	0.74 a	0.63 a	0.92 a	0.67 a
1.49 Gls + inóculo / 1.49 Gls + inoculum	0.30	0.41 c	0.46 c	0.52 c	0.40 c	0.42 c	0.41 c	0.42 c
2.98 Gls+ inóculo / 2.98 Gls+ inoculum	0.30	0.34 d	0.38 d	0.41 d	0.34 d	0.35 d	0.33 d	0.33 d
DMSH / LSD		0.008	0.005	0.020	0.012	0.007	0.005	0.004
Temperatura °C / Temperature °C								
22	0.30	0.66 a	0.73 a	0.83 a	-	-	-	-
4	0.30	0.43 b	0.54 b	0.61 b	0.63 a	0.57 a	0.54 a	0.59 a
0	0.30	0.34 c	0.37 c	0.40 c	0.39 b	0.40 b	0.40 b	0.40 b
DMSH / LSD		0.006	0.004	0.015	0.006	0.004	0.002	0.002

Medias con la misma letra dentro de columnas no son diferentes (Tukey con $P \leq 0.05$). DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. GLs: glucosinolatos.

Means with the same letter within columns are not different (Tukey con $P \leq 0.05$). LSD: Least significant difference. GLs: glucosinolates.

mantuvo constante, alrededor de 4.94 mg de CO₂ kg⁻¹·h⁻¹ en 0 y 4 °C, mientras que bajo temperatura ambiente, al tercer día de almacenamiento, se registró un aumento de 8.84 mg de CO₂ kg⁻¹·h⁻¹ de CO₂, lo que produjo pérdida de nutrientes y vapor de agua (González-Aguilar, 2005).

Etileno

En el Cuadro 8, es posible observar que la arúgula tratada con 2.98 µg·ml⁻¹ de GLs registró a los 15 días una producción de etileno de 0.33 µl·kg⁻¹·h⁻¹ a diferencia del tratamiento sin GLs + inóculo que fue 0.67 µl·kg⁻¹·h⁻¹. A partir del día tres de almacenamiento se observan diferencias estadísticas, entre los tratamientos aplicados. Koukounaras *et al.* (2009) reportan que después de un día de almacenamiento, se incrementó significativamente la concentración de etileno, el cual alcanzó 2 µl·litro⁻¹ decayendo hasta 0.5 µl·litro⁻¹ al día 14 de almacenamiento. Los autores señalan que una concentración de 1 µl·litro⁻¹ produce amarillamiento de las hojas de arúgula.

En 0 °C la producción de etileno de hojas de arúgula, fue de 0.40 µl·kg⁻¹·h⁻¹ con un ligero decremento; sin embargo, en temperatura ambiente se incrementó a 0.83 µl·kg⁻¹·h⁻¹ con diferencias significativas entre las temperaturas evaluadas desde el día tres hasta el día 15 de almacenamiento. Able *et al.* (2005), obtuvieron valores similares de 0.9 a 0.5 µl·kg⁻¹·h⁻¹ a 2 °C relativamente bajos en comparación a los encontrados por Char *et al.* (2012) que reportan valores de 77.7 a 47.6 µl·kg⁻¹·h⁻¹ a 5 °C.

CONCLUSIONES

La calidad de hojas de arúgula y vida de anaquel tuvo una mejor conservación con aplicación de GLs y almacenadas a 0 °C, lo que permitió conservar el color y la calidad. El jugo de brócoli GLS tuvo efecto antifúngico, lo que representa una alternativa potencial para el control de *Alternaria alternata* durante el manejo postcosecha en arúgula.

LITERATURA CITADA

ABLE, A. J.; WONG, L. S.; PRASAD, A.; O'HARE, T. J. 2005. The physiology of senescence in detached pak choy leaves (*Brassica rapa* var. *Chinensis*) during storage at different temperatures. *Postharvest Biology and Technology* 35:271-278. doi: 10.1016/j.postharvbio.2004.10.004

ANDERSEN, B.; KROGER E.; ROBERTS, G. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research* 105:291-299. doi: 10.1017/S0953756201003446

ARTÉS-CALERO, F. 2006. El envasado en atmósfera modificada mejora la calidad de consumo de los productos hortofrutícolas intactos y mínimamente procesados en fresco. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 7 (2): 61-85. <http://www.redalyc.org/pdf/813/81370202.pdf>

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Cuarta edición. Minnesota. APS Press. 210 p.

