

Reducción en la Germinación *in vitro* de Conidios de *Alternaria alternata* aislada de *Eruca sativa* con Jugo de Brócoli

Reduction in the *in vitro* Germination of Conidia of *Alternaria alternata* Isolated from *Eruca sativa* with Juice of Broccoli

Maria Antonia Flores Córdova, Posgrado en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo Km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo. CP 56230, México; **María Teresa Martínez Damián**, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo. CP 56230, México; **Daniel Nieto Ángel**, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Edo. de México. CP 56230, México; **Juan Enrique Rodríguez Pérez**, **María Teresa Colinas León**, **Juan Martínez Solís**, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo. CP 56230, México. Correspondencia: teremd13@gmail.com

(Recibido: Octubre 18, 2013 Aceptado: Abril 11, 2014)

Flores Córdova MA, Martínez Damián MT, Nieto Ángel D, Rodríguez Pérez JE, Colinas León MT y Martínez Solís J. 2013. Reducción en la germinación *in vitro* de conidios de *Alternaria alternata* aislada de *Eruca sativa* con jugo de brócoli. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 180-190.

Resumen. El hongo *Alternaria alternata*, es considerado uno de los principales patógenos de plantas, a nivel mundial ocasiona el síntoma de la mancha de la hoja en hortalizas. Aunque se han evaluado diferentes compuestos químicos para su control, el uso de productos biológicos representa una gran alternativa. Los glucosinolatos son productos naturales, derivados del brócoli, que contienen nitrógeno y azufre con actividad antifúngica. Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficacia del jugo de brócoli *in vitro* sobre la germinación de conidios de *A. alternata*. Para la realización del experimento, se colectaron hojas de *Eruca sativa* (arúgula) con síntomas de la mancha de la hoja de las cuales se aisló e identificó al hongo *A. alternata*. Los conidios del hongo se colocaron en medio PDA, con diferentes concentraciones de glucosinolatos presentes en el jugo de brócoli 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01 y 0 µg/µL. Las concentraciones 0.07, 0.11, 0.15 µg/µL inhibieron en un 100 % la germinación de conidios de *A. alternata* a las 6 h de evaluación. La concentración letal media CL₅₀ fue de 0.028 µg/µL. Se concluye que los glucosinolatos presentes en el jugo de brócoli, poseen un potencial antifúngico y puede ser usado como tratamiento en postcosecha, con el fin de disminuir los daños causados por *A. alternata* en hortalizas.

Abstract. The fungus *Alternaria alternata*, is considered one of the major plant pathogens worldwide causing the symptom of leaf spot in vegetables. Glucosinolates are natural products derived from broccoli, containing nitrogen and sulfur, with antifungal activity. Based on the above, the present study aimed to evaluate the effectiveness of broccoli juice *in vitro* on germination of conidia of *A. alternata*. To carry out the experiment, leaves of *Eruca sativa* (arugula) with symptoms of leaf spot were collected, from which the fungus *A. alternata* was isolated and identified. Conidia of the fungus were placed on PDA medium with different concentrations of glucosinolates found in broccoli juice 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01, and 0 ng/µL. It was observed that the concentrations 0.07, 0.1, 0.15 µg/µL inhibited 100 % spore germination of *A. alternata* at 6 h evaluation. The average lethal concentration LC₅₀ was 0.028 µg/µL. In conclusion, it can be mentioned that the glucosinolates present in broccoli juice, have an antifungal potential and can be used as post-harvest treatment, in order to reduce the damage caused by *A. alternata* in vegetables.

Additional keywords: Arugula, glucosinolates, antifungal, molecular identification, inhibition.

Economic losses, during postharvest handling of horticultural products, caused by various microorganisms are of considerable economic importance (Faire-Cordero *et al.*, 2010; Bautista-Baños *et al.*, 2000). One of the main causes of diseases in fruits and vegetables are produced by the action of fungal pathogens, most notably caused by *Alternaria alternata*.

Palabras clave adicionales: Arúgula, glucosinolatos, antifúngico, identificación molecular, inhibición.

Las pérdidas económicas durante el manejo postcosecha de productos hortícolas causadas por diversos microorganismos pueden ser de considerable importancia económica (Fraire-Cordero *et al.*, 2010; Bautista-Baños *et al.*, 2000). Una de las causas principales de enfermedades en frutas y hortalizas son originadas por la acción de hongos fitopatógenos, entre las que destaca la causada por *Alternaria alternata*.

A. alternata es una especie cosmopolita que se encuentra como saprófito o fitopatógeno en un amplio rango de hospedantes y en subproductos (Andersen *et al.*, 2001; Carrillo, 2003). Este hongo presenta un micelio de color oscuro, conidios grandes, alargados y oscuros, o bien multicelulares en forma de pera con septos tanto transversales como longitudinales. Los conidios germinan y se introducen por los tejidos susceptibles a través de heridas y en poco tiempo producen nuevos conidios que pueden ser diseminados por el viento (Carrillo, 2003; Agrios, 2005). Esta especie infecta de manera foliar y causa manchas en la hoja de plantas de la familia de las *Brassicaceae* (Nidhi *et al.*, 2007), así como en frutos. En casi todos los casos, se comporta como un parásito de heridas. La penetración estomatal puede ocurrir cuando las plantas están fisiológicamente debilitadas, causando una destrucción relativamente lenta de los tejidos del hospedante. A medida que avanza la invasión de las hifas, destruyen las células de donde obtienen los nutrientes reduciendo el potencial fotosintético. La infección se caracteriza por la formación de lesiones necróticas de forma redonda sobre el haz de las hojas, su color se intensifica debido a la producción de estructuras propagativas del hongo (Thomma, 2003). La producción de conidios de *Alternaria* es óptima a 27 °C, pero es inhibida por debajo de 15 °C, aunque el rango de crecimiento está entre 0 y 35 °C (Rotem, 1994; Carrillo, 2003).

Este patógeno se ha observado en arúgula, planta perteneciente a la familia de las *Brassicaceae* que tiene su origen en la región Mediterránea y es conocida por su agradable sabor amargo y alto contenido de fitonutrientes como los carotenoides, vitamina C, fibra dietética polifenoles y flavonoides que promueven la salud (Barillari *et al.*, 2005). Así mismo, tiene una larga historia de uso medicinal para diversos fines: astringente, depurativa, diurética, digestiva, emoliente, tónico, estimulante y laxante (Durazzo *et al.*, 2003). Esta planta se encuentra disponible todo el año en el mercado; ya que tienen la capacidad de rebrotar, lo que permite más de una cosecha al año (Koukounaras *et al.*, 2010). Por lo que el consumo de hortalizas recién cortadas es cada vez más importante en la dieta de los consumidores debido a los hábitos de alimentación saludable que está adquiriendo la población (Oms-Oliu *et al.*, 2006), teniendo como resultado que los consumidores demanden alimentos naturales, de apariencia y valor nutricional y microbiológicamente seguros (García *et al.*, 2006). En relación a la carga microbiológica, arúgula

A. alternata is a broad-based species found as a saprophyte or plant pathogen in a wide range of hosts and subproducts (Andersen *et al.*, 2001; Carrillo, 2003). This fungus has a dark color mycelium, large, elongated and dark conidia or multicellular pear-shaped, with both transverse and longitudinal septa. Conidia germinate and get introduced through susceptible tissues (wounds) and very soon they produce new conidia that can be dispersed by the wind (Carrillo, 2003; Agrios, 2005). This species infects in foliar way and causes leaf spots on plants of the *Brassicaceae* family (Nidhi *et al.*, 2007), as well as in fruits. In most cases, it behaves as a wound parasite. Stomatal penetration can occur when plants are physiologically weakened, causing a relatively slow destruction of host tissues. As the hyphae invasion progresses, they destroy the cells that provide them nutrients by reducing the photosynthetic potential. A characteristic of the infection is the formation of necrotic lesions of round shape on the upper side of the leaf, the color is intensified due to the production of fungal propagative structures (Thomma, 2003). *Alternaria* conidia production is optimum at 27 °C, but is inhibited below 15 °C, although growth range is between 0 and 35 °C (Rotem, 1994; Carrillo, 2003).

This pathogen has been observed in arugula, plant belonging to the *Brassicaceae* family, which originated in the Mediterranean region and it is known for its pleasant bitter taste and high in phytonutrients such as carotenoids, vitamin C, dietary fiber, polyphenols and flavonoids which are all health-promoting (Barillari *et al.*, 2005). It has also a long history of medicinal use for various purposes: astringent, depurative, diuretic, digestive, emollient, tonic, stimulant and laxative (Durazzo *et al.*, 2003.). This plant is available throughout the year on the market; as they have the ability to resprout, allowing more than one crop per year (Koukounaras *et al.*, 2010). The freshly cut vegetable consumption is becoming increasingly important in the diet of consumers, because of the healthy eating habits that the population is adopting (Oms-Oliu *et al.*, 2006) resulting in higher demand of natural foods of nice appearance, high nutritional value and microbiologically safe (García *et al.*, 2006). Regarding the microbiological load, arugula is susceptible to *Alternaria*, which is a postharvest fungal pathogen that causes product quality loss because of major tissue damage, which occurs during the marketing process from harvest to the end consumer, reducing its life span (Kader, 2007; Ferrato *et al.*, 2012).

It is noteworthy that fungal diseases management is currently based on the use of synthetic chemicals. In the last decades, efforts have been directed to obtain a better understanding of the biological effects of compounds isolated from plants that have potential effect in disease control, because of the recent trend to use less harmful alternatives to the environment to control fungi and rely less on synthetic products. It is expected that the use of natural compounds have a minor impact on the ecosystem, because unlike chemicals, they are biodegradable and do not accumulate in the environment (Báez-Flores *et al.*, 2008).

Among the most common strategies is the use of natural compounds derived from plants such as essential

es susceptible a *Alternaria* un hongo patógeno de postcosecha causante de la pérdida de calidad del producto por los importantes daños en el tejido, los cuales se presentan durante los procesos de comercialización desde la cosecha hasta el consumidor final, reduciendo su vida útil (Kader, 2007; Ferrato *et al.*, 2012).

Es importante destacar que el manejo de las enfermedades fúngicas se basa, en la utilización de productos químicos sintéticos. En las últimas décadas, los esfuerzos se han dirigido a obtener una mejor comprensión de los efectos biológicos de compuestos aislados de plantas que tienen un efecto potencial en el control de enfermedades, debido a la reciente tendencia a utilizar alternativas menos perjudiciales al ambiente para el control de hongos y a reducir la dependencia de productos sintéticos. Se espera que el uso de compuestos naturales tenga un menor impacto sobre los ecosistemas, ya que a diferencia de los productos químicos, éstos son biodegradables y no se acumulan en el medio ambiente (Báez-Flores *et al.*, 2008).

Entre las estrategias más comunes está el uso de compuestos naturales obtenidos de plantas como los aceites esenciales, compuestos aromáticos (Tripathi y Dubey, 2004) y las moléculas producidas por varios sistemas de defensa de las plantas, éste último grupo de componentes, incluye algunas moléculas como los glucosinolatos (GLs), que en pruebas biológicas específicas han mostrado una fuerte actividad contra un amplio intervalo de patógenos (Mari *et al.*, 2008). Los glucosinolatos pertenecen al grupo de los tioglucósidos, formados por una β -tioglucosa, una oxima sulfonada, y una cadena lateral variable derivada de un aminoácido, se encuentran almacenados en vacuolas y son liberados al sufrir daño celular, luego de que entran en contacto con la enzima mirosinasa y son hidrolizados en diferentes productos (Molina-Vargas y Bentura-Castellanos, 2009). Con frecuencia son tres grupos de acuerdo a la naturaleza de su cadena lateral: alifáticos, aromáticos e indólicos. Se han aislado y caracterizado aproximadamente 120 GLs de especies de plantas de la familia *Brassicaceae* y familias relacionadas, como son: el brócoli, la col y coliflor entre otras, quienes contienen altos niveles de GLs. Estos vegetales y algunas plantas comestibles del orden *Caparrales* son la fuente de todos los GLs de la dieta humana (Campas-Baypoli *et al.*, 2009).

El amplio intervalo de perfiles de GLs restringidos a las familias *Brassicaceae*, *Capparidaceae* y *Resedaceae*; almacenados en diferentes tejidos de la planta e involucrados contra las diferentes enfermedades vegetales, ofrece la posibilidad de seleccionar especies de plantas *Brassicaceae* como el brócoli, con mayor potencial fúngico. Autores como Brandi *et al.* (2006) y Sisti *et al.* (2006) probaron el jugo de *Brassica oleracea*, comprobaron la actividad antimicrobial y antifúngica del extracto, además se encontró ser efectivo en la inhibición y crecimiento de *Blastoconidia* y *Candida albicans*.

Por lo anteriormente expuesto el objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia del extracto de jugo de brócoli *in vitro* sobre *A. alternata* y proponer el uso posterior del mismo por su actividad antifúngica durante

oils, aromatic compounds (Tripathi and Dubey, 2004) and molecules produced by various plants defense systems, the latter group of components, includes some molecules such as glucosinolates (GLs), which in specific biological tests have shown a strong activity against a broad range of pathogens (Mari *et al.*, 2008). Glucosinolates belong to the thioglucosides group, which are formed by a β -thioglucose, a sulphonated oxime and a variable side chain derived from an amino acid, which are stored in vacuoles and released after cell damage, after contact with the myrosinase enzyme and they are hydrolyzed in different products (Molina-Vargas and Bentura-Castellanos, 2009). Often there are three groups according to the nature of their side chain: aliphatic, aromatic and indole. About 120 GLs have been isolated and characterized from plants of the *Brassicaceae* family and related families, such as: broccoli, cabbage and cauliflower among others, which have high levels of GLs. These vegetables and some edible plants of the *Caparrales* order are the source of all GLs of the human diet (Campas-Baypoli *et al.*, 2009).

The wide range of restricted GLs profiles to the *Brassicaceae*, *Capparidaceae* and *Resedaceae* families, stored in different plant tissues and involved against various plant diseases, offers the possibility of selecting plants of the *Brassicaceae* species such as broccoli, with more fungal potential. Authors like Brandi *et al.* (2006) and Sisti *et al.* (2006) tested the *Brassica oleracea* juice, and they demonstrated the antimicrobial and antifungal activity of the extract, also it was found to be effective in *Blastoconidia* and *Candida albicans* inhibition and growth.

Based on the above, the aim of this study was to evaluate *in vitro* the efficacy of broccoli juice extract on *A. alternata* and propose its further use because of its antifungal activity during postharvest in arugula.

MATERIALS AND METHODS

Isolation. Isolates of the fungus were obtained from arugula leaves with leaf spot symptoms from Morelos state, Mexico. From the symptoms, sections of tissue of the terminal part of the lesion were cut and disinfected by immersion in a 2 % sodium hypochlorite solution for 2 min. Then, the tissues were rinsed twice with distilled water and placed on absorbent paper towels to remove excess moisture. Each piece of tissue was seeded in Petri dishes with potato dextrose agar medium (PDA).