BELLOSTAS, N.; SORENSEN, J. C.; SORENSEN, H. 2004. Quantitative and qualitative evaluation of glucosinolates in cruciferous plants during their life cycles. *Agroindustria* 3(3):5-10. <http://orgprints.org/5611/1/5611.pdf>

BRANDI, G.; AMAGLIANI, G.; SCHIAVANO, G.; DE SANTI, M.; SISTI, M. 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection* 69(9):2274-2279.

CHAR, C.; SILVEIRA, A. C.; INESTROZA-LIZARDO C.; HINOJOSA, A.; MACHUCA, A.; ESCALONA, V. H. 2012. Effect noble gas-enriched atmospheres on the overall quality of ready-to-eat arúgula salads. *Postharvest Biology and Technology* 73: 50-55. doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.05.010

FIGUEROA, I.; COLINAS, M. T.; MEJÍA, J.; RAMÍREZ, F. 2005. Cambios fisiológicos en postcosecha de dos cultivares de rosa con diferente duración en florero. *Cien. Inv. Agr.* 32(3):209-219.

FRAIRE-CORDERO, M. L.; NIETO-ÁNGEL, D.; CÁRDENAS-SORIANO, E. 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *F. oxysporum* Hongos causantes de la pudrición de florete de brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(1):25-33. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n1/v28n1a3.pdf>

GARCÍA-IGLESIAS, E.; GAGO-CABEZAS, L.; FERNÁNDEZ-NUEVO, J. L. 2006. Tecnología del envasado en atmósfera protectora. CIEM. Dirección General de Universidades e Investigación. 141 p. http://www.madrid.org/edupubli/m_cata.htm

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. 2005. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. CIAD México. 558 p.

GUEVARA, J. C.; YAHIA, E. M.; BRITO DE LA FUENTE, E.; BISERKA, S.P. 2003. Effects of elevated concentrations of CO₂ in modified atmosphere packaging on the quality of prickly pear cactus stems (*Opuntia* spp). *Postharvest Biology and Technology* 29: 167-176. doi:10.1016/S0925-5214(03)00021-8

HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; VELÁZQUEZ, M. 2007. Prospectiva de Extractos Vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 2:119-123. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61030202>

HERRERO, A. M.; ROMERO-DE ÁVILA, M. D. 2006. Innovaciones en el procesamiento de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Rev. Med. Univ. Navarra* 50:71-74. www.unav.es/revistamedicina/50_4/10-INNOVACIONES.pdf

JEZEK, J.; BARRY, G.; HAGGETT, D.; ATKINSON, A.; RAWSON, D. M. 1999. Determination of glucosinolates using their alkaline degradation and reaction with ferricyanide. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4669-4674. doi: 10.1021/jf9906026

KOUKOUNARAS, A.; SIOMOS, A. S.; SFAKIOTAKIS, E. 2007. Postharvest CO₂ and ethylene production and quality of rocket (*Eruca Sativa* Mill.) leaves as affected by leaf age and storage temperature. *Postharvest Biology and Technology* 46: 167-173. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.04.007

KOUKOUNARAS, A.; SIOMOS, A. S.; SFAKIOTAKIS, E. 2008. Effects of degree of cutting and storage on atmosphere composition, metabolic activity and quality of rocket leaves