Once the mycelium development was observed, some monoconidial cultures were done by placing 1000 μ L of distilled water with a micropipette on each isolate. Water was mixed with the mycelium and the conidia were detached by using a sterile glass rod, then 100 μ L of the conidial suspension were placed in a 1.5 mL Eppendorf tube and filling it with distilled water to the mark. The tube content was poured to a petri dish with agar water (AW), it was distributed throughout the bed and allowed to stand for 5 s, and then any water excess contained in the box was discarded on sterile paper towel. Each isolate was incubated at 27°C for 24 h.

By using an American Optical Microscope Model 1130 (Microstar, USA), a single germinated conidium was

postcosecha en arúgula.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento. Los aislados de hongos se obtuvieron a partir de hojas de arúgula con síntomas de la mancha de la hoja procedentes del estado de Morelos, México. De los síntomas se realizaron cortes de tejido de la parte terminal de la lesión y se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 min. Posteriormente los tejidos se enjuagaron dos veces con agua destilada y se colocaron sobre toallas de papel absorbente para retirar el exceso de humedad. Cada porción de tejido se sembró en cajas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA).

Una vez que se observó el desarrollo de micelio se realizaron cultivos monoconidiales colocando 1000 µL de agua destilada con una micropipeta sobre cada uno de los aislamientos. El agua se mezcló con el micelio y los conidios se desprendieron con la ayuda de una varilla de vidrio estéril, posteriormente se recuperaron 100 µL de la suspensión de conidios, se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad y se aforó con agua destilada. El contenido del tubo se vació a una caja de Petri con agua-agar (AA) se distribuyó en toda la caja y se dejó reposar por 5 s, posteriormente se desechó todo el exceso de agua contenido en la caja sobre sanitas estériles. Cada aislamiento se incubó a 27 °C durante 24 h.

Con la ayuda de un microscopio American Optical Microscope model 1130 (Microstar, USA), de cada aislamiento se seleccionó un conidio individual germinado y se transfirió para su incremento a medio PDA para mantenerse en incubación a 27 °C durante 6 d. La especie se identificó por medio de las claves morfológicas de Ellis (1971), Barnett y Hunter (1998) y Rotem (1994).

Identificación de *Alternaria*. Para identificar el hongo aislado, se sembraron cultivos monoconidiales en medio papa-zanahoria-agar (PZA), los cuales se mantuvieron por 8 d a temperatura de 27±2 °C con luz blanca fluorescente. La identificación se hizo con base a las características del micelio, color de colonia, forma de conidióforos; y forma, tamaño y color de los conidios. Para observar estas estructuras se hicieron preparaciones permanentes de los hongos en glicerol al 50 % acidificado con 0.5 mL de HCL al 12N y se observaron en el microscopio de luz Jenaval (Carl Zeiss, Germany). Para la identificación de los aislamientos a nivel de especie, se tomaron fotografías con una cámara digital instalada en el objetivo 40 X del microscopio compuesto y con el programa Motic M.C. Cámara (Motic, China); se midió el ancho y la longitud de 100 conidios y conidióforos, considerados al azar.

El color de la colonia se determinó examinando la masa conidial y micelial, las observaciones de los cultivos monoconidiales se realizaron a partir de aislamientos mantenidos a 27 °C durante 8 d.

Pruebas de patogenicidad. Para comprobar la patogenicidad del hongo, se inocularon hojas de arúgula, las mismas que se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 3 min y se enjuagaron con agua destilada dos veces. Del hongo aislado en PDA,

selected from each isolate and transferred to PDA medium in order to keep incubated at 27 °C for 6 d. The species were identified by using morphological keys of Ellis (1971), Barnett and Hunter (1998) and Rotem (1994).

***Alternaria* identification.** In order to identify the isolated fungus, monoconidial cultures were seeded in potato-carrot-agar (PCA) medium, which were maintained for 8 d at 27 ± 2 °C under fluorescent white light. Identification was made based on the mycelium characteristics, colony color, conidiophores shape; and size, shape and color of the conidia. In order to be able to observe these structures, permanent preparations of the fungus were done in 50 % glycerol, acidified with 0.5 mL of 12N HCL and observed under the light microscope Jenaval (Carl Zeiss, Germany). For identification of isolates to the species level, photographs were taken with a digital camera installed on the 40 X compound microscope with Motic MC program Camera (Motic, China); the width and length of 100 conidia and conidiophores randomly chosen, were measured.

The color of the colony was determined by examining the conidial and mycelial mass, the observations of monoconidial cultures were done from isolates maintained at 27 °C for 8 d.

Pathogenicity tests. In order to test the pathogenicity of the fungus, arugula leaves were inoculated, disinfested by immersion in a 2 % sodium hypochlorite solution for 3 minutes and rinsed twice with distilled water. From the isolated fungus in PDA, a 1X10⁶ conidia/mL suspension was prepared using a hemacytometer.

Inoculation was performed on the upper side of the leaf, 20 µL of the conidia solution with a micropipette were placed on the wounds made with a sterilized toothpick, and in the control only distilled water was added to the wounds. The inoculated leaves were kept in a moist chamber at room temperature (24 ± 2 °C) for 10 d. Ten replications were performed, and one plant was considered the experimental unit.

According to Koch's postulates, when this period concluded, the presence of symptoms was observed (Agrios, 2005) and they were compared with the initial symptoms, from which isolation was done; also, the re-isolation of the fungus was performed and it was confirmed that it corresponded to the isolate used for inoculation. Preservation of monoconidial cultures was done in test tubes with PDA medium and covered with sterile mineral oil.

Molecular identification. In order to confirm the morphological identification, DNA (deoxyribonucleic acid) extraction was done. DNA extraction was performed from a monoconidial culture by using a DNeasy Mini kit (Qiagen, USA) according to manufacturer's instructions. The DNA from each of the isolates was refrigerated at -20 °C until further use.

An amplification of internal regions ITS1 and ITS2, located in the internal transcribed spaces of ribosomal genes (rDNA) located between the small subunits 18S, 5.8S and 28S was done by using a combination of primers ITS5 (GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG) / ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). The PCR conditions used for amplification were as follows: sterile ionized water

se preparó con ayuda de un hematocitómetro una suspensión a una concentración de 1×10^6 conidios/mL.

La inoculación se realizó sobre el haz de la hoja, se colocaron 20 μ L de la solución de conidios con una micropipeta, sobre heridas realizadas con un palillo de madera esterilizado, al testigo, solo se le adicionó agua destilada sobre las heridas. Las hojas inoculadas se mantuvieron en cámara húmeda a temperatura ambiente (24 ± 2 °C) durante 10 d. Se realizaron 10 repeticiones, se consideró una planta como unidad experimental.

De acuerdo a los postulados de Koch, al concluir este periodo, se observó la presencia de síntomas (Agrios, 2005) y se compararon con los síntomas iniciales de donde se realizó el aislamiento; así mismo, se realizó el reaislamiento del hongo y se corroboró que correspondiera al aislamiento inoculado. La preservación de los cultivos monoconidiales se hizo en tubos de ensaye con medio PDA y cubiertos con aceite mineral estéril.

Identificación molecular. Para confirmar la identificación morfológica se llevó a cabo la extracción de DNA (ácido desoxirribonucleico). La extracción de DNA se realizó a partir de un cultivo monoconidial con el uso del DNeasy Mini kit (Qiagen, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El DNA de cada uno de los aislamientos se conservó en refrigeración a -20 °C hasta su uso posterior.

Se realizó una amplificación de las regiones internas ITS1 e ITS2, ubicadas en los espacios transcritos internos de los genes ribosomales (rDNA) localizadas entre la subunidad pequeña 18S, 5.8S y la subunidad larga 28S, se utilizó una combinación de iniciadores ITS5 (GGAAGTAAAAGTCTGTAACAAGG) / ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Las condiciones de la PCR usadas para la amplificación fue la siguiente: agua estéril ionizada (12.145 μ L), Buffer PCR 5x, $MgCl_2$ a 1.5 mM (2.75 μ L), dNTP's a 0.2 mM (1.375 μ L), *Taq* DNA-polimerasa 1.5 unidades (0.33 μ L) (Promega, USA) iniciadores ITS5 e ITS4 a 10 pM (2 μ L) de cada uno y muestra de DNA a una concentración de 20 ng (1 μ L). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador TC-512 (Techne, USA) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, 30 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión a 95 °C por 1 min, 50 °C por 30 s, 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 10 min (White *et al.*, 1990). El producto de PCR se purificó de acuerdo al protocolo del QIAquick PCR Purificación Kit (Qiagen, USA) y se ajustó a una concentración de 50 ng/ μ L con un volumen de 15 μ L. La amplificación del producto se separó en un gel de agarosa al 1.5 % por electroforesis en 1x TAE buffer, las bandas se visualizaron en un transiluminador Dial Intensity UVP de luz UV modelo KD1208PTS (Scorpion Scientific, Taiwan). Los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones en un 3730XL de Applied Biosystems.

Las secuencias obtenidas se ensamblaron y se compararon con las depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Preparación del extracto de jugo crudo de brócoli. Material vegetal. El material vegetal se obtuvo del

(12.145 μ L), PCR Buffer 5x, 1.5 mM (2.75 μ L) $MgCl_2$, 0.2 mM (1.375 μ L) dNTP's, *Taq* DNA-polymerase 1.5 units (0.33 μ L) (Promega, USA) and 10 pM (2 μ L) of each ITS4 and ITS5 primers, and DNA sample at a concentration of 20 ng (1 μ L). The amplification reaction was performed in a TC-512 (Techne, USA) thermocycler with the following program: initial denaturation at 95 °C for 2 min, 30 cycles of denaturation, alignment and extension at 95 °C for 1 min, 50 °C for 30 s, 72 °C for 2 min and a final extension at 72 °C for 10 min (White *et al.*, 1990). The PCR product was purified according to the protocol of the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA) and adjusted to a concentration of 50 ng/ μ L with a 15 μ L volume. Amplification of the product was separated on a 1.5 % agarose gel by electrophoresis in 1x TAE buffer, the bands were visualized with a transiluminador Dial Intensity UVP of UV light model KD1208PTS (Scorpion Scientific, Taiwan). The PCR products were sequenced in both directions with a 3730XL Applied Biosystems.

The obtained sequences were assembled and compared with those deposited in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Preparation of broccoli crude extract juice. Plant material. The plant material was obtained from the food market of the city of Texcoco, Mexico, which was then analyzed at the Laboratory of Fruit Postharvested of the Universidad Autónoma de Chapingo. For the extraction, broccoli florets and stems were used, they were disinfested with 100 mg/L sodium hypochlorite and grounded with a juice extractor model 140-1-03 (Moulinex, Mexico); then, they were allowed to stand for 1 h. After this time, sample were transferred to a centrifuge at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was stored at -20 °C until use.

Method to determine glucosinolates in broccoli, by spectrophotometry. For the lyophilization process, broccoli juice was placed in vials that were frozen at -20 °C for 24 h, then placed in the lyophilizer for 5d until dehydration. For GLs determination, Jezek *et al.* (1999) methodology was used: approximately 0.5 mg of lyophilized extract were mixed with 7.5 mL of 0.2 M acetate buffer, pH 4.2 and 1.5 mL of lead acetate and barium 0.5 M. The mixture was vigorously vortexed and 0.4 g of polyvinylpyrrolidone (PVPP) were added and incubated at room temperature with stirring for 15 min. Then 1.5 mL of 2 M sodium sulfate were added and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min at room temperature, after this time, 0.9 mL of PVPP-treated extract was mixed with 0.9 mL of 2 M sodium hydroxide and it was incubated at room temperature for 30 min; 0.138 mL of concentrated hydrochloric acid were added to the mixture and centrifuged at 4,000 rpm for 10 min. For the spectrophotometric determination, 0.5 mL supernatant were mixed with 0.5 mL of 2 mM ferricyanide solution in 0.2 M phosphate buffer pH 7.0. Lastly, the absorbance of the solution was measured at 420 nm within 15 s using 0.2 M phosphate buffer pH 7.0 as a blank. Additionally, the blank analysis was done by mixing 0.5 mL of hydrolyzed extract with 0.5 mL 0.2 M phosphate buffer, pH 7.0. In order to build the calibration curve, sinigrina 5.60×10^{-3} M was used as well as dilutions from 0 -

mercado de abastos de la ciudad de Texcoco, México, el cual se trasladó al laboratorio de Postcosecha de frutales de la Universidad Autónoma de Chapingo. Para la extracción se utilizaron floretes y tallos de brócoli, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 100mg/L y se molieron en un extractor de jugo modelo 140-1-03 (Moulinex, México); posteriormente se dejaron reposar por espacio de 1 h. Después de este periodo la muestra se pasó a una centrifuga a 10,000 rpm por 10 min, obteniéndose un sobrenadante el cual se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Método para determinar glucosinolatos en brócoli, mediante espectrofotometría. Para el proceso de liofilizado, el jugo de brócoli se colocó en viales los cuales se congelaron a -20 °C, durante 24 h, posteriormente se colocaron en el liofilizador durante 5 d hasta su deshidratación. Para la determinación de los GLs se utilizó la metodología establecida por Jezek *et al.* (1999), se tomaron aproximadamente 0.5 mg de extracto liofilizado, se adicionaron 7.5 mL de buffer acetato 0.2 M, pH 4.2 y 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 polivinilpolipirrolidona (PVPP) y se incubó a temperatura ambiente, con agitación, por 15 min. Después se agregó 1.5 mL de sulfato de sodio 2 M y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente, después de este tiempo se agregó 0.9 mL de extracto tratado con PVPP se mezcló con 0.9 mL de hidróxido de sodio 2M y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. A la mezcla se adicionó 0.138 mL de ácido clorhídrico concentrado y se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min. Para la determinación espectrofotométrica se tomaron 0.5 mL de sobrenadante y se mezcló con 0.5 µL de solución de ferricianuro 2mM en buffer fosfato 0.2 M pH 7.0. Finalmente se midió la absorbancia de la solución a 420 nm antes de 15 s usando buffer fosfato 0.2 M pH 7.0 como blanco. Adicionalmente, se realizó la medida del blanco de muestra para lo cual se tomaron 0.5 mL de extracto hidrolizado y 0.5 mL de buffer fosfato 0.2 M, pH 7.0. Para la construcción de la curva de calibración se utilizó el patrón sinigrina 5.60×10^{-3} M y se hicieron diluciones de 0, a 90 µL de solución. Las medidas se hicieron sobre cada dilución. Con los datos del espectrofotómetro se ajustó un modelo de regresión, para determinar la concentración de los GLs obtenidos del jugo de brócoli. El modelo utilizado fue: $Y = -0.0041x + 0.9313$ (R^2 de 0.97, $P = 0.002$) y la concentración de Glucosinolatos obtenida fue de 0.0029 µg/mL.