- under modified atmosphere packaging. *Journal of Food Quality* 33: 303-316. doi: 10.1111/j.1745-4557.2010.00302.x
- KOUKOUNARAS, A.; SIOMOS, A. S.; SFAKIOTAKIS E. 2009. Impact of heat treatment on ethylene production and yellowing of modified atmosphere packaged rocket leaves. *Postharvest Biology and Technology* 54:172-176. doi: 10.1016/j.postharvbio.2009.07.002
- MARI, M.; IORI, R.; LEONI, O.; MARCHI, A. 1996. Bioassays of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest pear pathogens. *Plant pathology* 45:753-760. doi: 10.1046/j.1365-3059.1996.d01-5.x
- MARI, M.; LEONI O.; LORI, R.; CEMBALLI, T. 2002. Antifungal vapour-phase activity of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. *Plant pathology* 51: 231-236. doi: 10.1046/j.1365-3059.2002.00667.x
- MARIE, L. M.; FAST, S. H.; EDELENBOS, M. 2012. Freshness and sensory quality of packaged wild rocket. *Postharvest Biology and Technology* 73:99-106. doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.06.004
- MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; ALLENDE, A.; CORTÉS-GALERA, Y.; GIL, M. I. 2008. Respiration rate response of four baby leaf *Brassica* species to cutting at harvest and fresh-cut washing. *Postharvest Biology and Technology* 47:382-388. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.07.010
- MASAHIRO, K.; ANDRIANTSOA, R.; YOKO, O.; MOTOAKI, T.; HITOSHI, H.; RYO F. 2006. Induction of soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* by incorporation of dried plant residues into soil. *Phytopathology* 96:1372-1379. doi: 10.1094/PHYTO-96-1372
- MONFORT, W. S.; CSINOS, A.; DESAEGER, J.; SEEHOLD, K.; WEBSTER, T.; DÍAZ-PÉREZ, J.C. 2007. Evaluating *Brassica* species as an alternative control measure for root-knot nematode (*M. Incognita*) in Georgia vegetable plasticulture. *Crop Protection* 26:1359-1368. doi:10.1016/j.cropro.2006.11.008
- NICOLA, S.; FONTANA, E.; TIBALDI, G.; ZHAN, L. 2010. Qualitative and physiological response of minimally processed rocket (*Eruca sativa* Mill.) to package filling amount and shelf-life temperature. *Acta Horticulturae* 877:611-618.
- PAVÓN-MORENO, M. A.; GONZÁLEZ-ALONSO, I.; MARTÍN-DE SANTOS, R.; GARCÍA-LACARRA, T. 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria* 27:(6)1772-1781. doi: 10.3305/nh.2012.27.6.6017
- RODRÍGUEZ-SAUCEDA, E. N. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai* 7(1):153-170.
- ROTEM, Y. 1994. The genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press, American Phytopathological Society. 326 p.
- SAS Institute. 1998. Language guide for personal computer release. 9.0 Edition. SAS Institute. Cary. N.C. USA. 1028 p. <https://support.sas.com/documentation/cdl/en/statugintroduction/61750/PDF/default/statugintroduction.pdf>
- SISTI, M.; AMAGLIANI, G.; BRANDI, B. 2006. Antifungal activity of *Brassica oleracea* var. botrytis fresh aqueous juice. *Fito-terapia* 74:453-458. doi: 10.1016/S0367-326X(03)00108-4
- SMOLINSKA, U.; MORRA, M.; KNUDSEN, G.; JAMES, R. L. 2003. Isothiocyanates produced by *brassicaceae* species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant disease* 87(4):407-412. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.4.407
- TIZNADO-HERNÁNDEZ, M.; TRONCOSO-ROJAS, R. 2006. Control of fungal diseases with isothiocyanates. *Stewart Postharvest Review* 1(4):1-14. doi: <http://dx.doi.org/10.2212/spr.2006.1.4>
- TRONCOSO-ROJAS, R.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; RUELAS, C.; GARCÍA, H. S. 2005. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85:1427-1434. doi: 10.1002/jsfa.2129
- TRONCOSO, R.; ESPINOZA, C.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; TIZNADO, M. E.; GARCÍA H. S. 2005. Analysis of the isothiocyanates present in cabbage leaves extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. *Food Research International* 38:701-708. doi:10.1016/j.foodres.2005.02.004
- WITHAM, H. F.; BLAYDES, D. F.; DEVLIN, R. M. 1971. Experiments in Plant Physiology. Van Nostrand Reinhold. New York, USA. 245 p.
- ZUKALOVÁ, H.; VASÁK, J. 2002. The role and effects of glucosinolates of *Brassica* species-a review. *Rostlinná Výroba* 48(4):175-180. <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/52986.pdf>