Evaluación del efecto del jugo de brócoli sobre la germinación de conidios. Bioensayo. Se colocaron 150 µL de medio de cultivo PDA en recipientes translúcidos con una capacidad de 300 µL. Antes de que el medio de cultivo solidificara, se mezcló con 50 µL del extracto puro de brócoli diluido en agua con la finalidad de que se obtuvieran las concentraciones utilizadas en los bioensayos (Cuadro 1).

Después se añadió 20 µL de la suspensión de conidios, sobre cada uno de los recipientes, los que se colocaron en cámara húmeda y se incubaron por 2, 4 y 6 h a $28 \pm 3^\circ\text{C}$. Posteriormente con la ayuda de un microscopio se cuantificó los conidios germinados, se consideraron 100 conidios al azar, de cada concentración se hicieron tres

90 µL of solution. Measurements were made on each dilution. From spectrophotometry data a regression model was adjusted, in order to determine the concentration of the GLs obtained from broccoli juice. The model used was: $Y = -0.0041x + 0.9313$ ($R^2 = 0.97$, $P = 0.002$) and the concentration of glucosinolates obtained was 0.0029 g/mL.

Evaluation of the effect of broccoli juice on the conidia germination. Bioassay. 150 µL of PDA culture medium were placed in translucent containers with a capacity of 300 µL. Before the culture medium was solidified, it was mixed with 50 µL of pure broccoli extract diluted in water, in order to obtain the concentrations used in the bioassays (Table 1).

Then 20 µL of the conidial suspension were added to each of the containers which were placed in a humidity chamber and incubated for 2, 4 and 6 h at $28 \pm 3^\circ\text{C}$. Subsequently, germinated conidia were quantified with a microscope, considering 100 random conidia, three replicates of each concentration were made.

Statistical Analysis. The data obtained were analyzed by variance analysis and (Tukey, $p = 0.05$) mean comparison tests ($p = 0.05$). In order to calculate the average effectiveness, the effective concentration 50 % (LC_{50}) was calculated using the Probit procedure (SAS Institute, USA). Additionally, the inhibition % was estimated with the following formula:

$$IN (\%) = \frac{a - b}{a} 100$$

Where: a = Total germinated conidia of the blank

b = Total germinated conidia of the treatment

RESULTS AND DISCUSSION

Pathogenicity tests. Two days after inoculation, small spots on the surface of the leaves (Figure 1) were observed, the initial lesions were smaller than 1 mm in diameter, circular and scattered on the leaves, which were manifested by the presence of circular dark brown spots and

Cuadro 1. Concentración del extracto de jugo de brócoli, para determinar el efecto de inhibición sobre la germinación de conidios de *Alternaria alternata*.

Table 1. Concentration of broccoli juice extract to determine the inhibitory effect on the germination of *Alternaria alternata* conidia.

Tratamiento	Cantidad de agua mL	Extracto de Jugo de brócoli mL (Glucosinolatos)	Concentración final del extracto de brócoli en un volumen de 50 mg/mL
1	0	50	0.15
2	12.5	37.5	0.11
3	25	25	0.07
4	37.5	12.5	0.04
5	45	5	0.01
6	50	0	0

repeticiones.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Tukey, $p=0.05$). Para el cálculo de la efectividad media se determinó la concentración efectiva 50 % (CL_{50}) la cual se calculó mediante el procedimiento Probit (SAS Institute, USA). Así mismo se determinó el % de inhibición mediante la fórmula:

$$IN (\%) = \frac{a - b}{a} 100$$

Donde: a= El total de conidios germinados del testigo

b= al total de conidios germinados del tratamiento

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de patogenicidad. A los dos días después de la inoculación se observaron pequeñas manchas sobre la superficie de las hojas (Figura 1), las lesiones iniciales fueron pequeñas < 1 mm de diámetro, circulares y dispersas en las hojas, las cuales se manifestaron con la presencia de manchas circulares de color café oscuro, a medida que las lesiones se ampliaron se convirtieron en irregulares. Luego al unirse las manchas se observaron áreas necrosadas grandes que llegaron a cubrir la hoja entera. Estos síntomas coinciden con los reportados por Mercado Vergnes *et al.* (2006).

Then, after the large necrotic spots joined together, they covered the whole leaf. These symptoms are consistent with those reported by Mercado Vergnes *et al.* (2006).

***Alternaria* morphological characterization.** The fungus causing leaf spot was identified as *A. alternata* and it was characterized by showing dark green colonies in PCA culture medium. Under the microscope, simple septate conidiophores of light brown color, lineal or sometimes geniculate were observed, with 16.1- 57.9 x 1-2.4 μ m length, obclavate muriform conidia with variable transversal and longitudinal septa of 1-7 and 0-3, respectively; conidia have a range of 19.2-55.9 μ m long, and 6.1- 11.8 μ m wide, short, cylindrical, and pale peak; septa are muriform and according to Saccardo's classification (1877), conidia are dictyosporous. The catenulate showed 5-10 conidia, with secondary and even tertiary branching, and such characteristics correspond to the *A. alternata* species according to Ellis keys and descriptions (1971), Barnett and Hunter (1998), and Rotem (1994). This also corresponds with López and Cabral (1999), Andersen *et al.* (2001), and Fraire-Cordero *et al.* (2010) reports (Figure 1).

Molecular identification. In order to determine the species, the sequence was compared with BLAST option of NCBI, and the percentage of similarity was of 99 % with *A. alternata* (Fries) species; this result coincides with

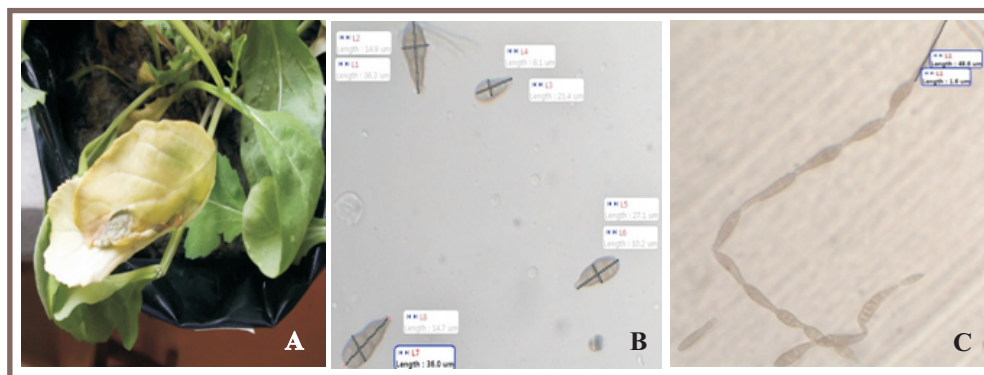


Figura 1. A) hojas de arúgula inoculadas con *Alternaria*. B) fotomicrografía de conidios, C) cadenas de conidios y conidióforo.

Figure 1. A) Arugula leaves inoculated with *Alternaria alternata* B) Photomicrograph of conidia, C) chains of conidia and conidiophore.

Caracterización morfológica de *Alternaria*. Se identificó al hongo causante de las manchas foliares como *A. alternata*, se caracterizó por presentar colonias de color verde oscuro, en medio de cultivo PZA. Al microscopio se observaron conidióforos simples de color café claro tabicados, lineal o a veces geniculado, con una longitud de 16.1-57.9 x 1-2.4 μ m, conidios obclavados muriformes, con septa transversal, longitudinal variable de 1-7 y 0-3 respectivamente y conidios que van de 19.2- 55.9 μ m de largo, y de 6.1 a 11.8 μ m de ancho y con pico corto cilíndrico pálido, los septos son muriformes y de acuerdo a la clasificación de Saccardo (1877) los conidios son dictyoesporas. La catenulación presentó de 5 a 10 conidios, se presentó ramificación secundaria e incluso ramificación terciaria, características que corresponden a la especie de *A. alternata* de acuerdo a las claves y descripciones de Ellis

Serdani *et al.* (2002) and Mercado Vergnes *et al.* (2006) reports.

Effect of broccoli juice on *Alternaria*. The analysis of variance showed statistically significant differences in the germination percentage of conidia, based in the GLs concentrations present in broccoli juice, as shown in Table 2.

The control showed the highest percentage of germination 6 h after the conidia were placed on PDA.

Rotem (1994) mentioned that under favorable conditions, most *Alternaria* species germinate in about 1-3 hours. At concentrations of 0.15, 0.11 and 0.07 μ g/ μ L, a no germination rate was observed, while at concentrations of 0.04, 0.01 μ g/ μ L had little effect, indicating that at higher concentration, lower growth. Compared to the control, all treatments with GLs present in broccoli juice influenced the fungus growth. It has also been shown that when the

(1971), Barnett y Hunter (1998) y Rotem (1994). Lo que corresponde con lo reportado por López y Cabral (1999), Andersen *et al.* (2001) y Fraire-Cordero *et al.* (2010) (Figura 1).

Identificación Molecular. Para determinar la especie, la secuencia se comparó con la opción BLAST del NCBI, obteniéndose un porcentaje de similitud de 99 % con la especie *A. alternata* (Fries), resultado que coincide con el trabajo realizado por Serdani *et al.* (2002) y Mercado Vergnes *et al.* (2006).

Efecto del jugo de brócoli sobre *Alternaria*. El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de germinación de los conidios, en función de las concentraciones de GLs presentes en el jugo de brócoli, como se puede observar en el

Brassica GLs are applied at 0.054 µg/mL concentration in the form of crude aqueous juice, the *Candida albicans* growth is inhibited up to 95 % after 4 h incubation (Sisti *et al.* 2006), similar results have been found in the present study.

In terms of conidia inhibition percentage of *A. alternata*, Troncoso-Rojas *et al.* (2005) reported concentrations of isothiocyanates derived from GLs of 0.025, 0.5, 0.1, 0.2 and 0.4 mg mL⁻¹ with 75, 87 and 100 % similarity to those found in this work; however, it is important to mention that the other authors worked with commercial compounds and in this study the broccoli juice was freshly collected, prepared and used. Also Hafidh *et al.* (2011) tested (in 11 bacteria and 11 fungi) the antimicrobial effect of red cabbage and they used concentrations from 0 to

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición y germinación de conidios de *Alternaria alternata* en diferentes concentraciones de glucosinolatos presentes en jugo de brócoli.

Table 2. Percentage of inhibition and conidia germination of *Alternaria alternata* in different glucosinolates concentrations found in broccoli juice.

Concetración (Glucosinolatos) mg/mL	Germinación % 2 h	Germinación % 4 h	Germinación % 6 h	Inhibición %
0	26 a	55 a	96 a	4 d
0.01	22 b	45 b	91 b	9 c
0.04	13 c	31 c	44 c	54 b
0.07	0 d	0 d	0 d	100 a
0.11	0 d	0 d	0 d	100 a
0.15	0 d	0 d	0 d	100 a
DMSH	3.4	3.9	3.2	2.4
Pr < F	0.001**	0.001**	0.001**	0.001**

Medias con la misma letra dentro de las columnas, no son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey con $p < 0.05$

DMSH: Diferencias mínimas significativa honesta.

**Significativo al 1 %.

Cuadro 2.

El control presentó el porcentaje de germinación más alto a las 6 h, después de que los conidios se colocaron en el PDA.

Rotem (1994), menciona que en condiciones favorables, la mayoría de especies de *Alternaria* germinan en aproximadamente 1-3 horas. En las concentraciones de 0.15, 0.11 y 0.07 µg/µL, no se observó germinación, mientras que la concentración a 0.04, 0.01 µg/µL tuvieron un menor efecto, lo que indica que a mayor concentración menor crecimiento. En comparación con el testigo, todos los tratamientos con GLs presentes en el jugo de brócoli influyeron en el crecimiento del hongo. Se ha demostrado también que cuando se aplican los GLs de *Brassica* a una concentración de 0.054 µg/mL en forma de jugo acuoso crudo, el crecimiento de *Candida albicans* se inhibe hasta un 95 % después de 4 h de incubación (Sisti *et al.*, 2006), resultados similares se han encontrados en el presente estudio.

En cuanto al porcentaje de inhibición de conidios de *A. alternata*, Troncoso-Rojas *et al.* (2005) reportan concentraciones de isotiosianatos derivados de los GLs de

600 mg/ ml for bacteria and 0 to 350 mg/ mL for fungi, obtaining the minimum concentration for each organism.

Moreover, Hang and Flieming (1994) and Mucete *et al.* (2006) showed that isothiocyanates derived from GLs have an effective antibacterial activity in *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizopus nigricans* and lactic acid bacteria, with concentrations of 142 mg/100 g⁻¹ with positive effects at 24 and 48 h. Similar behavior was observed by Mari *et al.* (2008) with 85 % in the inhibition of *Monilia* spp. spore at a concentration of 0.04 to 0.27 mg L⁻¹ when using different isothiocyanates.

Figure 2 shows the behavior of the different broccoli juice concentrations containing GLs on *A. alternata* conidia germination observed in the microscope.

The GLs present in broccoli juice influenced *A. alternata* inhibition and they did not exhibit any conidia germination (Figure 2). Likewise, the effective concentration 50 % (LC₅₀) that allowed the *A. alternata* conidia germination of broccoli extract was 0.028 µg/µL and the concentration that completely inhibited the conidia germination was 0.07 µg/µL. The GLs inhibitory effect on

0.025, 0.5, 0.1, 0.2 y 0.4 mg mL⁻¹ con 75, 87 y 100 %, igual al encontrado en este trabajo, sin embargo cabe mencionar que ellos trabajaron con compuestos comerciales y en este estudio se utilizó el jugo de brócoli recién extraído. Igualmente Hafidh *et al.* (2011) probaron en (11 bacterias y 11 hongos) el efecto antimicrobiano del extracto de col roja y utilizaron concentraciones de 0 a 600 mg/mL para bacterias y de 0 a 350 mg/mL para los hongos, logrando obtener la concentración mínima para cada organismo.

Por otra parte, Hang y Flieming (1994) y Mucete *et al.* (2006) demostraron que los isotiocianatos derivados de los GLs tienen una eficaz actividad antibacterial en *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizopus nigricans* y bacterias de ácido láctico, con concentraciones de 142 mg/100 g⁻¹, con efectos positivos a las 24 y 48 h. Comportamiento similar fue el que observó Mari *et al.* (2008) con un 85 % en la inhibición de esporas de *Monilia* spp. a una concentración de 0.04 hasta 0.27 mg L⁻¹ al utilizar diferentes isotiocianatos.

En la Figura 2 se puede apreciar el comportamiento de las concentraciones de jugo de brócoli con contenido de GLs sobre la germinación de conidios de *A. alternata* observadas en el microscopio.

Los GLs presentes en el jugo de brócoli influyeron en la inhibición de *A. alternata*, no presentaron germinación alguna de los conidios (Figura 2). Así mismo la concentración efectiva 50 % (CL₅₀) que presentó la germinación de conidios de *A. alternata* al extracto de brócoli fue de 0.028 µg/µL y la concentración que inhibió por completo la germinación de conidios fue de 0.07 µg/µL.

conidia germination of phytopathogenic fungi has also been observed by Vargas-Arispuro *et al.* (2005) who tested *Brassica oleracea* crude extracts and reported 100 % growth inhibition of *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert at 10 mg mL⁻¹ concentration.

Another example of the fungicidal potential of the *Brassica* spp. genus, has been shown *in vitro* with aqueous extracts of rape or turnip, which completely inhibited the growth of *Aphanomyces euteiches* oospores, also some volatile substances from *Brassica rapa* plants that inhibited mycelial growth of *Rhizoctonia solani* at a concentration of 20 mg g⁻¹ (Masahiro *et al.*, 2006).

Brandi *et al.* (2006) by using *Brassica oleracea* juice reported that antimicrobial effectiveness is due to a mechanism of action by blocking the sulfhydryl groups of bacteria. Furthermore, Delaquis and Mazza (1995), affirm that the effect is due to inactivation of intracellular enzymes, via oxidative cleavage of disulfide bonds. Also, Kojima *et al.* (1971) Banks *et al.* (1986), and Troncoso-rojas *et al.* (2005), reported that the mechanism by which isothiocyanates (ITC) will inhibit the fungi growth is still unknown. However, some hypotheses suggest that it is due to a non-specific and irreversible interaction between the ITC and sulfhydryl groups, disulphide bonds and amino groups of proteins and amino acid residues. The main goal of toxic lipophilic compounds in eukaryotic cells is the cell membrane, (ITC) is a lipophilic compound, which can react with other enzymes present in the plasma level of the membrane causing growth, inhibition and cell death.

Based on the above results obtained in this study, it is possible an optimal control of *A. alternata* by inhibiting its

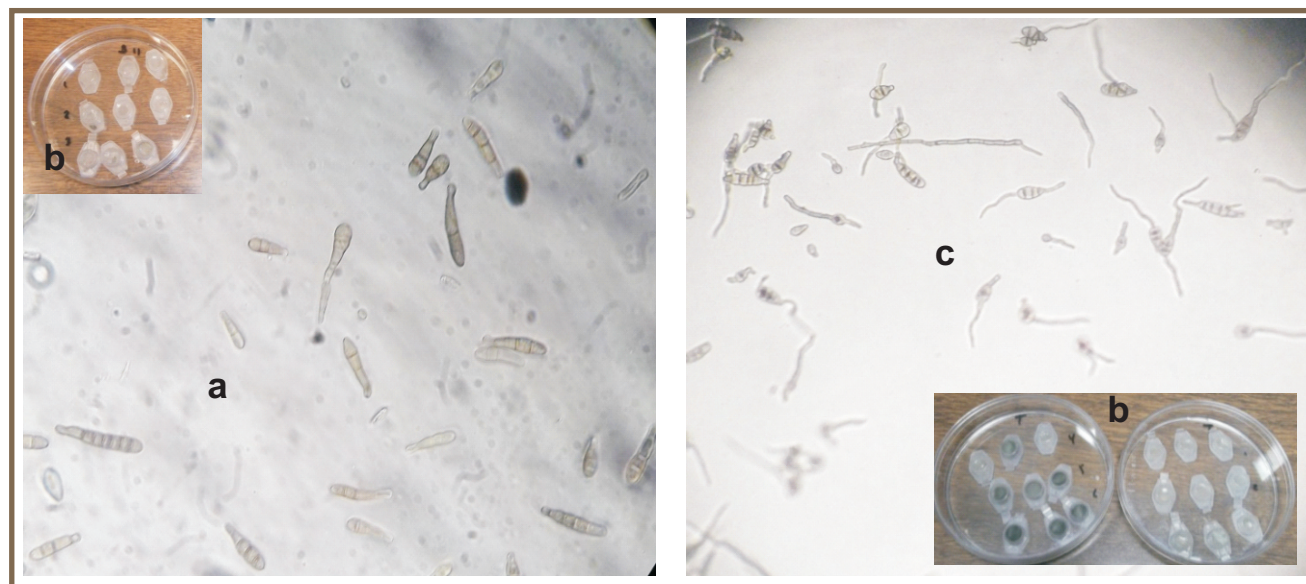


Figura 2. Efecto de Glucosinolatos (jugo de brócoli) en la inhibición de *Alternaria alternata* a) Esporas de *Alternaria* en PDA a las 6 h con una concentración de 0.15 µg/µL; b) crecimiento del hongo a los 3 d, solo o con diferentes concentraciones de jugo de brócoli; c) Esporas de *Alternaria alternata* en PDA a las 6 h (testigo).

Figure 2. Broccoli juice effect on the inhibition of germination of *Alternaria alternata* a) germination of conidia at 6 h with a concentration of glucosinolates 0.15 µg/µL b) growth of the fungus after 3 d, alone or with different concentrations of broccoli juice. c) Germination of *A. alternata* conidia on PDA at 6 h (control).

El efecto inhibitorio de los GLs sobre la germinación de conidios de hongos fitopatógenos, ha sido observado por Vargas-Arispuro *et al.* (2005) quienes probaron extractos crudos de *Brassica oleracea* y reportan 100 % de inhibición en el crecimiento de *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert a una concentración de 10 mg mL⁻¹.

Otro ejemplo del potencial fungicida del género *Brassica* spp. se ha comprobado en estudios *in vitro*, con extractos acuosos de nabo o colinabo, los cuales inhibieron completamente el crecimiento de oosporas de *Aphanomyces euteiches*, así como sustancias volátiles de plantas de *Brassica rapa* que inhibieron el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* a una concentración de 20 mg/g⁻¹ (Masahiro *et al.*, 2006).

Brandi *et al.* (2006) utilizando jugo de *Brassica oleracea* reportan que la efectividad antimicrobiana se debe a un mecanismo de acción a través del bloqueo de los grupos sulfhidrilo en bacterias. Por otro lado, Delaquis y Mazza (1995), aluden que el efecto se debe a una inactivación de enzimas intracelulares, a través de la escisión oxidativa de enlaces de disulfuro. Así mismo, Kojima *et al.* (1971), Banks *et al.* (1986) y Troncoso-rojas *et al.* (2005), comentaron que el mecanismo por el cual los isotiocianatos (ITC) inhiben el crecimiento de hongos aún se desconoce. Sin embargo, algunas hipótesis sugieren que se debe a una no específica e irreversible interacción de ITC con los grupos sulfhidrilo, enlaces de disulfuro y grupos amino de las proteínas y los residuos de aminoácidos. El principal objetivo de compuestos lipófilos tóxicos en células eucariotas es la membrana celular, el (ITC) es un compuesto lipófilo, que puede reaccionar con otras enzimas presentes en el nivel del plasma de la membrana causando el crecimiento, inhibición y muerte celular.

Basado en lo anterior los resultados obtenidos en este estudio, muestran un óptimo control de *A. alternata* al inhibir su reproducción, además de ser biodegradable no producen un desequilibrio al ecosistema y por su origen vegetal desarrollará una resistencia lenta con respecto a los insecticidas sintéticos (Chirinos, 2009).

Por consiguiente el jugo de brócoli con contenido de GLs posee un potencial antifúngico y podría ser usado como tratamiento preventivo en la producción de arúgula o en postcosecha, con el fin de disminuir los daños causados por *A. alternata*.

CONCLUSIONES

El jugo de brócoli a una concentración de 0.07 µg/µL inhibió la germinación de conidios de *Alternaria alternata*, este método de control natural se puede considerar para el manejo de la enfermedad en campo y postcosecha.

LITERATURACITADA

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press. New York, USA. 922p.
- Andersen B, Kroger E and Roberts G. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycological Research 105:291-299.

reproduction, besides being biodegradable (not producing an imbalance to the ecosystem) and because of its nature, the plant will develop a slow resistance to synthetic insecticides (Chirinos, 2009).

Therefore, broccoli juice with high GLs content possesses a high antifungal potential and it could be used as a preventive treatment in the arugula production or in post-harvest, in order to decrease the damage caused by *A. alternata*.

CONCLUSIONS

Broccoli juice at 0.07 µg/µL concentration inhibited conidia of *Alternaria alternata* germination; this natural control method can be considered for management of the disease in the field and during postharvest.

- Báez-Flores ME, Troncoso-Rojas R y Tiznado-Hernández ME. 2008. Respuestas genéticas provocadas por el tratamiento con Isiocianatos en hongos del género *Alternaria*. Revista Mexicana de Fitopatología 29:61-68.
- Banks JG, Board RG and Sparks, NH. 1986. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 8:103-107.
- Barillari J, Canistro D, Paolini M, Ferroni F, Pedulli GF, Iori R and Valgimigli L. 2005. Direct antioxidant activity of purified glucoerucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* Mill.) seeds and sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2475-2482.
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth edition. APS Press. Minnesota, USA. 210p.
- Bautista-Baños S, Hernández-López M and Barrera-Necha L. 2000. Antifungal Screening of plants of the State of Morelos, México against four fungal postharvest pathogens of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18:36-41.
- Brandi G, Amagliani G, Schiavano GF, De Santi M and Sisti M. 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection* 9:2274-2279.
- Campas-Baypoli ON, Bueno-Solano C, Martínez-Ibarra DM, Camacho-Gil F, Villa-Lerma AG, Rodríguez-Núñez JR, López-Cervantes J y Sánchez-Machado DI. 2009. Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfenil)-butano) en vegetales crucíferos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 59:95-100.
- Carrillo L. 2003. Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. Universidad Nacional de Salta. Cuarta edición. 130p.
- Chirinos J. 2009. Uso de extractos naturales como una alternativa ecológica para el control de enfermedades en plantas. *INIA Divulga* 14:40-42.
- Delaquis PJ and Mazza G. 1995. Antimicrobial properties of isothiocyanates in Food Preservation. *Food Technology*. Edited by James Giese, Associate Editor. 73-84p.
- Durazzo A, Azzini E, Lazzé MC, Raguzzini A, Pizzala R and Maiani G. 2003. Italian Wild Rocket (*Diplomatix*

- Tenuifolia* (L.) DC.): influence of agricultural practices on antioxidant molecules and on cytotoxicity and antiproliferative effects. *Agriculture* 3:285-298.
- Ellis MB. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Cambrian Printers, Aberystwyth, Dyfed U.K. 465p.
- Ferrato J, Firpo I, Ortiz MM, Rotondo R y Beltrán C. 2012. Pérdidas poscosecha de hortalizas en negocios minoristas, con distintos sistemas de manejo, en Rosario, Santa Fe, Argentina. *Asociación Argentina de Horticultura* 31:21-27.
- Fraire-Cordero ML, Nieto-Ángel D y Cárdenas-Soriano E. 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición de florete de brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:25-33.
- García IE, Gago CL y Fernández NJL. 2006. Tecnología del Envasado en Atmósfera Protectora. Dirección General de Universidades e Investigación. CIEM. Madrid. 141p.
- Hafidh RR, Abdulmir AS, Vern LS, Bakar FA, Abas F, Jahashiri F and Sekawi Z. 2011. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *The Open Microbiology Journal* 5:96-106.
- Hang KK and Fleming HP. 1994. Antibacterial activity of cabbage juice against lactic acid bacteria. *Journal of Food Science* 59:125-129.
- Jezek J, Barry G, Haggett D, Atkinson A and Rawson DM. 1999. Determination of glucosinolates using their alkaline degradation and reaction with ferricyanide. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 47:4669-4674.
- Kader AA. 2007. *Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas*. Tercera edición. UCANR. Davis California. 580p.
- Kojima M and Oawa K. 1971. Studies on the effect of isothiocyanates and their analogues on microorganisms. (I) Effects of isothiocyanates on the oxygen uptake of yeast. *Journal of Fermentation Technology* 49:740-746.
- Koukounaras A, Siomos AS and Sfakiotakis E. 2010. Effects of 6-Ba Treatments on yellowing and quality of stored rocket (*Eruca sativa* Mill) Leaves. *Journal of Food Quality* 33:768-779.
- López SE y Cabral D. 1999. *Alternaria*. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Ciudad Universitaria Buenos Aires Argentina Academic Press. 42-47p.
- Mari M, Leoni O, Bernardi R, Neri F and Palmieri S. 2008. Control of brown rot on stonefruit by synthetic and glucosinolate-derived isothiocyanates. *Postharvest Biology and Technology* 47:61-67.
- Masahiro K, Andriantsoa R, Yoko O, Motoaki T, Hitoshi H and Ryo F. 2006. Induction of soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* by incorporation of dried plant residues into soil. *Phytopathology* 96:1372-1379.
- Mercado Vergnes D, Renard ME, Duveiller E and Maraite H. 2006. Identification of *Alternaria* spp. on wheat by pathogenicity assays and sequencing. *Plant Pathology* 55:485-493.
- Molina-Vargas LF y Bentura-Castellanos JU. 2009. Efecto inhibitorio *in vitro* de cinco isotiocianatos sobre *Rhizoctonia solani* Kühn AG-3. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental (RIAA)* 1:37-40.
- Mucete D, Borozan A, Radu F and Jianu I. 2006. Antibacterial activity of isothiocyanates, active principles in *Armoracia rusticana* roots (I). *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 2:443-452.
- Nidhi S, Muhammad HR, Stephen S, Mohan T, Vipin KB and Nat NVK. 2007. Proteome-level changes in two *Brassica napus* lines exhibiting differential responses to the fungal pathogen *Alternaria brassicae*. *Plant Science* 172:95-110.
- Oms-Oliu G, Aguiló-Aguayo I and Martín-Belloso O. 2006. Inhibition of browning on fresh-cut pear wedges by natural compounds. *Journal of Food Science* 71:216-224.
- Rotem Y. 1994. *The Genus Alternaria: Biology, Epidemiology and Pathogenicity*. APS Press, American Phytopathological Society. 326p.
- Saccardo PA. 1877. *Fungi veneti novi vel critici vel Mycologiae Venetae addendi*. Series VI. *Michelia* 1:1-72.
- Serdani M, Kang J, Andersen B and Crous P. 2002. Characterization of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research* 106:561-569.
- Sisti M, Amagliani G and Brandi B. 2006. Antifungal activity of *Brassica oleracea* var. *botrytis* fresh aqueous juice. *Fitoterapia* 74:453-458.
- Thomma BPHJ. 2003. *Alternaria* spp. From general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4:225-226.
- Tripathi P and Dubey NK. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 32:235-245.
- Troncoso-Rojas R, Sánchez-Estrada A, Ruelas C and García HS. 2005. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:1427-1434.
- Vargas-Arispuro I, Corrales-Maldonado C, Vallejo-Cohen S y Martínez-Téllez M. 2005. Correlación entre contenido de azufre y actividad antifúngica de variedades de *Brassica oleracea* L. para el control de *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:320-322.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (eds). Academic Press, San Diego, CA. USA. 315-322p.